



**HAL**  
open science

# Etude de l'impact des procédés de transformation sur la diffusion des caroténoïdes : cas du lycopène de la tomate

Antoine Edouard Degrou

## ► To cite this version:

Antoine Edouard Degrou. Etude de l'impact des procédés de transformation sur la diffusion des caroténoïdes : cas du lycopène de la tomate. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2013. Français. NNT : 2013AVIG0655 . tel-01060082

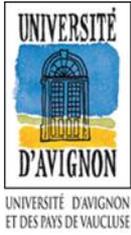
**HAL Id: tel-01060082**

**<https://theses.hal.science/tel-01060082>**

Submitted on 2 Sep 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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



ACADEMIE D'AIX MARSEILLE  
UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

---

THESE

Présentée pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Université  
d'Avignon et des Pays de Vaucluse

---

**Etude de l'impact des procédés de transformation sur la diffusion des  
caroténoïdes : cas du lycopène de la tomate**

---

Par Antoine DEGROU

Rapporteurs : Dr. Pierre Brat  
Dr. Dominique Dardevet

Le 20 Décembre 2013

---



ED 536 Science et Agrosciences  
Centre Technique de la Conservation des  
Produits Agricoles  
UMR SQPOV équipe Procédés  
UAPV-INRA Avignon

Mai sus l'aubre qu'èu espalanco, Tu toujours quihes quauco branco  
Ounte l'ome abrama noun posque aussa la man,  
Bello jitello proumerienço,  
E redoulènto, e vièrginenco,  
Bello frucho madalenenco  
Ounte l'aucèu de l'èr se vèn leva la fam.

Iéu la vese, aquelo branqueto,  
E sa frescour me fai ligueto !  
Iéu vese, i ventoulet, boulega dins lou cèu  
Sa ramo e sa frucho immourtalo... Bèu Dièu, Dièu ami, sus lis alo  
De nosto lengo prouvençalo,  
Fai que posque avera la branco dis aucèu !

*Frédéric Mistral, Mireïo.*



A Mamé, Papé,

Marcin ,Gerard

Chaque jour est sous votre regard.



Cher amis, chers tous,

Me voici rentré d'un grand voyage au pays des thésards ! Après plus de trois ans de voyage, me voilà de retour ! Je voudrais ici vous dire quelques mots sur cette formidable période, auréolée de grands moments de joie, tristesse, travail bien sûr, mais aussi repas, barbecues et autres agapes.

En tout cas voilà, me voici au bout de cette aventure oh combien enrichissante ! Si si je vous assure !!! Que de découvertes, de partages de rencontres se sont faites au cours de ces années ! Le voyage vaut vraiment le détour, et j'engage fortement tous ceux qui hésitent à s'embarquer dans cette belle aventure !

En plus d'une aventure scientifique, l'aventure humaine qui s'y rattache est forte, intense, et se trouve jalonnée de personnes admirables, érudites, complices, et géniales. Je tiens donc ici à remercier tous ceux qui ont participé de près ou de loin à cette aventure !

Pour le travail que vous avez accepté de juger, merci au membre du jury ; et en particulier aux rapporteurs qui ont su accorder du temps à l'appréciation de ce manuscrit : Dr. Pierre Brat et Dr. Dominique Dardevet.

Merci à **Catherine Renard**, pour m'avoir accepté dans son équipe, mais aussi pour sa science, ses conseils, sa compréhension et bien sur sa patience. Son professionnalisme et son soutien sans faille tout au long de cette belle aventure m'a grandement aidé et touché.

Je tiens aussi à remercier les personnes du laboratoire avec qui j'ai pu échanger, travailler, et qui ont eu à me supporter, papi alias Jean- François, Maryse qui profite bien de sa retraite, les taties sylvie et sylvaine, Marielle, Christian, Line, Patrice, Barbara qui ont toujours fait preuve de bonne humeur et patience et bien sûr David.

Une grande pensée pour Patrice, que de courage il te faudra chaque jour pour avancer et retrouver le sourire. Courage à toi, et aux tiens.

Un merci particulier à Carine qui a toujours été là, de bon conseil, dans la science où la vie ! Je lui souhaite de belles années au coté de Pierre, Charles et Louis !

Merci à Eric et Domi les SOSI préférés qui ont toujours répondu avec patience à mes questions.

Merci à Mimi pour sa bonne humeur matinale. A Julien, parti vivre à l'étranger (L'Hérault c'est loin...). En plus tu es papa maintenant ! Que d'aventure ! Félicitation à vous.

A côté de cette grande équipe de l'INRA, comment ne pas remercier les personnes du CTCPA ! En premier lieu **Stéphane Georgé**, qui m'a lui aussi accepté dans son équipe, a su être à mon écoute, a toujours montré une attention et un savoir faire indispensable. Sarah et Naima ont su aussi être indispensables, toujours le sourire malgré mes emprunts de catalogues, hélices, matériels divers, ou autres turpitudes.

Un grand merci à Elisabeth Payeux et François Zuber, merci pour votre professionnalisme, bonne humeur, conseils et savoir. Merci à Jean-claude dussaut. Merci à Patricia, Bénédicte, Ludivine.

Un Merci particulier à Eric Willy avec qui j'ai eut le plaisir de faire la plus grande quantité de coulis de tomate de ma vie !

Evidemment une thèse est aussi faite avec des soirées, repas, discussions, pour tout ça je tiens à remercier Aude et Nico, ainsi que leur tarte aux fraises ! Loïc, Stella, Raphaël, katerina, et tous ceux que j'ai eu le plaisir de rencontrer au cours de ces années.

En tout cas merci à tous pour tous ces bons moments. Comment ne pas continuer à écrire sans dire d'autres mercis....

Le premier sera pour mes parents ! Vous voyez j'ai enfin fini mes études ! Merci à vous d'avoir été là pendant toutes ces années (et pas que la thèse !!!), de m'avoir encouragé et soutenu tout au long de ces trois ans qui ont amené tant de nouvelles choses, épreuves, mais surtout bonheur.

Merci à mon cher frère Louis ! Que de longues discussions et de réveils brumeux ! Que de bon souvenir au cours de ces années. Un merci aussi à Clémence ! Les mots manquent parfois pour dire tout ce que l'on voudrait !

Merci à Olga et Biquet, Sophie et Marguerite. Je ne sais pas si c'est une thèse au petit rien, mais je suis sûr qu'elle est moins bien écrite que ton livre !

Merci à Fanny qui partage ma vie ! Tu vois j'ai finis par arriver au bout de mes études !!! Merci pour tout ! Et en plus de ça on a fini les travaux ! On va pouvoir un peu se reposer maintenant !

Un grand merci à Marité ! Quel plaisir de se ressourcer en Bretagne en votre compagnie, vive les crabes, les galettes et les araignées ! Gérard n'est malheureusement plus ici pour partager tous ces bons moments, qu'il repose en paix.

Un merci particulier à Vivi et Régis, bienvenue à Axel, qu'il grandisse bien et soit la fierté de ses parents (c'est bien parti pour ça en tout cas... !)

Un très grand merci à Kiki....surtout beaucoup de courage pour les dures et terribles épreuves endurées. Merci à Marcin, qui nous a quitté si brusquement, dans la fleur de l'âge, au moment où le bonheur lui souriait enfin, repose en paix. Tu étais un frère, et dans nos cœurs tu resteras à jamais.

Evidement je ne peux pas oublier Thomas, des bancs du primaire à la thèse on en aura fait ! Tu as voyagé dans les pays du monde entier au cours de ces années, et tu te demandais ce que je pouvais bien faire dans ce laboratoire, et bien en voici un résumé !

Une thèse c'est trois ans d'une vie, de travail, de science, mais à côté de ça, la vie avance aussi et permet de rencontrer, faire plein de choses. La page est grande je continue mon annuaire !

Merci à Arnaud et Alix, Laura et Damien, Milou et Rudy et à tous ceux qui nous ont épaulés pendant toutes ces épreuves, travaux et thèse.

Merci à vous tous, qui prenaient la peine de lire ces quelques lignes, que ce travail puisse vous être utile !

Le voyage est terminé, me voila arrivé à la fin. Je souhaite bonne continuation à tout le monde. Profitez de la vie, apprenez, découvrez, elle est courte !

Merci à tous

Antoine



## Table des matières

Liste des figures.....	xiii
Liste des tableaux.....	xv
Introduction générale.....	19
Travaux antérieurs .....	25
<b>1. Les caroténoïdes .....</b>	<b>25</b>
1.1. Références historiques.....	25
1.2. Structures.....	25
1.3. Sources .....	27
1.4. Origines biosynthétiques .....	30
1.5. Localisation cellulaire.....	34
1.6. Sources alimentaires.....	37
1.7. Méthodes de dosage.....	39
<b>2. Mesure de la bioaccessibilité.....</b>	<b>40</b>
2.1. Les étapes de la digestion des caroténoïdes.....	40
2.2. Facteurs affectant la biodisponibilité.....	42
2.2.1. Facteurs influençant la micellarisation (lettres S, L, A et E).....	43
2.2.2. Facteurs dépendants de l'hôte (lettres N, G, H et I) .....	46
2.2.3. Facteurs dépendants de la matrice.....	48
2.3. Impact des procédés de transformation sur la bioaccessibilité des caroténoïdes.....	50
2.3.1. Structure des tissus végétaux .....	50
2.3.2. Effet des procédés de transformation .....	51
<b>3. Modèles permettant la mesure de la biodisponibilité et bioaccessibilité des caroténoïdes.....</b>	<b>54</b>
3.1. Modèles <i>in vivo</i> .....	55
3.1.1. Réponse plasmatique après ingestion de caroténoïdes .....	55
3.1.2. Dosage dans les chylomicrons après ingestion.....	56
3.1.3. Balance orale/fécale.....	57
3.1.4. Mesure des pigments de la macula .....	58
3.2. Modèles <i>in vitro</i> .....	58
<b>4. Transformation industrielle des tomates .....</b>	<b>61</b>
4.1. Généralités sur la tomate.....	61
4.1.1. Historique et types.....	61
4.1.2. La tomate .....	62
4.1.3. Composition de la tomate.....	63
4.2. La filière tomate .....	65

4.2.1.	Production de tomates .....	65
4.2.2.	Production de tomates pour la transformation.....	66
4.3.	Les méthodes de transformation.....	68
4.4.	Principales étapes de la transformation .....	69
4.4.1.	Lavage .....	69
4.4.2.	Jus de tomate, pulpe et purée .....	70
4.4.3.	Concentration .....	71
4.4.4.	Tomates pelées .....	71
4.4.5.	Stérilisation .....	72
4.4.6.	Divers.....	73
<b>Objectif et stratégie.....</b>		<b>77</b>
<b>1. Contexte du projet.....</b>		<b>77</b>
<b>2. Protocole expérimental.....</b>		<b>79</b>
<b>Matériel et Méthodes .....</b>		<b>85</b>
<b>1. Matériel .....</b>		<b>85</b>
1.1.	Produits chimiques.....	85
1.2.	Matériel végétal .....	85
1.2.1.	Expériences préliminaires .....	85
1.2.2.	Elaboration du modèle de diffusion.....	86
1.2.3.	Transformation industrielle des tomates.....	86
1.2.4.	Expériences complémentaires .....	87
<b>2. Méthodes .....</b>		<b>88</b>
2.1.	Transformation des tomates.....	88
2.1.1.	Transformation à l'échelle du laboratoire .....	88
2.1.2.	Transformation industrielle .....	89
2.2.	Transformation des carottes.....	96
2.3.	Méthodes d'analyses chimiques .....	96
2.3.1.	Analyse des caroténoïdes .....	96
2.3.2.	Analyse des acides gras.....	100
2.4.	Méthodes d'analyses physiques .....	101
2.4.1.	Mesure de la couleur .....	101
2.4.2.	Distribution de la taille des particules.....	102
2.4.3.	Analyse d'image .....	102
2.4.4.	Degré Brix.....	103
2.4.5.	Teneur en matière sèche .....	103

<b>3. Mesure de la biodisponibilité des caroténoïdes .....</b>	<b>104</b>
3.1. Mise au point d'une méthode standard d'agitation.....	104
3.1.1. Agitation par roue .....	104
3.1.2. Agitation par barreaux aimantés .....	104
3.1.3. Agitation par Vibrax .....	105
3.1.4. Utilisation d'un agitateur mécanique .....	105
3.2. Composition des émulsions .....	106
3.2.1. Emulsion avec Sérum Albumine Bovine (SAB) .....	106
3.2.2. Emulsions avec Phospholipides .....	106
3.3. Paramètres étudiés.....	106
3.3.1. Modélisation du transfert .....	106
3.3.2. Calcul des paramètres.....	107
<b>Mise au point d'un test de bioaccessibilité .....</b>	<b>111</b>
<b>1. Optimisation du dosage des caroténoïdes .....</b>	<b>111</b>
<b>1.1. Extraction des caroténoïdes de la matrice .....</b>	<b>111</b>
1.2. Amélioration de l'analyse CLHP .....	114
1.2.1. Résistance du lycopène au cours de la cuisson par micro-onde.....	115
1.2.2. Dosage du lycopène dans l'huile par spectrophotométrie .....	115
<b>2. Diffusion des caroténoïdes (lycopène) dans l'huile.....</b>	<b>116</b>
2.1. Optimisation du mode de diffusion .....	117
2.2. Développement d'un agitateur mécanique multiposte .....	120
<b>3. Caractérisation du test de diffusion dans l'huile.....</b>	<b>121</b>
3.1. Influence du ratio huile/tomate.....	121
3.2. Diffusivité en fonction des ratios huile/tomate.....	124
3.3. Variation en fonction du pH et de la température .....	125
3.4. Développement d'un modèle émulsionné. ....	126
3.4.1. Utilisation de la Sérum Albumine Bovine.....	127
3.4.2. Utilisation de Phospholipides.....	130
3.5. Utilisation du modèle émulsifié .....	131
3.5.1. Influence du ratio huile/tomate.....	132
3.5.2. Influence du mode d'introduction du tensio-actif.....	133
3.6. Influence du mode de préparation des purées.....	135
<b>4. Conclusion .....</b>	<b>136</b>
<b>Impact des procédés industriels sur la diffusion du lycopène .....</b>	<b>141</b>

<b>1. impact des procédés de stabilisation sur la concentration en lycopène et sa diffusion dans une phase huile. ....</b>	<b>141</b>
1.1. Plan expérimental .....	141
1.2. Dosage du lycopène dans les purées .....	143
1.3. Diffusion vers une phase huile .....	144
1.3.1. Purées non stabilisées.....	144
1.3.2. Purées stabilisées par pasteurisation ou surgélation .....	145
1.4. Diffusion vers une phase émulsionnée .....	145
1.5. Conclusions .....	146
<b>2. Transformation industrielle de tomate .....</b>	<b>147</b>
2.1. Plan expérimental .....	147
2.2. Organisation de la transformation.....	150
2.3. Résultats et discussion .....	151
2.3.1. Ramassage des tomates.....	151
2.3.2. Aspect des tomates.....	153
2.3.3. Analyse physique des purées .....	154
2.3.4. Traitement des purées .....	155
2.4. Conclusion.....	160
<b>Utilisation du test de diffusion sur différents produits .....</b>	<b>165</b>
<b>1. Test de produits commerciaux.....</b>	<b>165</b>
1.1. Produits commerciaux à base de tomates.....	165
1.2. Produits à base de carottes.....	167
1.3. Autres produits .....	171
<b>2. Conclusion .....</b>	<b>172</b>
<b>Conclusion générale .....</b>	<b>175</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Structure des 4 caroténoïdes majeurs de l'alimentation humaine .....	26
Figure 2 : Voie de biosynthèse des caroténoïdes dans les plantes.....	31
Figure 3 : Position de la double liaison sur le cycle carboné.....	32
Figure 4 : Détail de l'insertion du cycle au cours de la biosynthèse des caroténoïdes .....	33
Figure 5 : Les caroténoïdes dans la photosynthèse. Détail des photosystèmes I et II à l'origine de la photosynthèse.. .....	35
Figure 6 : Variation de la teneur en lycopène durant la maturation de la tomate.....	36
Figure 7 : Les étapes de l'absorption des caroténoïdes.....	41
Figure 8 : Conditions globales d'ingestion des caroténoïdes.....	41
Figure 9 : Dosage du lycopène (A) et du $\beta$ -carotène (B) dans les chylomicrons plasmatiques. ....	57
Figure 10 : Coupe anatomique d'une tomate .....	62
Figure 11 : Evolution de la consommation et de la production de tomates d'industrie en Europe.....	66
Figure 12 : évolution de la production française de tomates .....	67
Figure 13 : les étapes de la transformation industrielles de tomates .....	69
Figure 14 : Transformation pilote des tomates. ....	89
Figure 15 : Déchargement des tomates à l'usine de transformation . ....	91
Figure 16 : Schéma des procédés mis en œuvre.....	92
Figure 17 : Diagramme thermique du procédé HB.....	93
Figure 18 : Barème de pasteurisation des produits transformés .. .....	94
Figure 19 : Gamme d'étalonnage du spectrophotomètre pour le lycopène .....	100
Figure 20 : Concentration en lycopène dans 9 purées. ....	111
Figure 21 : Comparaison de la micro extraction et de l'extraction classique.....	112
Figure 22 : Concentration de lycopène extrait de la purée de tomate CB en fonction du nombre de cycles de microextraction successifs.....	113
Figure 23 : Concentration en lycopène dans neuf purées de tomates.....	114
Figure 24 Evolution de la concentration en lycopène dans une purée de tomate CB en fonction de la durée de cuisson au micro-onde.....	115
Figure 25 : Courbes de diffusion obtenues avec différents modes d'agitation. ....	119
Figure 26 : Comparaison entre agitateur mécanique monoposte et multiposte.....	120
Figure 27 : Variation du facteur de partition maximal et de la concentration en lycopène dans l'huile au plateau de diffusion en fonction du ratio huile/tomate.....	122
Figure 28 : Calcul de la diffusivité pour différents ratio huile/tomate. ....	124
Figure 29 : Variation du facteur de partition maximum en fonction de la température (A) et en fonction du pH (B).. .....	125
Figure 30 : Récupération de la phase huileuse d'émulsions stabilisées par le sérum albumine bovine. ...	127
Figure 31 : Stabilité de l'émulsion au cours du temps. ....	130
Figure 32 : Evolution du facteur de partition maximal en fonction du ratio huile tomate. ....	132
Figure 33 : Comparaison des cinétiques de diffusion dans l'huile et les émulsions.....	133
Figure 34 : Impact de la présence et du mode d'introduction de la SAB sur la diffusion du lycopène vers une phase huile, une phase tampon, une phase avec SAB sans émulsification et une phase SAB avec émulsification.....	134
Figure 35 : Comparaison de l'effet des traitements thermiques sur la concentration en lycopène et le facteur de partition de purée de tomate préparée à partir de tomates commerciales.....	135

Figure 36 : Schéma d'expérimentation pour évaluer l'impact du procédé de stabilisation sur la teneur en lycopène de produits réalisés à base de tomate et sur la diffusion du lycopène.....	141
Figure 37 : profil des cinétiques de diffusion pour des purées HB et CB.....	144
Figure 38 : étude des cinétique de diffusion de purées stabilisées et non stabilisée : .....	145
Figure 39 : Planning optimal d'une journée de transformation de tomate.....	150
Figure 40 : Ramassage des tomates.....	151
Figure 41 : Dispositif permettant d'abimer artificiellement les tomates .....	152
Figure 42: Aspect visuel des différentes tomates ramassées.....	153
Figure 43 : Analyse L,a,b des tomates avant transformation. ....	153
Figure 44. : Diamètre des particules des purées.....	154
Figure 45 : Facteur de partition et taille de particules de produits commerciaux à base de tomates.....	166
Figure 46 : Photographie de particules de purée de carottes . ....	169

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Teneur en caroténoïdes majeurs dans certains aliments ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ou 100 ml de matière fraîche) (Maiani et al., 2009).....	27
Tableau 2 : Comparaison des apports de différents caroténoïdes en Europe ( $\text{mg}/\text{j}$ )(O'Neill et al., 2007). .	38
Tableau 3 : Aliments principaux contribuant à l'apport de caroténoïdes en Europe (O'Neill et al., 2007).	38
Tableau 4 : Comparaison des différentes méthode <i>in vitro</i> proposées pour l'évaluation de la bioaccessibilité des caroténoïdes (Rodriguez-Amaya, 2010b) .....	59
Tableau 5 : Gradient de solvants pour l'analyse CLHP de caroténoïdes avec colonne de types C8. ....	97
Tableau 6 : Gradient de solvants pour l'analyse CLHP de caroténoïdes avec colonne de types C30. ....	99
Tableau 7 : Facteur de partition (proportion du lycopène initial ayant migré dans l'huile) à 45 minutes d'agitation en fonction des conditions d'agitation, de volume total et de proportion des phases .....	118
Tableau 8 : Plan expérimental de développement d'une émulsion avec de la sérum albumine bovine ...	128
Tableau 9 : Conditions de préparation des émulsions avec la SAB, pourcentage de récupération d'huile et taille des particules (d 3 ;4).....	129
Tableau 10 : Conditions de préparation et caractérisation des émulsions avec les phospholipides, pourcentage de récupération d'huile et taille des particules.....	131
Tableau 11 : Concentration en lycopène dans des purées HB et CB avant et après stabilisation et facteur de partition de ces purées dans les tests huile, SAB et PL.....	142
Tableau 12: Nombre de boites à réaliser pour chaque produit.....	149
Tableau 13 : Teneur en lycopène et facteur de partition maximum obtenus avec le modèle huile pour les différents produits .....	156
Tableau 14 : Concentration et facteur de partition de produits commerciaux à base de tomates .....	165
Tableau 15 Teneur en caroténoïdes, facteur de partition et tailles de particules d [3/4] de différentes purées de carottes .....	168
Tableau 16 : Dosage de caroténoïdes et facteur de partition de différentes matrices.....	171



## **Introduction Générale**

## Introduction Générale

Introduction Générale  
**Introduction générale**

Les caroténoïdes sont une famille de molécules lipidiques que l'on trouve en particulier dans les végétaux, et qui ont pour caractéristique visuelle d'être colorés, du jaune au rouge. Parmi ces composés, quatre représentent l'essentiel des caroténoïdes présents dans le régime alimentaire : le lycopène, le  $\beta$ -carotène, la zéaxanthine et la lutéine. Ils ont été identifiés comme nutritionnellement actifs par des études épidémiologiques (Bugianesi et al., 2004 ; Rao & Rao, 2007). Certaines activités sont relativement bien connues et explicitées, comme l'activité provitaminique (vitamine A) en particulier pour le  $\beta$ -carotène, ou la protection visuelle par la prévention de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) pour la lutéine. Les autres activités restent encore insuffisamment connues, parmi lesquelles des activités antioxydantes (Edge, McGarvey, & Truscott, 1997), anticarcinogéniques (langue, poumon...)( Rao & Rao, 2007) et antiathérogéniques (Omoni & Aluko, 2005).

Afin de pouvoir jouer un rôle dans l'organisme les caroténoïdes doivent être absorbés. Pour ce faire ils doivent être libérés de la matrice alimentaire afin de passer après plusieurs étapes dans la circulation sanguine. Or les caroténoïdes des végétaux sont connus pour être peu biodisponibles (Castenmiller & West, 1998). Cette biodisponibilité augmente après transformation. L'objectif est donc ici de comprendre l'effet des procédés de fabrication sur la bioaccessibilité, en développant un outil simple permettant aux industriels de l'évaluer facilement.

Les notions qui prennent en compte le fait que tous les caroténoïdes de la matrice ne peuvent pas être utilisés sont les notions de bioaccessibilité et de biodisponibilité. Le terme de « biodisponibilité » peut avoir plusieurs définitions, dépendantes du domaine dans lequel elles vont s'appliquer. D'un point de vue nutritionnel, la biodisponibilité fait référence à la fraction de nutriment ou de composé bioactif ingéré et disponible pour une utilisation physiologique ou du stockage (Fernández-García, Carvajal-Lérida & Pérez-Gálvez, 2009). Benito et Miller (1998) définissent la biodisponibilité comme la proportion d'un nutriment donné dans un aliment donné ou un régime que le corps peut utiliser. La biodisponibilité est un concept clé pour l'étude des effets nutritionnels, indépendamment du type d'aliment considéré (fonctionnel ou non). D'un point de vue pharmacologique, la Food and Drug administration (FDA) a défini la biodisponibilité comme la quantité de matière active contenue dans un médicament qui est absorbé et rendue opérationnelle pour le site d'action concerné (Shi & Le Maguer, 2000). Ce terme de

biodisponibilité inclut la capacité à être absorbé, l'absorption, le métabolisme, la distribution tissulaire et la bioactivité.

Cependant, la mesure de la quantité réellement absorbée et bioactive d'un aliment (ou des médicaments) présente des difficultés pratiques. Aussi le terme de biodisponibilité est souvent défini comme la fraction d'une dose orale d'un composé ou actif métabolique d'une préparation qui rejoint la circulation systémique (Parada & Aguilera, 2007a). Dans cette définition, la notion de bioactivité est mise de côté, et l'on se rapproche plus du terme de bioaccessibilité. Bioaccessibilité et biodisponibilité sont souvent utilisées de façon indistincte, il est important de noter que la biodisponibilité prend en compte la notion de bioactivité. La bioaccessibilité est quant à elle définie comme la fraction d'un composé relargué de la matrice dans le système digestif et qui devient disponible pour l'absorption intestinale.

Plusieurs études montrent la plus grande bioaccessibilité des caroténoïdes de végétaux transformés. En effet, les caroténoïdes de tomates cuites sont plus bioaccessibles que ceux de tomates crues, ce qui a été confirmé depuis (Rao, 1998 ; Shi & Le Maguer, 2000 ; Fielding, Rowley, Cooper & O'Dea, 2005 ; Tiback et al., 2009).

Suite à ces études, des modèles *in vitro* mimant plus ou moins les différentes phases de la digestion ont été proposés (Garrett, Failla, & Sarama, 1999 ; Failla, Huo, & Thakkar, 2008) (Rodriguez-Amaya, 2010a). La plupart de ces modèles nécessitent un broyage du produit à étudier et ne tiennent donc pas compte de l'état de la matrice à étudier.

A ce jour, assez peu d'études se sont intéressées à l'influence de l'état de la matrice alimentaire sur la quantité et la qualité des nutriments. C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet DEMAVEG (Déstructuration de la Matrice Végétale). Cette thèse est partie intégrante de ce projet. Elle est financée par le Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA), dans le cadre d'une convention CIFRE. L'objectif de ce projet est de compléter les connaissances disponibles à l'heure actuelle et de mesurer l'impact de la transformation industrielle sur la capacité à améliorer la bioaccessibilité des caroténoïdes. La demande des industriels s'oriente vers la mise en place d'une méthode facilement applicable afin de vérifier l'impact des procédés de transformation sur la bioaccessibilité des caroténoïdes. La matrice principale qui sera utilisée est la tomate, mais d'autres matrices seront aussi testées.

## Introduction Générale

Cette thèse s'inscrit de plus dans le projet européen DREAM qui vise à modéliser les aliments et les conséquences des procédés de transformation.

Les travaux de thèse ont été valorisés sous forme de publications scientifiques, communications orales et posters comme suit :

- Publication(s) internationales(s)

### Publiées :

- Degrou, A., Georgé, S., Renard, C.M.G.C., Page, D. (2013). Physicochemical parameters that influence carotenoids bioaccessibility from a tomato juice. Food Chemistry, 136, 435-441
- Page, D., Van Stratum, E., Degrou, A., Renard, C.M.G.C. (2012). Kinetics of temperature increase during tomato processing modulate the bioaccessibility of lycopene. Food Chemistry, 135, 2462-2469.

- Publication nationale

### Participation à la rédaction d'un chapitre de livre (en cours de relecture)

- Borel, P., Degrou, A., Page, P., Caris-Veyrat, C.  
Effet de la matrice alimentaire et de ses modifications technologiques et culinaires, sur la bioaccessibilité, la biodisponibilité, le métabolisme gastro-intestinal et les effets santé des caroténoïdes

- Présentation à des congrès internationaux

Deux communications orales ont été réalisées dans le cadre de réunion du consortium du projet européen DREAM

- Ljubana (Slovénie) avril 2011
- Budapest (Hongrie) avril 2012

- Posters

### 28th International Horticultural Congress (2010) Lisbon - Portugal

The cooking method of tomatoes influences the particle sizes of the puree and modifies the capacity of the carotenoids to diffuse to an oil phase.

Page, D., Degrou, A., Georgé, S., Tort, M., Van Stratum, E., Reich, M., Renard, C.M.C.G.

Fruit and Veg Processing (2011) Avignon - France

Lycopene diffusion : from processed tomato to a lipid phase : an in vitro model for quantification

Degrou, A., Page, D., Georgé, S., Reich, M., C., Renard, C.M.G.C.

16th International Symposium on Carotenoids (2011) Krakow - Poland

Evaluation of lycopene bioaccessibility from tomato purée

Degrou, A., Page, D., Georgé, S., Reich, M., Caris-Veyrat, C., Renard, C.M.G.C.

10th World Processing Tomato Congress (2012) Beijing - Chine

Evolution of the nutritional value of tomato products from the field to the cans: impact of harvesting and processing methods on macro- and micro-element contents and lycopene bioaccessibility.

Page, D., Labadie, C., Degrou, A., Giovinazzo, R., Brat, P., Georgé, S., Renard, C.M.G.C.

EFFOST Annual Meeting (2012) Montpellier - France

A model to understand the impact of matrix characteristics on bioaccessibility of carotenoids

Degrou, A., Page, D., Georgé, S., Renard, C.M.G.C.

Après une présentation de l'état des connaissances sur le sujet, un chapitre matériel et méthodes présentera l'ensemble des essais réalisés dans le cadre de ces travaux. Les trois chapitres suivants celui-ci feront la synthèse des expérimentations réalisées et présenteront les résultats obtenus. Le premier présente la mise en place et la caractérisation d'un test permettant l'étude de la diffusion des caroténoïdes, le deuxième présente l'influence de procédés de conservation à l'échelle du laboratoire et de transformation à l'échelle pilote, sur la diffusion des caroténoïdes, et enfin un troisième chapitre introduit l'utilisation du test sur d'autres produits et d'autres matrices végétales.

## Travaux Antérieurs



## Travaux antérieurs

Cette partie présente des informations générales sur les caroténoïdes, molécules indispensables dans le monde du vivant. Cette famille de molécules est donc présentée, d'un point de vue structural, sources et biosynthèse. Seront ensuite abordées les méthodes de mesure de la bioaccessibilité et leurs limites, pour enfin introduire des notions sur la filière tomate, d'un point de vue culture et transformation.

### 1. Les caroténoïdes

#### 1.1. Références historiques

L'histoire des caroténoïdes remonte à 1831 quand Wackenroder isole pour la première fois un pigment à partir de carottes et le nomme "carotène". Les carotènes ont été dès lors largement découverts dans les plantes. Six ans plus tard, en 1837, Berzelius nomme les pigments jaunes des couleurs de l'automne xanthophylle. En 1910, Tswett nomme toute la classe de composés relatifs à ces pigments les caroténoïdes. Strain en 1938 a utilisé le nom carotène pour les hydrocarbures, et xanthophylle pour les dérivés oxygénés d'hydrocarbures (Patil, Jayaprakasha, Chidambara Murthy, & Vikram, 2009). Concernant leur analyse, c'est le botaniste russe Tswett qui aurait procédé à la séparation et la purification de ces composés pour la première fois. Il inventa la chromatographie pour la séparation des pigments de feuille (chlorophylle verte et carotènes et xanthophylles, orange à jaune).

#### 1.2. Structures

Les caroténoïdes sont des molécules lipidiques appartenant à la famille des terpènes. Les terpènes représentent une grande classe de composés à fonctions très variées. Les caroténoïdes sont des tétraterpènes. Ce sont des composés hydrophobes à structure hydrocarbonée de quarante atomes de carbone. Deux classes de caroténoïdes peuvent être différenciées en fonction de leur structure :

- Les carotènes : caroténoïdes essentiellement hydrocarbonés ;

- Les xanthophylles : caroténoïdes modifiés par un groupement fonctionnel oxygéné. Ils comportent un atome d'oxygène généralement sous forme de fonction alcool.

Il existe une variété importante de caroténoïdes, spécialement parmi ceux synthétisés par les bactéries. On compte plus de 600 structures différentes (Castenmiller & West, 1998). La couleur est l'élément caractéristique de ces molécules, elle peut varier du jaune au rouge. Leur couleur est due à leur système de doubles liaisons conjuguées créant un chromophore et permettant ainsi l'absorption de la lumière visible entre 400 nm et 500 nm. Le degré de conjugaison du chromophore détermine les caractéristiques d'absorption du caroténoïde. Les caroténoïdes peuvent être sous forme linéaire ou sous forme cyclisée.

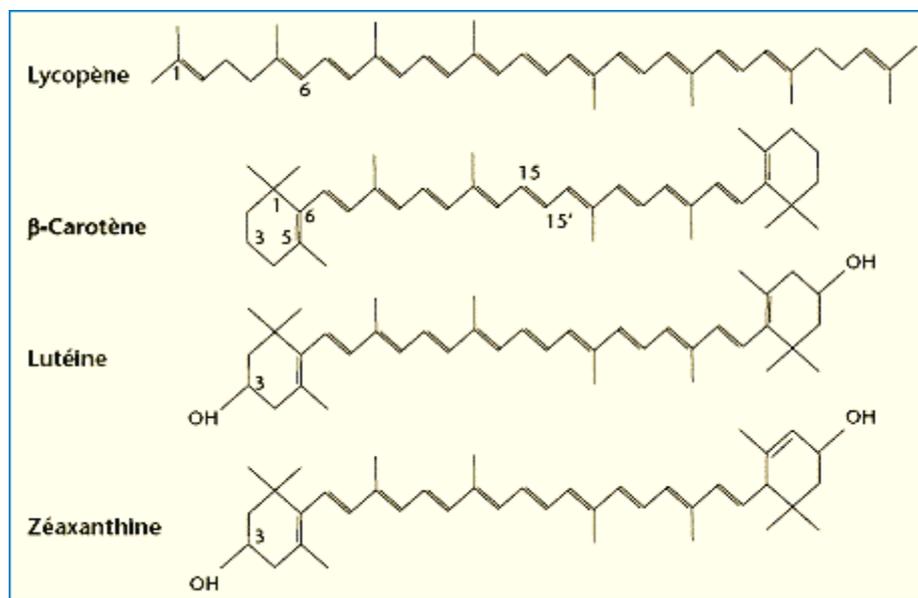


Figure 1 : Structure des 4 caroténoïdes majeurs de l'alimentation humaine

La figure 1 donne les structures de quatre caroténoïdes majeurs de notre alimentation. Deux sont des carotènes :

- le lycopène, pigment majoritaire de la tomate. Il est linéaire et contient 11 doubles liaisons ;
- Le  $\beta$ -carotène est le pigment majoritaire de la carotte, il est issu de la cyclisation du lycopène dans la biosynthèse des caroténoïdes.

Deux sont des xanthophylles :

- la lutéine présente dans la carotte, le maïs, et l'épinard ;

- la zéaxanthine, isomère de la lutéine, responsable de la couleur jaune des grains de maïs.

### 1.3. Sources

La majeure partie des caroténoïdes consommés dans les pays développés (80 à 90%) provient de la consommation de fruits et de légumes. Parmi la totalité des caroténoïdes identifiés seule une petite partie (environ 50) est présente dans le régime alimentaire humain et peut être absorbée et métabolisée par le corps humain (Nagao, 2009). Parmi ceux-ci, six ( $\beta$ -carotène,  $\beta$ -cryptoxanthine,  $\alpha$ -carotène, lycopène, lutéine et zéaxanthine) représentent plus de 95 % des caroténoïdes que l'on peut trouver dans le plasma sanguin humain.

Ceux-ci ont été étudiés et associés à des aspects bénéfiques pour la santé. Dans les végétaux, les caroténoïdes sont retrouvés dans les tissus verts photosynthétiques, les fruits, les racines, les fleurs.

Tableau 1 : Teneur en caroténoïdes majeurs dans certains aliments ( $\mu\text{g}/100\text{g}$  ou 100 ml de matière fraîche) (Maiani et al., 2009)

Produit	Lutéine	zéaxanthine	$\beta$ -cryptoxanthine	$\alpha$ -carotène	$\beta$ -carotène	lycopène
Abricot	123-188	n.d-39	-	n.d - 44	585-3800	54
Ananas	-	-	70-124	n.d	139-347	265-605
Aneth	13820	-	410	94	5450	n.d
Aubergine	170	-	n.d	n.d	1110	n.d
Avocat	213-361	8-18	21-32	19-30	48-81	-
Banane	86-192	-	n.d-5	60-156	43-131	n.d-247
Basilic	7050	-	89	n.d	4820	n.d
Broccoli	707-3300	-	n.d	n.d	291-1750	n.d
Carotte	254-510	-	n.d	2840-4960	4350-8840	n.d
Chou blanc	450	-	n.d	n.d	410	n.d
Chou frisé	4800-11470	-	-	-	1020-7380	-

Concombre	459-840	-	n.d	n.d	112-270	n.d
Cornflakes	n.d-52	102-297	n.d	n.d	n.d	n.d
Courge	630	-	60	-	490	500
Cresson	5610-7540	-	-	-	2720-3690	n.d
Endive	2060-3150	-	-	-	1340-4350	-
Epinard	5930-7900	-	n.d	n.d	3100-4180	n.d
Figue	80	-	10	20	40	320
Goyave	-	-	19-118	n.d	102-2669	769-1816
Haricot vert	883	-	-	-	503	-
Haricot rouge	n.d	-	-	-	6530-15400	-
Huile d'olive	350	-	n.d	n.d	230	n.d
Jus d'orange	-	-	16-151	n.d-31	n.d-96	-
Jus de mandarine	-	-	752	n.d	55	-
Kiwi	-	-	-	-	<20	<10
Laitue	1000-4780	-	-	-	870-2960	-
Mangue	-	-	17-317	n.d	109-1201	<10-724
Nectarine (chair)	-	-	n.d-21	-	2-131	-
Nectarine (peau)	-	-	n.d-31	-	5-307	-
Orange	-	-	74-141	n.d	171-476	n.d
Pamplemousse	-	-	-	-	-	750
Papaye	93-318	-	n.d-1034	n.d	81-664	n.d-7564
Pastèque jaune	-	-	59-110	n.d	56-287	n.d-109
Pastèque rouge	-	-	n.d	n.d	341-777	4770-13523
Patate douce	50	-	-	-	7830	-
Pêche	-	-	-	-	-	11
Pêche (chair)	-	-	n.d-16	-	4-168	-
Pêche (peau)	-	-	n.d-36	-	11-379	-
Persil	6400-10650	-	n.d	n.d	4440-4680	n.d
Petit pois	1910	-	n.d	n.d	520	n.d
Pistache	770-4900	-	-	-	n.d-510	-
Poireau	3680	-	n.d	n.d	3190	n.d
Poivron Jaune	419-638	n.d	14-41	10-28	42-62	-

Poivron orange	245	n.d	3	72	400	-
Poivron rouge	248-8506	593-1350	248-447	n.d-287	1441-2390	-
Poivron vert	92-911	n.d-42	n.d-110	n.d-139	2-335	n.d
Prune (chair)	-	-	3-13	-	40-188	-
Prune (peau)	-	-	3-39	-	217-410	-
Rhubarbe	-	-	-	-	-	120
Sauge	3650	-	87	n.d	2780	n.d
Tomate	46-213	-	n.d	n.d	320-1500	850-12700
Tomate (boite)	n.d	n.d	n.d	n.d	217-283	8480-11820
Tomate cerise	n.d-25	-	-	-	300-1100	800-12000
Tomate, concentré	-	-	-	-	-	49300-94000
Tomate, jus	29	-	-	-	369	1024-11000
Tomate, Ketchup	n.d	n.d	n.d	n.d	135-500	4710-23400
Tomate, purée	n.d	n.d	n.d	n.d	383-548	13160-26110
Tomate, sauce instantanée	-	-	-	-	-	5600-39400
Tomate, soupe instantanée	-	-	-	-	-	12400-19900

Le lycopène est présent dans les produits à base de tomates où il est le caroténoïde majoritaire, ainsi que dans la pastèque ou certains fruits rouges. Le  $\beta$ -carotène est particulièrement abondant dans la carotte, mais aussi les haricots rouges et les abricots. Il est aussi abondant dans des légumes verts comme la laitue (où sa présence visuelle est masquée par la chlorophylle). Le  $\alpha$ -carotène est abondant dans la carotte et quelques variétés de poivron.

La lutéine est trouvée principalement dans les légumes verts (épinard, cresson, laitue). La zéaxanthine est présente en faible quantité dans les avocats, les cornflakes ou le poivron rouge.

En marge des caroténoïdes végétaux, il est important de citer la présence de caroténoïdes dans des organismes photosynthétiques tels que le phytoplancton, certaines algues, bactéries, champignons et levures qui sont capables de les synthétiser. Dans le monde

animal certains oiseaux, poissons et invertébrés en contiennent après les avoir obtenus via leur alimentation (Fraser & Bramley, 2004).

Certains caroténoïdes sont utilisés comme colorants dans l'industrie alimentaire (E160a à E160f) pour la préparation de boissons, de crèmes glacées, de confiseries, ...etc. Ces produits contribuent à l'apport de caroténoïdes dans l'alimentation humaine mais dans des proportions bien moins importantes que les fruits et les légumes (Tanaka, Sasaki, & Ohmiya, 2008a).

#### **1.4. Origines biosynthétiques**

La voie de biosynthèse des caroténoïdes a été déterminée dans les années 1950-1960 en utilisant une approche biochimique classique, faisant appel à des inhibiteurs spécifiques et des mutants bloqués à certaines étapes. Dans les années 1970, des systèmes différents ont été développés afin d'étudier plus précisément les enzymes intervenants dans cette voie de biosynthèse (Fraser & Bramley, 2004). Cependant, c'est l'avènement des techniques modernes de génétique, facilitant l'isolation des gènes qui a permis de comprendre la totalité de la voie de biosynthèse des caroténoïdes, avec leurs régulations et leurs enzymes.

Cette voie de biosynthèse trouve son origine dans le plastide, elle découle, dans les plantes supérieures, de la voie commune aux autres isoprénoides (tel les gibberellines, tocophérols, chlorophylles..) et qui débute par un composé à 5 carbones : l'isopentenyl pyrophosphate (IPP), lui-même découlant de l'assemblage d'acide mévalonique et d'acétyl-coA (Fraser & Bramley, 2004) (Fig. 2).

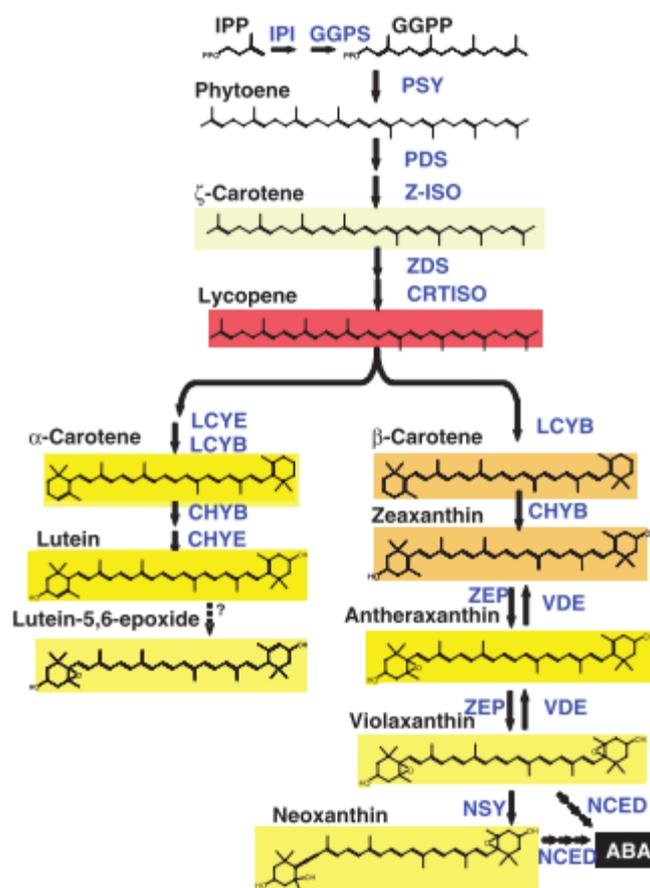


Figure 2 : Voie de biosynthèse des caroténoïdes dans les plantes. Dans un but de simplification seules les configurations trans sont données. DXPS, 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase ; DXR, 1-déoxy-D-xylulose-5-phosphate réductoisomérase; IPI, isopentenyl pyrophosphate isomérise; GGDP, géranylgeranyl diphosphate synthase; PSY, phytoène synthase; PDS, phytoène désaturase; ZDS, f-carotène désaturase; LCYB, lycopène β-cyclase; LCYE, lycopène α-cyclase; CHYB, hydroxylase sur cycle β ; CHYE, hydroxylase sur cycle α; ZEP, zéaxanthine époxidase; VDE, violaxanthine dé-époxydase; CRTISO, caroténoïde isomérise; NSY, néoxanthine synthase; NCED, 9-cis-époxy-caroténoïde dioxy-génase. (Tanaka, Sasaki, & Ohmiya, 2008b).

La biosynthèse des caroténoïdes dans les plantes (fig. 2) commence par une unité isoprène en C5 (IPP) subissant des assemblages tête queue jusqu'à obtenir la première molécule de 40 atomes de carbone qui est le phytoène. L'étape suivante consiste en la mise en place des doubles liaisons par des réactions de désaturation (du phytoène ou du β-carotène). Ces désaturations vont aboutir à la formation de composés intermédiaires, dont le lycopène avec 11 doubles liaisons conjuguées. L'augmentation du nombre de doubles liaisons s'accompagne d'une augmentation de la longueur d'onde d'absorption. Ceci amène à des

composés de couleurs différentes depuis le phytoène, composé incolore, jusqu'au lycopène, composé rouge. Au cours de ces différentes étapes, différentes réactions intermédiaires vont aboutir à la formation de composés cis. Ces composés seront transformés en forme trans par des isomérases.

Une des autres étapes clef de cette biosynthèse est la cyclisation du lycopène. Cette réaction est catalysée par des cyclases (lycopène  $\beta$ -cyclase (LCYB) et lycopène  $\alpha$ -cyclase (LCYE)).

Tous les caroténoïdes ne sont pas cycliques, la cyclisation du lycopène n'est donc pas une réaction universelle dans la caroténogénèse mais elle est commune à tous les organismes produisant des caroténoïdes cycliques. Elle consiste à introduire un cycle à chaque extrémité de la molécule de lycopène. Le cycle introduit peut être de type  $\beta$ ,  $\epsilon$  ou  $\gamma$  (Fig. 3), selon la position de la double liaison dans le cycle. Les cycles les plus communs sont les cycles de type  $\beta$ . Les cycles  $\epsilon$  sont uniquement retrouvés dans les plantes et certaines algues.

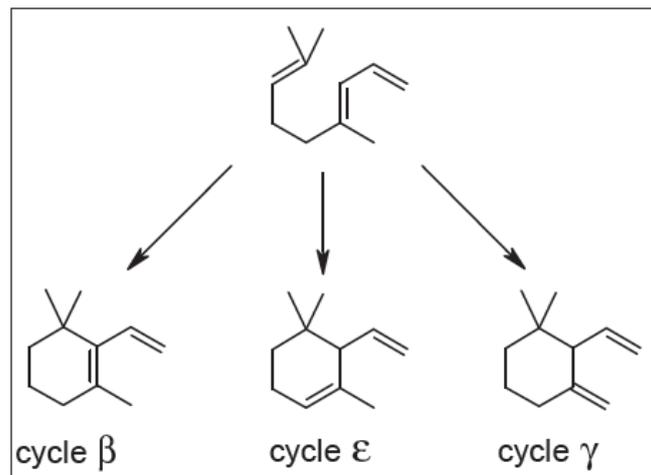


Figure 3 : Position de la double liaison sur le cycle carboné (Fraser & Bramley, 2004)

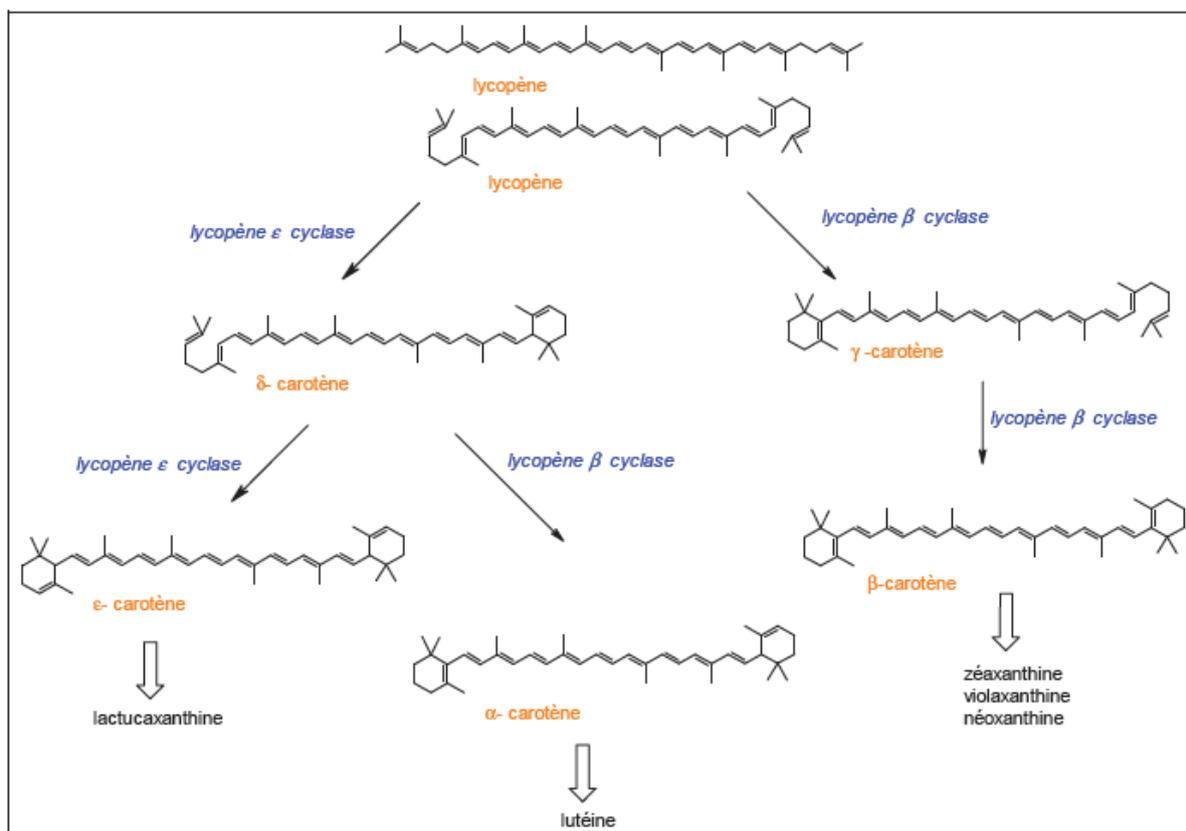


Figure 4 : Détail de l'insertion du cycle au cours de la biosynthèse des caroténoïdes (**Fraser & Bramley, 2004**)

La façon dont les cycles sont insérés au cours de la biosynthèse, ainsi que les caroténoïdes qui vont découler de l'action de chacune de ces enzymes, sont détaillés en figure 4. En effet, ces deux types d'enzymes permettent d'insérer successivement un cycle à chaque extrémité de la molécule de lycopène. Plusieurs combinaisons sont alors possibles :

- L'insertion d'un premier cycle  $\beta$  sous l'action de la lycopène  $\beta$ -cyclase permet la formation du  $\gamma$ -carotène. La lycopène  $\beta$ -cyclase peut ensuite utiliser ce carotène comme substrat et former ainsi un caroténoïde à deux cycles  $\beta$  : le  $\beta$ -carotène.
- Le  $\delta$ -carotène synthétisé sous l'action de la lycopène  $\epsilon$ -cyclase peut ensuite être le substrat de deux enzymes différentes :
  - la lycopène  $\beta$ -cyclase, qui forme un caroténoïde possédant un cycle de chaque type : l' $\alpha$ -carotène. Ce carotène est le précurseur de la lutéine.
  - la lycopène  $\epsilon$ -cyclase permet d'obtenir un carotène possédant 2 cycles  $\epsilon$ . Ces caroténoïdes sont peu représentés dans la nature. On les retrouve uniquement à l'état de

trace chez les plantes. La laitue *Lactuca sativa* est une des rares espèces à produire un caroténoïde possédant deux cycles  $\epsilon$  (la lactucaxanthine) en des quantités non négligeables.

La quantité de caroténoïdes présents dans un tissu végétal ne correspond pas seulement à la capacité de ce tissu à synthétiser des caroténoïdes. En effet, certains tissus peuvent en avoir la capacité mais n'en contiennent qu'une proportion négligeable. Le mécanisme responsable de cette régulation n'est pas encore bien connu à l'heure actuelle. Deux hypothèses sont avancées, la première mettant l'accent sur la dégradation des caroténoïdes, avec comme exemple celui des pétales de chrysanthèmes blanc contenant une enzyme de dégradation (caroténoïde désoxygénase) (CmCCD4a) (Amamizo, Irashima, Ishimoto, & Hmiya, 2011) empêchant l'accumulation de caroténoïdes qui coloreraient la fleur en jaune. La deuxième hypothèse de régulation est basée sur la capacité d'absorption des caroténoïdes par la peau des végétaux considérés (Tanaka, Sasaki, & Ohmiya, 2008b).

A l'heure actuelle, des modifications sur la voie de biosynthèse des caroténoïdes peuvent être réalisées afin de modifier le type de caroténoïdes s'accumulant dans la source végétale. Ceci est possible notamment pour la carotte, la tomate, ou même la pomme de terre. Ainsi un gène introduit dans la carotte (*Erwinia herbicola crt*), augmente entre 2 et 5 fois le taux de  $\beta$ -carotène, et dans les tomates, les gènes Psy-1 (dégradation du lycopène), CYC anti-sens (dégradation de  $\beta$ -carotène), CYC-b sens (accumulation du  $\beta$ -carotène) peuvent, entre autre, être modifiés (Fraser & Bramley, 2004). Ces modifications génétiques permettent d'aboutir à des variétés dont la structure cellulaire est semblable, mais qui diffèrent par la nature ou le taux de caroténoïdes.

### **1.5. Localisation cellulaire**

La localisation des caroténoïdes dans la matrice végétale est directement liée au rôle de ces molécules pour la plante, avec deux rôles distincts et deux localisations différentes.

Le premier rôle est commun à tous les organes végétaux verts, et consiste à assister l'activité photosynthétique, qui permet de convertir les radiations lumineuses du soleil en pouvoir réducteur nécessaire à la synthèse des sucres à partir du  $\text{CO}_2$  atmosphérique (Fig. 5). Les caroténoïdes sont donc intégrés dans les photosystèmes I et II, qui sont eux-mêmes

enchâssés dans les membranes phospholipidiques des chloroplastes (petits organites subcellulaires spécialisés). Des xanthophylles (lutéine, zéaxanthine) sont en périphérie du complexe (dans l'antenne photosynthétique) et complètent le spectre d'absorption lumineuse de la chlorophylle pour en augmenter l'efficacité, alors que le  $\beta$ -carotène est inclus au cœur du complexe où ses propriétés anti-oxydantes permettent de stabiliser le centre réactionnel. Les caroténoïdes sont donc, dans ce cas, très liés à la matrice, au cœur de complexes macromoléculaires. Les caroténoïdes ont donc ici une implication structurale, mais aussi fonctionnelle en jouant le rôle d'antioxydant limitant la formation d'espèces oxygénées réactives.

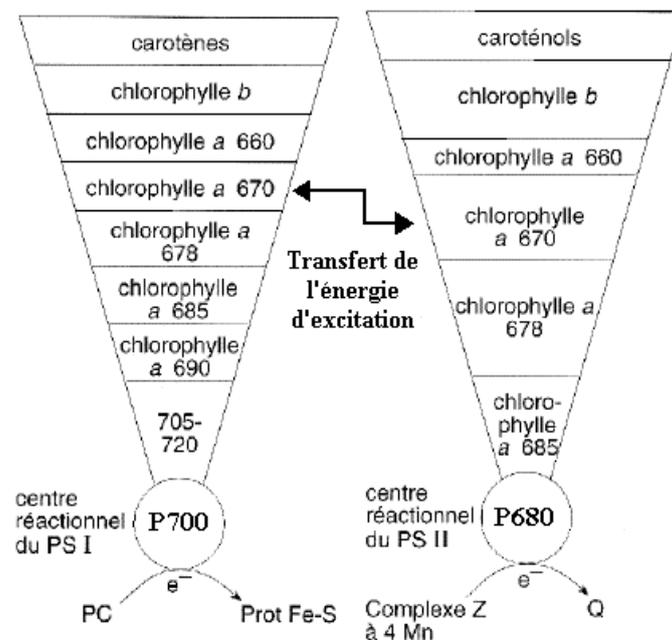


Figure 5 : Les caroténoïdes dans la photosynthèse. Détail des photosystèmes I et II à l'origine de la photosynthèse. Les caroténoïdes sont localisés à proximité directe de la chlorophylle *b*. (Laval-Martin D, 1995)

Le second rôle des caroténoïdes est pigmentaire. Dans certains fruits, au moment de leur maturation, ou dans les pétales de fleurs, les chloroplastes se transforment en chromoplastes en stockant de grandes quantités de caroténoïdes, ce qui confère aux tissus une couleur allant du jaune au rouge (suivant la nature du caroténoïde) et les rend attractifs aux insectes pollinisateurs (dans les fleurs), ou aux prédateurs pour les fruits (afin de

permettre la dispersion des graines) (Vishnevetsky, 1999). La figure 6 illustre le passage du chloroplaste en chromoplaste.

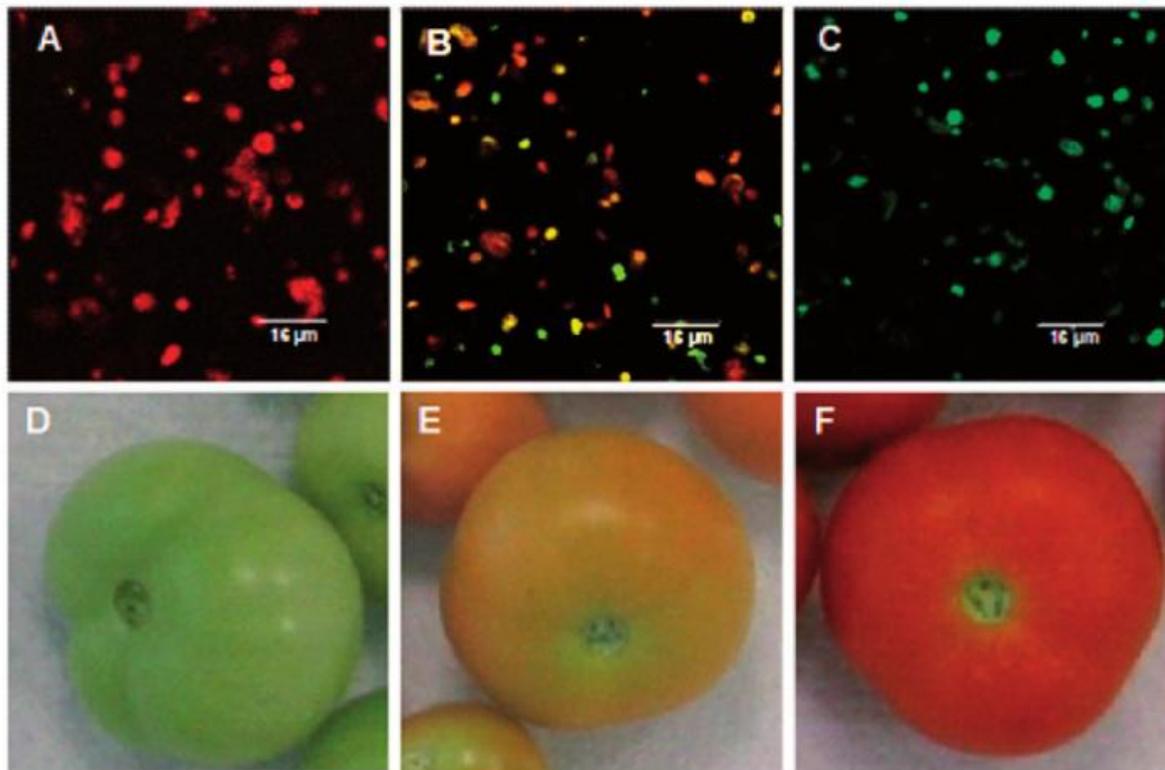


Figure 6 : Variation de la teneur en lycopène durant la maturation de la tomate. Image confocale de chloroplaste (A), chloroplaste en transition (B) et chloroplaste mature (C) Suspension isolée de tomate verte (D), tournant (E) et fruit mature (F). Les images sont des superpositions de fluorescence de chlorophylle et de caroténoïdes émises à des longueurs d'onde entre 740 et 750 nm (rouge) et entre 500 et 510 nm (vert). Les structures contenant principalement la chlorophylle apparaissent en rouge, celles ne contenant que des caroténoïdes apparaissent en vert, et celles contenant à la fois la chlorophylle et caroténoïdes semblent orangé rouge / jaune. (Egea *et al.*, 2010).

Au stade vert, tous les plastides sont des chloroplastes et la fluorescence mesurée est rouge, en raison de la large présence de la chlorophylle (A). Au stade du « tournant », la population de plastides est hétérogène, et la fluorescence est plus marquée vers le orange en raison de la présence de vert et de rouge, respectivement dûs au lycopène et à la chlorophylle (B). Au stade mature, seuls les chromoplastes sont présents, la fluorescence est donc verte en raison de la présence des caroténoïdes. La maturation de la tomate fait donc bien apparaître un stockage important de caroténoïdes. Ce stockage nécessite une organisation moléculaire précise dans le chromoplaste. A ce jour, six grands types de structures de stockage ont été décrites dans la littérature (Egea *et al.*, 2010). Les formes de stockage les plus simples sont constituées de gouttelettes lipidiques dans lesquelles sont

dissous les caroténoïdes *a priori* sans structure apparente. D'autres systèmes sont à l'inverse très organisés, impliquant des liaisons à des membranes secondaires, des arrangements en cristaux pour minimiser l'encombrement stérique. Plusieurs formes de stockage peuvent cohabiter dans le même chloroplaste. Dans les tomates, par exemple, le lycopène peut être stocké sous forme globulaire (et/ou de réseau de globules), tubulaire (et/ou de réseau tubulaire), sous forme de cristalloïdes entourés ou non de membranes, ou dissous dans des plastoglobules, gouttelettes lipidiques enfermant des caroténoïdes et des tocophérols (Egea *et al.*, 2010; Pudney, Gambelli, & Gidley, 2011). La description précise de ces structures internes n'est pas complètement résolue compte tenu de la petite taille des objets (de l'ordre du micromètre). La plupart des études ont fait intervenir la microscopie électronique à transmission qui montre clairement les structures membranaires, mais qui nécessite la déshydratation des préparations via des solvants organiques, lesquels dissolvent également les caroténoïdes et peuvent induire des artéfacts d'observation (Kim, Rensing, Douglas, & Cheng, 2010). Récemment, une étude en microscopie confocale Raman a néanmoins permis d'identifier différents caroténoïdes dans les organites cellulaires, ainsi que des différences de conformation des cristaux de lycopène (Pudney *et al.*, 2011).

## **1.6. Sources alimentaires**

De nombreuses études ont été réalisées depuis quelques années sur les sources alimentaires de caroténoïdes dans l'alimentation. Différentes bases de données ont ainsi été constituées. La première est la table de composition de l'alimentation américaine (Holden *et al.*, 1999) qui fait le bilan des teneurs en caroténoïdes pour des produits crus, transformés et cuisinés. Une base de données similaire a été constituée pour les aliments riches en caroténoïdes pour 5 pays européens (Angleterre, Irlande, Espagne, France et Pays-Bas (O'Neill *et al.*, 2007)). Cette base de données est le résultat de la compilation de données publiées dans les années 1990. D'autres bases de données ont depuis été développées (Australie, Danemark...)(Maiani *et al.*, 2009).

A l'aide de ces bases de données des études ont été menées afin d'évaluer l'apport en caroténoïdes dans la consommation alimentaire. Le tableau 2 résume l'étude de O'Neill *et*

al., (2007) sur la quantité et la nature de différents caroténoïdes apportés par l'alimentation dans différents pays d'Europe.

Tableau 2 : Comparaison des apports de différents caroténoïdes en Europe (mg/j). Ces données sont issues d'un questionnaire alimentaire pour les fréquences de consommation des différents aliments et les concentrations sont issues de l'analyses de bases de données (O'Neill et al., 2007).

	β-carotène		Lutéine		Lycopène		α-carotène		β-cryptoxanthine		Caroténoïdes totaux	
	Médiane	E-T	Médiane	E-T	Médiane	E-T	Médiane	E-T	Médiane	E-T	Médiane	E-T
Espagne	2,96	1,58-4,41	3,25	1,75-4,34	1,64	0,50-2,64	0,29	0,15-0,51	1,36	0,74-2,16	9,54	7,16-14,48
France	5,84	3,83-8,0	2,50	1,71-3,91	4,75	2,14-8,31	0,74	0,37-1,36	0,45	0,17-0,88	16,06	10,3-22,1
Angleterre	5,55	3,66-6,56	1,59	1,19-2,37	5,01	3,2-7,28	1,04	0,71-1,66	0,99	0,32-1,64	14,38	11,77-19,1
Irlande	5,16	3,47-7,42	1,56	1,14-2,1	4,43	2,73-7,13	1,23	0,69-1,78	0,78	0,4-1,44	14,53	10,37-18,9
Pays-Bas	4,35	2,93-5,7	2,01	1,42-3,04	4,86	2,79-6,53	0,68	0,30-0,90	0,97	0,50-1,75	13,71	9,98-17,7

E-T : écart types

Cette publication indique que les habitudes alimentaires des français les conduisent à ingérer plus de caroténoïdes que leurs homologues. Pour l'Angleterre, les Pays Bas et Irlande, les apports journaliers sont équivalents. Le plus petit apport est constaté pour l'Espagne. Le plus fort apport de lycopène est constaté en Angleterre et de β-carotène en France. Le lycopène est très peu présent par contre dans l'alimentation espagnole, qui comprend plus de β-cryptoxanthine et de lutéine. Il est intéressant de constater dans chacun de ces pays quels sont les aliments contributeurs de l'apport de ces caroténoïdes (tableau 3).

Tableau 3 : Aliments principaux contribuant à l'apport de caroténoïdes en Europe (nom des aliments et pourcentage entre parenthèse) (O'Neill et al., 2007).

	France	Irlande	Angleterre	Pays Bas	Espagne
β-carotène	Carotte (38)	Carotte (60)	Carotte (53)	Carotte (42)	Epinard (26)
	Epinard (14)	Produits à base de tomates (13)	Soupes (10)	Epinard (21)	Carotte (24)
Lutéine	Epinard (31)	Pois (19)	Pois (36)	Epinard (30)	Epinard (34)
	Laitue (8)	Brocoli (16)	Brocoli (8)	Brocoli (10)	Laitue (16)
Lycopène	Tomate (25)	Tomate en conserves (23)	Tomate (21)	Soupe de tomates (29)	Tomate (55)
	Tomate en conserves (16)	Soupe de tomates (17)	Tomate en conserves (20)	Tomate (16)	Purée de tomates (42)
	Pizza (16)	Pizza (16)	Pizza (15)	Pizza (16)	

$\alpha$ -carotène	Carotte (82)	Carotte (90)	Carotte(38)	Carotte (87)	Carotte (60)
	Orange (6)	Salade de choux (5)	Salade de choux (6)	Orange (5)	Mandarine (17)
$\beta$ -cryptoxanthine	Jus d'orange (50)	Orange (42)	Jus d'orange (45)	Mandarine (41)	Mandarine (53)
	Orange (30)	Mandarine (28)	Orange (26)	Jus d'orange (33)	Orange (38)

---

La carotte apparait comme la source majeure de  $\beta$ -carotène en Europe, et est le principal apport de ce composé dans l'alimentation de ces 5 pays (de 24% pour l'Espagne à 60% pour l'Irlande). En Espagne l'épinard apparait comme la première source de  $\beta$ -carotène, à cause d'une faible consommation de carottes dans ce pays, il en est la seconde source en France, et aux Pays-Bas.

La carotte est aussi le premier apport d' $\alpha$ -carotène dans ces 5 pays, les sources secondaires étant les agrumes ou les choux. La lutéine est apportée principalement par les épinards sauf en Irlande et en Angleterre où elle est apportée par les pois. En ce qui concerne le lycopène, l'apport est fait soit directement avec des tomates, soit avec des produits à base de tomates. La différence notoire est la faible consommation de pizza en Espagne qui n'en fait pas une source importante de lycopène contrairement aux autres pays.

Une limite de cette étude est l'utilisation de données de l'alimentation hivernale. Des résultats différents seraient probablement obtenus avec les consommations de fruits et légumes en période estivale (augmentation probable des parts de tomates, melons, pastèques).

### 1.7. Méthodes de dosage

De nombreuses techniques ont été développées afin de réaliser des dosages des caroténoïdes dans les différentes matrices végétales. En raison de leur structure complexe et de leur variabilité, ainsi que de la variabilité des matrices dans lesquels ils se trouvent, il n'existe pas de méthode de référence. Dans tous les cas la première partie consiste à réaliser une extraction de ces caroténoïdes de la matrice. Cette extraction peut être réalisée avec des méthodes liquide/liquide, liquide/solide ou par utilisation de fluides supercritiques. Une saponification peut être effectuée avant l'analyse pour éliminer des produits pouvant interférer comme la chlorophylle.

L'utilisation de la spectroscopie UV-visible est courante dans la détection des caroténoïdes (Rao, Waseem, & Agarwal, 1998). Cette quantification se base sur le spectre UV-Visible des caroténoïdes, qui possède trois bandes caractéristiques entre 400 et 500 nm (Britton et Liaaen-Jensen, 1995).

Cependant, la méthode d'analyse la plus fréquemment utilisée pour les caroténoïdes après extraction de la matrice reste la chromatographie liquide (CLHP) avec des colonnes en phase inverse. Les études les plus récentes font état de l'utilisation de colonne C30 (colonne en phase inverse greffée par des groupements à 30 atomes de carbone) permettant de séparer différents isomères de caroténoïdes. La détection est en général réalisée par suivi des absorbances UV-visible. Un couplage avec spectrométrie de masse peut être utilisé. C'est un outil efficace pour confirmer l'identification d'un caroténoïde (Rodriguez-Amaya 2010). Le seuil de détection étant plus faible, les quantités à doser peuvent être plus faibles.

## **2. Mesure de la bioaccessibilité**

### **2.1. Les étapes de la digestion des caroténoïdes**

Furr & Clark en 1997 ont démontré que les caroténoïdes ont la même voie d'absorption que les structures lipidiques. Leur absorption dans l'organisme peut être schématisée par une succession de quatre étapes (Fig.7). La première étape est la libération des caroténoïdes de la matrice, qui aura pour but de rendre ceux-ci potentiellement absorbables pour la suite du processus. Cette première étape est influencée par les procédés de fabrication et la mastication. Les caroténoïdes vont ensuite être dissous dans la phase grasse de l'émulsion du *bolus*, où les conditions d'émulsification peuvent introduire des limitations, puis l'apport de sels biliaires permet la formation de micelles mixtes. Enfin les caroténoïdes vont franchir la barrière du duodenum, avant de transiter dans la circulation sanguine. Ceci peut se faire par simple diffusion ou par l'utilisation de protéines membranaires de transport (Hof et al., 2000).

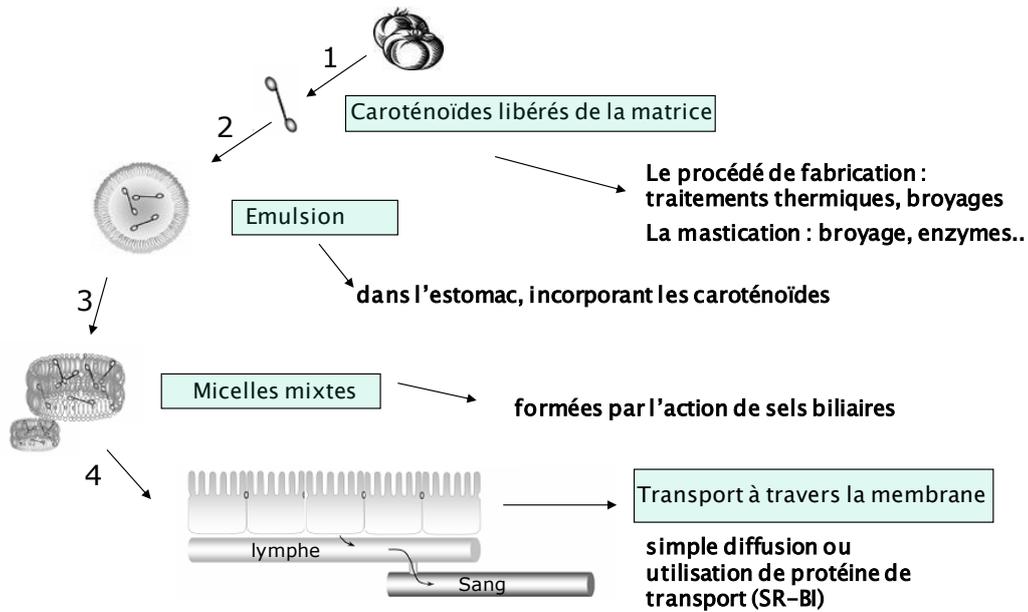


Figure 7 : Les étapes de l'absorption des caroténoïdes (Yonekura & Nagao, 2007).

Le dérèglement d'une seule de ces étapes aura une influence sur la biodisponibilité, les étapes cruciales étant la destruction de la matrice, et la dissolution dans la phase lipidique (gouttelettes lipidiques) (Yeum & Russell, 2002).

Au cours de la digestion, les caroténoïdes vont subir des changements de pH, et être confrontés à différentes conditions, avec la mise en contact de polymères, enzymes ou sels biliaires (Fig. 8).

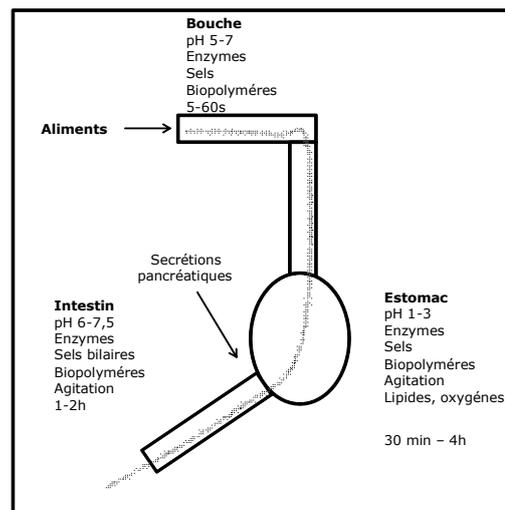


Figure 8 : Conditions globales d'ingestion des caroténoïdes (Williams, Boileau, & Erdman, 1998).

Le pH va ainsi descendre de 5-7 dans la bouche à 1-3 dans l'estomac, où le temps de séjour peut durer plusieurs heures. Les caroténoïdes y seront en contact avec des enzymes, et soumis à une agitation, et seront en présence des autres molécules constituant les aliments et qui pourront interagir avec eux. La dernière partie de l'absorption, avec le passage dans l'intestin, voit le pH remonter entre 6 et 7,5, et l'apport de bile issue du pancréas.

Ces variations rencontrées au cours de ces différentes étapes vont avoir pour conséquences des effets sur l'absorption par l'organisme des caroténoïdes ingérés et donc leur biodisponibilité ou bioaccessibilité.

## 2.2. Facteurs affectant la biodisponibilité

Les facteurs pouvant affecter la biodisponibilité des caroténoïdes ont été rassemblés sous l'acronyme mnémotechnique Slamenghi (Castenmiller & West, 1998), qui liste les facteurs qui affectent la biodisponibilité des micronutriments lipidiques (ML). Chaque lettre correspond à un facteur :

- S pour espèce moléculaire du ML (**S**pecies) ;
- L pour estérification ou conjugaison de la molécule (molecular **L**inkage) ;
- A pour quantité de ML dans le repas (**A**mount consumed in a meal) ;
- M pour effet de la matrice alimentaire (**M**atrix) ;
- E pour autres molécules modulant l'absorption : lipides, fibres, médicaments (**E**ffectors of absorption) ;
- N pour statut de l'individu en ML (**N**utrient status of the host) ;
- G pour facteurs génétiques (**G**enetic factors) ;
- H pour facteurs liés à l'individu : âge, sexe ( **H**ost-related factors) ;
- I pour interactions entre tous ces facteurs (mathematical **I**nteractions).

Les différentes lettres de cet acronyme peuvent être reliées avec les différentes étapes de l'absorption des caroténoïdes. La lettre M va donc se trouver dans la première étape, la libération des caroténoïdes. Les lettres S, L, A et E vont concerner la deuxième étape, avec la mise en micelles. En effet cette étape dépend des molécules présentes dans le milieu. Et enfin les lettres N, G, H et I sont des facteurs généraux dépendant de l'hôte et peuvent donc être reliées à la dernière étape de l'absorption.

### **2.2.1. Facteurs influençant la micellarisation (lettres S, L, A et E)**

Les interactions avec différents composés, présents dans la matrice ou ajoutés lors de procédés de transformation, peuvent avoir une influence sur la bioaccessibilité des caroténoïdes (Granado-Lorenzo, Herrero-Barbudo, Blanco-Navarro, Pérez-Sacristán, & Olmedilla-Alonso, 2009 ; Parada & Aguilera, 2007).

#### **2.2.1.1. Interactions entre les caroténoïdes**

Les interactions entre caroténoïdes peuvent influencer leur absorption (van den Berg, 1999 ; Zaripheh & Erdman, 2002). Ainsi, chez l'Homme, les carotènes diminueraient l'absorption des xanthophylles (Paetau, Chen, 1997 ; Stacewiczapuntzakis M., 1994). La lutéine pourrait aussi diminuer la quantité de  $\beta$ -carotène traversant une couche de cellules Caco-2 (O'Sullivan L., 2009). Cependant Gartner (1996) a démontré l'effet inverse avec une augmentation possible de l'absorption des caroténoïdes par les xanthophylles.

Ces interactions pourraient résulter de la compétition entre caroténoïdes pour leur incorporation dans les micelles mixtes (Tyssandier, Cardinault, Caris-Veyrat, Amiot, Grolier, Bouteloup, 2002) ou pour leur captage entérocytaire par les transporteurs membranaires SR-BI et CD36 (Borel, 2012). Cependant les interactions entre caroténoïdes n'ont pas de conséquences majeures à long terme sur les teneurs sanguines en caroténoïdes (Riso, Brusamolino, Scalfi, & Porrini, 2004 ; Tyssandier, Cardinault, Caris-Veyrat, Amiot, Grolier, Bouteloup, 2002), ces teneurs étant soumises à de multiples régulations.

### **2.2.1.2. Interactions avec les vitamines liposolubles**

De par leur caractère lipophile commun, les vitamines liposolubles (A, E, D, K) pourraient entrer en compétition avec les caroténoïdes pour la micellarisation. L' $\alpha$ -tocophérol diminue l'absorption de la canthaxanthine chez le rat (Hageman et Li, 1999) mais n'influe pas sur la biodisponibilité *in vitro* de la lutéine (Reboul, Thap, Tourniaire, Andre, Juhel, Morange, Amiot, 2007). Inversement, la biodisponibilité *in vitro* et *in vivo* de l' $\alpha$ -tocophérol est fortement diminuée par un mélange de lycopène,  $\beta$ -carotène et lutéine (Reboul, Thap, Perrot et Amiot, 2007).

### **2.2.1.3. Interactions avec les phytostérols**

Les phytostérols diminuent le taux de cholestérol chez l'homme, aussi sont-ils utilisés dans des matières grasses végétales pour des personnes contrôlant leur taux de cholestérol. Ces molécules, essentiellement présentes dans les céréales et matières grasses végétales, ne sont pas présentes dans les mêmes aliments que les caroténoïdes, mais peuvent être ingérées simultanément au cours d'un repas. Leurs effets sur la biodisponibilité des caroténoïdes ont été résumés dans une revue sur l'absorption intestinale des caroténoïdes (Yonekura & Nagao, 2007). Les esters de lutéine sont plus absorbés en présence de stérols, le  $\beta$ -carotène et le lycopène ne sont quant à eux pas affectés du point de vue de la réponse plasmatique. Cependant pour des aliments non transformés, la présence de stérol favorise la micellarisation des caroténoïdes (notamment lycopène et  $\beta$ -carotène). En milieu modèle, sans matrice végétale, l'absorption du  $\beta$ -carotène *in vitro* est réduite d'environ 50% en présence de  $\beta$ -sitostérol (Fahy, 2004). Les phytostérols végétaux et les caroténoïdes pourraient être compétiteurs au niveau des transporteurs entérocytaires (SR-BI, CD36 et peut-être NPC1L1). Chez l'Homme, une réduction de 50% du taux plasmatique de  $\beta$ -carotène a été observée après addition de phytostérols pendant un repas unique (Richelle, Enslin, Hager, Groux, Tavazzi, Godin, Berger, Metairon, Quaile, Piguet-Welsch, Sagalowicz, 2004). Cet effet semble dose-dépendant et partiellement lié à la diminution du cholestérol dans les LDL, principaux transporteurs des caroténoïdes *in vivo*. Phytostérols et caroténoïdes étant lipophiles, ils pourraient également être compétiteurs pour leur incorporation dans les micelles mixtes.

#### **2.2.1.4. Interactions avec les macronutriments**

##### 2.2.1.4.1. Matières grasses

Les lipides sont indispensables à l'absorption des caroténoïdes, leurs effets varient avec le caroténoïde et la quantité de lipides ingérée. Pour le  $\beta$ -carotène, une quantité minimale de lipides est nécessaire et suffisante à son absorption mais pour la lutéine il existe un effet dose de lipides sur l'efficacité de son absorption (Roodenburg, Leenen, Hof, 2000). L'absorption du lycopène à partir de tomates cuites est aussi très fortement accrue (+82%) en présence d'huile d'olive à la cuisson (Fielding et al., 2005). La présence de lipides dans les aliments peuvent aussi améliorer la biodisponibilité des caroténoïdes, comme cela a été montré pour l'avocat (Unlu et al., 2007).

La bioaccessibilité des caroténoïdes *in vitro* est significativement accrue en présence de lipides (Ribaya-Mercado, 2002). Ainsi 88% du  $\beta$ -carotène de carottes cuites sont micellarisés, contre 52% en absence d'huile (Homero-Mendez & Minguez-Mosquera, 2007). Plusieurs études sur des légumes sources de provitamine A en Afrique ont montré que l'addition d'huile à la cuisson favorisait la bioaccessibilité du  $\beta$ -carotène (Bengtsson, Larsson Alminger, & Svanberg, 2009 ; Failla, Thakkar, & Maziya-Dixon, 2009 ; Hedren, Mulokozi, & Svanberg, 2002).

Deux mécanismes ont été proposés pour cet effet (Reboul et al., 2005) : (i) les lipides constituent un compartiment où les caroténoïdes peuvent se solubiliser ; (ii) en stimulant la sécrétion biliaire, les triglycérides peuvent augmenter la quantité de micelles susceptibles de solubiliser les caroténoïdes ou encore la capacité des micelles à solubiliser les caroténoïdes.

##### 2.2.1.4.2. Fibres

Les fibres diminuent l'absorption des caroténoïdes chez l'Homme (Gartner, 1996 ; Rock et al., 1998) et pourraient donc être partiellement responsables de leur faible biodisponibilité à partir de produits végétaux. *In vitro* les fibres altèrent la formation des micelles (Pasquier et al., 1996) nécessaires à l'assimilation des caroténoïdes. Elles augmentent la viscosité du

milieu, ce qui réduit la vitesse de diffusion des micelles (Yonekura & Nagao, 2007). D'autre part, l'amélioration de la biodisponibilité des caroténoïdes avec la maturité des fruits pourrait être liée à la nature et la quantité de pectine, variable avec le stade de maturité, comme cela a été démontré pour la mangue (Ornelas-Paz, Failla, Yahia, & Gardea-Bejar, 2008).

### **2.2.2. Facteurs dépendants de l'hôte (lettres N, G, H et I)**

Lors de l'ingestion, les aliments sont partiellement broyés au cours de la mastication. Cette première étape de la digestion contribue à libérer certains nutriments et micronutriments de leurs matrices alimentaires et à les exposer aux enzymes présentes dans la salive. Une fraction des caroténoïdes pourrait être extraite de leur matrice alimentaire à ce niveau et, du fait de leur hydrophobicité, une partie des caroténoïdes pourrait être incorporée dans la fraction lipidique co-ingérée avec la matrice alimentaire (e.g. lutéine de la salade incorporée dans la vinaigrette accompagnant couramment la salade). Le transfert des caroténoïdes dans la phase lipidique présente dans la bouche et se déversant dans l'œsophage pourrait aussi être affecté par de nombreux paramètres liés à l'individu : temps de mastication, état de la dentition, capacité de sécrétion de la salive et des enzymes salivaires. Si ces hypothèses sont fondées il est ainsi probable que la proportion de caroténoïdes transférée vers la phase lipidique du repas dans la cavité buccale est affectée chez les personnes âgées, qui ont souvent des problèmes de mastication. Après avoir été mastiqués les aliments sont déglutis et transférés dans l'estomac où ils sont soumis à divers facteurs (pH acide, enzymes hydrolytiques, mouvements péristaltiques...) (McClements, Decker, Park, & Weiss, 2008 ; Williams, Boileau, & Erdman, 1998).

Après avoir été pré-digérés dans l'estomac, les aliments, mélangés aux sécrétions gastriques, sont déversés dans la première partie de l'intestin : le duodénum. A ce niveau sont sécrétés les sucs pancréatiques et biliaires qui apportent de nouvelles enzymes digestives, ainsi que les sels biliaires essentiels à la solubilisation des molécules lipidiques dans le milieu aqueux, et à leur transport vers la cellule responsable de l'absorption des nutriments et des micronutriments : l'entérocyte. Dans la mesure où il est supposé que les caroténoïdes sont essentiellement absorbés dans les parties hautes du tube digestif (duodénum et jéjunum) (Moussa et al., 2008), il est admis que, pour être efficacement absorbés, les caroténoïdes

doivent être incorporés dans les micelles mixtes. Outre les facteurs liés à la matrice alimentaire, à la quantité de caroténoïdes et aux propriétés physico-chimiques des caroténoïdes, de nombreux facteurs liés à l'individu peuvent affecter leur bioaccessibilité (Tyssandier et al., 2003) : des variations des sécrétions pancréatiques et/ou biliaires, des variations dans le temps de transit du bol alimentaire, des polymorphismes affectant l'efficacité d'hydrolyse des enzymes digestives et des polymorphismes dans les transporteurs entérocytaires de ces micronutriments (Moussa et al., 2011). Ces facteurs liés à l'individu pourraient expliquer la très grande variabilité interindividuelle de l'efficacité d'absorption de ces composés (Borel et al., 1998) à partir d'une même forme ingérée.

Le métabolisme des caroténoïdes dans les parties basses du tube digestif a été très peu étudié. Des caroténoïdes ont été retrouvés dans les selles (van Lieshout, West, & van Breemen, 2003) et il est supposé qu'il y a une métabolisation des caroténoïdes par la flore colique. Néanmoins Borel et al. (1998) n'ont pas obtenu de dégradation du  $\beta$ -carotène par la flore colique humaine *in vitro*.

Les connaissances sur les mécanismes moléculaires de l'absorption des caroténoïdes ont évolué au cours de la dernière décennie. En effet, si l'absorption passive des caroténoïdes à travers les membranes a longtemps été considérée comme leur mécanisme d'absorption, Moussa et al. (2008) ont montré qu'une protéine, le « scavenger receptor class B type I » (SR-BI), localisée préférentiellement dans la membrane apicale de l'entérocyte, est impliquée dans l'absorption de la lutéine. De plus, cette protéine ne serait pas la seule impliquée dans le transport actif des caroténoïdes, un autre « scavenger receptor », le « cluster determinant 36 » (CD36) pourrait aussi participer à ce transport (Moussa et al., 2011). Son inhibition entraîne une baisse de l'entrée et de la sortie du lycopène dans les adipocytes. Sa surexpression au contraire augmente l'entrée du lycopène dans les adipocytes (Moussa et al., 2011). Sa variation génétique peut être associée à la différence inter-individus concernant l'absorption des caroténoïdes (Borel et al., 2010). Le fait que des protéines soient impliquées dans l'absorption des caroténoïdes permet d'imaginer que des interactions entre ces protéines, qui dépassent parfois de la membrane apicale dans la

lumière intestinale, et d'autres constituants de la matrice alimentaire puissent affecter l'efficacité d'absorption des caroténoïdes.

### **2.2.3. Facteurs dépendants de la matrice**

Du fait de leur origine végétale, et bien que l'on trouve des caroténoïdes dans des aliments d'origine animale (beurre, œufs...), les caroténoïdes sont essentiellement apportés dans l'alimentation par des matrices végétales.

La complexité du processus par lequel les caroténoïdes deviennent bioaccessibles varie. Ces phénomènes sont relativement simples pour les caroténoïdes libres, par exemple ceux présents dans les compléments alimentaires, ou complexe dans les différentes matrices alimentaires (Faulks & Southon, 2005).

Les caroténoïdes présents dans les matrices animales sont considérés comme totalement biodisponibles. La bioaccessibilité des caroténoïdes issus de compléments alimentaires est aussi plus élevée que celle des mêmes caroténoïdes intégrés dans des matrices végétales (O'Callaghan & O'Brien, 2010). Les caroténoïdes peuvent être utilisés comme colorants naturels dans certains produits transformés, où ils peuvent être « libres » car non encapsulés dans la matrice végétale. En effet, ils sont alors dissous ou dispersés dans une phase porteuse lipophile, ou formulés afin d'être dispersibles dans l'eau. Dans ces cas là, il n'y a que très peu de rétention, ils sont donc majoritairement biodisponibles (Faulks & Southon, 2005).

Suivant la composition et la structure physico-chimique de ces matrices végétales, et la façon dont elles ont été traitées avant leur ingestion (traitements technologiques et/ou culinaires), la cinétique de libération des caroténoïdes de la matrice vers l'épithélium du tube digestif, et donc la biodisponibilité et les effets santé de ces composés, ou de leurs métabolites, vont être affectés.

Les caroténoïdes peuvent être dans différentes formes et localisations dans les cellules végétales :

- dans les membranes lipidiques des cellules végétales,

- dans des gouttelettes lipidiques intracellulaires.

La digestion des molécules environnant ces composés pourrait jouer sur leur extraction.

L'effet des traitements (industriels ou domestiques) sur la bioaccessibilité des caroténoïdes va concerner principalement la première étape de la digestion, c'est-à-dire leur libération de la matrice.

Contrairement aux croyances populaires, un fruit ou un légume transformé n'est pas nécessairement moins bénéfique pour la santé qu'un produit cru (Aguilera, 2005). Des études récentes ont en effet montré que la présence de barrières matérialisées par le tissu végétal, et donc les parois cellulaires, peut avoir un effet important sur la proportion de micronutriments pouvant être ingérés et assimilés par l'organisme (Aguilera, 2005). En règle générale, la biodisponibilité des caroténoïdes est estimée varier de 10% dans les produits crus à 50 % dans les produits commerciaux (Deming & Erdman, 1999). La libération des caroténoïdes de la matrice végétale n'est possible que si les cellules sont déstructurées dans l'aliment, ce qui est le cas lors des procédés de transformation ou de la mastication, mais non lors de la digestion (Parada & Aguilera, 2007b).

La simple cuisson des aliments a pour conséquence de désagréger les matrices alimentaires et faciliter la libération des nutriments et des micronutriments. La réponse plasmatique d'individus ayant consommé des carottes cuites est plus élevée (65,1% du carotène ingéré) que ceux ayant ingéré des carottes crues (41,4% du carotène ingéré) (Yonekura & Nagao, 2007). Il en est de même après l'ingestion de purée d'épinard ou d'épinard cru pendant 4 semaines (Rock et al., 1998).

La quantité totale de caroténoïdes peut diminuer au cours des procédés de transformation, sous l'effet de la chaleur ou de la lumière notamment, mais cette diminution est compensée par une augmentation de la quantité bioaccessible (Parada & Aguilera, 2007b). Dans les différentes études, bien que la totalité des micronutriments soit potentiellement bioaccessible, en réalité une partie seulement est bioaccessible (Faulks & Southon, 2005). Les interactions avec d'autres composés au sein de la matrice cellulaire pourraient être responsables de cette rétention.

Un autre aspect bénéfique des procédés de transformation sur la bioaccessibilité des caroténoïdes est lié à la réactivité de ces molécules. En effet les isomères cis sont plus bioaccessibles que les isomères trans. Le processus d'isomérisation peut être obtenu au cours du traitement appliqué sur la matrice (Shi & Le Maguer, 2000).

## **2.3.Impact des procédés de transformation sur la bioaccessibilité des caroténoïdes**

### **2.3.1. Structure des tissus végétaux**

Les tissus végétaux sont constitués de parois. Ces parois sont des fibres, c'est-à-dire non digestibles par les enzymes endogènes du tube digestif de l'Homme. Elles sont à l'origine de l'encapsulation des nutriments, leur destruction est nécessaire pour libérer le contenu cellulaire dans le tube digestif. Cette paroi est hydrophile et poreuse, elle ne présente donc pas d'obstacle absolu à la diffusion des petites molécules hydrosolubles tels les sucres. Cependant elle va encapsuler en particulier les macroconstituants lipidiques et les microconstituants lipophiles comme les caroténoïdes ou la vitamine E (Raven & Evert, 1999).

Dans la plupart des aliments végétaux, la paroi peut être assimilée à une paroi primaire composée essentiellement d'eau (environ 65%) et de polysaccharides. Elle comprend également en faible proportion des glycoprotéines structurales (2-10%), des composés phénoliques (<2%), des minéraux (1 à 5%) et des enzymes. Elle assure la cohésion entre les cellules mitoyennes. Elle est riche en substances pectiques (Raven & Evert, 1999).

Les pectines assurent de nombreuses fonctions dans la paroi incluant le contrôle de la porosité et des propriétés viscoélastiques, et le maintien de l'adhésion cellulaire. Outre leurs fonctions structurelles dans les plantes, elles sont impliquées directement dans les propriétés de texture des fruits et légumes et les procédés de transformation des fruits et légumes. Il est donc intéressant d'étudier l'impact des procédés de transformation sur cette structure.

Les pectines sont caractérisées par une teneur élevée en acide  $\alpha$ -D-galacturonique (GalA). Elles se composent aussi d'oses neutres, principalement rhamnose, arabinose, galactose. Les pectines sont constituées de différents domaines liés par des liaisons covalentes, les

homogalacturonanes, les rhamnogalacturonanes I et les rhamnogalacturonanes II. Le degré de méthylation (DM) est défini par le nombre de fonctions acides méthylestérifiées pour 100 unités d'acides galacturoniques. Le nombre de groupements méthyles ainsi que leur distribution est variable selon l'espèce de la plante, le type cellulaire et le stade physiologique de l'organe (Jarvis, 1984). Les degrés de méthylation et d'acétylation sont des paramètres importants car ils déterminent la capacité et les modalités de gélification des pectines (Renard, 1999).

Au pH naturel des cellules végétales, généralement entre 4 et 6, la dégradation par  $\beta$ -élimination et la déméthylation de la pectine sont deux réactions qui vont pouvoir se dérouler lors d'un traitement thermique (Constenla, Lozano, Piloto, & Química, 2003). Ces deux réactions sont accélérées lors de l'accroissement de la température, mais avec un effet température plus marqué pour la  $\beta$ -élimination (Constenla et al., 2003). Il est donc envisageable de procéder à des pré-traitements afin de modifier la structure cellulaire, et ainsi la bioaccessibilité. Le contrôle des propriétés physiques de la pectine peut donc être utilisé pour modifier les propriétés structurelles des parois cellulaires.

### **2.3.2. Effet des procédés de transformation**

Des études dans les années 1990 ont déjà mis en avant que la cuisson ou le broyage des aliments pouvaient augmenter la biodisponibilité du lycopène, par la destruction de certains tissus végétaux, ou la destruction de complexe lycopène-protéine (Hussein, and El-Tohamy, 1989 ; Giovanucci, Ascherio, Rimm, Stampfe, Colditz, & Willett, 1995). La concentration de lycopène dans le sérum est plus élevée lors de la consommation de produits transformés à base de tomates cuites, que lors de la consommation de tomates crues (Gartner, Stahl, et Sies 1997). Depuis, un grand nombre d'études ont été mises en place afin d'évaluer l'impact des procédés sur la biodisponibilité du lycopène. Quelques effets sont détaillés ci-dessous.

### **2.3.2.1. Influence des procédés sur les produits à base de carottes**

#### 2.3.2.1.1. Traitement thermique

Lemmens, Van Buggenhout, Oey, Van Loey, & Hendrickx (2009) ont traité deux lots de carottes par des chauffages forts ou faibles respectivement. La structure cellulaire de ces deux lots est différente. Le premier lot présente une augmentation de la dégradation, alors que le deuxième lot est plus stable (moindre perte de texture). Dans ce deuxième cas, l'activité de la pectine méthylestérase est mise en avant. En effet, cette enzyme permet la déméthylation de la pectine, et rend de ce fait plus difficile sa  $\beta$ -élimination. La concentration initiale en  $\beta$ -carotène des différents échantillons ne varie pas de façon significative. La bioaccessibilité est largement augmentée dans les deux lots. Cette bioaccessibilité est directement liée à la structure cellulaire, avec une variation inversement proportionnelle à la dureté des échantillons. Cette propriété peut être reliée directement à la structure cellulaire et à la dégradation des pectines, qui jouent donc un rôle important dans le contrôle de la bioaccessibilité.

#### 2.3.2.1.2. Hautes pressions hydrostatiques

Les consommateurs sont à l'heure actuelle demandeurs de produits faiblement transformés avec une durée de vie suffisamment longue. Le processus thermique est utilisé conventionnellement comme méthode de stérilisation ou de pasteurisation, bien que l'utilisation de hautes températures influence la texture, la couleur, la flaveur, et la valeur nutritionnelle du produit fini. De ce fait, l'utilisation d'un procédé à haute pression (avec ou sans chaleur) est de plus en plus fréquemment proposé comme alternative (Mertens & Knorr, 1992). Ces procédés affectent moins les micronutriments, car les liaisons covalentes ne sont pas rompues (Smelt, 1998).

L'utilisation des hautes pressions sur des produits à base de carottes permet de limiter les risques d'isomérisation et de dégradation du  $\beta$ -carotène (Van Buggenhout, Sila, Duvetter, Van Loey & Hendrickx, 2009). L'apport bénéfique du traitement thermique sur la

biodisponibilité du  $\beta$ -carotène est donc à comparer avec l'influence d'un traitement à haute pression.

Les produits soumis à un traitement de stérilisation considéré comme moyen (équivalent en destruction de microorganismes pour les deux procédés, haute pression et traitement thermique) ne diffèrent pas au niveau de la structure cellulaire (texture mesurée). Au contraire, les mêmes produits soumis à un traitement de stérilisation considéré comme poussé (avec là aussi équivalence entre les deux technologies) sont différents. La haute pression permet en effet de produire des morceaux plus de deux fois plus résistants que le traitement thermique (Knockaert et al., 2011). Ceci a été attribué à une moindre  $\beta$ -élimination du fait des températures plus basses.

La pasteurisation moyenne présente des résultats différents, en effet la bioaccessibilité est plus élevée pour le traitement sous haute pression que pour le traitement thermique, alors que les structures cellulaires sont identiques. Pour la stérilisation, on retrouve par contre le rapport entre structure et biodisponibilité, avec une biodisponibilité plus élevée pour le traitement thermique que pour le traitement sous haute pression. Les résultats observés sous pasteurisation moyenne pourraient s'expliquer par la température trop basse pour générer une  $\beta$ -élimination de la pectine. La déstructuration serait due uniquement à la perte de pression de turgescence (Knockaert et al., 2011).

### **2.3.2.2. Influence des procédés sur les produits à base de tomates**

#### 2.3.2.2.1. Effet de la cuisson

Svelander et al., (2010) ont comparé deux traitements thermiques : faible (60°C) et fort (90°C) suivis par une étape de blanchiment. La bioaccessibilité du lycopène est significativement augmentée dans des proportions égales pour les deux traitements thermiques. L'étape de blanchiment n'affecte pas la bioaccessibilité du lycopène. La consistance des échantillons traités à température faible est significativement réduite, ce qui montre une dégradation des pectines.

#### 2.3.2.2.2. Effet de l'homogénéisation

Tibäck et al., (2009) ont testé l'effet d'un broyage ou d'une homogénéisation appliqués à des tomates. Ces deux traitements par eux-mêmes ne modifient pas la bioaccessibilité du lycopène. L'application d'un traitement thermique sur ces échantillons permet par contre d'augmenter sensiblement cette bioaccessibilité.

#### 2.3.2.2.3. Effet du traitement haute pression

Colle et al. (2010) ont utilisé la haute pression afin de transformer des tomates, et ont montré une diminution des tailles de particules des échantillons, et un resserrement des fibres. Ceci conduit à une baisse de la biodisponibilité du lycopène, qui pourrait être encapsulé par les fibres.

### **3. Modèles permettant la mesure de la biodisponibilité et bioaccessibilité des caroténoïdes**

Ces modèles s'appliquent à reproduire à l'échelle du laboratoire les différentes étapes de l'absorption des caroténoïdes, et toutes les conditions que cela implique. La diversité des conditions rencontrées fait apparaître une diversité de modèles. Les premiers modèles ont été développés par Garrett et al., (1999). Depuis diverses approches et méthodes ont été élaborées.

Ces modèles peuvent être classés en trois catégories. Les modèles *in vivo* sont le plus proches de la réalité. Ils peuvent être développés sur modèle humain ou animal (l'animal le plus adapté étant le furet). Les modèles *in vitro* restent proches des conditions physiologiques mais permettent d'examiner plus d'échantillons, ou une étape de l'absorption en particulier. Parmi ceux-ci se trouvent les modèles statiques dont les conditions ne varieront pas au cours de l'expérimentation et les modèles dynamiques, qui seront modulés afin de se rapprocher des conditions réelles et de leurs cinétiques dans le tube digestif (variation de pH, introduction de sels biliaires entre autres).

### **3.1. Modèles *in vivo***

#### **3.1.1. Réponse plasmatique après ingestion de caroténoïdes**

##### **3.1.1.1. Méthodes classiques**

Ces méthodes reposent sur l'ingestion par des volontaires sains d'une quantité déterminée de caroténoïdes. La variation de la concentration plasmatique (ou dans le sérum) en caroténoïdes est ensuite mesurée à différents intervalles de temps. Les caroténoïdes peuvent être ingérés seuls, sous forme de mélanges, voire sous forme de préparations alimentaires diverses (Yeum & Russell, 2002a).

Certains facteurs peuvent être limitants :

- la concentration mesurée dans le sérum peut être très variable entre volontaires après l'ingestion d'une dose unique de caroténoïdes,
- le sérum humain contient des caroténoïdes « endogènes » tels que  $\beta$ -carotène, lycopène et lutéine, stockés dans le foie et les tissus adipeux,
- les caroténoïdes pro-vitaminique A peuvent être métabolisés durant l'absorption intestinale.

Ce modèle a permis cependant de montrer que les niveaux plasmatiques chez l'Homme de la vitamine E et des caroténoïdes sont associés à des polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (Borel et al., 2007)

Pour palier aux inconvénients cités ci-dessus, les doses ingérées sont souvent plus élevées que les doses correspondant à une consommation classique de produits contenant des caroténoïdes. Ceci pourrait avoir un effet sur l'absorption, le transport ou le métabolisme des caroténoïdes, ce qui rend parfois l'interprétation des résultats délicate.

##### **3.1.1.2. Utilisation d'isotopes stables**

Une autre possibilité consiste à suivre des isotopes stables de caroténoïdes, ce qui permet la distinction totale entre les caroténoïdes déjà présents dans l'organisme et ceux apportés par

la supplémentation. La conversion en vitamine A des caroténoïdes pro vitaminique peut aussi être observée. Cette méthode a par exemple été utilisée par Dueke, Lin et Buchholz (2000) avec un  $\beta$ -carotène octa-deutééré et du rétinol tétra-deutééré. Après ingestion ces composés sont dosés dans le sérum par CLHP – SM/SM.

Cette méthode est basée sur le principe de la méthode sérum/plasma réponse. Elle est la plus intéressante à l'heure actuelle pour étudier la biodisponibilité des caroténoïdes car ayant de faibles limites de détection et de quantification elle permet l'utilisation de doses physiologiques de caroténoïdes purs (sans matrice végétale) (Yeum & Russell, 2002b)

### **3.1.2. Dosage dans les chylomicrons après ingestion**

La mesure de la concentration des caroténoïdes dans les lipoprotéines tels que les chylomicrons est une technique utilisée pour estimer les variations inter-individuelle d'absorption de  $\beta$ -carotène notamment. Les avantages par rapport à la méthode classique de dosage dans le plasma ou le sérum sont :

- Une évaluation de la conversion en ester dans l'intestin,
- Une distinction entre les caroténoïdes endogènes et ceux absorbés pour l'étude,
- Une utilisation de doses plus faibles.

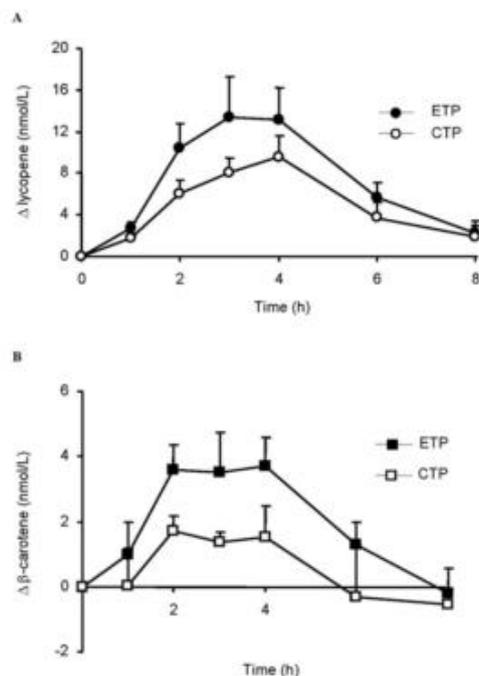


Figure 9 : Dosage du lycopène (A) et du  $\beta$ -carotène (B) dans les chylomicrons plasmatiques. ETP Repas enrichi en caroténoïde. CTP repas classique. (Reboul et al., 2005)

Un exemple de courbes pouvant être obtenues est présenté dans la figure 9. Les prélèvements sont réalisés toutes les deux heures, et la quantité est exprimée en nmol/l. L'ingestion d'un repas enrichi avec 6% de concentré de tomate permet l'obtention d'un taux plus élevé de lycopène et de  $\beta$ -carotène dans les chylomicrons.

Les limites concernent surtout les matrices qui sont digérées lentement, présentant une absorption lente des caroténoïdes. Dans ce cas il pourra ne pas y avoir d'augmentation détectable du taux de caroténoïdes dans les chylomicrons. Les courbes de réponse sont aussi très variables selon les individus (van den Berg, 1999).

### 3.1.3. Balance orale/fécale

La comparaison entre la consommation de caroténoïdes et leur excrétion fécale est utilisée pour l'estimation de l'absorption de caroténoïdes présents dans des matrices alimentaires. Cette méthode consiste à calculer la dose de caroténoïdes absorbés, et collecter et analyser les caroténoïdes présents dans les matières fécales sur une période donnée.

Les limitations sont notamment dues à la métabolisation des caroténoïdes par la flore intestinale. Afin de palier à ces inconvénients, Bowen, Mobarhan & Smith, (1993) ont réalisé des lavages d'estomac après une période définie pour l'ingestion et l'absorption.

#### **3.1.4. Mesure des pigments de la macula**

La zéaxanthine et la lutéine sont les pigments majeurs de la macula de la rétine humaine. Leur concentration peut être évaluée directement dans la macula par une méthode non invasive. Cette méthode est basée sur la réponse du sujet à des stimuli visuels qui sont contrôlés et mesurés par densité optique. Elle permet de faire le lien entre la consommation de caroténoïdes et la quantité absorbée par l'organisme (Hammond, Wooten et Snodderly, 1999).

### **3.2. Modèles *in vitro***

Les méthodes *in vivo* ont comme désavantage général un coût de fonctionnement relativement élevé, une mise en œuvre difficile, et présentent des difficultés dans l'interprétation des données. Pour palier à ces inconvénients, des méthodes *in vitro* ont été développées.

Les deux grandes familles de modèles sont :

- Les modèles statiques : pas de variations des conditions au cours de la mise en place du modèle,
- Les modèles dynamiques : variation des conditions pour s'approcher au mieux des conditions biologiques.

Les premiers modèles ont été mis au point d'après la description de Miller; Schricker; Rasmussen et Van Campen (1981) qui ont travaillé sur l'estimation de la disponibilité d'ions métalliques contenus dans un repas. Cette méthode de digestion était alors couplée avec des cultures de cellules Caco-2. Le premier a travaillé sur la bioaccessibilité des

caroténoïdes à l'aide d'un modèle *in vitro* fut Garrett et al. (1999). Dans ce modèle, les caroténoïdes sont dosés par CLHP dans la matière ingérée, dans le digesta, les fractions micellaires et après les cellules Caco-2, ceci afin d'évaluer la stabilité dans le tube digestif, la micellarisation et l'absorption cellulaire.

Cette méthode a été largement utilisée pour évaluer les effets de la matrice ou du procédé de transformation appliqué à la matrice. Pour avoir un meilleur rapprochement avec les conditions physiologiques, une phase de digestion enzymatique peut être rajoutée (Thakkar, Maziya-Dixon, Dixon, & Failla, 2007), avec ajout de lipase notamment. Le tableau 4 résume les différentes principales méthodes *in vitro* proposées pour évaluer la bioaccessibilité, avec les variations de milieux pouvant être réalisées.

Tableau 4 : Comparaison des différentes méthode *in vitro* proposées pour l'évaluation de la bioaccessibilité des caroténoïdes (Rodriguez-Amaya, 2010b)

Etapas	Méthodes				
	Thakkar et al. (2007) Failla et al. (2008b)	Reboul et al. (2006)	Granado-lorencio et al. (2007 <sup>a</sup> )	Hedrés et al. (2002)	Liu et al. (2004)
Préparation de l'échantillon	Homogénéisation en purée	Homogénéisation avec sérum physiologique et pyrogallol	Homogénéisation avec mixer de cuisine avec 4 intervalles de 15s	Découpé en morceaux de taille comparable à celle constatée à la décongélation	Homogénéisation (carottes) ou broyage en poudre (maïs) dans sérum physiologique et Buthyl hydroxytoluène
Phase orale	$\alpha$ -amylase, pancréatique porcine, pH 6,8, 10 min à 37°C		$\alpha$ -amylase, pH 6,5, 5 min à 37°C		
Phase gastrique	Pepsine porcine, pH 2,5, 1h 37°C	Pepsine porcine, pH 4, 30min 37°C	Mucine, sérum albumine bovine, pepsine porcine. pH 1,1, 1h, 37°C	Pepsine porcine, pH 2, 1h 37°C	Pepsine porcine, pH 2, 1h 37°C
Phase intestin grêle	Extrait de bile porcine, carboxyl ester lipase, lipase pancréatique porcine, pancréatine porcine, pH 6,5, 2h à 37°C	Extrait de bile porcine, pancréatique porcine, pH 6, 30 min à 37°C	Bile bovine, pancréatine porcine, lipase pancréatique humaine, colipase, cholestérol estérase, phospholipase A <sub>2</sub> sels de taurocholate pH 7,8, 2h	Sels biliaires porcins, pancréatique pH 7,5, 30 min	Extraits de bile porcine, pancréatique porcine pH 6,9, 2h à 37°C

Isolation de la fraction micellaire	Centrifugation à 5000g, 45 min à 4°C, filtration	Centrifugation à 20 000 rpm, 18h, à 10°C, filtration	Décantation une nuit ou centrifugation à 500 rpm, 20 min	Centrifugation à 5000g, 20 min
Utilisation de cellules	Cellules Caco-2 4h à 37°C			Cellules Caco-2 4h à 37°C

---

Les différents modèles explicités dans le tableau 4 sont les modèles les plus utilisés, et faisant office de référence.

La première étape consiste dans chacun des cas en une homogénéisation de l'échantillon. Il est ensuite mis en milieu « phase orale ». Certains paramètres ne sont pris en compte dans aucune des modalités proposées, c'est le cas en particulier des effets de la matrice végétale contrôlant la sortie des micronutriments dans le tube digestif haut. La quantité de matière grasse permettant la mise en émulsion des caroténoïdes, notamment, n'est pas non plus prise en compte dans les études, alors que Colle, Van Buggenhout, Lemmens, Van Loey, & Hendrickx, (2012) ont démontré dans une étude récente l'importance de la présence de lipide lors de l'évaluation de la biodisponibilité des caroténoïdes.

La séparation des différentes phases a pour but d'isoler la fraction des caroténoïdes contenus dans les micelles, durant la phase correspondant à l'intestin grêle. Elle peut se faire par ultracentrifugation (167 000g) ou par centrifugation (5000 g ou 500 rpm) selon les modèles (Thakkar et al., 2007).

Les modalités de prise en compte du franchissement de la barrière cellulaire, peuvent elles aussi introduire des variations. En effet, différentes lignées de cellules épithéliales peuvent être utilisées, elles doivent avoir des morphologies et des fonctionnalités caractéristiques (Sambury, Ferruzza, Ranaldi, Angelis 2001). Ces cellules peuvent en outre transformer le  $\beta$ -carotène sous forme de rétinol et sécréter du  $\beta$ -carotène, du rétinol et des esters de rétinol (Nayak, Harrison et Hussain, 2001). Ceci va rendre l'analyse plus complexe d'une part car les molécules natives peuvent avoir disparu, et d'autre part car l'activité de synthèse ou de conversion peut varier selon les lignées utilisées.

## 4. Transformation industrielle des tomates

### 4.1. Généralités sur la tomate

#### 4.1.1. Historique et types

La tomate (*Solanum lycopersicum* L.) est une plante herbacée de la famille des Solanacées, originaire du nord ouest de l'Amérique du Sud. Elle est largement cultivée pour son fruit, qui est un fruit charnu et consommé dans de nombreux pays, frais ou transformé (Dore C., Varoquaux F., 2006).

Elle fût introduite en Europe au début du XVI<sup>ème</sup> siècle par les Espagnols, elle fût en premier lieu consommée dans les pays méditerranéens, alors que dans les pays du nord de l'Europe elle resta considérée comme une plante ornementale jusqu'au XVII<sup>ème</sup> siècle. En France, l'introduction de la tomate fût longue et commença en Provence. Sa diffusion s'accéléra à la fin du XVII<sup>ème</sup> siècle et ce fruit entra peu à peu dans la composition de nombreux plats. Depuis le XX<sup>ème</sup> siècle, une industrie de la tomate s'est réellement développée et propose des produits à base de tomates de plus en plus diversifiés (Dore C., Varoquaux F., 2006).

Elle est cultivée à l'heure actuelle dans de nombreux pays du monde, sous diverses conditions et climats. Cependant son développement optimal nécessite un climat tempéré chaud et des températures comprises entre 16 et 27°C. L'intensité lumineuse et la durée du jour ont aussi un rôle important dans le développement de la plante.

Deux filières de la tomate sont à considérer : la tomate de bouche (pour la consommation directe) et la tomate industrielle (pour la transformation).

La première est cultivée en serre pour plus de 90% de la production commerciale, ou en plein champ (avec une production domestique non négligeable) et se ramasse manuellement, à un stade de maturité incomplet lorsque les fruits sont fermes et peu colorés.

La deuxième est quant à elle cultivée en plein champ. Les plantes doivent être résistantes, aux conditions climatiques mais aussi aux pathogènes. La récolte se fait de façon mécanique

à maturité, ce qui implique l'utilisation de variétés spécifiques avec une croissance déterminée, et une maturation groupée des fruits. Ces tomates présentent une résistance physique plus importante que les tomates de bouche.

#### 4.1.2. La tomate

D'un point de vue botanique, la tomate est un fruit, mais elle est cultivée et utilisée comme un légume. Elle est constituée de trois parties : le péricarpe (peau et partie charnue), le gel (contenu dans les loges), et les graines. La peau consiste en quatre à cinq couches de cellules de type épidermique ou hypodermique sous une fine cuticule. La figure ci-après permet de détailler les différentes parties de la tomate.

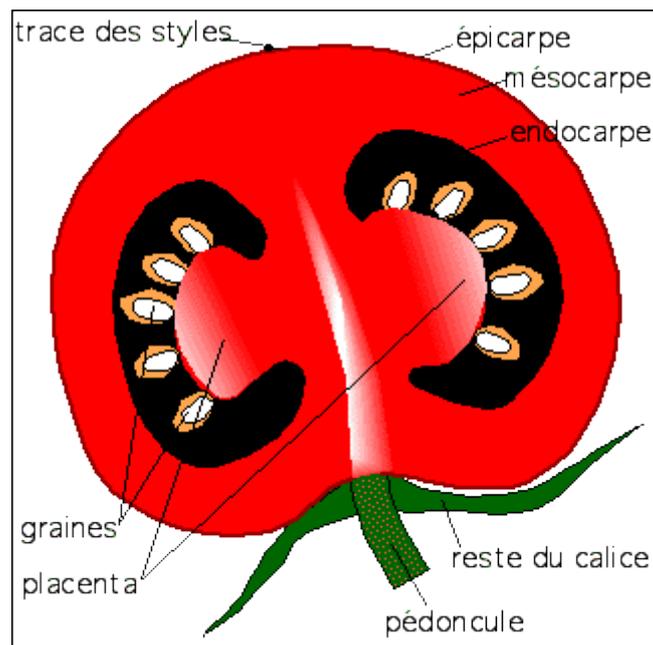


Figure 10 : Coupe anatomique d'une tomate

Le péricarpe est formé par l'épicarpe, le mésocarpe et l'endocarpe. Les graines sont à l'intérieur de la tomate dans les loges. Le pédoncule sert quand à lui à relier le fruit au plant.

La tomate est un fruit climactérique : au début de sa maturation, le fruit présente un pic de respiration caractéristique associé à un pic d'éthylène ( $C_2H_4$ ). Au cours de sa maturation, la tomate change de couleur par la dégradation de la chlorophylle et la mise en place de la voie de biosynthèse des caroténoïdes. Elle va donc passer du vert au blanc, puis au jaune, pour

enfin parvenir au rouge à maturité (pour la majorité des variétés). Il est à noter l'existence de variétés qui auront une couleur différentes à maturité, telles les tomates « noire de Crimée » qui ne dégradent pas la chlorophylle ou les divers mutants de la voie de biosynthèse des caroténoïdes.

Pendant la même période, la teneur en sucre du fruit augmente par l'apport des sucres de la plante et l'hydrolyse des réserves d'amidon. L'acidité des fruits due en grande partie à la présence d'acides citrique et malique est maximale au stade jaune et diminue ensuite peu à peu. Au cours de la maturation le goût du fruit va se développer ainsi que sa structure, qui va devenir de plus en plus molle grâce à l'action d'enzymes au niveau des parois cellulaires (Génard et al., 2010).

#### **4.1.3. Composition de la tomate**

Les tomates peuvent avoir des compositions variables en fonction du cultivar, du lieu de culture, de la façon dont elles sont cultivées (techniques agricoles et facteurs environnementaux), ainsi que de la conservation post-récolte. Par exemple une intensité lumineuse plus importante permet d'obtenir une augmentation des teneurs en caroténoïdes et en vitamine C (Génard et al., 2010).

Le jus représente la majeure partie des constituants physiques de la tomate. La tomate est constituée de 94 à 96 % de jus, 1 à 1,5 % de pépins et 1,5 à 2,5% de pelures et fibres. Les sucres contenus dans la tomate sont essentiellement des sucres réducteurs : le glucose représente 0,88-1,25%, et le fructose 1,08-1,48% (Moresi et Liverotti, 1982).

Les constituants protéiques sont présents en faible concentration dans la majorité des fruits et légumes. Ils sont toutefois d'une importance capitale en tant qu'enzymes impliquées dans le métabolisme des fruits au cours de leur croissance. La tomate malgré sa faible teneur en protéines (1,1%) contient pratiquement tous les acides aminés (Yu et al. 1967).

La composition en lipides varie en fonction de la variété et du degré de maturité lors de la récolte ; plus de 33 acides gras ont été répertoriés dans le péricarpe, avec une teneur en lipides de 0,3 g par 100g de poids frais (SOLTNER, 1988).

La teneur globale en cendres est de 0,75%. Les principaux minéraux sont : le Calcium (2,95 à 3,95 mg/kg), le Magnésium (2,5 à 4 mg/kg), le Fer (0,6 à 0,8 mg/kg), le Phosphore (2,4 à 2,9 mg/kg), le Potassium (18,7 à 29,5 mg/kg) et le Sodium (15,7 à 17,6 mg/kg) (Cotte, 2000).

Outre ces principaux constituants le fruit de la tomate contient des vitamines, des enzymes, des substances pectiques, des pigments porphyriques comme les chlorophylles et les caroténoïdes dont le carotène, le lycopène, les xanthophylles, etc (HART et SCOOT, 1995).

les vitamines hydrosolubles sont bien représentées dans la tomate, à commencer par la vitamine C, dont le taux peut varier de 100 à 300 mg/kg. Les teneurs maximales se rencontrent dans les tomates de plein champ, en pleine saison. Enfin le lycopène, qui lui donne sa couleur rouge, constitue avec le  $\beta$ -carotène l'essentiel des caroténoïdes que l'on peut trouver dans la tomate (Fraser & Bramley, 2004).

## 4.2. La filière tomate

### 4.2.1. Production de tomates

La tomate est la troisième espèce de légumes la plus cultivée au monde en termes de volume de production après la pomme de terre et la patate douce. Selon les statistiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), la production mondiale de tomates s'élevait en 2007 à 126,2 millions de tonnes pour une surface de 4,63 millions d'hectares, soit un rendement moyen de 27,3 tonnes à l'hectare. Ces chiffres ne tiennent toutefois compte que de la production commercialisée, et n'incluent pas les productions familiales et vivrières qui peuvent être non négligeables dans certaines régions ("FAO stat").

La Chine est de loin le premier producteur mondial avec un peu plus du quart du total (33,6 millions de tonnes), production destinée essentiellement (environ 85 %) au marché intérieur pour la consommation en frais. Elle est suivie par six pays produisant plus de 5 millions de tonnes : les États-Unis, la Turquie, l'Inde, l'Égypte, l'Italie et l'Iran. Seize pays rassemblent 80 % de la production mondiale. Considérée globalement, l'Union européenne se placerait au deuxième rang avec 12,5 % de la production mondiale (15,8 millions de tonnes), dont l'Italie assure près de 40 %, et les quatre pays méditerranéens produisant plus de 1 Mt (dans l'ordre: Italie, Espagne, Grèce et Portugal) plus des trois quarts (76,8 %). Sur la période 1961-2007, la production mondiale a été multipliée par près de 4, passant de 27,6 à 126,2 millions de tonnes, soit un taux de croissance annuelle moyen de 3,36 %. Cette évolution a été particulièrement forte en Asie, ainsi la Chine a multiplié sa production par 7 et dans la même période, l'Inde par 18,5 ("FAO stat").

Le rendement moyen s'établit à 23,1 t/ha, un peu en dessous du niveau mondial, en Chine et à 17,9 t/ha en Inde. Il s'étage entre 50 et 80 t/ha dans les pays du sud de l'Europe, tandis que les pays du nord, dont la production est quasi exclusivement assurée sous serre, ont des rendements records : 445 t/ha aux Pays-Bas, 428 au Royaume-Uni et 408 en Belgique. Des records de 100 kg/m<sup>2</sup>, soit 1 000 t/ha, ont même été obtenus aux Pays-Bas dans des serres avec éclairage artificiel ("FAO stat").

#### 4.2.2. Production de tomates pour la transformation

La production de tomates pour la transformation représente un peu plus de 37 millions de tonnes de tomates.

En 2011, Les USA restent le premier pays producteur avec 11 millions de tonnes transformés, la Chine s'inscrit avec 6,7 millions de tonnes déclarées (loin derrière les 8,2 millions déclarées en 2009) comme le deuxième pays producteur, mais surtout comme le premier pays exportateur mondial de produits dérivés ("FAO stat").

La première entreprise mondiale est californienne (Morning Star) et avec 3,2 millions tonnes de tomates fraîches, elle représente près de 8,5% de la transformation mondiale. Les seconde et troisième sont chinoises et ont transformé à elles deux, plus de 3,7 millions de tonnes de tomates fraîches, soit presque 10% de la production mondiale ("FAO stat").

Dans le même classement la première entreprise européenne est Italienne, et se situe au 13<sup>ème</sup> rang mondial avec un peu moins de 550 000 T.

##### 4.2.2.1. Union européenne

La production des 5 pays « historiques » de l'UE est de 8,5 millions de tonnes en 2011.

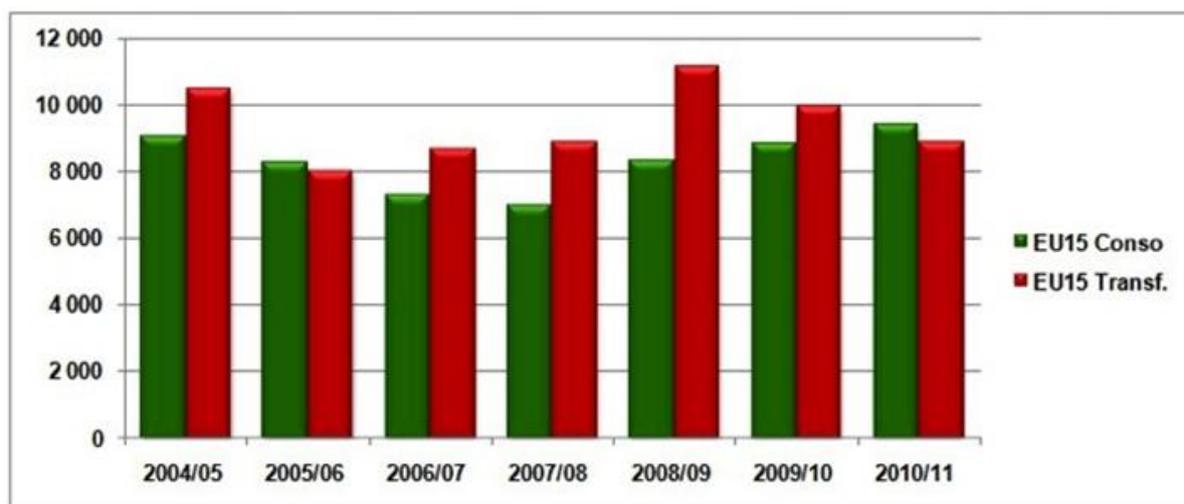


Figure 11 : Evolution de la consommation et de la production de tomates d'industrie en Europe (SONITO)

Dans les années 2004-2005 la transformation (et donc la production de produit à base de tomates) est plus élevée en Europe que la consommation de ces mêmes produits. En 2005-2006 les quantités sont sensiblement équivalentes, à partir de 2007-2008 la production est supérieure à la consommation et connaît une forte ascension avec un maximum en 2008-2009. La courbe de consommation augmente quant à elle plus doucement mais ne connaît pas de repli jusqu'à la dernière campagne connue, 2011, où elle dépasse donc la courbe de transformation. La production européenne n'est donc pas suffisante à l'heure actuelle et nécessite des importations, notamment depuis la Chine.

#### 4.2.2.2. France

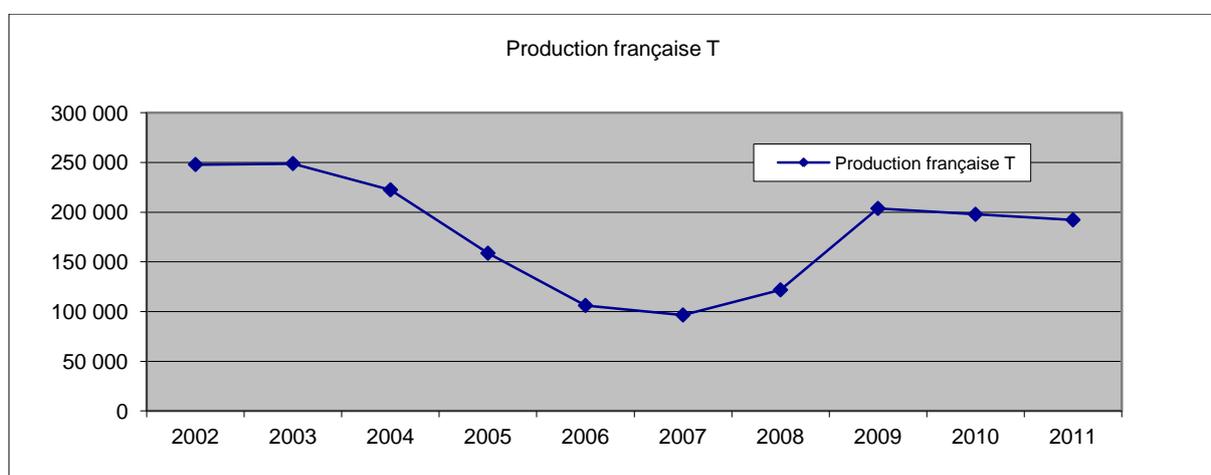


Figure 12 : évolution de la production française de tomates (SONITO)

Avec 197 113 tonnes de tomates la campagne 2011 en France confirme en volume le maintien de la production nationale qui retrouve pratiquement les seuils de production des années 2002/2004. Le nombre de producteurs, qui s'était redressé depuis 2008, se stabilise en 2011, à 195 ce qui représente son meilleur niveau depuis 2005.

La production de tomates d'industrie compte aujourd'hui un nombre significatif de producteurs aux très forts volumes. C'est aussi l'arrivée et le maintien pour cette campagne et celle de 2012 des «nouveaux» arrivants dans cette production qui permet de situer ces moyennes par exploitation à ces niveaux élevés (SONITO).

La production de tomates d'industrie en France est localisée principalement dans deux bassins, le Sud Est et le Sud Ouest, ceci étant lié à la présence dans ces bassins d'outils de transformation.

### **4.3. Les méthodes de transformation**

Un quart environ de la production mondiale de tomate est consommée sous forme transformée industriellement.

Les conserves de tomates regroupent les tomates pelées entières ou non, le jus de tomate, la pulpe de tomate, le concentré de tomate. Quelle que soit la technique de transformation, les produits sont mis en conserve et stabilisés par un traitement thermique. Les produits à base de tomates correspondent essentiellement aux soupes de tomate, ketchups et sauces tomate. Dans ce cas, de nombreux autres ingrédients peuvent être ajoutés pour aboutir au produit final, qui est emballé et stabilisé par un traitement thermique. Enfin une production minimale est faite sous forme de tomates séchées, ce qui correspond à des poudres et flocons de tomate, entières, en moitié, tranchées, etc. Ces produits sont déshydratés par des techniques différentes, la faible teneur en humidité constituant le facteur de stabilisation. La diversité de formes, de goûts, de concentrations, de procédés, de destination, est telle qu'il est impossible d'identifier un schéma général de transformation (Gould, 1920).

Parmi les produits à base de tomate, une grande partie correspond à des produits alimentaires intermédiaires. Il s'agit de produits qui sont stabilisés, en gros volumes, et qui seront utilisés par d'autres industriels pour faire un produit secondaire. Par exemple le concentré de tomate à 12% peut être soit directement commercialisé, soit utilisé pour une confection de purée de tomate, qui pourra être elle-même utilisée pour une troisième transformation comme une soupe ou une sauce de pâtes (Fig. 14).

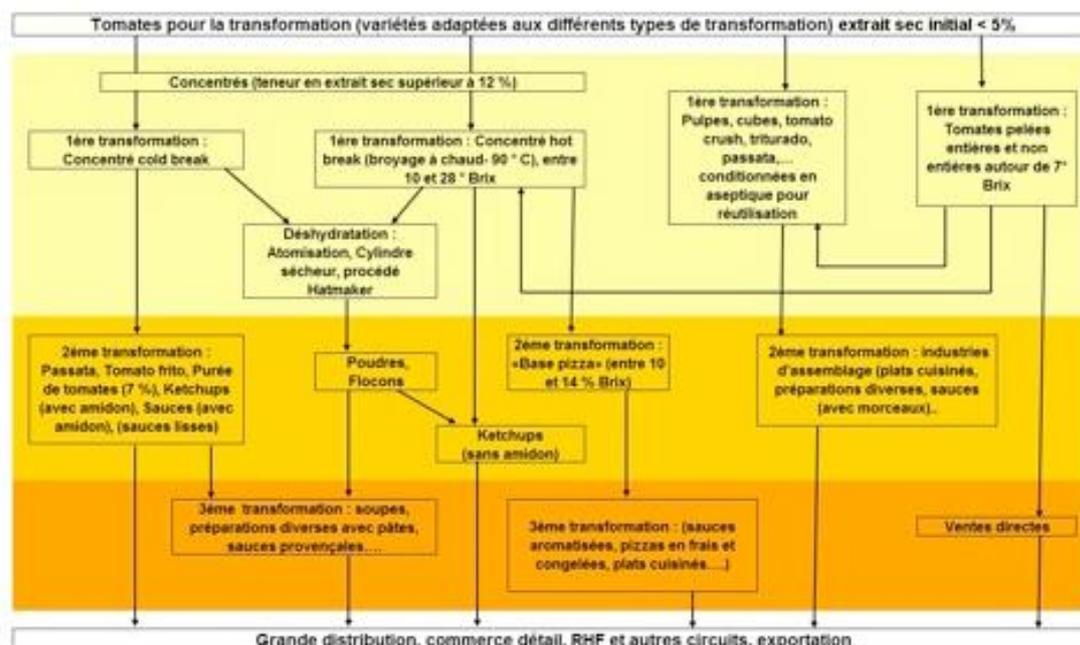


Figure 13 : les étapes de la transformation industrielles de tomates (SONITO)

Cette figure illustre bien les différents parcours que peuvent avoir les produits industriels à base de tomate avec des transformations primaires, secondaires ou tertiaires. Les produits issus de la transformation primaire sont en majorité des concentrés, qui sont utilisés pour une transformation secondaire, seule une faible partie est vendue directement. Les produits obtenus à partir de ces concentrés sont eux même transformés de nouveaux, mais une plus grande partie est vendue directement (SONITO).

#### 4.4. Principales étapes de la transformation

##### 4.4.1. Lavage

Le lavage des tomates a lieu à la réception en usine. Cette opération est indispensable pour séparer la terre des fruits : les particules de terre présentes sur les tomates peuvent contenir des résidus de pulvérisation, des micro-organismes, des moisissures. Elles doivent également être enlevées en raison des dommages physiques qu'elles pourraient occasionner aux équipements de transformation, en particulier aux broyeurs, aux raffineuses, aux pompes, etc. L'opération de lavage comporte deux phases: période de trempage et rinçage par jet. Elle permet aussi un tri par flottaison, les tomates trop vertes ou endommagées tombant au fond du canal de transport (Gould, 1992).

Après le lavage, le tri des tomates permet de diriger les tomates vers les différentes lignes de production. S'il est bien effectué, seules les tomates sans défauts et de taille adéquate vont servir à la fabrication des tomates entières pelées. Les petites tomates ou celles présentant quelques défauts (maturité, pigmentation, altérations diverses, etc.) sont plutôt dirigées vers les lignes de pulpe ou de concentré. Les opérations de tri sont désormais réalisées le plus souvent au moyen de trieurs optiques électroniques (Gould, 1992).

#### **4.4.2. Jus de tomate, pulpe et purée**

Les tomates sont ensuite convoyées directement vers l'étape de raffinage pour l'extraction à froid (Cold Break), ou vers une installation de préchauffage suivie de l'extraction à chaud (Hot Break).

La pulpe de tomate est fabriquée à partir de tomates crues en séparant d'abord les parties liquides et charnues des graines, des peaux, etc. et en évaporant ensuite l'eau du jus jusqu'à ce que le produit concentré contienne au moins 8% de matière sèche (hors sel).

Conformément aux différentes législations en vigueur, le jus de tomate obtenu à l'issue des premières étapes communes de transformation possède un extrait sec maximal de 8 %. Le jus de tomate peut être considéré comme une étape intermédiaire de la préparation du concentré de tomate. Il peut être embouteillé après l'étape d'extraction, et stérilisé. Cependant la méthode la plus couramment utilisée est la fabrication du jus de tomate à partir de concentré de tomate dilué, homogénéisé et acidifié (Gould, 1992).

##### **4.4.2.1. Procédé CB**

Dans le processus « cold break » la tomate est broyée à des températures inférieures à 66°C, puis raffinée. Le produit obtenu a une couleur plus naturelle et une saveur de tomate fraîche. Dans ce cas, la lipoxgénase, la pectinméthylestérase et la polygalacturonase ne sont pas inactivées.

#### **4.4.2.2. Procédé HB**

Dans le procédé « hot break », les tomates sont broyées en présence d'un minimum d'air, puis la pulpe ainsi obtenue est immédiatement chauffée à plus de 90°C avant d'être soumise à l'étape de raffinage. Cette technique permet d'améliorer le rendement industriel, tout en obtenant un produit plus visqueux qui ne donne pas lieu à une séparation en plusieurs phases. Le traitement à chaud permet d'inactiver les enzymes pectinméthylestérase et polygalacturonase (Gould, 1992).

#### **4.4.2.3. Extraction – Raffinage**

L'extraction du jus est l'étape au cours de laquelle les graines, la peau et l'ensemble des composants végétaux (écorces, tiges, feuilles, etc.) sont séparés du jus.

L'extraction du jus de tomate peut être accomplie de différentes manières, la plus répandue étant l'extracteur à pales. La force centrifuge créée par la rotation du système hélicoïdal contraint la pulpe à traverser une grille cylindrique ou le plus souvent tronconique, dont la maille (entre 0,6 et 1,2 cm) est déterminée en fonction de différents paramètres (consistance, viscosité, couleur, etc.) souhaités. Le nombre de pales, la vitesse de rotation, l'écartement entre les pales et la grille sont également déterminants pour la qualité finale du produit (Gould, 1992).

#### **4.4.3. Concentration**

A partir des produits HB ou CB obtenus, des concentrés peuvent être réalisés. Pour produire le concentré de tomate, différents modèles d'évaporateurs sont utilisés, comme les évaporateurs à flot tombant, à circulation forcée ou à effet multiple (Gould, 1992).

#### **4.4.4. Tomates pelées**

Deux grands types de technologies de pelage (vapeur et soude caustique) ont été utilisés dans ce secteur, qu'il s'agisse de tomates entières pelées ou en dés. Désormais, la technologie la plus répandue est le pelage à la vapeur, devenu populaire dans les années 1970 et 1980 en raison des préoccupations environnementales et des coûts associés à l'élimination des déchets caustiques (Gould, 1992).

Les tomates pelées peuvent être vendues entières ou cubetées. Dans ce deuxième cas l'utilisation de lames spécifiques permet un découpage des tomates après pelage.

#### **4.4.4.1. Pelage à la vapeur**

Les tomates sont chauffées à la vapeur dans un espace clos équipé de buses de pulvérisation. Elles sont exposées à la vapeur vive entre 30 à 60 secondes selon la variété, la taille, et le stade de maturité des fruits. Immédiatement après traitement, les fruits sont soumis à des jets d'eau froide destinés à fracturer la peau. La peau des tomates peut ensuite être détachée du fruit au moyen d'une cloche sous vide ou en faisant passer les fruits sous des lanières plastiques ou des brosses sur lesquelles la peau reste accrochée (Gould, 1992).

#### **4.4.4.2. Pelage chimique**

La qualité du pelage dépend de l'optimisation du compromis entre l'élimination des peaux et le maintien de la quantité maximale de chair. L'intérêt du pelage chimique est la sélectivité de l'action de la soude caustique, qui attaque les tissus externes des fruits tout en laissant la chair intacte. Les déchets de pelage sont facilement éliminés par entraînement à l'eau (Gould, 1992).

Le pelage chimique des tomates a été utilisé durant de nombreuses années dans l'industrie agro-alimentaire, mais n'est plus utilisé aujourd'hui en dehors des USA.

#### **4.4.5. Stérilisation**

En fin de préparation, le produit est soumis à un cycle thermique obtenu par des échangeurs de chaleur indirects à tubes concentriques. Il circule dans l'espace annulaire central, tandis que les liquides de réchauffement et de refroidissement circulent dans les deux enceintes intérieures et extérieures, à contre courant du produit. Ce type d'équipement permet de maintenir le produit à température constante sur de longues durées. Pour le secteur des concentrés, l'installation de stérilisation la plus courante est le stérilisateur aseptique continu « tube in tube », destiné au traitement de produits alimentaires à haute consistance ou viscosité (jus, pulpes, mais surtout concentrés, sauces et ketchups) (Gould, 1992).

#### **4.4.6. Divers**

Les déchets de transformation des tomates, ou drèches, qui sont encore le plus souvent utilisés en alimentation animale, se sont révélés être une excellente source peu coûteuse de caroténoïdes. Ces sous-produits représentent environ 2 à 3 % des quantités traitées en industrie.



## **Objectif et stratégie**



## Objectif et stratégie

### 1. Contexte du projet

Les bienfaits d'une alimentation riche en fruits et légumes ne sont plus à démontrer. Leur intérêt serait lié notamment à leur forte teneur en certains micronutriments (caroténoïdes, polyphénols, vitamines,...).

Pour cette raison, de nombreux projets de recherche ont eu pour objectif principal d'établir les teneurs en nutriments de cette famille d'aliments. Mais cette approche ne permet que d'accéder à la quantité totale et non réellement "bioactive" de ces nutriments. Cette notion de bioaccessibilité (caractéristique qualitative) n'a pas été beaucoup étudiée.

De plus, des données scientifiques démontrent que la structure des aliments influence (de manière positive ou négative) la bioaccessibilité de certains nutriments. En effet, la rupture de la matrice résultant des différentes étapes des procédés de fabrication peut influencer le relargage, la diffusion, la transformation, et *in fine* l'absorption de nutriments d'intérêt.

Aujourd'hui, les connaissances scientifiques sont insuffisantes pour relier la composition des fruits et légumes à leurs effets nutritionnels. Au-delà de la quantification des nutriments, l'état structurel du tissu végétal va fortement influencer les concentrations de micronutriments qui peuvent atteindre les muqueuses digestives. Si quelques données commencent à être disponibles sur la composition des produits végétaux, elles sont souvent limitées aux produits frais. De plus, ces données ne fournissent aucune indication sur les quantités qui sont réellement disponibles pour l'absorption intestinale.

La biodisponibilité des micronutriments est extrêmement variable, en partie à cause de leur nature chimique mais aussi de l'état de la matrice végétale. La plupart des fruits et légumes sont consommés après des procédés peu agressifs, leur microstructure est donc toujours très proche de celle du tissu végétal. Les micronutriments sont donc toujours confinés dans une structure cellulaire organisée par les parois végétales, dont ils devront être libérés pour pouvoir être absorbés. En effet, les micronutriments dans le tube digestif se répartissent en trois phases : une phase particulaire (fragments de cellules, amas cellulaire), une phase aqueuse et une phase

lipidique, formant une émulsion complexe. Ils ne seront bioaccessibles que lorsqu'ils auront quitté la phase particulaire, voire seront intégrés dans la phase lipidique pour les micronutriments lipophiles. Ce passage dans la phase lipidique est donc un préalable indispensable à toute biodisponibilité. Il a été montré, y compris pour des macronutriments (lipides dans des graines oléagineuses par exemple) que le matériel végétal peut traverser intact tout le tube digestif, les parois empêchant la libération des lipides intracellulaires (Ellis et al., 2004). Ceci est particulièrement important pour les caroténoïdes, molécules liposolubles et souvent présentes complexées à des protéines dans les membranes des chromoplastes.

### **Objectifs du projet**

Les problématiques du projet sont de comprendre les mécanismes impliqués dans la diffusion potentiellement accrue des micronutriments des fruits et légumes transformés. L'objectif n'est pas de modéliser entièrement la biodisponibilité des micronutriments et il n'est pas prévu de prendre en compte les interactions avec les autres composants du bol alimentaire, qu'il s'agisse d'interactions spécifiques avec d'autres molécules ou de la forme physique des phases lipidiques.

Les principaux objectifs de ce projet seront de mettre au point des méthodologies robustes permettant de mesurer des caractéristiques intrinsèques du produit « fruit ou légume » affectées par la transformation. L'influence de la structure sur la relation entre les quantités de nutriments présents dans un produit et leur diffusion pourra ainsi être établie.

Ces outils permettront de déterminer comment la déstructuration du tissu végétal, par traitement thermique ou mécanique, peut en modifier les propriétés (encapsulation) et créer des pores par lesquels les micronutriments liposolubles pourront diffuser.

Trois étapes sont envisagées :

- Mise au point d'un test de diffusion permettant d'étudier la première partie de l'absorption, à savoir la diffusion de la matrice vers une phase lipidique ;
- Fabrication d'échantillons contrastés afin de les confronter au modèle et vérifier l'impact des traitements sur les propriétés de diffusion de différents produits à base de tomate ;
- Validation du modèle par l'utilisations de différentes matrices.

Ce projet permettra de démontrer l'intérêt de la transformation et ainsi de valoriser les qualités nutritionnelles des fruits et légumes. Il viendra aussi en appui à la politique du PNNS (Programme National Nutrition Santé) qui promeut, entre autres, les bienfaits des fruits et légumes sous toutes leurs formes.

## **2. Protocole expérimental**

Ce projet est structuré en trois tâches :

1. Mise au point de méthodes de mesure de la diffusion des micronutriments
2. Déstructuration de la matrice végétale : production d'échantillons contrastés
3. Utilisation du modèle sur d'autres matrices.

Les échantillons produits lors de la tâche 2 seront testés selon les méthodes mises au point dans la tâche 1

### **Tâche 1 : étude de la diffusion des micronutriments vers une phase lipidique**

Dans la première tâche, un jus commercial sera utilisé. Il sera confronté à différentes phases lipidiques afin d'étudier les propriétés de diffusion du lycopène.

- Utilisation d'une phase lipidique homogène : l'huile d'arachide ;
- Utilisation d'une phase lipidique émulsionnée : afin de se rapprocher des conditions alimentaires, une émulsion est utilisée. La taille des gouttelettes lipidiques est contrôlée ainsi que le pH du milieu. Deux émulsifiants seront utilisés :
  - Une émulsion avec de la Sérum Albumine Bovine : protéine commerciale présente en quantité dans l'alimentation,
  - Une émulsion avec des phospholipides du jaune d'œuf.

Ces deux émulsifiants présentent des propriétés physiques différentes et pourront agir de façon différente sur la diffusion.

Au cours de cette tâche, les cinétiques de diffusion seront suivies et reliées aux caractéristiques des échantillons (taille des particules, type de produit), les coefficients de transfert vers la phase lipidique d'émulsions seront établis, ainsi que les différents paramètres à caractériser.

### **Tâche 2 : fabrication de produits « modèles »**

Des échantillons issus d'opérations unitaires seront spécifiquement fabriqués en laboratoire ou en halle technologique afin d'obtenir des produits « modèles » ayant des itinéraires technologiques très différents.

Différentes opérations unitaires seront ainsi étudiées telles que : broyage, raffinage, traitement thermique.

Différents types de mesures seront mis au point et réalisés :

- Structure :
  - o granulométrie pour quantifier les tailles de particules obtenues,
- Nutriments
  - o teneurs et nature en caroténoïdes dans les différentes phases obtenues
- Répartition
  - o Des caroténoïdes dans les différentes phases

Cette étape permettra de prendre en compte le procédé dans sa globalité (succession et intensité des étapes unitaires).

La tomate a été choisie car elle contient une quantité importante de divers caroténoïdes et permet de fabriquer des produits ayant une large gamme de taille et de texture (jus, concentré, cubes).

De ce fait, des fabrications de produits à base de tomates seront spécifiquement réalisées dans le but de faire varier les facteurs pressentis de la diffusibilité des caroténoïdes. Ces différents facteurs sont :

- le stockage : deux temps de stockage post-récolte seront appliqués afin d'étudier l'état physiologique du fruit et en particulier l'impact du stress de cueillette et de pré-

conservation (allant jusqu'à des chocs pour simuler les réactions de maturation accélérées et libérer les enzymes endogènes) ;

- le mode de fabrication :
  - utilisation des procédés cold et hot break pour modifier l'intégrité de la paroi végétale dans les produits finis, le procédé cubage donnant une modalité où l'intégrité tissulaire elle-même est respectée ;
  - concentration pour maximiser l'impact thermique en termes de recombinaison des molécules présentes dans le tissu végétal.

### **Tâche 3 : Utilisation du test sur d'autres produits.**

Afin de vérifier l'efficacité du test mis en place dans la tâche 1, celui-ci sera appliqué à différents produits commerciaux ou produits générés en laboratoire.

Les contraintes physiques et chimiques de l'utilisation de ce test seront ainsi mises en avant, par l'utilisation de produits de différentes structures, ainsi que de produits susceptibles d'entraîner des interactions lors de la diffusion.



## Matériel et Méthodes



## Matériel et Méthodes

### 1. Matériel

#### 1.1. Produits chimiques

Le lycopène (ref 05059 pureté 98.8%) provient d'Extrasynthèse (Genay, France). Le  $\beta$ -carotène (ref 22040, pureté 97%), le (all-E)- $\beta$ -apo-8'caroténal (ref 10810, pureté 96%), la sérum albumin bovine (SAB), les phospholipides de jaune d'œuf (PL) et tous les tampons utilisés proviennent de Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)

Les solvants méthanol et méthyl tert-butyl éther de qualité CLHP proviennent de chez Merck (Darmstadt. Germany).

Les solvants acétate d'éthyle, dichlorométhane,  $\text{BF}_3$ , toluène, hexane de qualité CLHP, proviennent de VWR international (Fontenay-sous-bois, France).

L'eau de qualité milliQ a été obtenue à l'aide d'un système millipore QPak 2 (Millipore corporation, Bedford, USA).

#### 1.2. Matériel végétal

##### 1.2.1. Expériences préliminaires

Les variétés de tomates utilisées dans les premières expérimentations HB et CB réalisées au micro-onde (chapitre 1) sont des lignées expérimentales M 82 et IL 925 de type tomate d'industrie, tomates allongées, riches en matière sèche et cultivées non tuteurées. Elles ont été cultivées sous serre à l'INRA d'Avignon avec des procédures de fertilisation et d'irrigation standards. Les fruits ont été récoltés à maturité et stockés à 12°C.

Les tomates utilisées pour la transformation HB et CB dans le chapitre 2 sont des tomates de bouche achetées dans un supermarché local (Auchan, Avignon). Elles ont été choisies les plus rouges possibles.

### **1.2.2. Elaboration du modèle de diffusion**

Des bouteilles de 1 litre d'huile d'arachide (marque Maurel) provenant d'un même lot de production et des bouteilles de 33 ml de jus de tomates (marque Girard) d'un même lot de production ont été achetées au supermarché local (Metro, Avignon).

Ces produits sont stockés à 4°C dans le noir. La composition de l'huile et sa stabilité (données non montrées) sont contrôlées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à spectrométrie de masse (GC-MS) (les conditions sont développées dans la partie analyses chimiques §2.2.2).

La concentration en caroténoïdes du jus de tomate et sa stabilité (données non montrées) sont contrôlées par chromatographie liquide haute performance (CLHP) (les conditions sont développées dans la partie analyses chimiques).

La taille des particules présentes dans le jus est mesurée par granulométrie laser (§2.3.2).

### **1.2.3. Transformation industrielle des tomates**

La variété de tomate utilisée pour la transformation en halle pilote est la variété Bronte couramment utilisée en industrie. Ces tomates sont cultivées en plein champ entre Piolenc et Mornas (Vaucluse) par EARL ORVANNE (André et Sylvain Bernard). Une parcelle a été préalablement sélectionnée avec l'assistance de la SONITO (Robert Giovinazzo) (à proximité de Bollène, Vaucluse). Le mode de culture, l'irrigation et la fertilisation suivent les procédés classiques de culture de tomates industrielles. Ce sont des tomates cultivées en plein champs, non tuteurées, sur des bandes de cultures de 1m de large afin de permettre le passage d'une ramasseuse mécanique.

#### **1.2.4. Expériences complémentaires**

Du ketchup (marque Heinz), des dés (marque « Le Cabanon »), du concentré de tomate (marque « Le Cabanon »), du maïs doux (marque Bonduelle), des épinards frais, des carottes fraîches sont achetés au supermarché local (Auchan, Avignon).

Les abricots blancs et rouges sont issus des vergers de l'INRA d'Avignon, à l'Armarine (Gard), dans le sud de la France.

## 2. Méthodes

### 2.1. Transformation des tomates

#### 2.1.1. Transformation à l'échelle du laboratoire

Une adaptation du protocole de Anthon & Barrett (2010) a été utilisée afin de mimer la cuisson Hot Break (HB) et Cold Break (CB) au laboratoire en utilisant un four micro-onde (Samsung, Auchan).

- La purée HB : environ 250 g de tomates sont introduits dans un sac en plastique thermosoudé. Elles sont alors chauffées au micro onde (0,35 s par gramme de tomate) à 900 W, laissées au repos pendant la même durée afin de laisser la température s'homogénéiser, et enfin chauffées de nouveau. Le sac est ensuite plongé dans un bain d'eau glacée pour être refroidi rapidement. Les tomates sont ensuite broyées 30 s dans un broyeur à couteaux (marque waring®, Fischer scientific) ;
- La purée CB : Environ 250 g de tomates sont broyées pendant 30 s au broyeur à couteaux. Elles sont ensuite laissées à température ambiante pendant 30 minutes., puis chauffées au micro onde avec le même programme que la purée HB ;
- La purée crue : Environ 250 g de tomates sont coupées en morceaux et broyées pendant 30 s dans un broyeur à couteaux. Cette purée est ensuite utilisée directement pour évaluer la diffusion et quantifier les caroténoïdes.

## 2.1.2. Transformation industrielle

### 2.1.2.1. Présentation générale de l'expérimentation

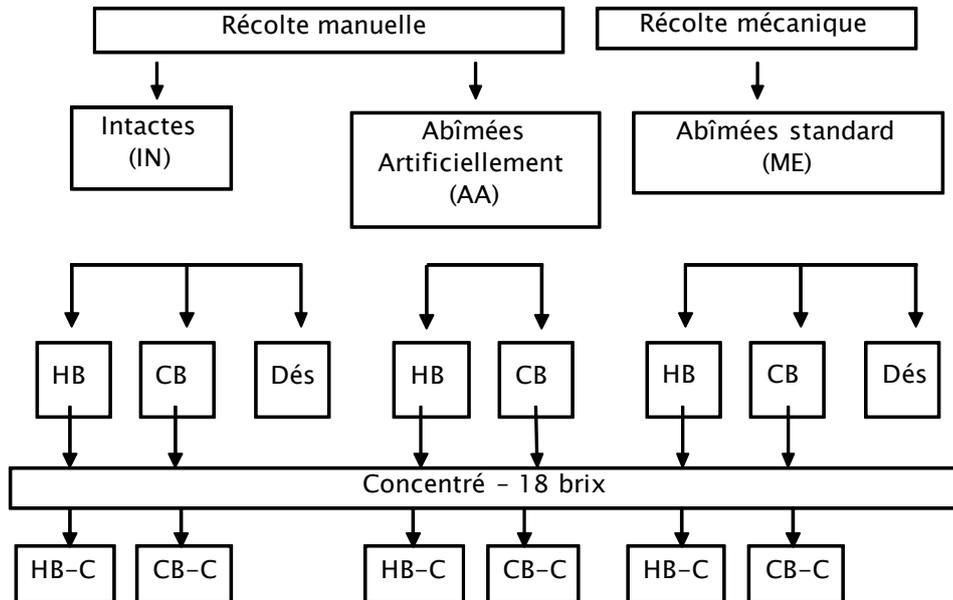


Figure 14 : Transformation pilote des tomates.

Dans le cadre de ces essais, deux modes de récoltes sont choisis : le mode de récolte manuel, les tomates sont prélevées à la main puis mises dans des caisses en plastique de 18 kg et le mode de récolte mécanique où les tomates sont directement récoltées par une machine dédiée, puis mises dans une benne de 18 T. Les tomates intactes sont transformées directement après le ramassage manuel, les tomates abimées artificiellement proviennent du même ramassage et sont abimées par chute de 4 m dans un cylindre sur une surface métallique plate non amortie. Les tomates abimées standard sont celles issues du ramassage mécanique.

Les conditions de transformation en halle pilote sont identiques aux conditions industrielles. La première étape avant la transformation est le lavage des tomates.

Deux procédés de cuisson sont utilisés , un procédé Hot Break (HB) et un procédé Cold Break (CB), ainsi qu'une fabrication de dés de tomate n'ayant pas subi de chauffage avant pasteurisation.

Ceci conduit à la réalisation de 14 échantillons (8 non concentrés et 6 concentrés) contrastés.

### **2.1.2.2. Trois pré-traitements**

#### 2.1.2.2.1. Lot tomates « intactes » (IN)

Les tomates ont été ramassées à maturité manuellement et conditionnées en caisses plastiques (environ 18 kg). Un tri rapide a été fait sur place afin d'enlever les corps étrangers et la terre. Des échantillons (une dizaine de fruits par caisse) ont été prélevés pour réaliser des analyses de couleur et de texture. Ces tomates ont été transportées directement au CTCPA afin d'être transformées le jour même.

#### 2.1.2.2.2. Lot abimé artificiellement (AA)

Les tomates sont issues du ramassage présenté précédemment. Les tomates ont été transportées à l'INRA d'Avignon où elles ont subi un stress mécanique (chute de 4 m dans un tube PVC sur un support métallique non amortissant). Elles ont alors été stockées 48h à température ambiante avant transformation au CTCPA (à J+2).

#### 2.1.2.2.3. Lot abimé standard (ME)

Sur la même parcelle, l'agriculteur a effectué un ramassage mécanique. Les tomates ont été directement séparées du plan de façon mécanique : la ramasseuse coupe le plan et sépare les fruits des parties vertes par vibration, puis les résidus de terre, les feuilles et les cailloux sont enlevés par tri manuel, les tomates sont ensuite déposées dans une benne ouverte de 18 T. La benne est transportée à l'usine Provence Tomate, à Tarascon (environ 80 km). Les tomates sont déchargées et acheminées dans l'usine par un flux d'eau dans lequel les tomates ont été prélevées pour l'expérimentation. Les tomates sont prélevées le long du quai du canal de transport qui permet d'amener les tomates du lieu de déchargement vers le lieu de transformation dans l'usine (figure 15). Ces tomates ont ensuite été transportées au CTCPA et conservées une journée à température ambiante avant leur transformation.



Figure 15 : Déchargement des tomates à l'usine de transformation : A tapis en sortie de benne ; B : chute du premier tapis vers le canal de transport vers le lieu de transformation.

2.1.2.3. Les procédés mis en œuvre

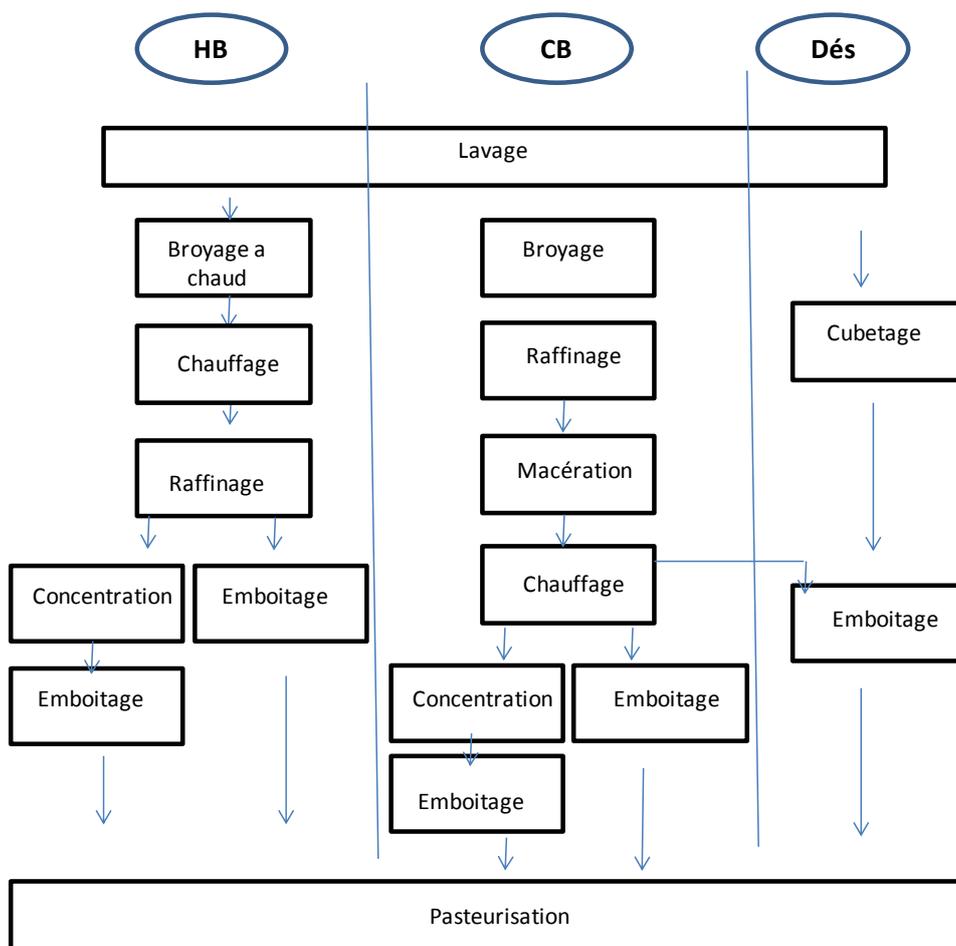


Figure 16 : Schéma des procédés mis en œuvre

2.1.2.3.1. Hot Break (HB)

**Lavage :** les tomates sont lavées à l’aide d’un laveur de marque Holland 750L. Les tomates sont brassées avec de l’eau sans additif. De l’air comprimé est envoyé dans la cuve afin de maintenir le brassage, et un tapis vibrant avec buses d’aspersion en fin de cycle permet de laver les tomates et éliminer les dernières impuretés. Le temps de séjour des tomates est de l’ordre d’une minute.

**Broyage à chaud :** Le broyage des tomates est réalisé à l’aide d’un broyeur à marteaux Electra (Poudenas, France), (2500 rpm, 8 marteaux (9cm X 4cm X1cm)), et avec un crible de 8 mm. Le broyage est réalisé au dessus de la cuve de chauffage. Les tomates sont broyées par petites quantités afin de ne pas faire baisser la température du bac de purée par l’ajout d’une trop grande quantité de tomates à température ambiante.

**Chauffage :** La purée fabriquée est pompée du bac de chauffe vers un échangeur tubulaire par une pompe volumétrique à rotor excentré de marque PCM (Levallois Perret, France), communément appelée « Pompe Moineau » du nom de son inventeur. La pompe sert à mettre en place la boucle de chauffage de l'échangeur tubulaire à eau surchauffée Rossi et Catelli (Parme, Italie), avec sonde Pt 100 permettant la régulation de température à 93°C ainsi que l'enregistrement de celle-ci. Cette boucle de chauffage est composée d'un tube double enveloppe en inox. La première enveloppe contient la purée de tomate et la deuxième la vapeur de chauffage.

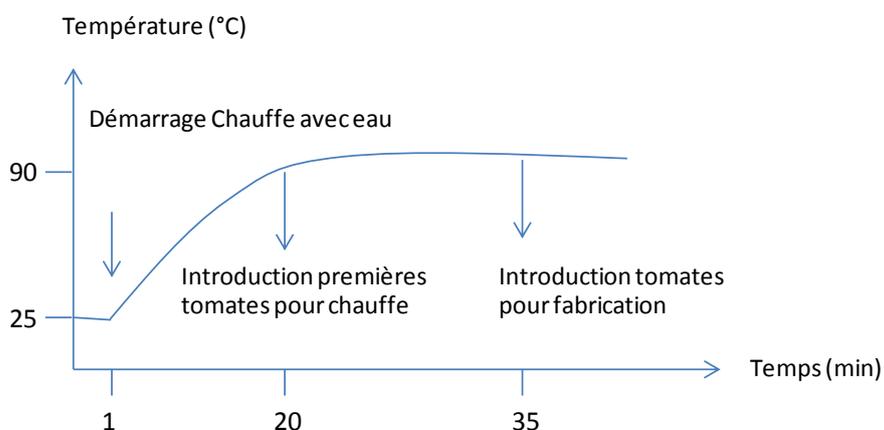


Figure 17 : Diagramme thermique du procédé HB

L'évolution de la température au cours de la transformation des tomates en purée HB peut être scindée en deux parties. La première est le préchauffage de la boucle avec une montée en température (pendant 20 minutes environ) avec de l'eau dans le circuit. La deuxième partie est celle où la température est stabilisée à 93°C. L'eau est alors enlevée du circuit et une petite quantité de tomates est introduite afin de chauffer l'appareil. Une fois la température de nouveau stabilisée à 93°C, les tomates à transformer sont introduites progressivement (environ 1h).

**Raffinage :** Quand la totalité des tomates est introduite, la boucle de chauffage est déconnectée et la purée est transférée dans la raffineuse. Le raffinage est réalisé par une raffineuse de marque Auriol (Marmande, France) modèle PH 3 avec tamis 10/10<sup>ème</sup> et une vitesse de rotation de 310 rpm

**Emboitage :** Une partie de la purée produite est emboîtée manuellement (à l'aide d'une louche) à chaud dans des boîtes ½ pour les produits non concentrés. Celles-ci sont serties à l'aide d'une sertisseuse encapsuleuse SEMI AUTO INOX ( MQP Mécanique, Quercy Périgord).

**Concentration :** L'autre partie de la purée est introduite dans le concentrateur. La concentration est réalisée à l'aide d'un concentrateur de marque Auriol (Marmande, France), à une pression de travail de 0.96 mBar (96 Pa) et une température de concentration de 38°C, afin d'obtenir des purées avec un Brix de 18 (concentration 4 fois de la purée initiale). Le concentré est emboîté comme décrit ci-dessus dans des boîtes ¼.

**Pasteurisation :** Elle est réalisée à l'aide d'un autoclave Lagarde (Malataverne, France) modèle Multiprocess horizontal. Le barème de pasteurisation est le suivant :

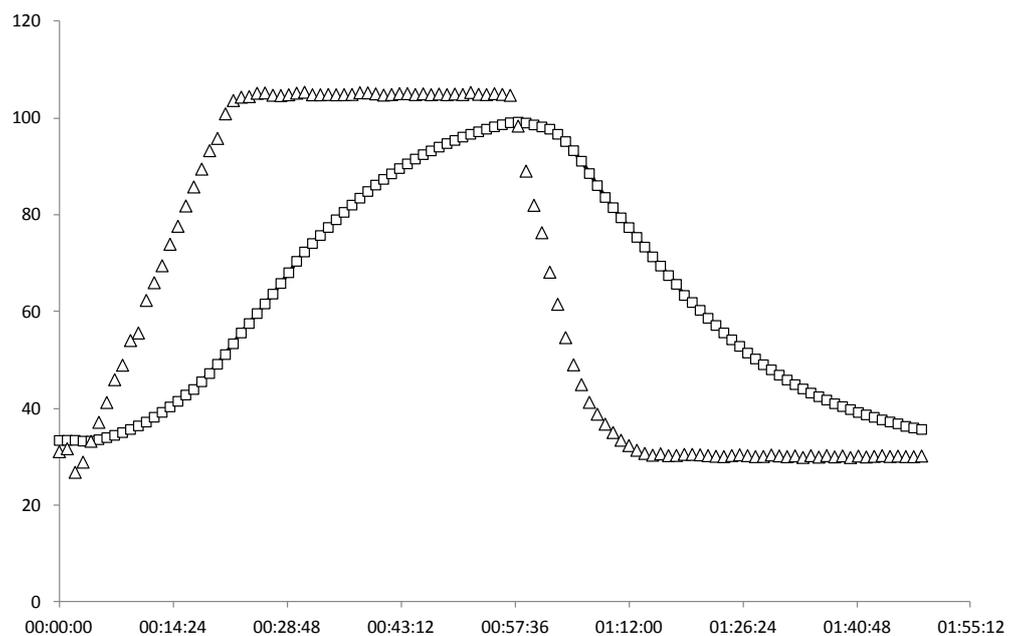


Figure 18 : Barème de pasteurisation des produits transformés . Δ : Température de consigne, □ : Température enregistrée au cœur de la boîte.

2.1.2.3.2. Cold Break (CB)

**Broyage** : Même broyeur que pour la purée HB, le broyage est ici effectué à température ambiante.

**Raffinage** : Même raffineuse que précédemment. Le raffinage est réalisé à température ambiante directement après le broyage.

**Macération** : La purée raffinée est transférée dans un bac inox et subit une étape de macération à température ambiante de 30 minutes.

**Chauffage** : Le chauffage est réalisé par un Stephan (Hameln, Allemagne) UM 45 réglé à 70°C. La montée en température de 20°C à 70°C est réalisée en 5 minutes environ, le temps de chauffe à 70°C est de 10 minutes. Après chauffage la purée est laissée emboîtée à chaud pour une partie, ou concentrée pour une autre.

**Emboitage, concentration et pasteurisation** : Ces trois étapes sont réalisées selon le même mode que précédemment.

2.1.2.3.3. Dés

**Cubetage** : Les tomates sont découpées en cube 20x20 mm à l'aide d'une cubeteuse Robot-coupe CL55 (Vincennes, France).

**Emboitage** : Les dés sont mis en boîte avec l'ajout de jus CB (20% en masse).

**Pasteurisation** : La pasteurisation est réalisée selon le même mode que précédemment et le même barème.

## 2.2. Transformation des carottes

Les carottes (20 kg) sont achetées au supermarché local (Auchan). Elles sont découpées en rondelle de 10 mm d'épaisseur à l'aide d'une cubeteuse Robot-coupe CL55 (Vincennes, France).

Le blanchiment est réalisé dans une enceinte double enveloppe de type « Pierre Guerrin » à 100 °C pendant 3 min pour une partie des carottes, les autres sont traitées crues pour les procédés suivants.

Un premier broyage au couteau est réalisé à l'aide d'un Stephan (Hameln, Allemagne) UM 45 réglé à 25°C en 2 étapes : 15 s à 3000 rpm et 1 min à 1000 rpm. Le deuxième broyage est réalisé dans le même Stephan, 2 min 30 s à 3000 rpm. Le troisième broyage est réalisé à l'aide d'un broyeur colloïdal (Broyeur Colloïdal MZ80IR FRYMA-KORUMA, Rheinweg 9, Allemagne). Le dernier broyage est réalisé à l'aide d'un homogénéisateur Haute Pression (Homogénéisateur-Lisseur Guerrin modèle ALM2, Mauzé-sur-le-Mignon, France).

Les produits sont conditionnés en lots de 100 g en pochettes plastiques thermocollées.

La surgélation est réalisée à l'aide d'un surgélateur.

## 2.3. Méthodes d'analyses chimiques

### 2.3.1. Analyse des caroténoïdes

#### 2.3.1.1. *Extraction des caroténoïdes*

L'extraction des caroténoïdes est réalisée en utilisant la méthode décrite par Serino, Gomez et al. (2009) avec quelques modifications. Environ 400 mg de purée de tomate (à 10 mg près) sont introduits dans un tube Eppendorf de 2 ml contenant 80 µg de billes de Zirconium/Silice de 0,1 mm de diamètre (Biospec, Bartlesville, USA) et une solution à 0,2 mg.ml<sup>-1</sup> de β-Apo8'caroténal comme standard interne. Trois réactifs sont ajoutés successivement avec, entre chaque ajout, une agitation de 40s par un homogénéisateur FastPrep® (Thermo

scientific, Waltham, USA) et une phase de centrifugation à 10 000 g (4 °C) pendant 2 minutes. Les réactifs sont (i) 100 µl d'eau saturée en NaCl/50 µl d'hexane, (ii) 200 µl de dichlorométhane et (iii) 800 µl d'acétate d'éthyle. La fraction organique est mise de côté et on répète l'extraction une nouvelle fois. Les fractions sont ensuite rassemblées et filtrées.

### 2.3.1.2. Analyse CLHP

Deux colonnes différentes sont utilisées, une première colonne C8 qui permet une analyse rapide des caroténoïdes, et une colonne C30 qui permet une séparation plus efficace des isomères. L'appareil utilisé est une CLHP équipée avec un détecteur à barrette de photodiode (SPD-M20A Shimadzu inc., Kyoto, Japon).

#### 2.3.1.2.1. Utilisation d'une colonne C8

La séparation et la quantification des caroténoïdes sont réalisées par une colonne C8 phase inverse (Phenomenex, 3µm, 100 x 4,6 mm) thermostatée à 60°C. Le débit est fixé à 1 ml.min<sup>-1</sup> et un volume d'injection de 20 µl. L'élution est réalisée avec une phase mobile composée d'un tampon acétate d'ammonium 0,1M/méthanol (30/70%, v/v) (solvant A) et de méthanol pur (solvant B). Le gradient utilisé est présenté dans le tableau 5.

Tableau 5 : Gradient de solvants pour l'analyse CLHP de caroténoïdes avec colonne de type C8.

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	80	20
4	25	75
14	25	75
24	5	95
25	0	100
30	0	100

## Matériel et Méthodes

31	80	20
41	80	20

---

### 2.3.1.2.2. Utilisation d'une colonne C30

La séparation et la quantification des caroténoïdes sont réalisées par une colonne C30 (250 x 4,6 mm, tailles de particules 3  $\mu\text{m}$ , YMC Co, Kyoto, Japon) thermostatée à 30°C. Le débit est fixé à 1,4  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  et un volume d'injection de 20  $\mu\text{l}$ . L'élution est réalisée avec une phase mobile composée de méthanol pur (solvant A) et de MTBE (solvant B). Le gradient utilisé est présenté dans le tableau 6.

Tableau 6 : Gradient de solvants pour l'analyse CLHP de caroténoïdes avec colonne de type C30.

Tomate et carotte			Epinard et maïs doux		
Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)	Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	100	0	0	100	0
20	40	60	40	40	60
25	40	60	45	40	60
30	0	100	46	0	100
31	100	0	51	0	100
41	100	0	52	100	0
			62	100	0

#### 2.3.1.2.3. Détection et quantification

Les composés sont quantifiés à 290 nm pour le phytoène, 350 nm pour le phytofluène, 450 nm pour l'apo-caroténal, le  $\beta$ -carotène et la lutéine et 503 nm pour le lycopène. Les caroténoïdes  $\beta$ -carotène, (all-E)-lycopène and  $\beta$ -Apo8'caroténal sont identifiés par co élution de leurs standards. Les autres, et plus particulièrement les (Z)-lycopènes, sont identifiés en fonction de leur spectre UV et quantifiés en équivalent de (all-E)-lycopène (G. Britton, S. Liaaen-Jensen, 1995).

La quantification est réalisée par rapport au pic du standard interne ( $\beta$ -Apo8'caroténal). Les facteurs de réponses sont calculés pour le lycopène et le  $\beta$ -carotène avec des solutions standard. Les autres composés sont quantifiés en équivalent lycopène.

## 2.3.1.2.4. Analyse par spectrophotométrie

La quantification des caroténoïdes qui ont diffusé dans l'huile se fait par un spectrofluorimètre (N-Spectrofluorimètre SAFAS flx-Xenius-01, Safas, Monaco). Pour cela 200 µl d'huile enrichie en caroténoïdes sont transférés dans une microplaque avec une pipette motorisée multicanaux.

L'analyse est effectuée en enregistrant un spectre d'absorption entre 300 et 600 nm afin de confirmer la présence d'une espèce majoritaire (notamment lycopène ou β-carotène) et vérifier la longueur d'onde d'absorption maximale qui subit un effet hypsochrome dans l'huile. L'absorbance est ensuite relevée à cette longueur d'onde et la concentration est calculée relativement à une courbe d'étalonnage de lycopène (ou β-carotène) dans l'huile. Le blanc est réalisé avec de l'huile pure.

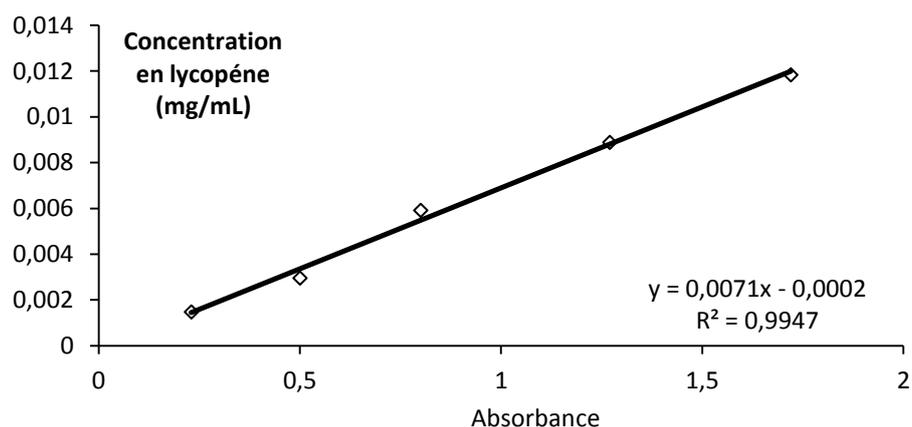


Figure 19 : Gamme d'étalonnage du spectrophotomètre pour le lycopène

La droite obtenue pour le lycopène a pour équation  $y=0,0071x-0,0002$  avec un  $R^2$  de 0,9947. Les variations observées pour la pente de la droite d'étalonnage au cours du temps sont inférieures à 2%.

### 2.3.2. Analyse des acides gras

L'analyse des acides gras de l'huile d'arachide est réalisée par chromatographie en phase gazeuse après saponification et conversion en esters méthyliques.

L'huile (20 mg) est dissoute dans 500 µl de toluène, 1 ml de  $BF_3$ /Méthanol (14% v/v) est ajouté, et le mélange est chauffé à 80°C pendant 1h.

Ensuite, 1 ml d'hexane est ajouté et le mélange est rincé avec une solution de bicarbonate à 0,2 M. La phase organique est ensuite injectée dans un GC-MS Quadripole 2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan). La colonne est une UBWAX (30 m x 0,25 mm, 0,50  $\mu\text{m}$ ), le gaz vecteur est de l'hydrogène (débit de 36  $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

L'ionisation est réalisée par impact électronique à 70 eV et les masses sont scannées de 50 à 360 unités de masse atomique à 2  $\text{scan}\cdot\text{s}^{-1}$ . L'injecteur est chauffé à 250°C et réalisé en mode split avec un ratio de 1/20. La température est programmée avec 50°C pendant une minute, 150°C pendant 10 minutes, augmentation à 230°C à 3°C.min<sup>-1</sup> pendant 5 minutes, puis augmentée à 240°C à 20°C.min<sup>-1</sup> avec un isotherme à cette température pendant 10 minutes.

## 2.4. Méthodes d'analyses physiques

### 2.4.1. Mesure de la couleur

CIE Lab (plus précisément L\*a\*b\*) est un modèle de représentation des couleurs développé en 1976 par la Commission internationale de l'éclairage (CIE). Il est une version corrigée du modèle Hunter Lab créé en 1948. Comme tous les systèmes issus du système CIE XYZ, il caractérise une couleur à l'aide d'un paramètre d'intensité correspondant à la luminance et de deux paramètres de chrominance qui décrivent la couleur. Il a été spécialement étudié pour que les distances calculées entre couleurs correspondent aux différences perçues par l'œil humain.

La composante L\* est la clarté, qui va de 0 (noir) à 100 (blanc). La composante a\* représente la gamme de l'axe vert (négative) → rouge (valeur positive) en passant par le gris (0). La composante b\* représente la gamme de l'axe bleu (négative) → jaune (valeur positive) en passant par le gris (0).

La couleur des échantillons est mesurée avec un colorimètre Minolta (modèle CR410, Konica-Minolta, Arrières sur seine, France). Il est éclairé par un flash de lumière blanche et

un capteur enregistre la lumière réfléchi. Une interface logicielle permet ensuite de donner la valeur des trois composantes de l'échantillon.

### **2.4.2. Distribution de la taille des particules**

Les tailles de particules des différents produits sont évaluées à l'aide d'un granulomètre laser Masterziser hydros S2000 (Malvern instrument, Worcestershire, UK), en mode liquide équipé d'un échantillonneur permettant l'ajout du dispersant (eau milliQ).

Cette technique permet la détermination de la distribution de la taille de particules de natures diverses présentes dans des matériaux comme des poudres, des suspensions ou des émulsions. Le principe de cet appareil repose sur l'analyse des spectres de diffraction et de diffusion de particules lors de leur excitation par un laser. Elle s'appuie sur les théories de Fraunhofer et de Mie qui relient la lumière diffractée à la taille et la nature des particules étudiées. Selon Fraunhofer, l'intensité du rayonnement diffracté et l'angle de diffraction sont fonction de la taille des particules. Pour des particules inférieures à 1  $\mu\text{m}$  il faut utiliser la théorie de Mie qui prend en compte en complément de la diffraction de la lumière, sa réflexion et sa diffusion dans le milieu.

L'analyse est faite sur l'ensemble des particules circulant devant le faisceau laser, un traitement mathématique complexe permet alors de donner le diamètre moyen et la distribution de la taille de particules selon une distribution en nombre, en volume ou en surface. Le  $d[4,3]$  correspond au diamètre moyen en volume, c'est-à-dire le diamètre moyen d'une sphère qui aurait le même volume que les particules, et le  $d[3,2]$  est le diamètre moyen en surface, il correspond au diamètre moyen d'une sphère ayant la même surface projetée que les particules.

En pratique, on établit une circulation d'eau dans laquelle sont introduits les échantillons végétaux (environ 1 g) ou quelques gouttes d'émulsion, jusqu'à obtenir une obscurité du faisceau laser d'environ 20%. Les tailles de particules sont alors calculées en fonction de la déviation de ce faisceau.

### **2.4.3. Analyse d'image**

Cette méthode permet d'analyser les particules des purées grâce à la reconnaissance automatique des éléments contenus dans l'image. L'acquisition de l'image est effectuée par une caméra couleur Pixelink 1/2" CMOS , 2048 x 1536 avec un objectif Pentax 16 mm (Elvitec, France). Cette prise d'image nécessite un éclairage le plus homogène possible. Celui-ci est assuré par un dôme et un rétro éclairage. Le dôme est un dôme de 324 mm de diamètre équipé de 480 et 240 leds DMC/ DMK 3218 (Elvitec, France) assurant l'éclairage dans les 3 canaux R, G et B, et réglé à 95% de leur puissance maximale. Le rétro éclairage est équipé de 200 x 200 leds phlox/ LRGB 200 x 200 (Elvitec, France) réglé à 50% de leur puissance. En pratique une dilution de l'échantillon est effectuée dans une boîte de pétri en verre pour la prise d'image (pour assurer une individualisation des particules pour la prise d'image).

#### **2.4.4. Degré Brix**

L'échelle de Brix sert à mesurer en degrés Brix (°B) la fraction de matière sèche soluble dans un liquide. Le Brix est calibré pour une solution de saccharose, il est mesuré avec un réfractomètre, qui mesure la déviation d'un faisceau de lumière selon la nature du milieu où il se propage.

#### **2.4.5. Teneur en matière sèche**

La teneur en matière sèche correspond au poids d'un échantillon obtenu après séchage. Environ 3g de chaque échantillon sont pesés exactement dans des cupules tarées, puis placés dans une étuve à 70°C pendant 4 jours. Après refroidissement dans un dessiccateur, les cupules sont de nouveau pesées. Le pourcentage de matière sèche est ensuite calculé par la formule :  $(\text{poids sec}/\text{poids initial}) \times 100$ .

### **3. Mesure de la biodisponibilité des caroténoïdes**

La biodisponibilité des caroténoïdes est ici mesurée comme la proportion de ces caroténoïdes qui migrent depuis la phase « légume » vers une phase lipidique (huile ou émulsion). Pour optimiser cette mesure nous avons étudié l'impact des paramètres (i) ratio phase lipidique/ phase végétale, (ii) Température, (iii) pH, ceci après avoir mis au point un mode d'agitation présentant les qualités suffisantes de stabilité et de répétabilité.

#### **3.1. Mise au point d'une méthode standard d'agitation**

Il s'agit d'obtenir un système d'agitation permettant d'avoir des résultats reproductibles de la diffusion. Dans chacun des essais une quantité X d'huile et une quantité Y de tomate sont utilisés. La température est réglée par enceinte thermostatée (étuve Memmert, VWR international, États-Unis ) à 37°C. Les prélèvements sont réalisés à des temps de 2, 5, 15, 30 et 45 minutes afin d'établir la cinétique de diffusion.

##### **3.1.1. Agitation par roue**

Des tubes Falcon de 15 ml sont utilisés. Après introduction de l'huile et du jus de tomate les tubes sont placés sur une roue (rotateur à disque, Interchim, Montluçon, France) permettant une agitation à 20 rpm. Les tubes sont ensuite prélevés au fur et à mesure de la cinétique et sont centrifugés (2 min à 10 000 g). Ceci permet donc de récupérer l'huile (surnageant) et analyser sa teneur en lycopène au spectrophotomètre.

##### **3.1.2. Agitation par barreaux aimantés**

Une deuxième technique consiste à placer des béchers de 50 ml sur un agitateur magnétique multiposte (Variomag, Thermoscientific, Waltham, États-Unis). La vitesse de rotation est fixée à 50 rpm. Au cours de la cinétique les béchers sont prélevés les uns après les autres. Le contenu est transvasé dans un tube Falcon de 15 ml afin d'être centrifugé (2 min à 10 000 g).

Une variante consiste à introduire un seul bécher de 250 ml et de faire des prélèvements de 2 ml à l'aide d'une pipette pasteur dans celui-ci au cours de la cinétique.

### **3.1.3. Agitation par Vibrax**

Un Vibrax (Vortex Vibrax, IKA, Interchim, Montluçon, France) muni d'un plateau oscillant est utilisé afin de provoquer une agitation des tubes. Différents contenants sont testés, des tubes en verre ou Falcons de 15 ml. Les tubes sont prélevés au fur et à mesure de la cinétique.

### **3.1.4. Utilisation d'un agitateur mécanique**

Un agitateur mécanique (IKA, Interchim, Montluçon, France) muni d'une hélice à trois pales de 55 mm de diamètre est utilisé à 600 rpm. L'huile et le jus de tomate sont introduites dans un bécher de 400 ml placé dans un bain marie à 37°C (Gellenkamp, VWR international, États-Unis). Des aliquotes de 2 ml sont prélevés dans des tubes Eppendorf de 2 ml. Ils sont ensuite centrifugés 2 min à 10 000 g.

Pour les besoins de l'expérimentation, un agitateur mécanique multiposte a été réalisé dans les ateliers de l'INRA afin de permettre l'agitation de 4 béchers simultanément pour améliorer la répétabilité entre deux cinétiques de diffusion.

Cet agitateur multiposte repose sur une plaque crédence munie de 5 roues crantées, une est directement reliée à l'axe moteur et les 4 autres sont munies de 4 tiges avec hélices de 55 mm de diamètre. Les 4 hélices tournent donc à la même vitesse, la roue crantée centrale est reliée au même moteur que celui utilisé avec un seul bécher.

## 3.2. Composition des émulsions

### 3.2.1. Emulsion avec Sérum Albumine Bovine (SAB)

La SAB est dissoute dans un tampon acétate ( $5 \text{ mmol.l}^{-1}$ , pH 4.7) à  $2,5 \text{ g.l}^{-1}$ . Vingt ml de cette solution et 15 g d'huile sont mélangés à l'aide d'un premier traitement avec un Ultra Turrax T25 Basic à 11 000 rpm pendant 1 min suivi d'une émulsification par ultrasons (VibraCell 75022, VWR international, États-Unis) à 30 W, 20 KHz avec 3 pulsations de 20s.

### 3.2.2. Emulsions avec Phospholipides

Les phospholipides sont dissous dans le même tampon acétate à  $5 \text{ g.l}^{-1}$ . L'huile (15 g) est mélangée à 20 ml de cette solution. L'émulsification est la même que pour l'émulsion avec la SAB, hormis le nombre de pulsations d'ultrason qui est ici de 6.

## 3.3. Paramètres étudiés

### 3.3.1. Modélisation du transfert

Les paramètres de diffusion du lycopène vers l'huile ont été déterminés par une série d'essais permettant de faire varier le ratio huile/tomate. Les proportions huile tomate suivantes 10/90, 20/80, 35/65, 50/50, 58/42, 66/33, 75/25, 85/15, 89/11, 90/10, 94/6 and 95/5 (m/m) ont été étudiées.

Le pH et la température sont ensuite étudiés:

- (i) pH 2, 3, 4,7, 5,5 et 6,5 à une force ionique constant de  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  (ces valeurs de pH correspondent au saut de pH observé dans le bolus pendant la digestion);
- (ii) température : 12, 15, 19, 26, 32, 37, 50 and 60 °C. De 12°C à 19°C, la température est régulée dans une chambre froide, et de 26 à 60 °C, avec un bain marie.

Lors de ces essais, les ratios utilisés entre l'huile et le jus de tomate sont : 50/50 et 90/10

### 3.3.2. Calcul des paramètres

#### 3.3.2.1. Facteur de partition

Les résultats de la diffusion sont exprimés en Facteur de Partition (FP), ceci représente le pourcentage de caroténoïdes ayant diffusé dans l'huile (mesure au spectrophotomètre) par rapport au pourcentage de caroténoïdes initialement présents dans le jus (mesurés par CLHP).

$$\frac{\text{Quantité de caroténoïdes ayant diffusé dans l'huile}}{\text{Quantité de caroténoïdes présents dans la matrice}} \times 100 = PF$$

Équation 1 : calcul du facteur de partition

#### 3.3.2.2. Normalisation de la diffusion

La normalisation de la diffusion permet d'évaluer la diffusivité de l'échantillon considéré. Il s'agit du rapport de la concentration de lycopène dans l'huile à chaque instant sur la concentration de lycopène dans l'huile obtenue au maximum de la diffusion.

A partir de la courbe obtenue, et de la taille des particules de l'échantillon, la diffusivité peut être calculée selon la seconde loi de Fick.

$$\frac{dC}{dt} = D \frac{d^2C}{dx^2}$$

Équation 2 : deuxième loi de Fick

#### 3.3.2.3. Méthodes

Les valeurs des coefficients des équations phénoménologiques obtenues lors des expérimentations ont été ajustées par l'utilisation du solveur excell (excel 2010) qui permet d'estimer le meilleur ajustement d'un modèle à un groupe de données en minimisant la somme des carrés des écarts entre modèle et données.

## Matériel et Méthodes

Les données ont été analysées selon le test de t (avec l'ajustement de Bonferonni) afin de tester la significativité des résultats (Student, seuil à 0,05).

## Chapitre III : Mise au point d'un test de bioaccessibilité



# Mise au point d'un test de bioaccessibilité

## 1. Optimisation du dosage des caroténoïdes

### 1.1. Extraction des caroténoïdes de la matrice

La méthode utilisée afin d'extraire les caroténoïdes de la matrice avant l'analyse CLHP est la méthode de microextraction développée par Sérino, Gomez, Costagliola, & Gautier (2009a) pour des poudres de tomates crues broyées à l'azote liquide. Une première série d'analyses a montré des problèmes de reproductibilité pour le dosage du lycopène dans des purées préparées au sein du laboratoire avec trois variétés de tomates. Ces extractions étaient réalisées sur des échantillons congelés au préalable dans des pots de 150 ml (Fig. 19).

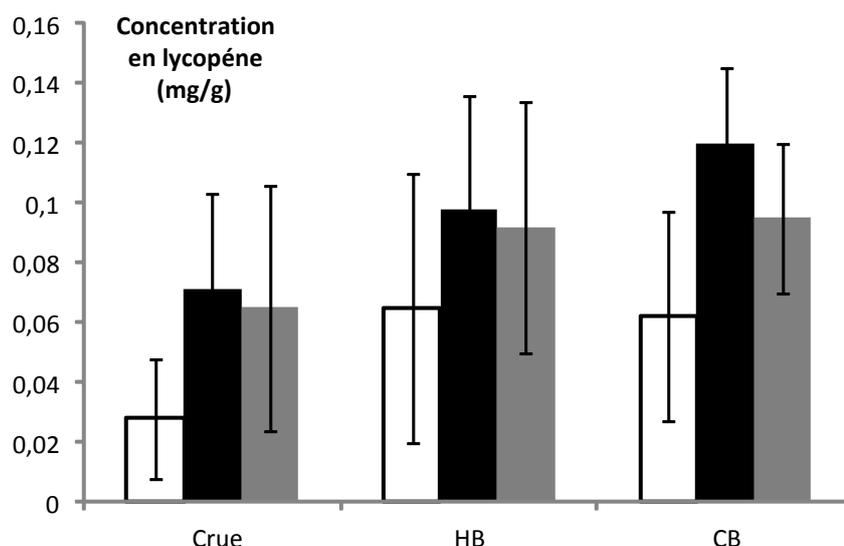


Figure 20 : Concentration en lycopène dans 9 purées, préparées par trois méthodes (crue, coldbreak, hotbreak) à partir de 3 variétés de tomates ( □ M82 ■ 925 ■ 1223) avec la méthode d'extraction de (Sérino, Gomez, Costagliola, & Gautier, 2009b). Chaque purée est fabriquée 3 fois et analysée 3 fois.

Les écarts-types sont trop grands pour permettre une quelconque analyse statistique des résultats obtenus. Plusieurs hypothèses sont possibles :

- soit il y a un problème d'homogénéité des échantillons extraits. En effet, le prélèvement étant relativement faible par rapport au volume total de

l'échantillon, des phénomènes de décantation peuvent se produire lors de la décongélation rendant ainsi l'échantillon hétérogène; de plus l'échantillon (initialement congelé) pourrait comporter des zones non encore décongelées plus riches en eau.

- soit l'extraction présente des limites. Etant appliquée ici sur une matrice végétale relativement intacte et non sur des poudres, il se pourrait que l'efficacité de l'extraction soit insuffisante.

Pour tester la première hypothèse, une homogénéisation de l'échantillon est réalisée au vortex. Cependant le temps nécessaire à la décongélation totale de l'échantillon pourrait introduire des risques d'isomérisation ou d'altération de la teneur en lycopène.

Pour tester la deuxième hypothèse, la microextraction a été comparée à une méthode classique d'extraction des caroténoïdes (Fig. 21) qui demande l'utilisation d'une plus grande quantité d'échantillon et de solvant.

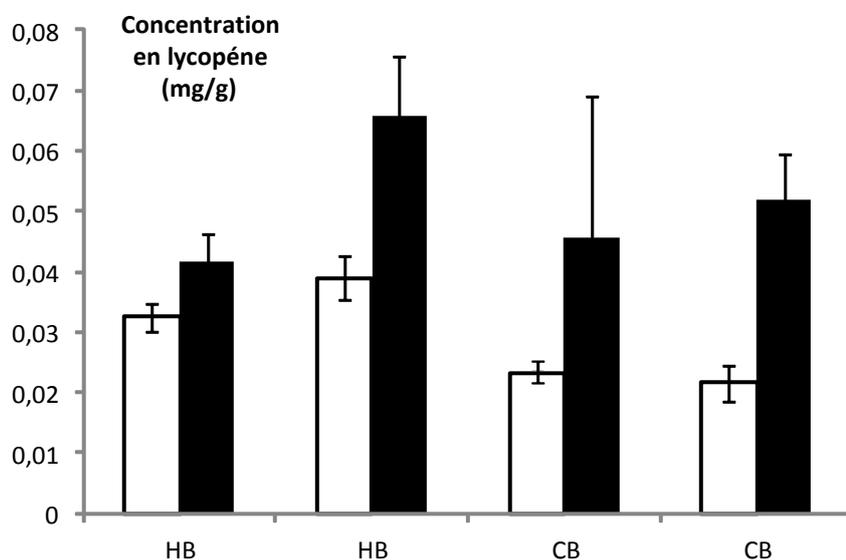


Figure 21 : Comparaison de la micro extraction et de l'extraction classique. □ : Macro extraction, ■ : Micro extraction. 2 lots de chaque purée sont réalisés. Chacun de ces lots est extrait trois fois avec chacune des méthodes d'extraction.

La concentration en lycopène a été mesurée dans 4 échantillons de purées de tomates décongelées en totalité et homogénéisées avant prélèvement. Chacune de ces purées est

séparée en 2 lots qui ont chacun été analysé 3 fois. La microextraction donne des concentrations plus élevées en lycopène, probablement parce qu'elle met en jeu des forces de déstructuration des tissus végétaux plus élevées, mais par contre avec toujours des écarts-types plus importants.

Plusieurs cycles de micro extraction sont réalisés sur un même échantillon. Il s'agit ici d'une purée HB obtenue avec la même variété de tomate que précédemment, à savoir 925. Les fractions obtenues à chacune des extractions sont analysées individuellement (Fig. 22).

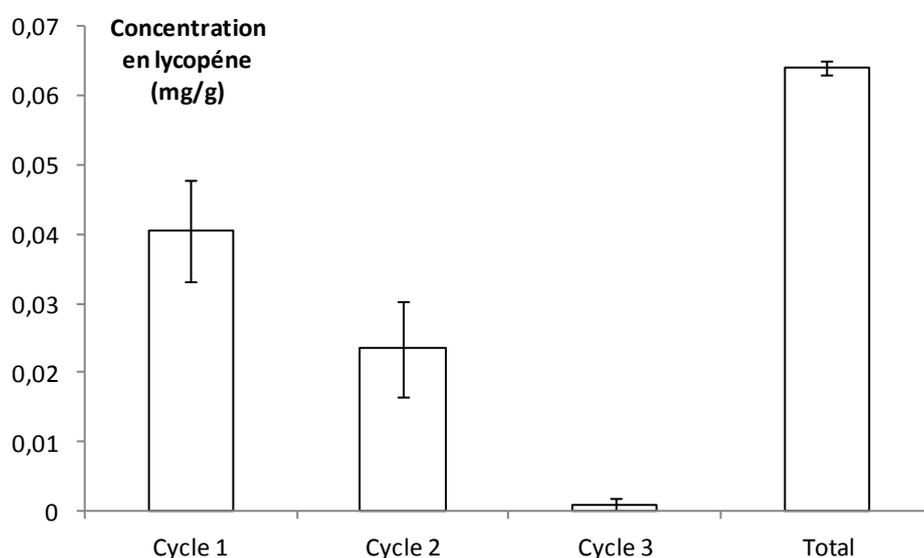


Figure 22 : Concentration de lycopène extrait de la purée de tomate CB en fonction du nombre de cycles de microextraction successifs. Chaque extraction est réalisée 4 fois.

Un seul cycle d'extraction n'est pas suffisant, en effet, lors du cycle 2 une quantité importante de lycopène (près de 1/3) est encore extraite. La quantité de lycopène extraite lors du cycle 3 est considérée négligeable. Deux cycles de micro extraction sont donc nécessaires pour extraire la quasi totalité du lycopène de l'échantillon et permettre ainsi de diminuer l'incertitude de l'analyse. Les échantillons obtenus après le premier cycle présentent un résidu de couleur rouge, ce qui n'est pas le cas des échantillons issus du 2<sup>ème</sup> cycle d'extraction.

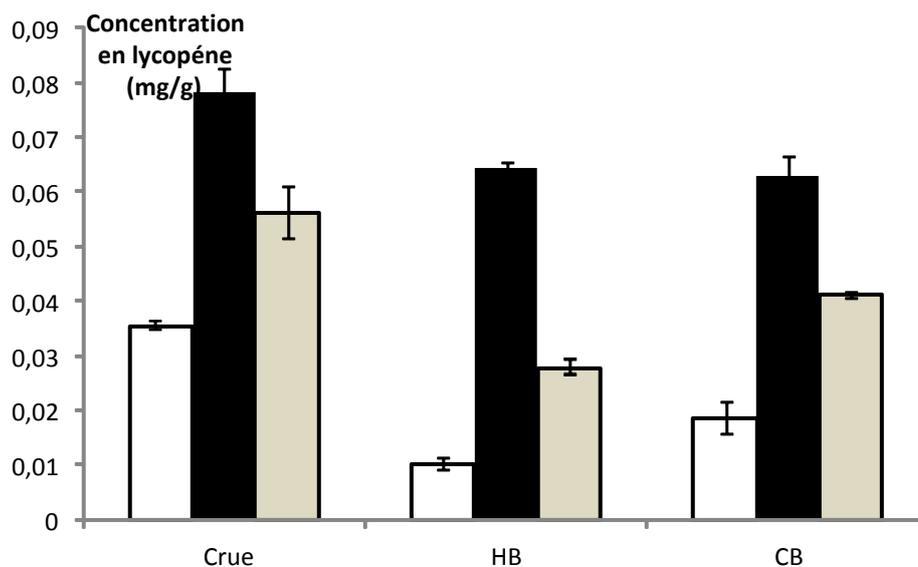


Figure 23 : Concentration en lycopène dans neuf purées de tomates, préparées par trois méthodes (crue, coldbreak, hotbreak) à partir de 3 variétés de tomates ( □ M82 ■ 925 ■ 1223) avec la méthode de microextraction optimisée. Chacune des purées est extraite par trois cycles de micro extraction.

La même analyse qu'en Fig. 20 est réalisée avec cette nouvelle méthode d'extraction. Les écarts-types sont faibles, la variation de concentration de lycopène en fonction de la variété et en fonction du traitement appliqué est ici significative. Cette technique d'extraction sera donc utilisée par la suite, avec une congélation des échantillons dans des tubes de 2 ml afin de limiter le volume à décongeler.

## 1.2. Amélioration de l'analyse CLHP

Afin de mieux caractériser les échantillons en identifiant de façon plus précise les isomères de lycopène présents initialement ou pouvant apparaître en cours de transformation, une méthode de dosage utilisant une colonne C30 est mise en place.

Cette colonne permet une meilleure résolution des pics, les seuls inconvénients étant l'utilisation de plus de solvant (Méthyl tert-butyl éther) et des temps de rétention plus longs. Ces inconvénients sont toutefois contrebalancés par une préparation plus rapide (pas de tampon) et moins de problèmes d'encrassement de l'appareil de par l'absence de tampon.

### 1.2.1. Résistance du lycopène au cours de la cuisson par micro-onde

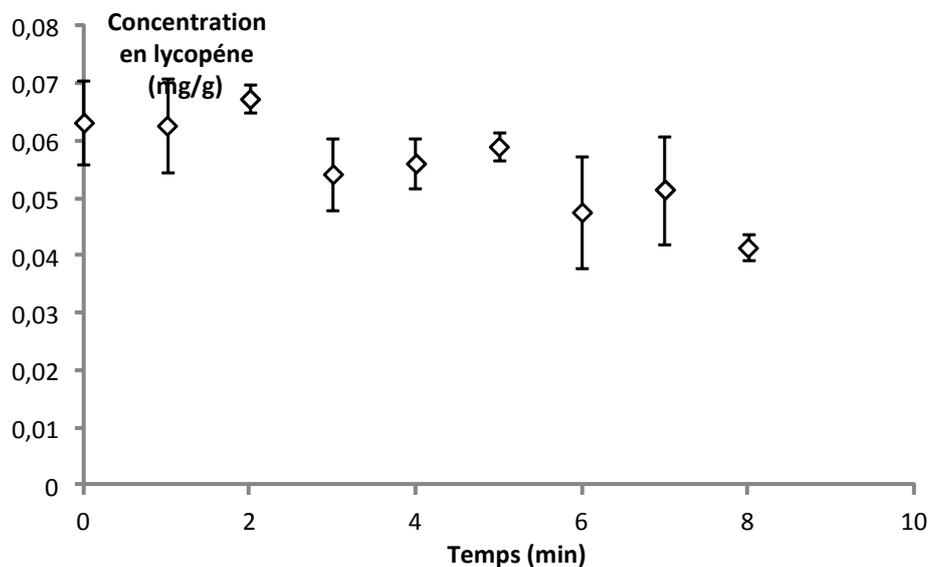


Figure 24 Evolution de la concentration en lycopène dans une purée de tomate CB en fonction de la durée de cuisson au micro-onde. Trois purées différentes sont réalisées. Chacune des purées est extraite trois fois.

Une purée de tomate issue du procédé de transformation Cold Break est préparée en laboratoire, puis traitée thermiquement dans un micro onde pour une durée totale de 8 minutes. Des prélèvements sont réalisés toutes les minutes. Le pic de lycopène trans est quantifié afin de vérifier la dégradation ou l'isomérisation de celui-ci au cours du temps, et donc en fonction de la quantité de chaleur absorbée (Fig. 24).

La répétabilité reste acceptable, et la concentration en lycopène relativement stable. En effet même si une légère décroissance est visible, les résultats ne sont pas significativement différents à l'exception du point extrême. Le lycopène contenu dans les tomates présente donc une résistance suffisante à la cuisson au micro onde pour les durées utilisées (4 min).

### 1.2.2. Dosage du lycopène dans l'huile par spectrophotométrie

Le dosage du lycopène dans la phase huile après diffusion est réalisé par spectrophotomètre. En effet, le dosage par CLHP ne s'est pas avéré possible malgré des

essais de saponification ou d'utilisation de cartouche SPE (Solid Phase Extraction) afin d'extraire les caroténoïdes de l'huile.

Cette méthode spectrophotométrique présente les avantages suivants :

- faible quantité d'échantillon nécessaire à l'analyse,
- utilisation de microplaque permettant de traiter un grand nombre d'échantillons simultanément,
- possibilité de réaliser les dosages sur les échantillons directement après prélèvement, sans phase de préparation, ce qui constitue aussi un gain de temps et limite les pertes et les erreurs.

Cependant certains inconvénients sont à prendre en compte, comme le faible volume d'échantillon et la grande sensibilité de l'appareil qui nécessitent une manipulation rigoureuse. De plus avec cette technique il n'est pas possible de réaliser des dosages des différents isomères, et donc d'identifier les comportements spécifiques.

La courbe d'étalonnage du spectrophotomètre est réalisée par dissolution du lycopène commercial directement dans l'huile d'arachide. Ceci est effectivement possible car le spectre du lycopène  $\gamma$  est identique à celui observé dans un solvant. Cette courbe d'étalonnage est contrôlée tout au long des essais afin de prévenir toute dérive. La reproductibilité est également vérifiée.

Après avoir mis en place des moyens de quantification des caroténoïdes dans l'huile et dans la matrice, il s'agit de mettre au point un test permettant d'évaluer la diffusion du lycopène de la matrice végétale vers la phase huile.

## **2. Diffusion des caroténoïdes (lycopène) dans l'huile**

L'ensemble de la mise au point est réalisée sur un lot unique de jus de tomate et d'huile d'arachide caractérisée régulièrement pour leur teneur en caroténoïdes, distribution de taille de particules et composition lipidique. Ces analyses régulières ont validé la stabilité des produits utilisés.

## 2.1. Optimisation du mode de diffusion

Le premier point qui a été optimisé est le mode d'agitation du mélange jus de tomate et huile, afin d'obtenir des diffusions répétables et reproductibles. Plusieurs modes d'agitation ont été étudiés.

- une roue à plateau permettant une agitation par retournement, réglée à 20 rpm ;
- un agitateur magnétique multiposte avec barreaux aimantés en croix de 2 cm d'axe, permettant une agitation circulaire ;
- un agitateur de type vibrax permettant une agitation par oscillation, réglé à 1500 rpm ;
- une hélice rotative de 4 cm de diamètre permettant une agitation circulaire, réglée à 600 rpm.

Différents volumes totaux (huile + jus) sont testés pour chaque condition d'agitation. La température est dans tous les cas thermostatée à 37°C, dans une étuve ou dans un bain-marie selon l'agitateur utilisé.

Le but est d'avoir une agitation homogène dans tout le récipient considéré. L'agitation doit être suffisamment efficace pour ne pas provoquer d'agrégation des particules de tomate, sans pour autant être trop importante ce qui conduirait à une destruction des particules de purée et non plus une diffusion.

Des cinétiques de 45 minutes avec prélèvements à 2, 5, 15, 30 et 45 minutes sont réalisées pour chaque dispositif. Chaque cinétique est répétée 7 fois. Après diffusion les phases huile et tomate sont séparées par centrifugation.

Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau 7, qui rassemble les pourcentages de lycopène ayant diffusé du jus vers l'huile pour les différentes conditions.

## Mise au point d'un test de bioaccessibilité

Tableau 7 : Facteur de partition (proportion du lycopène initial ayant migré dans l'huile) à 45 minutes d'agitation en fonction des conditions d'agitation, de volume total et de proportion des phases

Régulation de Température	Agitateur	Volume du contenant	Volume du		Facteur de partition*	Ecart type
			Huile	Tomate		
Etuve 37°C	Roue	15 ml	5 g	5 g	0,2	0,07
		15 ml	2 g	2 g	0,2	0,13
	Agitateur magnétique	20 ml	5 g	5 g	7,6	0,74
		20 ml	2 g	2 g	14,3	1,18
	Vibrax	300ml	150 g	50 g	-	-
		300 ml	100 g	100 g	-	-
		2 ml	0,5 g	0,5 g	17,1	1,04
		2 ml	0,5 g	0,2 g	16,1	0,10
		10 ml	2 g	2 g	16,6	0,26
		10 ml	4 g	2 g	27,9	3,53
Bain Marie 37°C	Hélice	10 ml	5 g	5 g	2,0	0,82
		400 ml	150 g	150 g	6,9	1,3
		400 ml	50 g	50 g	15,3	3,2
		400 ml	90 g	10 g	30,0	2,0
		400 ml	75 g	25 g	26,2	1,2
	400 ml	20 g	80 g	7,6	1,1	

\* à 45 minutes

Certains modes d'agitation sont inefficaces, ou présentent des variabilités trop fortes. Les résultats exprimés en facteur de partition montrent une diffusion même minimale pour la plupart des modes d'agitation. Pour l'agitateur multiposte à barreau aimanté, le bécher unique de 300 ml avec prélèvement ne permet pas d'observer de diffusion. Le vibrax et l'agitation par hélice présentent des résultats plus intéressants avec des facteurs de partition plus élevés et des écarts types plus faibles. Les cinétiques de diffusion (Fig. 24) montrent des comportements très différents selon le dispositif.

## Mise au point d'un test de bioaccessibilité

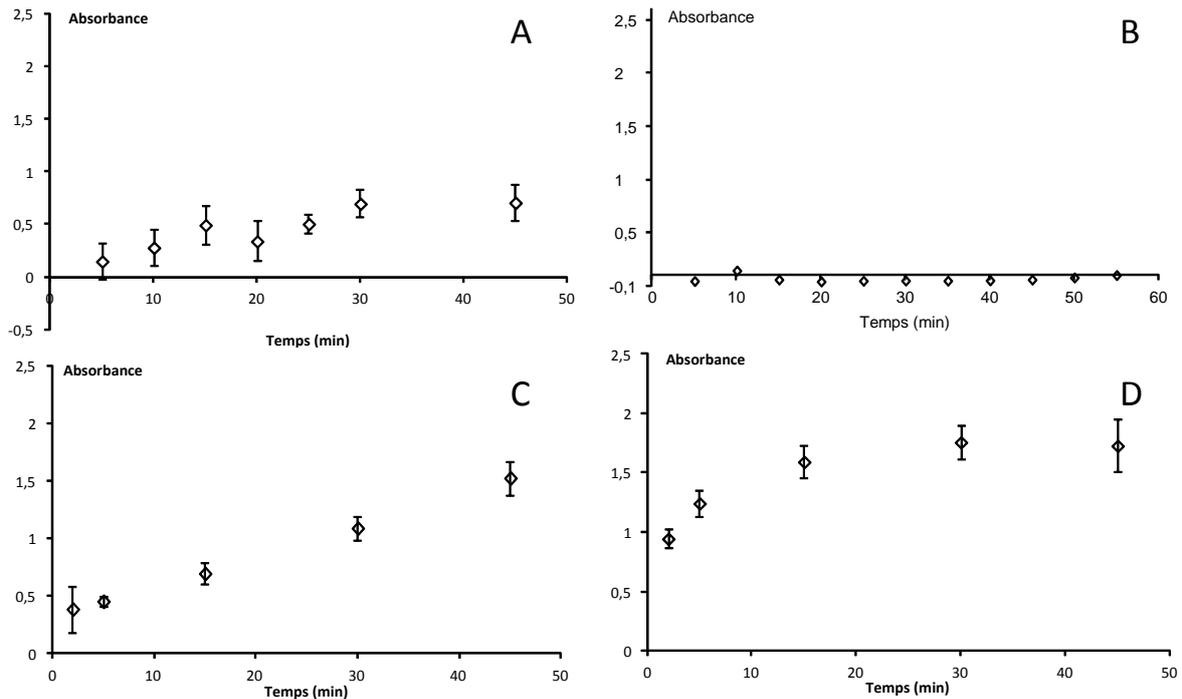


Figure 25 : Courbes de diffusion obtenues avec différents modes d'agitation. A : roue à plateau (agitation des tubes par retournement) ; B : bêcher 300 ml avec agitation par barreau aimanté ; C : tubes de 10 ml avec agitation par Vibrax (agitation par oscillation) ; D : bêchers de 400 ml avec agitation par hélice rotative. Chacune des diffusions est réalisée dans les proportions 50/50 (poids/poids).

Les résultats sont présentés en absorbance afin de comparer les 4 dispositifs (Fig. 25). La diffusion du lycopène dans l'huile est visible avec l'agitation par retournement (Fig. 25A) mais les écarts-types sont trop importants pour avoir une variation significativement représentative. Aucune augmentation de l'absorption n'est obtenue avec l'agitation par un barreau aimanté (Fig. 25B). La diffusion obtenue avec l'agitation par oscillation du Vibrax (Fig. 25C) est lente et linéaire. L'hélice rotative (Fig. 25D) permet une montée rapide de l'absorbance, et un plateau de diffusion après 30 minutes. L'agitation est ici suffisante pour provoquer une bonne diffusion du lycopène vers l'huile.

L'analyse conjointe du tableau et des graphiques fait apparaître la nécessité de travailler avec un agitateur mécanique à hélice rotative. En effet, dans ces conditions, la diffusion est optimale et reproductible. Le plateau est obtenu à 30 minutes. Cette condition et durée d'agitation seront donc utilisées.

Le tableau 7 fait aussi apparaître des variations du facteur de partition en fonction des proportions huile et jus pour une même méthode d'agitation. Il pourrait donc y avoir un effet de saturation de l'huile qu'il sera intéressant d'étudier.

## 2.2. Développement d'un agitateur mécanique multiposte

Un agitateur mécanique multiposte est réalisé sur mesure dans les ateliers de l'INRA. Il permet l'agitation de 4 béciers au lieu d'un (gain de temps et de reproductibilité). Cet agitateur est réalisé à partir de pièces mécaniques commerciales. La comparaison avec l'agitateur monoposte (Fig. 26) montre une bonne répétabilité entre les 4 positions.

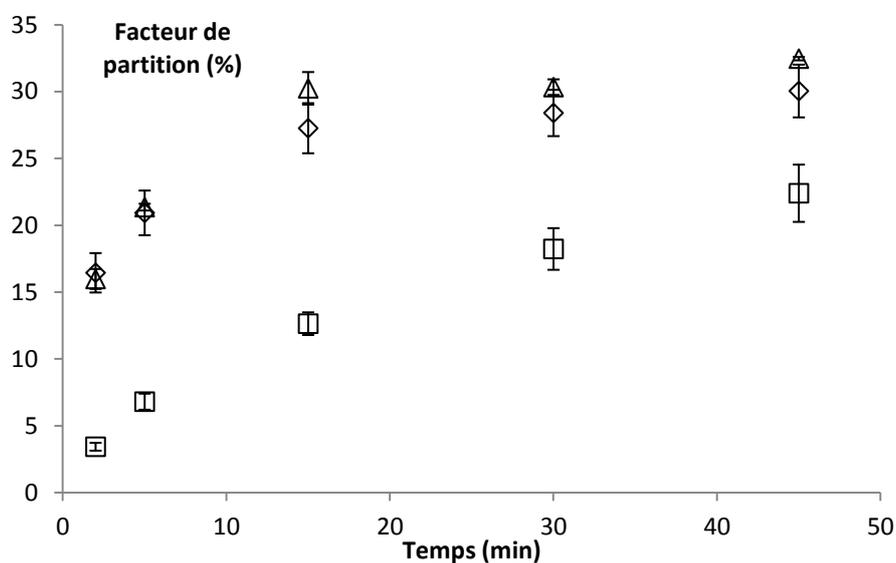


Figure 26 : Comparaison entre agitateur mécanique monoposte et multiposte. La diffusion est réalisée dans des proportions huile/jus de tomate de 50/50 (poids/poids). Trois séries de diffusion sont réalisées pour chaque agitateur. Les résultats de la totalité des diffusions pour l'agitateur multiposte sont rassemblés sur une même courbe. ◇ : Agitateur monoposte 600 rpm, □ : Agitateur multiposte 600 rpm, Δ : Agitateur multiposte 800 rpm.

Une différence est observée entre l'agitateur monoposte à 600 rpm et le multiposte à 600 rpm, elle pourrait venir de la démultiplication du moteur sur 4 bras d'agitation au lieu d'un seul. La vitesse d'agitation est donc réglée sur 800 rpm, la courbe obtenue est donc ainsi identique à l'agitateur monoposte.

Le dispositif expérimental permettant d'évaluer la diffusion du lycopène depuis une matrice tomate vers une phase lipidique consiste en 4 bécher de 400 mL thermostatés dans un bain-marie, munis d'une agitation par hélice rotative au moyen d'un agitateur mécanique multiposte. Les analyses des caroténoïdes dans la matrice sont réalisées par CLHP et ceux ayant diffusé dans l'huile sont analysés par spectrophotométrie. Par la suite ce dispositif est utilisé afin de caractériser la diffusion du lycopène dans l'huile.

### **3. Caractérisation du test de diffusion dans l'huile**

Afin de connaître les caractéristiques de la diffusion du lycopène dans l'huile, différents paramètres sont testés. Chacun est représentatif de variations pouvant être observées au cours de la préparation des aliments ou au cours de la digestion. Le ratio huile tomate est en effet fonction des conditions de préparation ou d'ingestion du repas, la quantité de corps gras pouvant être plus ou moins importante. La température peut varier au cours de la préparation du repas, et enfin le pH peut varier en fonction des conditions de préparation mais surtout au cours de la digestion. Ce sont donc trois paramètres à étudier afin de vérifier leur influence sur la diffusion du lycopène.

#### **3.1. Influence du ratio huile/tomate**

Le premier paramètre est la proportion d'huile. La figure 26 représente le facteur de partition obtenu au plateau de diffusion en fonction du ratio huile/jus de tomate.

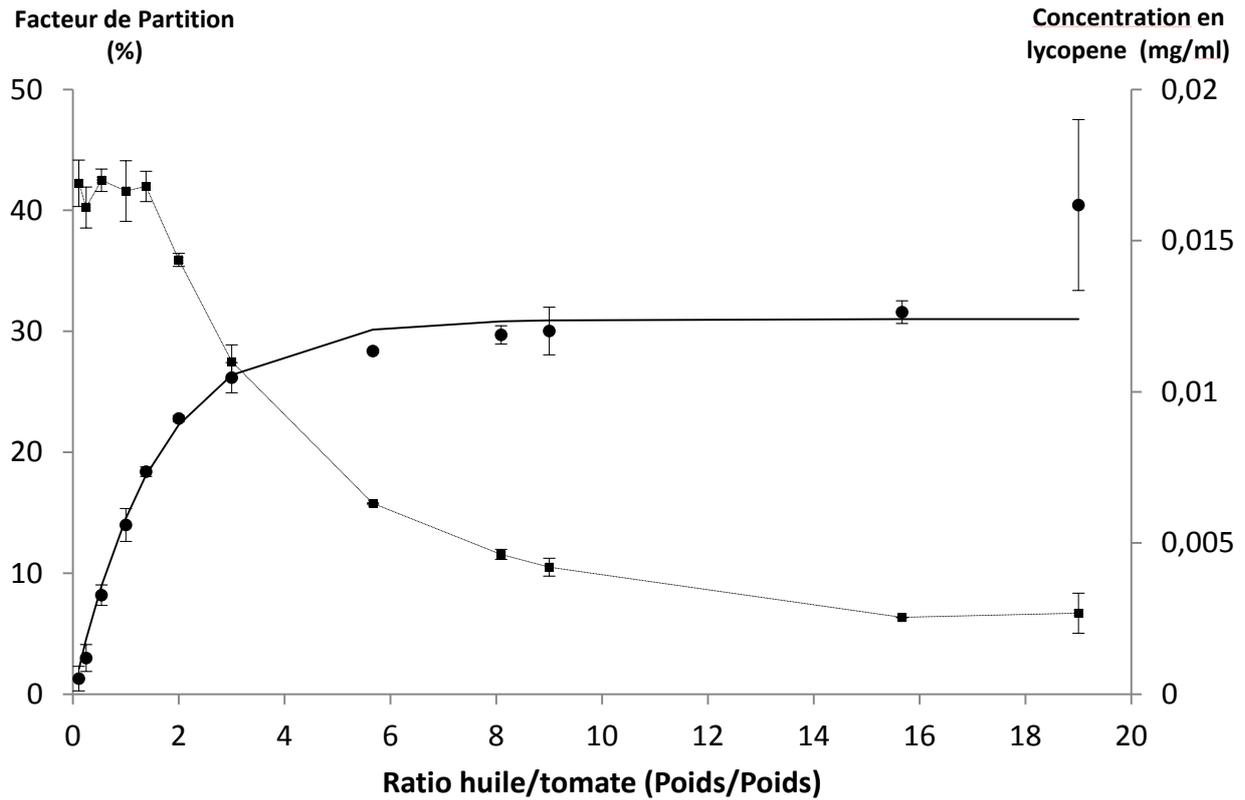


Figure 27 : Variation du facteur de partition maximal et de la concentration en lycopène dans l'huile au plateau de diffusion en fonction du ratio huile/tomate. Chacune des diffusions est réalisée 7 fois.

● Facteur de partition maximum ■ concentration en lycopène dans l'huile.

Le facteur de partition au plateau est fortement dépendant du ratio huile/tomate. Trois phases sont observées :

- le facteur de partition augmente jusqu'à un ratio de 3, avec une concentration de lycopène dans l'huile constante (environ  $18 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Il pourrait s'agir de conditions saturantes pour l'huile ;
- le facteur de partition augmente et la concentration de lycopène dans l'huile diminue ;
- Le facteur de partition atteint un maximum pour un ratio huile/tomate supérieur ou égal à 7.

Il est donc important pour la suite des essais de ne pas se placer dans des conditions saturantes afin de ne pas limiter la diffusion de la matrice vers la phase huile.

Le facteur de partition maximum observé est ici de 31%. Ce plateau correspond aux caractéristiques intrinsèques du jus. En effet la quantité d'huile est largement excédentaire et les concentrations en lycopène y sont faibles, loin de la saturation. C'est donc le jus qui présente des caractéristiques empêchant la diffusion de plus de 31% du lycopène présent.

Une courbe est calculée pour exprimer la variation du facteur de partition en fonction du ratio ( $R^2 = 0,917$ )

$$FP = FP_{max} \cdot (1 - e^{-b \frac{huile}{tomate}}) \quad \text{Eq. 2}$$

Le paramètre  $FP_{max}$  correspond au facteur de partition maximum, et le paramètre « b » varie de 0 à 1 en fonction des conditions de saturation de l'huile. Les valeurs obtenues avec le jus de tomate sont respectivement de 31% et 0,634.

L'existence d'une saturation de l'huile aux faibles ratio huile/tomate met en évidence l'importance de la proportion de matière grasse au cours de la préparation du repas ou de l'ingestion. En effet la diffusion du lycopène en dehors de la matrice peut être limitée par la quantité d'huile présente et non le produit en lui-même.

Ceci est d'autant plus important que cet effet n'est pas pris en compte dans les modèles de bioaccessibilité/biodisponibilité, alors que ceux-ci comportent souvent de faibles proportions de matière grasse. La diffusion du lycopène (et d'autres micro-constituants lipidiques) dans ces modèles pourrait ainsi être limitée par les conditions de saturation de la phase lipidique.

Cette constatation correspond aux observations réalisées par diverses équipes (Shi, 2000 ; Colle et al., 2012; Biehler, Kaulmann, Hoffmann, Krause, & Bohn, 2011) qui font état d'une augmentation de la biodisponibilité des caroténoïdes par une augmentation de la matière grasse dans les aliments.

### 3.2. Diffusivité en fonction des ratios huile/tomate

La diffusivité est calculée en fonction de la taille de particules moyenne mesurée pour le jus de tomate (350  $\mu\text{m}$ ). Les particules sont considérées sphériques. La deuxième loi de Fick peut être appliquée après normalisation des diffusions, à savoir le calcul du rapport de la diffusion normalisé par rapport au plateau final.

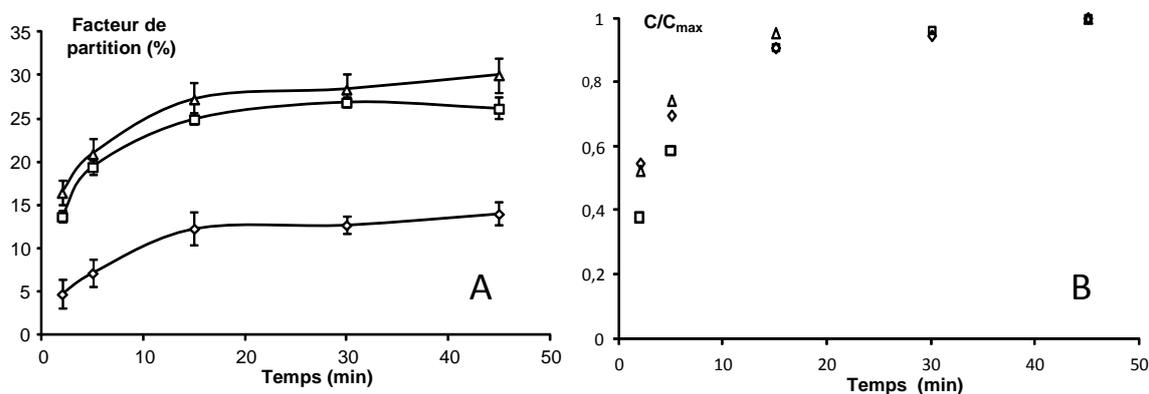


Figure 28 : Calcul de la diffusivité pour différents ratio huile/tomate. A : courbe des cinétiques ◇ : ratio huile/tomate 50/50 (poids/poids) ; □ : ratio huile/tomate 80/20(poids/poids) ; △ : ratio huile/tomate 90/10 (poids/poids) ; B : courbe des cinétiques ramenée à FPmax/FP pour chacun des trois ratio de la Fig. 9A.

Les différents ratios huile/tomate utilisés pour la diffusion aboutissent à des formes de cinétique identiques, avec comme seule modification le facteur de partition maximum obtenu (Fig. 28A).

La diffusivité calculée à partir de la normalisation des cinétiques (Fig. 28B) et de la seconde loi de Fick est de  $3.10^{-11} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$  (calculé avec une taille de particules moyenne de 350  $\mu\text{m}$ ). Elle est identique pour les trois ratios, ce qui confirme des cinétiques identiques.

Quels que soient les ratios utilisés, le facteur de partition maximum est toujours obtenu après 30 minutes de diffusion. La diffusivité reste identique pour tous les ratio huile/tomate, deux ordres de grandeur plus faible que celle du sucre de melon vers une phase aqueuse (Ferrari & Hubinger, 2008), et un ordre de grandeur plus élevé que la diffusion de lutéine de fleurs de souci vers de l'hexane (Hojnik, Skerget, & Knez, 2008), qui est connu comme étant

le solvant le plus efficace pour la dissolution des caroténoïdes (Tzouganaki & Koupparis, 2002). L'évolution du facteur de partition en fonction des ratio huile/tomate met en évidence des phénomènes de saturation de la phase huile. Ces phénomènes de saturation ne sont pas pris en compte à l'heure actuelle lors de l'utilisation des modèles de biodisponibilité/bioaccessibilité alors qu'ils peuvent influencer le pourcentage de micronutriments bioaccessible/biodisponible évalué.

### 3.3. Variation en fonction du pH et de la température

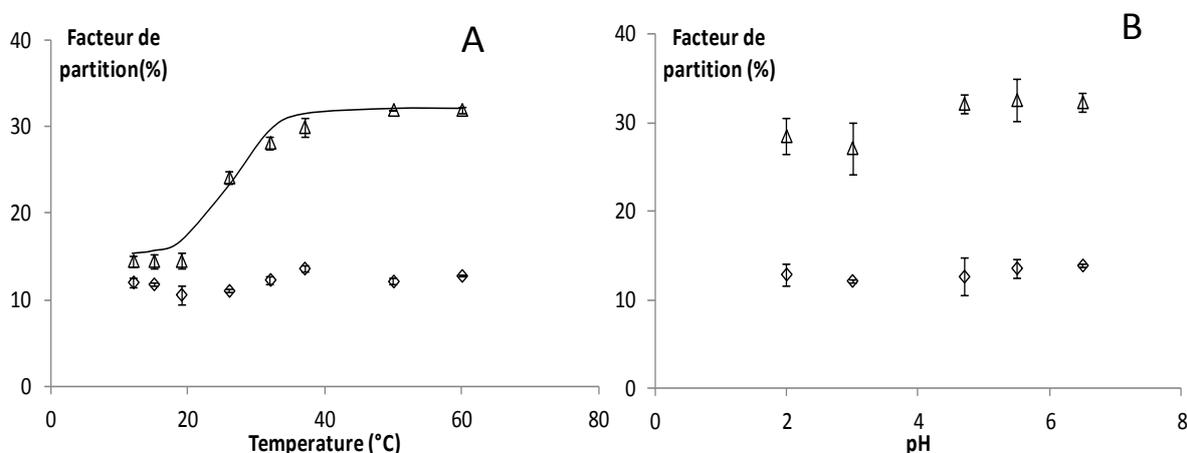


Figure 29 : Variation du facteur de partition maximum en fonction de la température (A) et en fonction du pH (B). ◇ : ratio huile/tomate 50/50 (poids/poids) ; Δ : ratio huile/tomate 90/10 (poids/poids). Une courbe est tracée seulement pour les variations significatives.

La variation de facteur de partition maximum en fonction du pH et de la température (Fig. 29) a été étudiée dans deux conditions, une condition saturante (ratio huile/tomate 50/50 poids/poids) et une condition non saturante (ratio huile/tomate 90/10 poids/poids). Une courbe a été calculée pour la seule variation statistiquement significative. Seule la variation de température en condition non saturante a une incidence statistiquement significative (Fig. 29A) avec une augmentation du facteur de partition entre 20 et 37°C. Cette courbe présente par ailleurs deux plateaux au dessus et au dessous de cette zone de variation.

Sur la Fig. 29B nous pouvons constater l'absence d'effet du pH sur le facteur de partition. Au cours de la digestion, la diffusion ne sera donc pas impactée par l'évolution du pH pouvant y être observée.

En excès d'huile la température va modifier le facteur de partition maximum avec un plateau à 12% pour des températures entre 12°C et 19°C et une augmentation du facteur de partition entre 19°C et 37°C. Cette augmentation permet de calculer une énergie d'activation pour cette partie de la courbe de  $E_a = 35,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$ . Enfin la dernière partie de la courbe correspond à un plateau à 31% pour les températures supérieures à 37°C. Les faibles valeurs pour les faibles températures peuvent être expliquées par la structure ou la viscosité de l'huile à cette température, ou aussi par la structure des membranes des organites présents, ou des complexes protéiques dans lesquels le lycopène est présent.

La température utilisée dans la plupart des modèles de digestion est aux alentours de la température physiologique, donc 37°C (Garrett et al., 1999 ; Fernando Granado-Lorencio et al., 2007). La température ne présente donc pas un facteur limitant dans ces modèles. De même, lors de la transformation industrielle ou en cuisine, la température est au dessus de ces valeurs et n'introduit donc pas de limitation.

La diffusion vers une phase huile est cependant loin des conditions de composition du bol alimentaire. Il est donc décidé de mettre en place en utilisant le même mode d'agitation et les mêmes conditions de ratio huile/tomate un test faisant intervenir des émulsifiants. Deux émulsifiants sont choisis, une protéine animale, la Sérum Albumine Bovine (SAB), et des phospholipides du jaune d'œuf (PL). Ces deux émulsifiants forment des interfaces différentes et peuvent avoir ainsi des propriétés différentes.

### **3.4. Développement d'un modèle émulsionné.**

Les émulsions devront :

- avoir des tailles de gouttelettes proches de celles observées dans l'estomac. Dans l'estomac les gouttelettes d'huile ont des diamètres d'environ 10  $\mu\text{m}$  (Armand et al., 1999) ;
- présenter des stabilités suffisantes avec un temps de crémage suffisamment long pour permettre la cinétique de diffusion ;

- avoir un ratio huile/tomate ajusté en fonction de la quantité de tampon nécessaire pour obtenir des conditions similaires à celles du §3.3 ;
- pouvoir être déstabilisées en libérant une quantité d'huile suffisante pour être prélevée et permettre des mesures ;
- avoir des conditions d'émulsification optimisées.

### 3.4.1. Utilisation de la Sérum Albumine Bovine

La Sérum Albumine Bovine est choisie car elle est couramment utilisée, c'est un produit commercial et facilement disponible. Le volume de travail pour réaliser les émulsions est fixé à 20 ml ce qui permet l'utilisation d'une sonde à ultrasons. Le milieu aqueux est un tampon acétate de sodium 5mM à pH 4,7.

La récupération de l'huile en fin d'expérience a nécessité l'essai de plusieurs techniques. En effet, les émulsions présentent une stabilité suffisante pour la durée des essais mais sont ensuite difficiles à casser en fin de diffusion. Les émulsions sont donc prélevées puis passées au froid à -20°C pendant 1h avant d'être centrifugées à 10 000 g pendant 15 minutes.

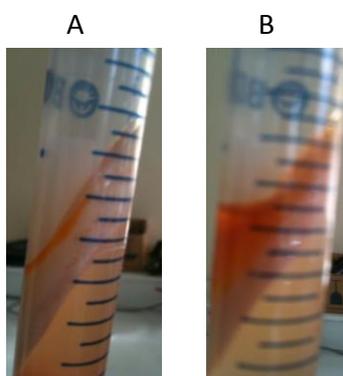


Figure 30 : Récupération de la phase huileuse d'émulsions stabilisées par la sérum albumine bovine. A : émulsion centrifugée à 10 000 g pendant 20 minutes ; B : émulsion congelée à -20°C pendant 1h puis centrifugée à 10 000 g pendant 15 minutes.

La figure 30 illustre la différence de comportement d'une émulsion ayant subi une phase de congélation par rapport à une émulsion centrifugée avec la même durée. Dans la première (A), l'huile reste emprisonnée dans l'émulsion et n'est donc pas récupérable, ce qui n'est pas le cas de l'émulsion dans (B).

Les paramètres pouvant être modifiés sont :

## Mise au point d'un test de bioaccessibilité

- le pourcentage d'huile introduite dans le milieu ;
- la concentration de SAB ;
- la durée de sonication.

Une pré-émulsification est réalisée dans tous les cas par une agitation dispersive (ultraturrax) pendant 1 min à 13000 rpm. Des essais préliminaires ont permis de définir des bornes dans lesquelles les émulsions pouvaient présenter une stabilité suffisante, et un pourcentage de récupération de l'huile en fin d'expérimentation suffisamment important. A partir de ces premiers essais un plan expérimental a été réalisé pour identifier les conditions optimales (tableau 8).

Tableau 8 : Plan expérimental de développement d'une émulsion avec de la sérum albumine bovine

		Niveaux		
Facteur		-1	0	1
1	Nombre de traitements de 20s d'ultrasons	1	2	3
2	Concentration de SAB (g/l)	1,250	2,5	5
3	Rapport huile/tampon	0,25	0,375	0,70

Les émulsions ainsi générées sont caractérisées en prenant en compte la stabilité (temps visuel de séparation des phases), la taille des particules et le pourcentage d'huile récupéré en fin d'expérience. Seules les émulsions avec 7,5 et 15 g d'huile ont présenté une stabilité suffisante, et sont présentées dans le tableau 9.

## Mise au point d'un test de bioaccessibilité

Tableau 9 : Conditions de préparation des émulsions avec la SAB, pourcentage de récupération d'huile et taille des particules (d 3 ;4)

<i>Huile (g)</i>	Tensio- actif (g/l)	US (Nb x 20 s)	Stabilité (min)	Récupération (%)	Taille des particules ( $\mu\text{m}$ )	
7,5	1,25	1	< 5			
		2	< 5			
		3	16	67		
	2,5	1	< 5			
		2	< 5			
		3	>21	63		
	5	1	< 5			
		2	32	26		
		3	38	18		
15	1,25	1	< 5			
		2	< 5			
		3	45	82	50,3	
	2,5	1	< 5			
		2	> 15			
		3	120	84	10,3	
	5	1	< 5			
		2	> 15			
		3	90	74	1,4	

Seules quelques émulsions présentent une stabilité suffisante. Parmi celle-ci, 5 seulement permettent une récupération de l'huile supérieure à 60%. La taille des particules permet de choisir l'émulsion réalisée avec 15 g d'huile, 2,5 g/l de SAB dans le tampon et 3 pulsations de 20 s d'ultrasons. La stabilité de cette émulsion est vérifiée par granulométrie.

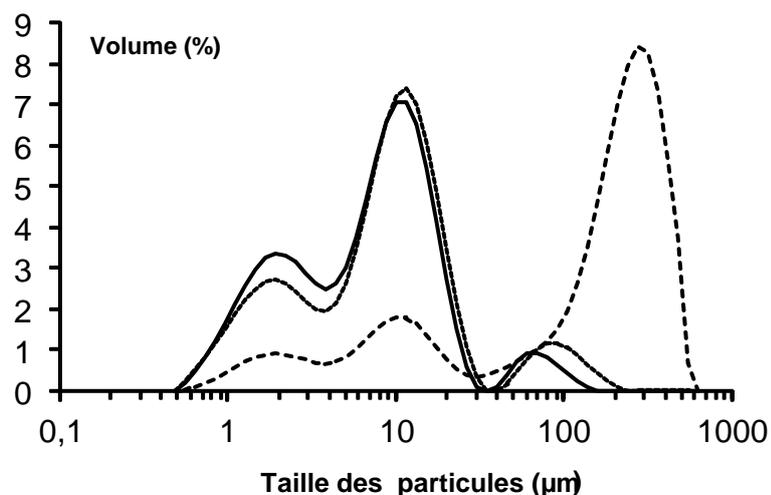


Figure 31 : Stabilité de l'émulsion au cours du temps. La ligne pleine correspond à t=0, les pointillés à t=60 min et les pointillés larges à t=120 min.

La taille des particules (Fig. 31) ne varie pas au cours de la première heure. L'émulsion est donc stable suffisamment longtemps pour réaliser les essais de diffusion.

### 3.4.2. Utilisation de Phospholipides

L'émulsion avec les phospholipides est donc mise en place en repartant des conditions ci-dessus. Les conditions restent les mêmes au niveau du tampon et de la quantité d'huile introduite.

Les mêmes caractéristiques sont recherchées pour cette émulsion et les mêmes facteurs étudiés. Le tableau 10 présente les résultats pour les émulsions réalisées avec les phospholipides du jaune d'œuf.

## Mise au point d'un test de bioaccessibilité

Tableau 10 : Conditions de préparation et caractérisation des émulsions avec les phospholipides, pourcentage de récupération d'huile et taille des particules

<i>Huile</i> (g)	Tensio actif (g/l)	US (Nb x 20 s)	Stabilité (min)	Récupération (%)	Taille des particules ( $\mu\text{m}$ )
PL					
15	20	6	<5		
		7	18	65	50,3
		8	42	72	19,3
30	30	6	<5		
		7	<5		
		8	55	70	26,9
40	40	6	<5		
		7	<5		
		8	80	92	8,3
60	60	6	<5		
		7	90	89	6,8
		8	95	87	2,3

Cinq émulsions présentent une stabilité suffisante pour réaliser les essais de diffusion. Parmi celles-ci seules 3 permettent une récupération de l'huile supérieure à 80%. La taille des particules permet de choisir l'émulsion réalisée avec 15 g d'huile, 60 g/l de PL dans le tampon et 8 pulsations de 20 s d'ultrasons.

### 3.5. Utilisation du modèle émulsifié

Les deux systèmes émulsifiés étant développés et au point, la partie suivante consiste donc en la confrontation de ces systèmes au jus de tomate afin de vérifier l'impact des émulsifiants sur la diffusion. L'impact des ratios huile/tomate sera tout particulièrement étudié.

### 3.5.1. Influence du ratio huile/tomate

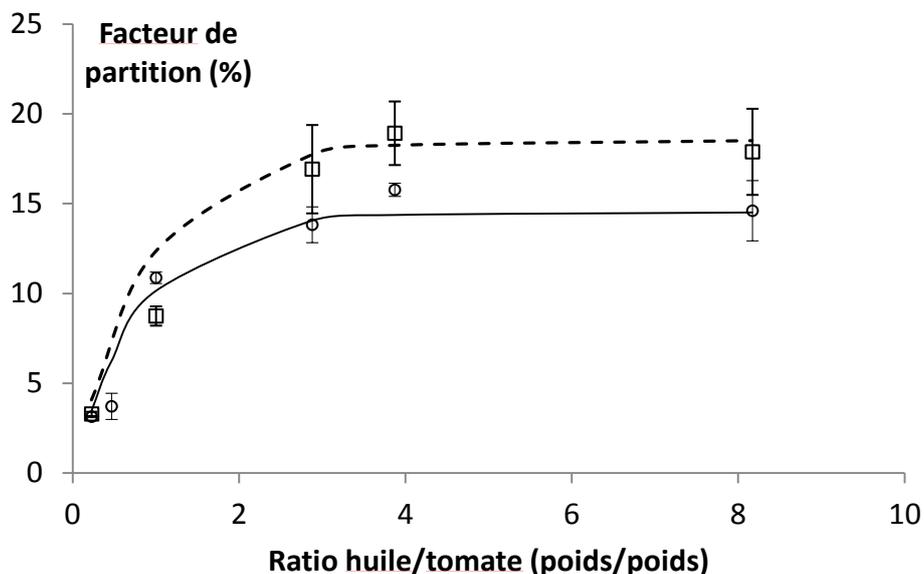


Figure 32 : Evolution du facteur de partition maximal en fonction du ratio huile tomate. ○ : émulsion avec SAB, □ : émulsion avec PL.

L'évolution des facteurs de partition avec le ratio huile/tomate (Fig. 32) suit la même logique que celle observée lors de la diffusion dans l'huile, avec une phase d'augmentation du facteur de partition suivie d'un plateau. L'équation obtenue pour la courbe avec l'huile peut être ainsi appliquée. Pour la SAB nous avons ainsi  $FP_{\max} = 14,5\%$  et  $b = 1,2$  ( $R^2 = 0,942$ ) et pour les PL,  $FP_{\max} = 18,5\%$  et  $b = 1,1$  ( $R^2 = 0,919$ ). Le paramètre  $b$  lié à la saturation est donc très proche pour les deux émulsions. Par contre la valeur du plateau varie de plus de 4% et en terme de cinétique de transfert les comportements sont très différents (Fig. 33), avec une diffusion presque instantanée dans le cas de l'émulsion stabilisée par SAB, et une diffusion plus longue dans le cas d'une émulsion stabilisée avec les PL.

La diffusivité obtenue avec les PL est de  $7,6 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , avec la SAB la diffusivité ne peut être calculée car le plateau est obtenu dès la mise en contact avec le jus de tomate.

Les facteurs de partitions maximaux obtenus avec les deux émulsifiants (eux-même différents entre eux) sont différents et plus faibles que ceux obtenus avec l'huile seule. De plus la diffusivité dans l'émulsion avec les PL est plus faible d'un ordre de grandeur que celle

observée dans l'huile. Les PL et la SAB modifient donc le transfert du lycopène de la matrice végétale vers l'huile.

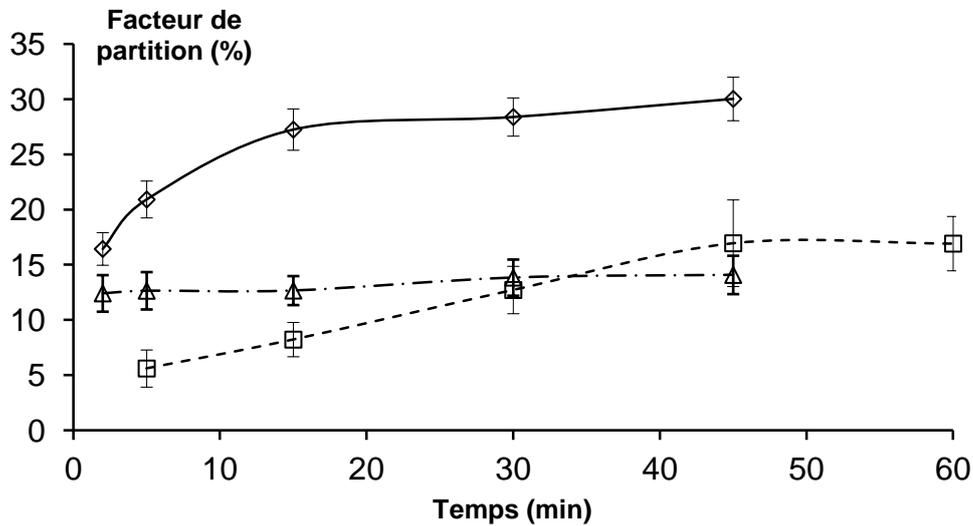


Figure 33 : Comparaison des cinétiques de diffusion dans l'huile et les émulsions stabilisées par Sérum Albumine Bovine, Phospholipides. ◇ : huile, Δ : SAB, □ : PL.

### 3.5.2. Influence du mode d'introduction du tensio-actif

Afin de mieux comprendre l'effet de la SAB sur le facteur de partition, différentes façons de l'ajouter dans le milieu sont testées :

- Ajout du tampon (phase aqueuse supplémentaire) dans le milieu huile/tomate ;
- Introduction de la SAB dissoute dans le tampon. Celle-ci est connue pour être capable de fixer des composés lipidiques (Wackerbarth, Stoll, Gebken, Pelters, & Bindrich, 2009) ;
- Introduction de la SAB dissoute dans le tampon et mise en émulsion par la sonication.

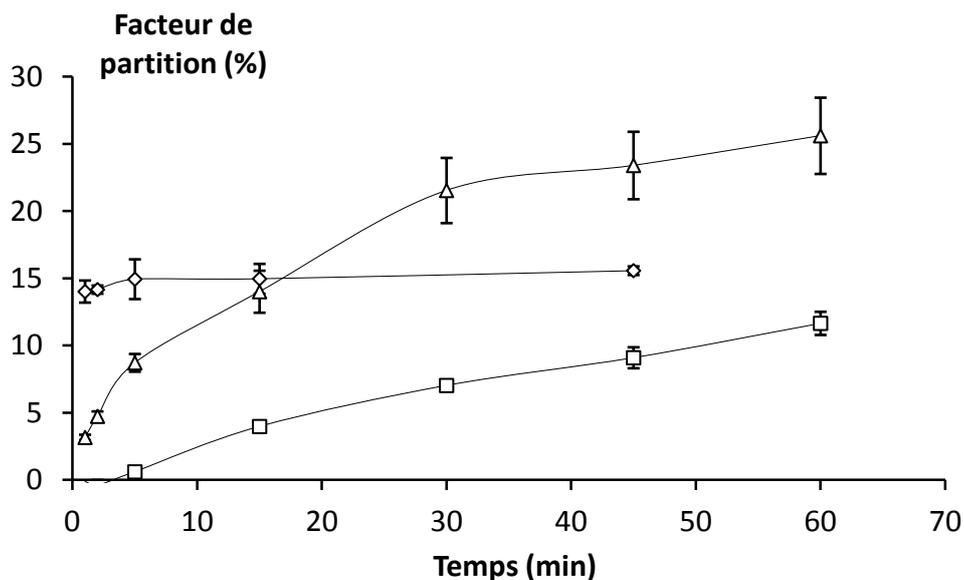


Figure 34 : Impact de la présence et du mode d'introduction de la SAB sur la diffusion du lycopène vers une phase huile, une phase tampon, une phase avec SAB sans émulsification et une phase SAB avec émulsification. Δ : huile et tampon, □ : huile, tampon et SAB, ◇ : huile, tampon SAB et émulsification par ultrasons.

L'ajout de tampon au mélange jus de tomate/huile ne modifie pas la cinétique, par contre l'ajout de SAB sans émulsification provoque une baisse du facteur de partition et une diminution de la vitesse de diffusion qui allonge la cinétique de diffusion.

L'interaction du lycopène avec la SAB a donc des effets marqués sur la diffusion vers l'huile : la présence de SAB empêche une fraction du lycopène de passer dans la phase huile probablement parce qu'il est fixé par les molécules de SAB dans la phase aqueuse.

Avec les PL, le facteur de partition reste plus élevé de 4% qu'avec la SAB mais plus faible qu'en l'absence d'émulsifiant. L'effet est moindre mais il y a toujours une inhibition et un ralentissement de la diffusion vers l'huile. Les PL introduiraient dans le milieu une barrière supplémentaire à franchir pour le lycopène avant de diffuser dans l'huile.

### 3.6. Influence du mode de préparation des purées

Au cours de ces essais les tomates sont transformées selon 3 procédés distincts. Deux des procédés sont validés (Anthon & Barrett, 2010) comme permettant de mimer les procédés industriels Hot Break (HB) et Cold break (CB) qui se différencient par la succession des étapes de broyage et de chauffage et les conditions de température.

Dans le procédé HB un broyage « à chaud » est réalisé, théoriquement dans des conditions de température supérieure à 90 °C. Le seul mode de chauffage permettant d'obtenir rapidement une telle température à cœur au laboratoire est le micro-onde. Il permet d'éviter les transferts de chaleur à partir de parois chaudes, limitant en termes de vitesse de montée en température. Le deuxième procédé utilisé est le procédé CB, dans lequel un broyage « à froid » est réalisé et permet l'action des enzymes (principalement Pectinéméthyl estérase et Polygalacturonase).

Dans les deux cas la quantité de chaleur appliquée aux échantillons reste identique ; la durée de cuisson est adaptée à la masse, et la puissance du micro-onde constante. La purée générée avec le troisième protocole, dénommée purée RAW, est issue seulement d'un broyage des échantillons, sans apport de chauffage. Ces purées sont ensuite mises au contact avec de l'huile d'arachide afin de réaliser une diffusion du lycopène vers cette huile.

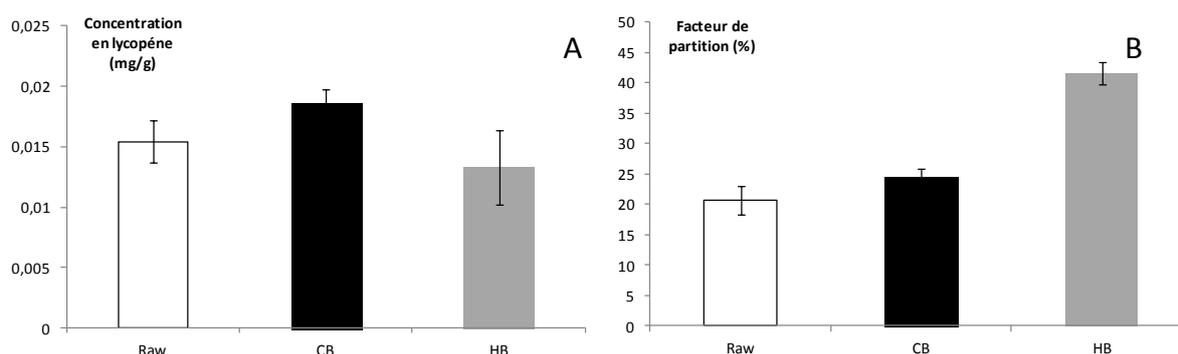


Figure 35 : Comparaison de l'effet des traitements thermiques sur la concentration en lycopène et le facteur de partition de purée de tomate préparée à partir de tomates commerciales. (A) comparaison des concentrations, (B) Facteur de partition après diffusion dans l'huile. ratio huile/tomate 90/10 (poids/poids). Chaque purée est préparée deux fois et chacune des purées est analysée trois fois et subit trois fois le test de diffusion.

Les concentrations en lycopène pour les trois purées ne présentent pas de différences statistiquement significatives (Fig. 35A). Le traitement thermique appliqué n'affecte donc pas leur teneur en lycopène. La diffusion est nettement plus élevée lors de l'utilisation du procédé HB (Fig. 35B). Les facteurs de partition des purées Raw et CB ne présentent pas de différences statistiquement significatives (Fig. 35B). Le procédé HB modifie de façon importante les propriétés de diffusion du lycopène présent dans la purée de tomate.

#### **4. Conclusion**

Ce test de bioaccessibilité permet d'évaluer la diffusion du lycopène depuis une matrice vers une phase huile. Il a permis de démontrer l'influence de la quantité d'huile sur la diffusion et la nécessité de se placer dans des conditions non saturantes. L'influence de la quantité d'huile dans les tests de biodisponibilité a été étudiée récemment par Colle et al., (2012). Ces auteurs ont utilisé un modèle classique de digestion en deux étapes (contenu gastrique et intestin grêle) avec des purées de tomates additionnées de différentes huiles végétales (différents acides gras) et en différentes proportions. Dans ce modèle l'ajout de 5% de lipides augmente considérablement la bioaccessibilité. Ces 5% d'acides gras peuvent provoquer un déplacement de l'équilibre du modèle gastrique utilisé et ainsi permettre une meilleure diffusion des caroténoïdes contenus dans les purées de tomate.

Les résultats de la diffusion exprimés en facteur de partition permettent d'évaluer de façon efficace la diffusion du lycopène d'une phase tomate vers une phase huile et ainsi donner un indicateur qualitatif de la valeur nutritionnelle du produit.

Lors de l'utilisation d'émulsions, le facteur de partition obtenu est plus faible. L'interaction possible entre les émulsifiants et le lycopène peut expliquer ce phénomène. La SAB pourrait former un complexe avec le lycopène pouvant à la fois accélérer le transfert vers la phase lipidique et fixer certaines molécules en solution aqueuse. Un tel complexe a déjà été décrit (Wackerbarth et al., 2009) .

La diffusion rapide du lycopène vers la phase huile avec l'émulsion stabilisée par la SAB pourrait mettre en évidence une population de lycopène libre dans la matrice et non soumis à des contraintes physiques d'encapsulation. En effet, la présence de limites physiques à la

diffusion du lycopène introduirait un ralentissement et rendrait ainsi possible le calcul de la diffusivité.

Le ralentissement du transfert en présence de phospholipides a déjà été décrit (Marisiddaiah & Baskaran, 2009), et pourrait être expliqué par la formation d'une interface avec un effet barrière.

Ces travaux ont permis de dégager des facteurs à prendre en considération lors de l'utilisation de modèle de digestion *in vitro*. En effet, les émulsions avec des protéines ou des phospholipides sont à l'heure actuelle largement utilisées dans les modèle *in vitro* (Reboul et al., 2006; Fernández-García, Carvajal-Lérida, & Pérez-Gálvez, 2009). La bioaccessibilité calculée pourrait donc ne pas être le seul fait des propriétés du produit alimentaire (la capacité à laisser diffuser les caroténoïdes) mais pourrait être aussi liée à des interactions avec des émulsifiants présents dans le milieu.

Les différences de diffusion des purées issues de différents procédés en laboratoire montrent la capacité du modèle à différencier les échantillons. Dans une deuxième partie du travail ce modèle va être utilisé avec des échantillons générés en halle pilote et présentant des caractéristiques de transformation variées.



## **Impact des procédés industriels sur la diffusion du lycopène**



# Impact des procédés industriels sur la diffusion du lycopène

## 1. impact des procédés de stabilisation sur la concentration en lycopène et sa diffusion dans une phase huile.

Dans cette partie va être développé un essai préliminaire ayant pour but de vérifier l'impact des procédés de stabilisation lors de fabrication d'échantillons de produits à base de tomate.

Les purées de tomates sont préparées en mimant les procédés HB et CB selon les méthodes présentées au §3.4 du chapitre 1, puis stabilisées soit par surgélation, soit par pasteurisation. Cette dernière est effectuée dans les locaux et selon les indications du CTCPA d'Avignon.

### 1.1. Plan expérimental

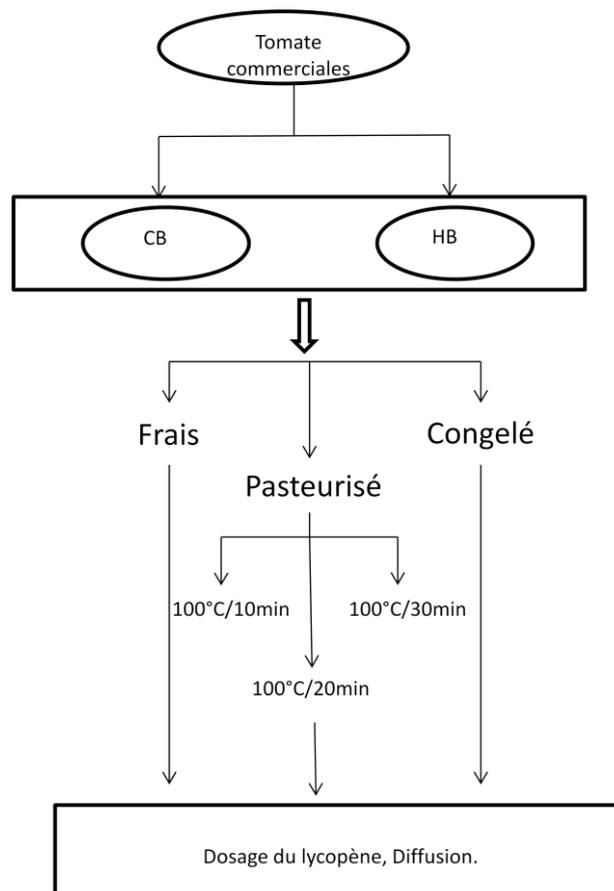


Figure 36 : Schéma d'expérimentation pour évaluer l'impact du procédé de stabilisation sur la teneur en lycopène de produits réalisés à base de tomate et sur la diffusion du lycopène.

Deux purées différentes HB et BC sont réalisées à partir de tomates grappes commerciales visuellement mures. Les purées sont réalisées par chauffage au micro-onde sans et avec broyage au préalable. Chaque purée est ensuite stabilisée soit par surgélation et congélation dans une chambre froide à  $-20^{\circ}\text{C}$ , soit par pasteurisation par ébullition pour un temps allant de 10 à 30 minutes à partir du début de l'ébullition de l'eau.

Les diffusions sont réalisées avec des ratios huile/ jus de tomate en accord avec les résultats du chapitre 1, présentant des conditions non saturantes pour l'huile (ratio de 9), et une température de  $37^{\circ}\text{C}$ .

Tableau 11 : Concentration en lycopène dans des purées HB et CB avant et après stabilisation et facteur de partition de ces purées dans les tests huile, SAB et PL

Types de purées	Concentration en lycopène (mg/kg)	Pourcentage d'isomérisation	FP huile (%)	FP SAB (%)	FP PL (%)
CB					
Non stabilisée	98 ± 19	3,22 ± 0,12	23 ± 2	11 ± 3	15 ± 3
Surgelées	92 ± 18	3,22 ± 0,09	28 ± 3	12 ± 4	18 ± 3
Pasteurisée 10 min	65 ± 17	3,26 ± 0,17	27 ± 5	11 ± 2	17 ± 2
Pasteurisée 20 min	66 ± 15	3,35 ± 0,16	30 ± 4	13 ± 1	20 ± 2
Pasteurisée 30 min	72 ± 22	3,88 ± 0,06	29 ± 4	14 ± 5	18 ± 2
HB					
Non stabilisée	82 ± 12	2,90 ± 0,14	38 ± 4	21 ± 2	26 ± 1
Surgelées	74 ± 23	3,90 ± 0,116	36 ± 2	25 ± 3	31 ± 1
Pasteurisée 10 min	62 ± 26	4,02 ± 0,11	40 ± 3	24 ± 4	28 ± 2
Pasteurisée 20 min	68 ± 19	3,78 ± 0,22	38 ± 3	26 ± 2	34 ± 3
Pasteurisée 30 min	61 ± 25	4,15 ± 0,25	40 ± 4	24 ± 5	30 ± 2

Le Tableau 11 présente l'ensemble des résultats des dosages et des facteurs de partition maximum obtenus pour les purées HB et CB non stabilisées et stabilisées. Chacun des dosages est réalisé à partir de 3 purées différentes elles-mêmes analysées 3 fois chacune.

Les facteurs de partition exprimés ici sont les facteurs de partition maximum obtenus lors de la diffusion.

## **1.2. Dosage du lycopène dans les purées**

Le lycopène est dosé dans les purées HB et CB non stabilisées, directement après fabrication. Les purées HB et CB ont des concentrations en lycopène proche, aucune différence significative n'est observable entre les deux (tableau 11), et le pourcentage d'isomérisation du lycopène reste faible (tableau 11). La variation de concentration en lycopène entre des purées HB et CB a été étudiée récemment (Page, Van Stratum, Degrou, & Renard 2012), et fait apparaître des écarts faibles mais statistiquement significatifs, avec un taux de lycopène plus faible pour la purée HB. Ceci pourrait être expliqué par la variation de concentration en lycopène entre les différentes tomates utilisées pour réaliser les purées. La similitude des concentrations en lycopène dans les deux sortes de purée est cependant conforté par Gupta, Kopec, Schwartz, & Balasubramaniam (2011) qui démontrent qu'une purée issue d'un traitement HB et une purée issue d'un procédé sans traitement thermique ont une concentration en lycopène identique.

Afin de vérifier l'effet du traitement de stabilisation sur la teneur en lycopène de chaque purée, le test de comparaison de moyenne multiple (ajustement de Bonferroni) a été utilisé séparément sur les deux purées. La pasteurisation ne diminue pas de façon significative le taux de lycopène pour les purées HB. La teneur en lycopène de la purée CB non stabilisée n'est pas significativement différente de celle des purées stabilisées. Il n'y a donc pas d'impact de la stabilisation par pasteurisation sur la teneur en lycopène des purées. Ces résultats sont en accord avec des études récentes (Colle, Lemmens, Van Buggenhout, Van Loey, & Hendrickx, 2010 ; Colle et al., 2010) démontrant la stabilité du lycopène dans des purées de tomates lors de traitement thermique. Une perte minimale n'est observée que pour des températures supérieures à 130°C.

La pasteurisation bien qu'introduisant une étape de chauffage supplémentaire ne provoque pas d'isomérisation significative du lycopène, celle-ci n'est pas non plus proportionnelle à la durée de chauffage. La surgélation n'affecte pas non plus ni la concentration ni l'isomérisation du lycopène dans les purées de tomate. Les procédés de stabilisation ou de

transformation n'ont pas d'impact sur la concentration en lycopène des purées ainsi que sur son isomérisation.

Lors de ces essais les purées sont confrontées aux tests de diffusion développés dans le chapitre 1 avec des conditions non saturantes (ratio huile/tomate de 9).

### 1.3. Diffusion vers une phase huile

#### 1.3.1. Purées non stabilisées

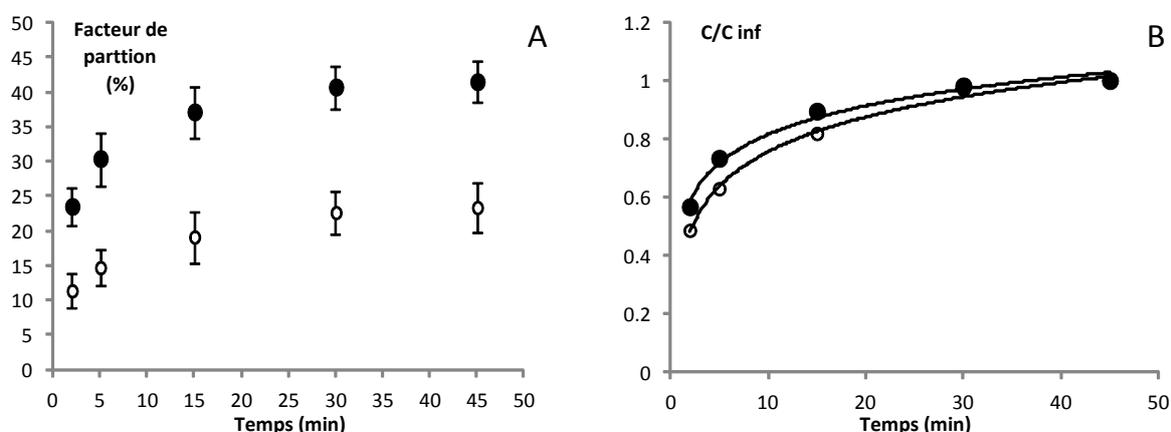


Figure 37 : profil des cinétiques de diffusion pour des purées HB et CB. LA figure 2A présente l'évolution de la cinétique de diffusion au cours de tu temps et la figure 2B présente la cinétique relative (FP max/FP). ● : Purée HB, ○ : Purée CB.

Les deux purées HB et CB présentent une forte différence de facteur de partition maximum (18%) (Fig 37A). Les cinétiques de diffusions sont cependant identiques (Fig. 37B). Les résultats sont conformes à ceux mentionnés dans le chapitre 1, un écart de facteur de partition étant observable en fonction du procédé utilisé pour la réalisation des purées.

Cet essai préliminaire confirme l'impact du procédé sur la diffusion du lycopène mesuré avec le modèle de diffusion développé au chapitre 1. Les résultats sont en accord avec Page et al., (2012) indiquant une différence de comportement de diffusion pour des purées HB et CB.

### 1.3.2. Purées stabilisées par pasteurisation ou surgélation

Les purées stabilisées sont confrontées au modèle de diffusion huile dans des conditions non saturantes (ratio 9/1) et le facteur de partition maximum est comparé entre les différentes purées (tableau 11). Les  $FP_{max}$  sont équivalents pour l'ensemble des purées HB d'une part, et l'ensemble des purées CB de l'autre. Cependant une tendance (non statistiquement significative) à l'augmentation des  $FP_{max}$  après pasteurisation est visible pour les purées CB. L'écart constaté entre les deux purées reste identique après le procédé de stabilisation.

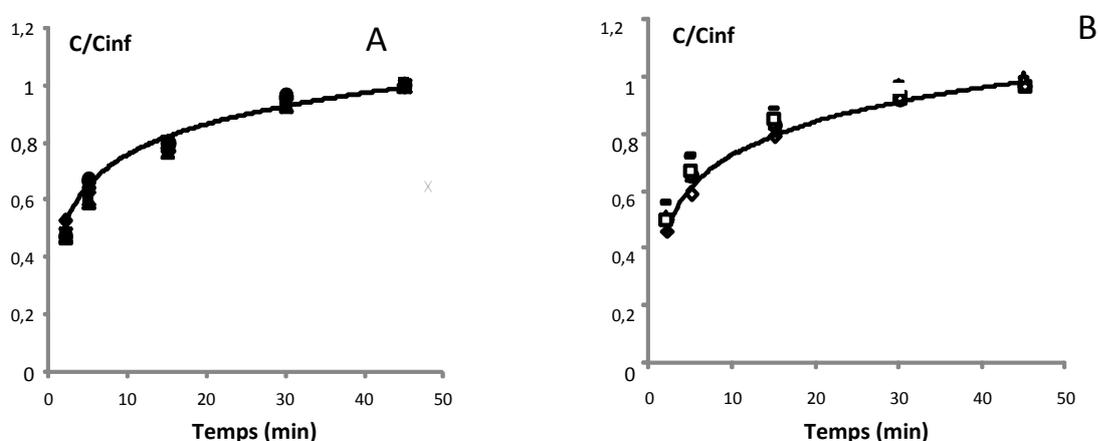


Figure 38 : étude des cinétique de diffusion de purées stabilisées et non stabilisée : A - Purée CB B - purées HB. ■ Purée non stabilisée,  $\Delta$  : Concentrée,  $\square$  : Pasteurisée 10 min,  $\circ$  : Pasteurisée 20 min,  $\diamond$  : pasteurisée 30 min.

La cinétique de diffusion reste identique après stabilisation pour les purées HB et CB (Fig. 38), ainsi qu'avant et après stabilisation, et ce quelle que soit la méthode de stabilisation utilisée.

### 1.4. Diffusion vers une phase émulsionnée

La hiérarchie des  $FP_{max}$  en fonction de l'état de la phase huileuse (non émulsionnée, émulsionnée par SAB, émulsionnée par PL) est respectée pour les purées stabilisées (Tableau 11).

Les facteurs de partition observés avec les émulsions sont inférieurs à ceux observés avec l'huile seule, en cohérence avec les résultats du chapitre précédent. La différence de

diffusion entre les deux purées reste de 10% ce qui est le cas dans le modèle huile. Les différents procédés de stabilisation n'influencent pas sur la diffusion du lycopène. Ceci est constaté pour les trois modèles de diffusion utilisés.

### **1.5. Conclusions**

Les différents traitements de pasteurisation appliqués ont permis dans tous les cas, de préserver la différence de diffusion entre les deux types de purées HB et CB. Ceci permet donc de prévoir pour des expérimentations en halle pilote l'utilisation de ces techniques de stabilisation pour stocker les échantillons avant leur analyse.

## 2. Transformation industrielle de tomate

La première partie de ce travail a montré une différence de comportement lors de la diffusion selon le mode de préparation de purées de tomate. Le procédé utilisé (micro-onde) est différent des procédés que l'on trouve réellement en industrie. Dans cette partie des échantillons contrastés sont préparés par les procédés industriels classiques, à l'échelle pilote. Les différences sont liées au mode de fabrication des échantillons, par l'utilisation de procédés HB et CB industriels, mais aussi au pré-traitement des tomates avant transformation. En effet celles-ci seront transformées soit intactes, soit abimées par un ramassage en machine et un transport industriel, soit abimées par une méthode adaptée en laboratoire visant à accentuer l'impact des chocs.

### 2.1. Plan expérimental

La figure 14 synthétise l'ensemble des transformations qui ont été réalisées en halle pilote. Ces produits ont été analysés par déterminer leur concentration en caroténoïdes, vitamine C, sucres totaux et confrontés aux tests de diffusions développés dans le chapitre 1. Seuls les résultats des analyses de caroténoïdes et de la diffusion sont présentés ici. Deux ramassages sont utilisés pour le pré-traitement des tomates, un ramassage manuel, sans choc physique pour les tomates, et un ramassage en machine où les contraintes mécaniques sont fortes pour les tomates (ME). Le lot de tomate ramassé manuellement est divisé en deux parties, une partie sera transformée directement (IN), et une autre est abimée artificiellement afin de reproduire en laboratoire l'effet du ramassage mécanique et du transport sur les tomates (AA).

Pour la purée HB, les tomates sont chauffées dans un échangeur tubulaire. La température de travail est fixée à 93°C et les tomates sont chauffées immédiatement après broyage. Le procédé est identique à celui utilisé couramment en industrie. Pour le procédé CB, un « stephan » est utilisé. Ce dispositif possède une cuve double enveloppe et une pale permettant le malaxage de la purée. Il produit là aussi des conditions identiques aux conditions industrielles. Ces deux procédés permettent l'obtention d'échantillons HB et CB avec des caractéristiques physiques différentes

Enfin un troisième procédé est utilisé, il s'agit de réaliser des dés de tomates. Ceux-ci sont obtenus à froid et les boîtes sont complétées avec 20% de jus CB en masse. Une partie de

chaque purée est concentrée. Enfin, tous les produits (dès, purées concentrées ou non) ont été emboîtés, sertis et pasteurisés.

Les quantités de tomates, les températures de travail et les différents paramètres pouvant intervenir ont d'abord été testés et optimisés afin de maîtriser la transformation le jour de l'essai définitif.

Le premier facteur à prendre en compte est la quantité de tomate à ramasser, pour obtenir suffisamment de produits finis et faire fonctionner des appareils de types « pilote ».

Les produits transformés réalisés ici sont destinés à des expérimentations croisées entre différents laboratoires. Ils seront répartis entre le Cirad, Le CTCPA, l'INRA, ainsi qu'une expérimentation de repas modèle sur des mini-pig dans le cadre d'un projet européen DREAM. Chaque laboratoire réalisera différentes analyses, les résultats globaux seront alors comparés. Dans le cadre de la thèse, seul les produits destinés à l'INRA seront traités.

Tableau 12: Nombre de boites à réaliser pour chaque produit

	IN		AA			ME		
	HB	CB	HB	CB	Dés	HB	CB	Dés
Non concentrés								
Total	50	50	40	40	40	40	50	40
Cirad	3	3	3	3	3	3	3	3
Mini pig	8	30	0	0	0	0	0	0
CTCPA	3	3	3	3	3	3	3	3
INRA	36	14	34	34	34	34	44	34
concentrés								
Total	20	20	10	10	-	10	20	-
Cirad	3	3	3	3	-	3	3	-
CTCPA	3	3	3	3	-	3	3	-
INRA	14	14	4	4	-	4	14	-

Les quantités correspondent aux boites de format  $\frac{1}{2}$  pour les produits non concentrés et format  $\frac{1}{4}$  pour les produits concentrés. Le nombre de boites est calculé en fonction du nombre d'analyses à réaliser et du nombre de laboratoires concernés. Une quantité supplémentaire est prévue afin d'être stockée et analysée après stockage de longue durée.

Les quantités à prendre en compte sont :

- La production de purée HB nécessite un minimum de 200 kg en fonction des outils de transformation ;
- La production de purée CB nécessite un minimum de 90 kg ;
- La production de Dés nécessite un minimum de 25 kg.

Il est donc nécessaire de récolter 400 kg pour la réalisation des produits IN et AA et 300 kg pour la réalisation des produits ME.

## 2.2. Organisation de la transformation

Le dernier paramètre est l'organisation de la transformation. En effet les tomates sont ramassées à maturité et le protocole de transformation ne doit pas introduire de variabilité non maîtrisée. Il faut pour cela que chaque lot correspondant à chaque pré-traitement soit transformé dans la journée. Les contraintes à prendre en compte, surtout pour le premier jour, sont le temps de ramassage et le temps de trajet entre le lieu de culture et le lieu de transformation, ainsi que la durée de transformation et la disponibilité du personnel et du matériel. Pour les jours 2 et 3 les tomates seront déjà sur place, la gestion du temps est donc moins problématique.

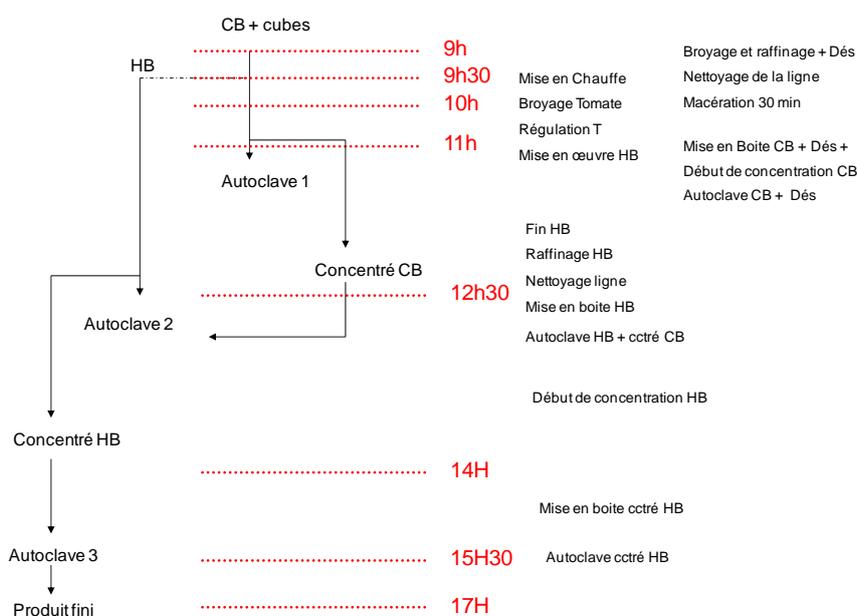


Figure 39 : Planning optimal d'une journée de transformation de tomate

Le déroulement ainsi programmé permet de tenir compte des contraintes en garantissant une transformation dans des conditions optimales. Ce protocole est mis en place lors d'essais préliminaires. L'enchaînement des trois modalités de préparation (intacte en J1, industrielle en J2, et « abimées artificiellement » en J3) permet de maximiser le paramètre testé qui est l'impact des activités enzymatiques endogènes, exprimées dans les tissus blessés.

## 2.3. Résultats et discussion

### 2.3.1. Ramassage des tomates

Le ramassage est effectué le même jour sur une parcelle déterminée.



Figure 40 : Ramassage des tomates : A : machine ; B : manuel

Les deux techniques de ramassage utilisées présentent des différences importantes. Le ramassage machine est beaucoup plus agressif pour les tomates. Elles subissent des chocs sur les tapis roulants de la machine, qui va les déposer dans une benne de 18T avec une hauteur de chute d'environ 1 m. Les tomates en fond de benne subiront la pression de celles au dessus. Les bennes sont ensuite posées dans le champ en attendant un enlèvement pour l'usine où elles seront de nouveau déposées en attendant le traitement. Ces mouvements de benne produisent de nouveau des chocs sur les tomates. Les conditions climatiques sont aussi importantes, les bennes étant stockées en plein air.

Tout ceci ne se retrouve pas dans les conditions de ramassage manuel où les tomates subissent un stress minimum, sont transportées dans des caisses de 30 cm de haut, et sont transformées directement après ramassage.

Le lot de tomate abimé volontairement à l'INRA d'Avignon permet d'accentuer les conditions de stress, et l'obtention de tomates visiblement abimées (épiderme fendu). Les

tomates subissent une chute de 4m de hauteur dans un tube cylindrique sur une surface plane métallique non amortie afin de provoquer plus de chocs et de rupture de l'épiderme.



Figure 41 : Dispositif permettant d'abimer artificiellement les tomates

### 2.3.2. Aspect des tomates

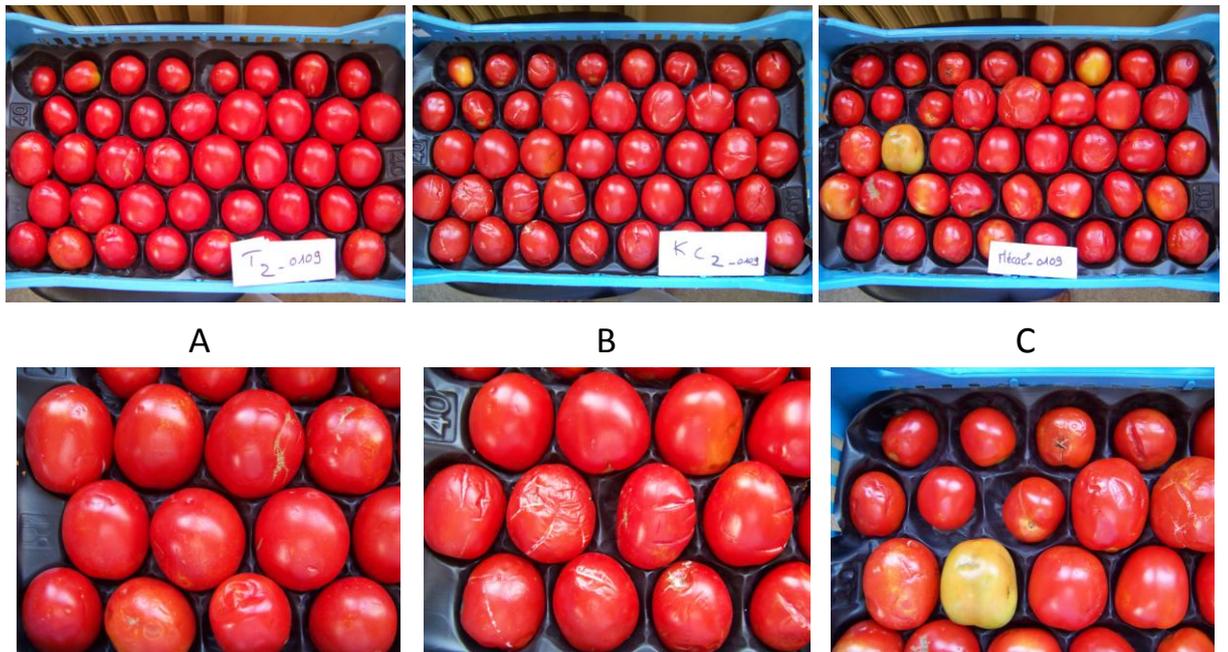


Figure 42: Aspect visuel des différentes tomates ramassées. A : Tomates IN ; B : Tomate AA, C ; Tomato ME

La différence de couleur est nette (Fig. 43) entre les tomates ramassées en machine et celles ramassées manuellement. Du point de vue de la structure physique, l'effet des chocs se concrétise par des fentes et une modification de l'aspect de l'épiderme, avec une similitude entre celles abimées artificiellement et celles ramassées en machine.

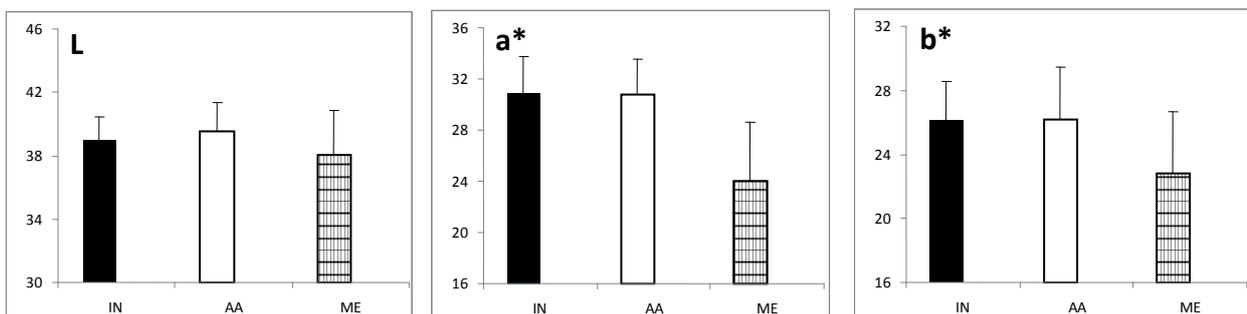


Figure 43 : Analyse L,a,b des tomates avant transformation. L : composante L

Les tomates issues du ramassage mécanique présentent effectivement une différence significative de couleur avec les tomates ramassées manuellement (fig. 44). En effet le a\*

présente une valeur 23% inférieure par rapport aux autres lots et le b\* une valeur de 15% inférieure. Ceci s'explique par la présence de tomates vertes en plus grande quantité dans le lot issu du ramassage mécanique. Le ramassage manuel, pourtant réalisé avec la consigne de ne pas trier, est malgré tout plus sélectif que le ramassage mécanique.

### 2.3.3. Analyse physique des purées

Les caractéristiques physiques des purées sont relativement proches en ce qui concerne la taille des particules (centrée sur 520  $\mu\text{m}$ ) et le pH (4,7). Ceci peut s'expliquer par l'utilisation de conditions de transformation proche et de tomates issues d'une même parcelle.

Le Brix mesuré est de 4,5 pour les purées de tomates non concentrées, ceci correspond à un brix observable dans le milieu industriel pour le même type de produit (Goodman, Fawcett, & Barringer, 2002). Le Brix de 18 mesuré pour les produits concentrés est celui fixé par l'étape de concentration mise en place.

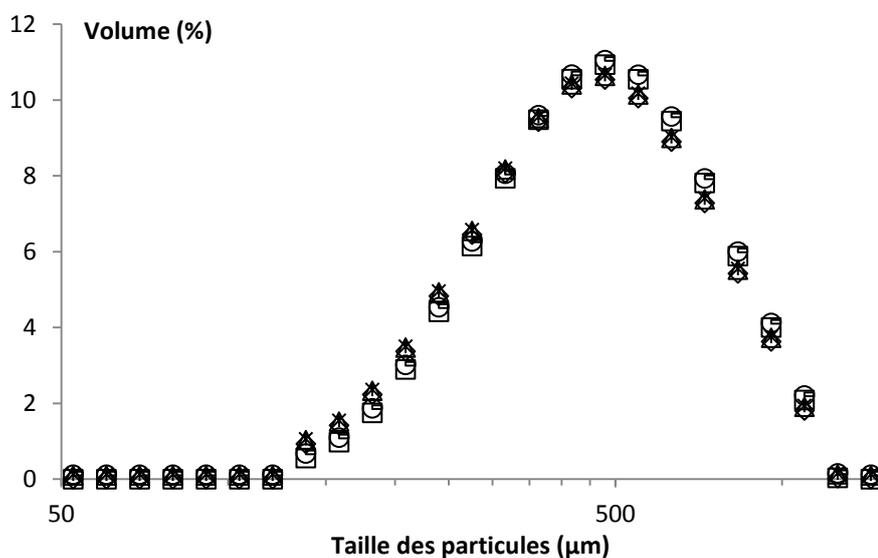


Figure 44. : Diamètre des particules des purées [d3 ;4]. □ : HB IN ;  $\Delta$  : CB IN ;  $\circ$  : HB AA ;  $\diamond$  : CB AA ; — : HB ME ; \* : CB ME.

#### **2.3.4. Traitement des purées**

Les purées sont analysées par CLHP et confrontées au test de diffusion huile développé dans le premier chapitre de la thèse. En effet , le modèle choisi ici est le modèle huile afin de ne pas introduire d'interaction avec les purées par la présence de tensio actif.

## Impact des procédés industriels sur la diffusion du lycopène

Tableau 13 : Teneur en lycopène et facteur de partition maximum obtenus avec le modèle huile pour les différents produits

	Intactes				Mécaniques				Abimées Artificiellement			
	Concentration		FP (%)		Concentration		FP (%)		Concentration		FP (%)	
	lycopène (mg/kg)				lycopène (mg/kg)				lycopène (mg/kg)			
	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC	Moyenne	EC
Avant traitement thermique	90	2	21,8	4,8	90	6	26	2,6	90	4	20	3,4
HB avant pasteurisation	110	2	53	1,4	80	3	44	3,3	100	2	36	3
HB après pasteurisation	110	3	48	4,7	80	2	42	2,2	90	3	35	1,22
HB concentré	360	4	32	6,1	300	3	29	4,3	330	7	30	3,1
CB avant pasteurisation	100	3	30	2,7	90	2	28	3,9	100	2	24	1,5
CB après pasteurisation	90	2	27	5,8	80	3	26	2,8	90	2	20	3,4
CB concentré	310	3	28	2	310	1,7	32	3,6	360	2	36	2,7
Dés Totaux	90	2	18	1,3	86	6	40	5,5				
Dés Jus seul	80	2	24	1,3	70	2	26	1,7				
Dés morceaux seuls	100	1	45	8,3	85	1	36	16				

EC : Ecart types, 3 échantillons sont analysés par purée, chacun 3 fois.

#### **2.3.4.1. Analyse chimique des purées**

Les purées après traitement HB ou CB présentent des concentrations en lycopène identiques à celles des produits n'ayant pas subis de traitement thermique, c'est-à-dire les tomates simplement broyées. Les valeurs globales de concentration en lycopène total obtenues rentrent dans les valeurs attendues pour ce types de produit (Maiani et al., 2009). Le chauffage n'affecte pas la teneur en lycopène des purées, comme démontré dans la première partie du chapitre et en accord avec la littérature (Svelander et al., 2010 ; Pérez-Conesa et al., 2009). L' étape de stabilisation par pasteurisation n'entraîne pas de différence de concentration en lycopène, comme attendu et en accord avec la littérature (Pérez-Conesa et al., 2009 ; Colle et al., 2010) qui démontre la stabilité du lycopène dans les tomates dans ces conditions de température (inférieures à 130°C). Il n'y a pas de différence significative entre les teneurs des produits issus de transformation HB et CB, ceci correspond à ce qui a été mis en avant dans la première partie du chapitre.

Une différence de teneur en lycopène peut être observée entre le ramassage mécanique et les ramassages manuels. Le ramassage mécanique n'implique pas le même tri qu'un ramassage manuel et se traduit donc par une plus grande présence de tomates vertes. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse de la couleur (Fig. 44) avec la présence d'une plus grande quantité de tomates vertes dans le ramassage mécanique.

La concentration ne dégrade pas le lycopène des purées. La concentration en lycopène a également été calculée par rapport à la matière sèche, et est la même pour les produits concentrés et pour les produits non concentrés. Il n'y a pas non plus de différence entre les produits CB et les produits HB après concentration. Les teneurs en lycopène sont en accord avec les teneurs observées dans la littérature pour des concentrés de tomates (Maiani et al., 2009 ; Pennington, 2002).

Les dés sont analysés en trois parties. Les dés totaux représentent l'analyse de dés (jus + dés) broyés avant extraction, le jus seul est issu du jus d'emboitage et les dés seuls sont analysés après essorage léger afin d'enlever le surplus de jus. Le jus présente une teneur en lycopène inférieure à celle des dés. Les concentrations ne sont cependant pas statistiquement significativement différentes de celles des autres produits.

Le broyage, le chauffage et la pasteurisation n'affectent pas la teneur en lycopène des produits à base de tomate. Le procédé de concentration conduit à une augmentation des concentrations proportionnelle à la perte d'eau. Les températures de travail des différents procédés appliqués sont inférieures à 100°C. Ces résultats restent donc dans la mesure de ceux déjà observées dans la littérature (Pérez-Conesa et al., 2009 ; Colle et al., 2010). Ceci présente un intérêt certain pour les industriels qui peuvent élaborer ainsi des produits à teneur en lycopène préservée par rapport à la tomate de départ.

Il s'agit dès lors de comparer les résultats issus de la confrontation au modèle de diffusion huile afin de vérifier l'impact des traitements sur la diffusion du lycopène vers une phase lipidique.

#### **2.3.4.2. Test de diffusion vers l'huile**

Les différents produits obtenus sont testés en utilisant la méthode de diffusion vers l'huile mise au point au chapitre 1, avec un ratio huile/tomate de 9/1 et une température de travail contrôlée à 37°C (condition non saturante pour l'huile). Plusieurs répétitions pour chaque produits sont réalisées : répétition analytique : chaque boite est analysée deux fois, répétition « biologique » : deux boites sont analysées par procédé.

La diffusion est réalisée en cinétique avec des prélèvements à 2, 5, 15, 30 et 45 minutes. Les produits n'ayant subis aucun traitement thermique présentent des facteurs de partitions inférieurs aux produits ayant subis un traitement. Ils restent cependant de l'ordre de ceux observés pour les produits ayant subi le procédé CB.

Une différence significative est observée entre les procédés HB et CB pour les produits stabilisés et non stabilisés, quel que soit le mode de ramassage. Ceci confirme donc l'importance du procédé de transformation. Le procédé HB permet en effet une diffusion plus importante du lycopène que le procédé CB. Les différences observées ici confirment aussi la validité de la méthode micro-onde proposée par Anton et Barrett (2010).

La stabilisation n'impacte pas la diffusion du lycopène, les facteurs de partition mesurés pour les produits stabilisés et non stabilisés ne présentent en effet pas de différence significative.

Les prés-traitements ont un effet important sur la diffusion du lycopène. En effet, dans les trois cas (IN, ME, AA) les facteurs de partition sont plus élevés pour le ramassage manuel que pour le ramassage mécanique, et eux-même sont plus élevés que pour les tomates abimées artificiellement. La différence introduite dans ces pré-traitements sur les tomates est lié à l'intégrité des cellules des trois lots de tomates. En effet lors du ramassage manuel, les tomates ne subissent pas de stress mécanique, ce que montre leur épiderme intact, à contrario des deux autres lots de tomates. La déstructuration mécanique introduite par le stress mécanique (rupture des cellules) permet une activité enzymatique notamment pour la PME et la PG par leur libération dans les compartiments cellulaires, phénomène empêché par les membranes plasmiques pour les tomates intactes (Tibäck, Svelander, Colle, Altskär, Alminger, Hendrickx, Ahrné, & Langton, 2009b).

Les produits ayant subi une étape de concentration ne présentent par contre pas les mêmes caractéristiques de diffusion que les produits sans étape de concentration. En effet, ormi pour les purées issues du ramassage manuel, le facteur de partition des produits CB devient plus élevé que celui des produits HB. De plus les facteurs de partition des produits CB ont augmenté, alors que ceux des produits HB ont diminué.

L'analyse des facteurs de partition pour les dés est plus complexe. En effet pour les dés totaux, les dés issus du ramassage mécanique présentent un facteur de partition plus élevé que ceux issus du ramassage manuel. L' étude de la diffusion des dés seuls fait apparaitre des écarts types élevés pour le facteur de partition. Les tailles de particules relativement importantes de ces produits peuvent introduire de fortes variabilités sur le facteur de partition, de par l'hétérogénéité de la géométrie des morceaux de tomate. La diffusion du jus est dans les deux cas semblable et les facteurs de partition maximaux correspondent aux valeurs obtenues pour les jus considérés. L'étude de la diffusion des dés totaux introduit cependant la notion de taille de particules, avec une baisse de la diffusion pour des morceaux de taille centimétrique.

## 2.4. Conclusion

Les concentrations mesurées dans les produits réalisés au cours de cet essai correspondent à des valeurs attendues pour des produits commerciaux de ces catégories et leur sont ainsi comparables (Pennington, 2002 ; O'Neill et al., 2007).

L'étude des facteurs de partition des différents produits montre l'importance du procédé mis en œuvre avec une forte augmentation du facteur de partition après un traitement HB. Les produits issus du traitement CB présentent un profil proche des produits n'ayant pas subi de traitement thermique. Les concentrations en lycopène sont pourtant équivalentes pour ces produits. Le procédé HB introduit donc une modification capable de favoriser la libération du lycopène des cellules. Le procédé HB a la particularité d'inhiber les enzymes tel la haute température appliquée dès le broyage (Lin, Aizawa, Inakuma, Yamauchi, & Kato, 2005). Ceci n'est pas le cas du procédé CB, qui au contraire est réalisé dans des températures optimales de fonctionnement pour ces mêmes enzymes (Lin et al., 2005). Les résultats obtenus à l'échelle pilote et au laboratoire (micro-onde) sont similaires en ce qui concerne la différence HB/CB.

Le facteur de partition maximum est plus élevé pour les tomates issues du ramassage manuel, intactes, on trouve ensuite celui des tomates issues du ramassage mécanique et enfin celui des tomates issues du ramassage manuel et abimées artificiellement. La déstructuration de la matrice lors du transport ou lors de chocs des tomates avant transformation influe de façon négative sur le facteur de partition. En effet les cellules déstructurées pendant le transport permettrait l'action d'enzymes et ainsi une complexation avec le lycopène, empêchant ainsi sa diffusion (Chong, Simsek, & Reuhs, 2009 ; Tibäck, Svelander, Colle, Altskär, Alminger, Hendrickx, Ahrné, & Langton, 2009b).

L'absence de différence de facteur de partition pour les produits ayant subis une étape de concentration est à constater. L'effet du traitement appliqué est apporté par les premières secondes de chauffage, comme l'atteste l'effet du procédé HB par rapport au procédé CB. L'étape de concentration apporte une étape de chauffe à faible température supplémentaire. Cette étape conduirait de ce fait à la formation de complexes plus stables entraînant ainsi une baisse de la diffusion du lycopène.

L'étude du facteur de partition dans les dés reste délicate, en effet les écarts types relativement importants rendent difficile toute interprétation des résultats. L'hétérogénéité des échantillons pourrait être responsable des écarts constatés.

Les valeurs globales observées pour les facteurs de partition maximum peuvent être comparées aux valeurs obtenues pour le même type d'étude à l'aide de modèle classique d'évaluation de la bioaccessibilité (Colle et al. 2010).

Les valeurs de bioaccessibilité données par Svelander et al., (2010) indiquent que l'application d'un traitement thermique à des matrices crues augmente la libération du lycopène pour des échantillons broyés 120 s mais non pour ceux broyés 15 s ou 30 s. De même, dans l'étude de De Hof *et al.* (2000a), les échantillons sont soumis à des traitements mécaniques et /ou thermiques et la réponse plasmatique est supérieure uniquement pour les échantillons soumis aux deux traitements conjugués. Dans l'étude de Svelander et al., 2010 le pourcentage de lycopène bioaccessible passe ainsi de 13% environ pour des échantillons crus à 30 % environ pour des échantillons traités thermiquement et mécaniquement. Les variations de diffusion trouvées ici sont ainsi comparables avec des variations observées dans la littérature. Le procédé HB permet d'augmenter la diffusion du lycopène de façon plus importante que des procédés thermiques classiques couplés à des procédés mécaniques.

Le modèle de diffusion mis en place est efficace pour évaluer l'impact du traitement technologique sur des produits à base de tomate. Il confirme le rôle important de ce traitement sur le facteur de partition avec par contre une préservation de la teneur en lycopène dans les produits.



**Utilisation du test de diffusion sur différents produits**



# Utilisation du test de diffusion sur différents produits

## 1. Test de produits commerciaux

Les deux chapitres précédents ont permis de mettre en place un test permettant d'évaluer le potentiel de diffusion du lycopène vers une phase lipidique, émulsionnée ou non. Ce test a permis de mettre également en évidence l'impact des procédés de transformation sur la diffusion du lycopène.

Ce test est utilisé pour caractériser différents produits commerciaux. Ceci permettra d'évaluer son efficacité et d'identifier certaines limites sur d'autres matrices.

### 1.1. Produits commerciaux à base de tomates

Tableau 14 : concentration et facteur de partition de produits commerciaux à base de tomates

Produit	Lycopène (mg/g)	Facteur de partition huile(%)	Facteur de partition SAB (%)	Facteur de partition PL (%)	Taille des particules (µm)
Ketchup	0,152	43	29	32	52 et 310*
Jus commercial	0,124	33	23	28	360
Dés	0,254	16	8	13	316 (jus)
Coulis	0,209	32	22	26	316
concentré	1,028	23	14	17	316

\*Bimodal

Les produits commerciaux sont comparés avec le jus utilisé pour la mise au point du modèle dans le chapitre 1. Les concentrations en lycopène obtenues pour ces différents produits sont en accord avec les concentrations données dans la littérature (Maiani et al., 2009). Le facteur de partition obtenu pour ce jus est semblable à celui obtenu avec les essais du chapitre 1.

Un produit est à mettre à part en raison de son hétérogénéité, il s'agit des cubes de tomates, avec deux phases présentant des structures différentes : les cubes et le jus contenu dans la boîte. Dans ce produit le facteur de partition est relativement faible. Ceci est cohérent avec les données obtenues au chapitre 2 : la diffusion du lycopène est plus difficile à partir de morceaux de tomates de taille centimétriques.

Le deuxième produit de structure spécifique est le ketchup. En effet ce produit présente une distribution de tailles de particules bimodales (Fig. 46B). Une partie des particules est de taille inférieure à celle des cellules de tomate. Les particules fines (taille moyenne d'environ 50  $\mu\text{m}$ ) sont en dessous de la taille des cellules de tomates (Aguilera, 2005). La taille des cellules de tomate, bien que très variable selon le stade de croissance, l'origine tissulaire, les facteurs génétiques ou le mode de culture, varie entre 100 et 500 nm pour des cellules de tomate à maturité (Barrett, Garcia, & Wayne, 1998 ; Legland, Devaux, Bouchet et Guillon 2012). Dans ce cas, le facteur de partition est statistiquement plus élevé que pour les autres produits. Ces particules subcellulaires semblent donc avoir un comportement différent dans les tests appliqués.

Les autres produits ont des distributions de tailles de particules monomodales, supérieures à la taille des cellules de tomate.

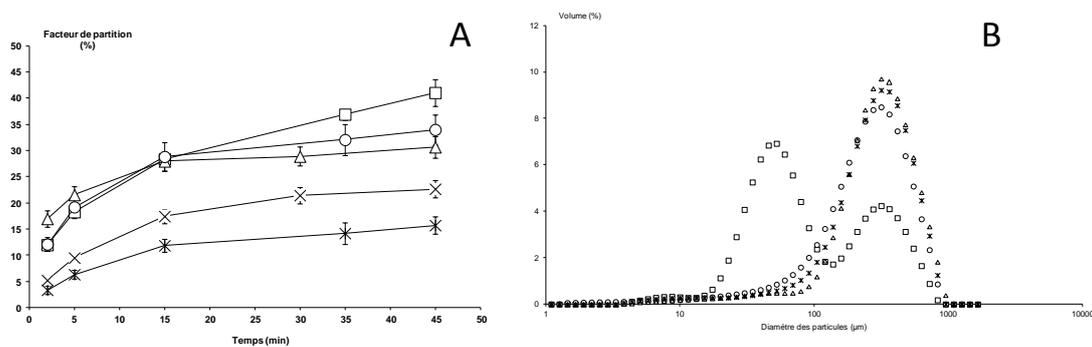


Figure 45 : Facteur de partition et taille de particules de produits commerciaux à base de tomates. A : cinétique de diffusion ; B : tailles de particules de produits commerciaux à base de tomates.  $\square$  : Ketchup;  $\Delta$  : Jus commercial,  $\times$  : petits dés,  $\circ$  : coulis.

Les cinétiques de diffusion sont identiques pour les différents produits commerciaux à l'exception du ketchup (Fig. 46A) qui ne présente pas de plateau de diffusion, même après

50 minutes. Le comportement de diffusion du lycopène peut être relié à la taille des particules. Avec des particules présentant des tailles inférieures à la taille des cellules végétales, le lycopène présente une plus forte diffusion. La perte de l'intégrité des parois végétales permettrait une diffusion plus facile du lycopène

Les facteurs de partition avec les phases émulsionnées (tableau 14) présentent les mêmes tendances qu'avec la phase huile, avec des valeurs inférieures. Le facteur de partition vers la phase émulsionnée avec des phospholipides est inférieur à celui dans l'huile et celui dans la SAB est inférieur à celui dans les phospholipides, comme obtenu au chapitre 1.

Le facteur de partition du concentré est plus bas que pour le jus, alors que les tailles de particules des deux produits sont sensiblement identiques. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus dans le chapitre 2, qui indique une baisse du facteur de partition pour les produits après concentration.

Cet essai valide l'utilisation possible du test sur des produits commerciaux à base de tomate. Il met en avant l'effet important de la taille des particules sur la diffusion. Une limitation est possible pour les particules trop grosses contenant encore des parois intactes et présentant des propriétés de rétention des caroténoïdes. Ceci confirme l'importance de la taille des particules sur la bioaccessibilité des caroténoïdes, démontré dans une étude récente (Lemmens, Van Buggenhout, Van Loey, & Hendrickx, 2010).

## **1.2.Produits à base de carottes**

Dans cette partie les différents produits sont générés à l'aide de différentes techniques de déstructuration cellulaire. Les premières techniques sont basées sur l'utilisation de broyeurs permettant d'obtenir des tailles de particules de plus en plus petites, en partant du broyeur à couteau simple jusqu'à l'homogénéisateur. La déstructuration est ensuite complétée par l'utilisation de la cuisson, de la surgélation, et des deux techniques réunies. La matière sèche est identique pour tous les échantillons avec une valeur moyenne de  $81 \pm 0,2$  g/Kg.

Tableau 15 : Teneur en caroténoïdes, facteur de partition et tailles de particules d [3/4] de différentes purées de carottes

	Produit	$\beta$ -carotène (mg/kg)	$\alpha$ -carotène (mg/kg)	Facteur de partition (%)	Taille des particules ( $\mu$ m)
Crues	Broyage au couteau	41 $\pm$ 5	14 $\pm$ 1,8	24 $\pm$ 3	>mm
	Broyage au couteau X2	63 $\pm$ 2	21 $\pm$ 1	21 $\pm$ 5	>mm
	Broyeur colloïdal	83 $\pm$ 15	27 $\pm$ 6	34 $\pm$ 2	810
	Homogénéisateur	92 $\pm$ 25	30 $\pm$ 2	32 $\pm$ 3	320
Cuit	Broyage au couteau	51 $\pm$ 6	17 $\pm$ 2	18 $\pm$ 4	>mm
	Broyage au couteau X2	58 $\pm$ 12	19 $\pm$ 5	43 $\pm$ 8	>mm
	Broyeur colloïdal	90 $\pm$ 20	26 $\pm$ 5	44 $\pm$ 6	810
	Homogénéisateur	91 $\pm$ 24	20 $\pm$ 8	36 $\pm$ 12	320
Surgelé	Broyage au couteau	41 $\pm$ 5	14 $\pm$ 1,8	23 $\pm$ 4	>mm
	Broyage au couteau X2	63 $\pm$ 2	21 $\pm$ 1	42 $\pm$ 8	>mm
	Broyeur colloïdal	83 $\pm$ 15	27 $\pm$ 6	46 $\pm$ 5	810
	Homogénéisateur	92 $\pm$ 25	30 $\pm$ 2	37 $\pm$ 7	320
Cuit et surgelé	Broyage au couteau	51 $\pm$ 6	17 $\pm$ 2	24 $\pm$ 7	>mm
	Broyage au couteau X2	58 $\pm$ 12	19 $\pm$ 5	44 $\pm$ 9	>mm
	Broyeur colloïdal	90 $\pm$ 20	26 $\pm$ 5	47 $\pm$ 5	810
	Homogénéisateur	91 $\pm$ 24	20 $\pm$ 8	34 $\pm$ 8	320

Les carottes présentent deux caroténoïdes majoritaires qui sont le  $\beta$ -carotène et l' $\alpha$ -carotène, dans des concentrations proches de celles citées par Knockaert et al., (2011). Ces deux composés ne sont pas ou peu affectés par les traitements appliqués aux carottes (tableau 15). Ces données sont en accord avec la littérature démontrant la relative stabilité du  $\beta$ -carotène lors des procédés de transformation ( Lemmens et al., 2010). Cependant les concentrations augmentent avec la finesse du broyage, que ce soit pour les produits crus ou pour les produits cuits. Seul l'homogénéisation haute pression ne provoque pas une telle augmentation. L'hypothèse permettant d'expliquer cette augmentation réside dans la

déstructuration croissante des cellules avec la finesse du broyage, permettant ainsi une extractabilité accrue du  $\beta$ -carotène et de l' $\alpha$ -carotène .

Les broyages au couteau n'affectent pas la concentration en caroténoïdes.

Les tailles de particules pour les échantillons issus des broyages au couteau avec un ou deux broyages successifs restent de l'ordre de quelques millimètres et ne sont donc pas mesurables par granulométrie. L'analyse d'image permet d'avoir une vision plus directe des échantillons générés (figure 46). Une forte différence est visible entre les particules issues du broyeur colloïdal (C) et de l'homogénéisateur (D), ce dernier conduit à des tailles de particules inférieures de 40% mais restant supérieures à la taille des cellules de carottes, qui sont à 95% inférieures à 125  $\mu\text{m}$  (Lemmens et al., 2010).

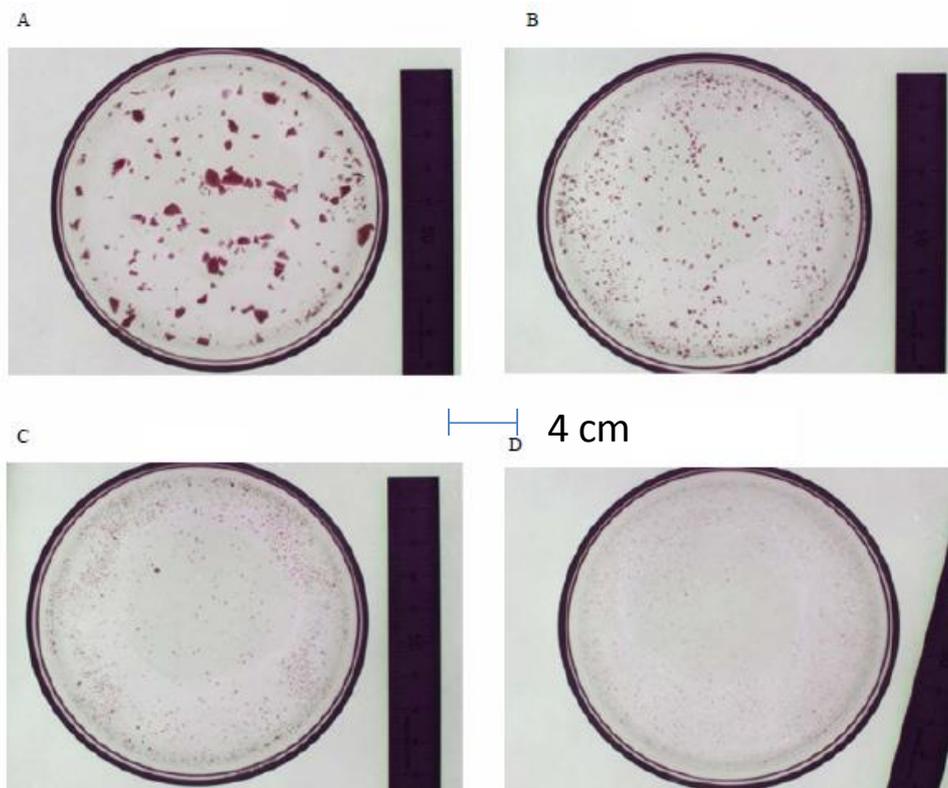


Figure 46 : Photographie de particules de purée de carottes : A : broyage au couteau ; B : deux broyages au couteaux successifs ; C : broyeur colloïdal ; D : Homogénéisateur.

La cuisson et la surgélation n'ont pas d'effet global sur la taille des particules des échantillons (données non montrées) ce qui correspond aux résultats de Lemmens et al., (2010). Le volume moyen des particules est par contre fortement dépendant de la méthode

de broyage employée. Cette constatation ne fait que confirmer l'efficacité des différents broyeurs utilisés.

Le facteur de partition des purées crues n'est influencé qu'à partir du broyeur colloïdal. Le facteur de partition est alors augmenté de 10% environ. La différence de diffusion entre le broyeur colloïdal et l'homogénéisateur haute pression n'est pas significative pour ces purées. Pour les purées ayant subies un traitement thermique (chauffage et/ou surgélation) le facteur de partition est dans les trois cas augmenté par la finesse du broyage, sauf pour l'homogénéisateur. La cuisson des échantillons issus du broyage au couteau provoque une diminution du facteur de partition, phénomène qui est inhibé par la congélation. Les échantillons issus du deuxième broyage au couteau et du broyeur colloïdal montrent une forte augmentation du facteur de partition après cuisson ou congélation. Lemmens, Van Buggenhout, Oey, Van Loey, & Hendrickx, (2009) ont aussi obtenus une augmentation du  $\beta$ -carotène bioaccessible avec la cuisson.

La cuisson ou la congélation provoque une décompartmentation qui libèrerait les caroténoïdes. Une décompartmentation mécanique similaire à celle obtenue avec une cuisson ou une congélation, a eu lieu avec le broyage très fin, il n'y a pas de différences avant et après cuisson, et la diffusion de l'échantillon cru obtenu par homogénéisation est proche de celle des échantillons cuits, broyés au couteau deux fois, et au broyeur colloïdal.

Avec les particules les plus grossières, le comportement est différent, l'échantillon cuit est celui qui libère le moins de  $\beta$ -carotène. Cette observation correspond à ce qui a déjà été vérifié dans la littérature (L Lemmens et al., 2010).

Pour l'homogénéisateur, le facteur de partition ne présente aucune différence significative pour les différents traitements thermiques. Il semblerait que la solubilisation des pectines n'est pas suffisante pour permettre la libération des caroténoïdes et provoquer une augmentation importante du facteur de partition. La taille des particules n'est en effet pas le seul paramètre permettant d'expliquer la bioaccessibilité des caroténoïdes (Lemmens et al., 2010). L'échauffement provoqué par le broyeur colloïdal pourrait aussi avoir un rôle sur les différences observées avec les autres traitements.

Le facteur de partition dans les purées crues est fonction du broyage. Ceci n'est pas constaté pour les autres purées. La taille des particules ne serait pas la seule modalité gérant la bioaccessibilité des caroténoïdes dans les particules de carottes. Celle-ci peut aussi être influencée par le degré de méthylation des parois cellulaires (Lemmens et al., 2009).

### 1.3. Autres produits

D'autres produits ont été testés, ils présentent soit des compositions différentes, soit des structures différentes. L'épinard se caractérise par la présence de lutéine, mais aussi de chlorophylle, elle aussi liposoluble. Le maïs est sous forme de grains encapsulés, présentant des cellules avec des structures de parois très différentes riches en lutéine. Enfin les deux variétés d'abricots utilisés ont des concentrations en  $\beta$ -carotène contrastées. .

Tableau 16 : Dosage de caroténoïdes et facteur de partition de différentes matrices

Produit	Caroténoïde (mg/kg)			Facteur de partition (%)
	$\beta$ - carotène	zéaxanthine	Lutéine	
Epinard cru	26,2 $\pm$ 4,1	4,23 $\pm$ 1,12	182 $\pm$ 12	-
Epinard cuit	24 $\pm$ 3,2	3,29 $\pm$ 2, 30	173 $\pm$ 17	-
Mais Broyé	-	-	24 $\pm$ 4	9 $\pm$ 6
Mais entier	-	-	26 $\pm$ 3	-
Abricot Blanc	5,6 $\pm$ 2,8	-	-	36 $\pm$ 8
Abricot orange	68,32 $\pm$ 12	-	-	45 $\pm$ 12

La diffusion des caroténoïdes de l'épinard est accompagnée d'une diffusion de la chlorophylle. L'interférence entre les deux spectres UV-vis de la chlorophylle et de la lutéine ne permet pas de réaliser de dosage à l'aide du spectrophotomètre, et donc d'obtenir un facteur de partition. Cependant, la différence de couleur pour les huiles après diffusion des produits cuits et crus est visuellement importante et tendrait à montrer une diffusion plus importante de molécules hydrophobes, dont la chlorophylle fait partie. La solution consisterait à effectuer un fractionnement des différentes phases après diffusion suivi d'une

analyse CLHP pour quantifier la lutéine, produit majoritaire. Cependant différentes tentatives de saponification ou d'utilisation de cartouche SPE de divers modèles ont échoué.

L'utilisation du modèle huile sur la matrice maïs montre aussi ses limites. La diffusion à partir du maïs appertisé entier est nulle, aucun caroténoïde n'est détecté dans l'huile après diffusion, même avec allongement de la cinétique de diffusion. La diffusion du maïs broyé n'est aucunement répétable, les particules de maïs ayant tendance à s'aggréger au cours de l'agitation.

Une grande différence de concentration en  $\beta$ -carotène est visible entre la variété blanche et la variété orange d'abricot, comme rapporté par Ruiz, Reich, Bureau, Renard, & Audergon, (2008). Le facteur de partition de ces deux variétés est comparable. La faible concentration en  $\beta$ -carotène de la variété blanche n'introduit donc pas une limite à l'utilisation de la méthode d'évaluation de la bioaccessibilité.

## **2. Conclusion**

Ces différents essais nous ont permis d'appréhender d'autres limites et caractéristiques du test de diffusion vers une phase huile. Les contraintes qui sont à prendre en compte lors de l'utilisation du test peuvent être chimiques ou physiques. L'interférence de molécules autres que celles étudiées présentant des absorptions dans le spectre UV-visible peut ainsi être une limite. La solution serait l'utilisation de la CLHP comme technique d'analyse en complément de la méthode spectrophotométrique.

Les contraintes physiques sont liées à la nature même de l'échantillon. Si celui-ci présente une propension à s'aggréger, la formation de massifs de particules hétérogènes peut alors gêner la diffusion des caroténoïdes vers l'huile et ainsi altérer la qualité des résultats obtenus, voire les rendre inutilisables de part leur trop grande variabilité. Cette dernière contrainte est sûrement la plus limitante car plus difficile à corriger. Les solutions à mettre en œuvre sont spécifiques à chaque échantillon et devront être envisagées au moment de l'utilisation du modèle après des premiers essais avec l'échantillon concerné.

## **Conclusion générale**



## Conclusion générale

Ces travaux ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances concernant la diffusion des caroténoïdes (lycopène en particulier) de la matrice alimentaire vers une phase lipidique, ainsi que l'impact des procédés de transformation sur ces propriétés de diffusion.

Dans un premier temps, la mise en place d'un modèle de diffusion spécifique à la première phase de l'absorption des caroténoïdes, c'est-à-dire la libération de la matrice, a permis de mettre en avant des limites de saturation pouvant intervenir dans les modèles de bioaccessibilité/biodisponibilité utilisés couramment. Une concentration insuffisante en matières grasses limite la libération des caroténoïdes de la matrice végétale. La température optimale pour la diffusion est à partir de 37°C, les températures inférieures entraînant une baisse du facteur de partition. Les variations de pH n'ont pas d'influence sur la diffusion.

Cette étude a aussi démontré l'importance de la présence de protéines ou de phospholipides lors de cette première phase d'absorption. Ceux-ci peuvent interagir avec les caroténoïdes et en modifier la diffusion. Le facteur de partition est diminué (plus fortement avec la SAB qu'avec les PL) et la vitesse de diffusion est modifiée (accélérée avec la SAB, ralentie avec les PL). La présence de ces molécules dans les modèles de bioaccessibilité ou les aliments peut donc introduire des interférences indépendantes de la matrice étudiée.

Le développement d'un modèle de bioaccessibilité amélioré devrait se faire par la prise en compte de ces interférences, et la prise en compte des effets de la première étape actuelle qui consiste au broyage systématique des échantillons. Ce modèle idéal serait réalisé à partir des échantillons directement transformé, et contiendrait des matières grasses en proportion suffisante pour ne pas être dans des conditions de saturation lors de la sortie des caroténoïdes de la matrice.

Dans un deuxième temps, cette étude a permis de vérifier l'impact des procédés de transformation sur les propriétés de diffusion du lycopène. Les échantillons contrastés réalisés par l'utilisation des procédés Hot Break (HB) et Cold Break (CB). Certains prétraitements ont montré des comportements de diffusion différents. L'inactivation des enzymes, par un broyage à une température supérieure à 93 °C (procédé HB) augmente le facteur de diffusion. Le pourcentage de lycopène qui diffuse est plus élevé, dans ce cas, que

celui observé pour les échantillons réalisés par le procédé CB. Ce procédé industriel (HB) permet donc la préparation de produits avec une teneur de lycopène bioaccessible plus élevée. Ces résultats confirment les résultats obtenus après transformation à l'échelle du laboratoire. Ceci confirme les données de la littérature (Anthon & Barrett, 2010; Page et al., 2012).

Les prétraitements (tomates ramassées manuellement (IN), tomates ramassées en machine (ME) et tomates ramassées manuellement et abimées artificiellement (AA)) ont démontré une baisse du facteur de partition avec l'augmentation du stress mécanique (visualisé par l'état de l'épiderme des tomates en fonction du pré-traitement) subi par les tomates avant transformation. Le facteur de partition le plus élevé est observé pour les tomates intactes, et le plus faible pour les tomates abimées artificiellement, celles qui présentent un aspect visuel plus déstructuré. Ce résultat est contraire à ce qui était attendu, car c'est dans les conditions qui favorisent la dégradation pariétale que la bioaccessibilité est la plus faible, au contraire de ce qui a pu déjà être observé dans la littérature avec une augmentation de la bioaccessibilité par la destruction de tissus végétaux (Hussein, L. and El-Tohamy, 1989 ; Giovanucci, Ascherio, Rimm, Stampfe, Colditz, & Willett, 1995).

L'étude a confirmé la résistance du lycopène aux procédés de fabrication : les variations de la concentration et de l'isomérisation ne sont pas significatives. Il en est de même pour les procédés de stabilisation (surgélation et pasteurisation) qui conservent l'intégrité du lycopène, mais aussi les propriétés de diffusion de celui-ci en dehors de la matrice. Ceci est d'autant plus vrai pour les résultats obtenus lors de la transformation industrielle où un seul et même lot de tomates a été utilisé, contrairement aux transformations en laboratoire.

Enfin, le test de diffusion a été appliqué à différentes matrices, produits commerciaux, ou frais transformés en laboratoire. Le test a démontré une bonne aptitude pour classer les produits commerciaux à base de tomates à partir de leur propriété de diffusion. Une capacité de diffusion plus élevée a été obtenue pour le Ketchup. Celui-ci présente une population spécifique de particule de taille inférieure à celle des cellules de tomates.

Les produits réalisés à base de carottes ont aussi pu être caractérisés à l'aide du test de diffusion. La diffusion est fortement influencée par la cuisson ou la surgélation, qui vont provoquer des décompartmentations cellulaires importantes. Les différents modes de

## Conclusion générale

broyages utilisés ont peu d'influence sur la diffusion en absence de traitement thermique. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lemmens, Van Buggenhout, Van Loey, & Hendrickx qui ont observé une influence importante de la cuisson sur la diffusion des caroténoïdes à partir de carotte. Ces résultats ont permis de confirmer que la taille des particules générées n'est pas le seul paramètre influençant la bioaccessibilité des caroténoïdes, comme déjà évoqué dans la littérature (Lemmens et al., 2009 ; Lemmens et al., 2010).

Des limites d'utilisation du test ont été montrées, en relation avec les caractéristiques physiques ou chimiques des échantillons. La viscosité du produit à tester et son intégrité physique sont à prendre en compte. La limite a été ici observée dans le cas du maïs, qui entier ne permet pas de diffusion et dont le broyage conduit à la formation d'un produit visqueux non utilisable dans ce test. Les limites chimiques sont la présence de molécules lipophiles autres que les caroténoïdes, telles que la chlorophylle, qui vont interférer lors de la quantification des caroténoïdes dans l'huile.

L'utilisation du test de diffusion sur d'autres matrices est donc possible, mais peut nécessiter dans certains cas une adaptation en vue d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Les perspectives portent principalement sur la caractérisation du test de diffusion mis en place. Les résultats obtenus ici, en particulier ceux avec les échantillons contrastés réalisés en halle pilote, sont à confronter avec des résultats de bioaccessibilité par l'utilisation d'un modèle de digestion, dynamique ou statique, utilisé classiquement (Garrett, Failla, & Sarama, 1999 ; Rodriguez-Amaya, 2010).

Dans le cadre du projet européen DREAM, des échantillons ont été utilisés afin de fournir des repas modèles à des cochons nains. Le dosage du lycopène dans leur plasma sanguin permettra d'avoir un comparatif des procédés HB et CB. Ces mêmes échantillons seront de plus confrontés à un modèle de bioaccessibilité classique. Les résultats obtenus pourront aussi être comparés à ceux obtenus avec notre test de diffusion.

## Conclusion générale

L'utilisation d'autres modèles permettrait de confirmer d'une part les résultats obtenus sur les produits réalisés en halle pilote, et d'autre part confirmer les risques de saturations de la phase lipidique des modèles classiques.

Les autres perspectives résident dans l'utilisation de ce test sur différentes matrices et différentes conditions de transformations, afin de mettre en place une évaluation globale de l'impact de la transformation sur la diffusion des caroténoïdes.

## Bibliographie

- Aguilera (2005). Why food microstructure? *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 3-11.
- Amamizo, Irashima, Ishimoto, & Hmiya. (2011). Carotenoid Composition in the Yellow and Pale Green Petals of Primula Species, *Bull. Natl. Inst. Flor. Sci*, 11, 67-72.
- Anthon, & Barrett (2010). Changes in pectin methylesterification and accumulation of methanol during production of diced tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 97(3), 367-372.
- Armand, M., Pasquier, B., André, M., Borel, P., Senft, M., Peyrot, J., Salducci, J., et al. (1999). Digestion and absorption of 2 fat emulsions with different droplet sizes in the human digestive tract. *The American journal of clinical nutrition*, 70(6), 1096-106.
- Barrett, Garcia & Wayne (1998). Textural modification of processing tomatoes. *Critical reviews in food science and nutrition*, 38(3), 173-258.
- Bengtsson, Larsson Alminger & Svanberg (2009). In vitro bioaccessibility of beta-carotene from heat-processed orange-fleshed sweet potato. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(20), 9693-8.
- Benito & Miller. (1998). IRON ABSORPTION AND BIOAVAILABILITY: AN UPDATED REVIEW. *Nutrition Research*, 18(3), 581-603.
- Biehler, Kaulmann, Hoffmann, Krause & Bohn, T. (2011). Dietary and host-related factors influencing carotenoid bioaccessibility from spinach (*Spinacia oleracea*). *Food Chemistry*, 125(4), 1328-1334 ST
- Borel, Grolier, Boirie, Simonet, Verdier, Rochette, Alexandre-Gouabau, et al. (1998). Oxidative stress status and antioxidant status are apparently not related to carotenoid status in healthy subjects. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 132(1), 61-66.
- Borel (2012). Genetic variations involved in interindividual variability in carotenoid status. *Molecular Nutrition and Food Research*, 56(2), 226-240.
- Borel, Moussa, Reboul, Lyan, Defoort, Vincent-Baudry, Maillot et al. (2007). Human plasma levels of vitamin E and carotenoids are associated with genetic polymorphisms in genes involved in lipid metabolism. *The Journal of nutrition*, 137(12), 2653-9.
- Borel, Edelenyi, Malezet-Desmoulin, Margotat, Lyan, Gorrard et al. (2010). Genetic variants in BCMO1 and CD36 are associated with plasma lutein concentrations and macular pigment optical density in humans. *Annals of medicine*, (February), 1-13.
- Bowen, Mobarhan & Smith, (1993). Carotenoid absorption in humans. *Methods Enzymol*, 214, 3-17.
- Britton, Liaaen-Jensen, & H. (1995). *UV/Visible spectroscopy Carotenoids*.

## Bibliographie

- Bugianesi, Salucci, Leonardi, Ferracane, Catasta, Azzini & Maiani (2004). Effect of domestic cooking on human bioavailability of naringenin, chlorogenic acid, lycopene and beta-carotene in cherry tomatoes. *European Journal of Nutrition*, 43(6), 360-366 ST
- Castenmiller & West (1998). Bioavailability and bioconversion of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*, 18, 19-38 ST
- Chong, Simsek & Reuhs (2009). Analysis of cell-wall pectin from hot and cold break tomato preparations. *Food Research International*, 42(7), 770-772.
- Colle, Van Buggenhout, Lemmens, Van Loey & Hendrickx (2012). The type and quantity of lipids present during digestion influence the in vitro bioaccessibility of lycopene from raw tomato pulp. *Food Research International*, 45(1), 250-255.
- Colle, Lemmens, Van Buggenhout, Van Loey, & Hendrickx (2010). Effect of Thermal Processing on the Degradation, Isomerization, and Bioaccessibility of Lycopene in Tomato Pulp. *Journal of Food Science*, 75(9), C753-C759 ST
- Colle, Lemmens, Tolesa, Van Buggenhout, De Vleeschouwer, Van Loey & Hendrickx (2010). Lycopene degradation and isomerization kinetics during thermal processing of an olive oil/tomato emulsion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(24), 12784-9.
- Constenla, Lozano, Piloto, & Química (2003). KINETIC MODEL OF PECTIN DEMETHYLATION, *Latin American applied research*, 33, 91-96.
- Deming, & Erdman (1999). Mammalian carotenoid absorption and metabolism. *Pure and Applied Chemistry*, 71(12), 2213-2223 ST -
- Dore, Varoquaux, coordinateurs. (2006). *Histoire et amélioration de 50 plantes cultivées* (INRA, coll., p. 691).
- Dueker, Lin, Buchholz et al. (2000). Long-term kinetic study of beta-carotene, using accelerator mass spectrometry in an adult volunteer. *J Lipid Res*, 41, 1790-1800.
- Edge, McGarvey & Truscott (1997). The carotenoids as anti-oxidants--a review. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 41(3), 189-200.
- Egea, Barsan, Bian, Purgatto, Latché, Chervin, Bouzayen et al. (2010). Chromoplast differentiation: current status and perspectives. *Plant & cell physiology*, 51(10), 1601-11.
- FAO stat. <http://faostat3.fao.org>
- Fahy (2004). Phytosterols: lack of cytotoxicity but interference with beta-carotene uptake in Caco-2 cells in culture. *Food Additives and Contaminants*, 21(1), 42-51.
- Failla, Huo, & Thakkar (2008). In vitro screening of relative bioaccessibility of carotenoids from foods. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17, 200-203 ST

## Bibliographie

- Failla, Thakkar & Maziya-Dixon (2009). BIOACCESSIBILITY OF beta-CAROTENE IN CASSAVA (MANIHOT ESCULANTA, CRANTZ) ROOT IS AFFECTED BY GENOTYPE AND STYLE OF COOKING. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 55, 375-376 ST -
- Faulks & Southon (2005). Challenges to understanding and measuring carotenoid bioavailability. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1740(2), 95-100 ST
- Fernández-García, Carvajal-Lérida & Pérez-Gálvez (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 29(11), 751-60.
- Ferrari & Hubinger (2008). Evaluation of the mechanical properties and diffusion coefficients of osmodehydrated melon cubes. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(11), 2065-2074.
- Fielding, Rowley, Cooper & O'Dea (2005). Increases in plasma lycopene concentration after consumption of tomatoes cooked with olive oil. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 14(2), 131-136 ST -
- Fraser & Bramley (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in lipid research*, 43(3), 228-65.
- Furr & Clark (1997). Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 2863(97), 364-377.
- Garrett, Failla & Sarama (1999). Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 4301-9.
- Gartner (1996). Preferential increase in chylomicron levels of the xanthophylls lutein and zeaxanthin compared to beta-carotene in the human. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 66(2), 119-125.
- Gartner, Stahl, Sies (1997). Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66(1), 116-122.
- Giovanucci, Ascherio, Rimm, Stampfe, Colditz & Willett (1995). Intake of carotenoids and retinol in relation to risk of prostate cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 87, 1767-1776.
- Goodman, Fawcett & Barringer (2002). Flavor, Viscosity, and Color Analyses of Hot and Cold Break Tomato Juices. *Journal of Food Science*, 67(1), 404-408.
- Granado-Lorenzo, Herrero-Barbudo, Blanco-Navarro, Pérez-Sacristán & Olmedilla-Alonso (2009). Bioavailability of carotenoids and alpha-tocopherol from fruit juices in the presence of absorption modifiers: in vitro and in vivo assessment. *The British journal of nutrition*, 101(4), 576-82.

## Bibliographie

- Granado-Lorenzo, Fernando, Olmedilla-Alonso, Herrero-Barbudo, Pérez-Sacristan, Blanco-Navarro & Blazquez-García (2007). Comparative in vitro bioaccessibility of carotenoids from relevant contributors to carotenoid intake. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(15), 6387-94.
- Gupta, Kopec, Schwartz & Balasubramaniam (2011). Combined pressure-temperature effects on carotenoid retention and bioaccessibility in tomato juice. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(14), 7808-17.
- Génard, Robin, Gautier, Massot, Bénard, Larbat, Bertin et al. (2010). Innovations Agronomiques 9 , 47-57.
- Hageman, Li (1999). Excess vitamin E decreases canthaxanthin absorption in the rat. *Lipids*, 34(6), 627-631.
- Hammond, Wooten, Snodderly (1999). A practical method for measuring macular pigment optical density in diverse populations. *INVESTIGATIVE OPHTHALMOLOGY & VISUAL SCIENCE*, 40(4), 165.
- Hedren, Mulokozi & Svanberg (2002). In vitro accessibility of carotenes from green leafy vegetables cooked with sunflower oil or red palm oil. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 53(6), 445-453 ST
- Hof, Boer, Tijburg, Lucius, Zijp, West, Hautvast et al. (2000). Human Nutrition and Metabolism Carotenoid Bioavailability in Humans from Tomatoes Processed in Different Ways Determined from the Carotenoid Response in the Triglyceride-Rich Lipoprotein Fraction of Plasma after a Single Consumption and in Plasma after Fo. *In Vitro*, (August 1999), 1189-1196.
- Hojnik, Skerget & Knez (2008). Extraction of lutein from Marigold flower petals – Experimental kinetics and modelling. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 2008-2016.
- Holden, Eldridge, Beecher, Buzzard, Bhagwat, Davis, Douglass et al. (1999). Carotenoid Content of U . S . Foods: An Update of the Database, 196, 604-630.
- Homero-Mendez & Minguez-Mosquera,(2007). Bioaccessibility of carotenes from carrots: Effect of cooking and addition of oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(3), 407-412
- Hussein & El-Tohamy (1989). Effect of supplementation with vitamin A or plant sources on plasma retinol levels among young Egyptian males. *Internat J Vit Nutr Res*, 59, 229-233.
- Jarvis (1984). Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant. Cell and Environment*, 7, 153-164.

## Bibliographie

- Kim, Rensing, Douglas & Cheng (2010). Chromoplasts ultrastructure and estimated carotene content in root secondary phloem of different carrot varieties. *Planta*, 231(3), 549-558  
ST
- Knockaert, De Roeck, Lemmens, Van Buggenhout, Hendrickx & Van Loey (2011). Effect of thermal and high pressure processes on structural and health-related properties of carrots (*Daucus carota*). *Food Chemistry*, 125(3), 903-912.
- LAVAL-MARTIN (1995). *Physiologie végétale I, Nutrition et métabolisme* (Hermann, pp. 269-280).
- Legland, Devaux, Bouchet , Guillon (2012). Cartography of cell morphology in tomato pericarp at the fruit scale. *J Microsc*, 247(1), 78-93.
- Lemmens, Van Buggenhout, Van Loey & Hendrickx (2010). Particle Size Reduction Leading to Cell Wall Rupture Is More Important for the beta-Carotene Bioaccessibility of Raw Compared to Thermally Processed Carrots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12769-12776
- Lemmens, Lien, Van Buggenhout, Oey, Van Loey & Hendrickx, (2009). Towards a better understanding of the relationship between the  $\beta$ -carotene in vitro bio-accessibility and pectin structural changes: A case study on carrots. *Food Research International*, 42(9), 1323-1330.
- Lin, Aizawa, Inakuma, Yamauchi & Kato (2005). Physical properties of water-soluble pectins in hot- and cold-break tomato pastes. *Food Chemistry*, 93(3), 403-408.
- Maiani, Castón, Catasta, Toti, Cambrodón, Bysted, Granado-Lorencio et al. (2009). Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular nutrition & food research*, 53 Suppl 2, S194-218.
- Marisiddaiah & Baskaran (2009). Bioefficacy of beta-carotene is improved in rats after solubilized as equimolar dose of beta-carotene and lutein in phospholipid-mixed micelles. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 29(8), 588-95.
- McClements, Decker, Park & Weiss (2008). Designing Food Structure to Control Stability, Digestion, Release and Absorption of Lipophilic Food Components. *Food Biophysics*, 3(2), 219-228.
- Mertens & Knorr (1992). Developments of nonthermal processes for food preservation. *Food Technology*, 46(5), 124-133.
- Miller, Schricker, Rasmussen, Van Campen (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 2248-2256.

## Bibliographie

- Moussa, Gouranton, Gleize, Yazidi, Niot, Besnard, Borel et al. (2011). CD36 is involved in lycopene and lutein uptake by adipocytes and adipose tissue cultures. *Molecular nutrition & food research*, 55(4), 578-84.
- Moussa, Landrier, Reboul, Ghiringhelli, Coméra, Collet, Fröhlich et al. (2008). Lycopene absorption in human intestinal cells and in mice involves scavenger receptor class B type I but not Niemann-Pick C1-like 1. *The Journal of nutrition*, 138(8), 1432-6.
- Nagao (2009). Absorption and Function of Dietary Carotenoids. *Food Factors for Health Promotion* (Vol. 61, pp. 55-63 ST
- Nayak, Harrison, Hussain,(2001). Retinyl ester secretion by intestinal cells: a specific and regulated process dependent on assembly and secretion of chylomicrons. *Journal of Lipid Research*, 42, 272-280.
- Omoni & Aluko (2005). The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 16(8), 344-350.
- Ornelas-Paz, Failla, Yahia & Gardea-Bejar (2008). Impact of the stage of ripening and dietary fat on in vitro bioaccessibility of beta-carotene in "Ataulfo" mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1511-1516
- O'Callaghan & O'Brien (2010). Bioaccessibility, cellular uptake and transepithelial transport of  $\alpha$ -tocopherol and retinol from a range of supplemented foodstuffs assessed using the caco-2 cell model. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(7), 1436-1442.
- O'Neill, Carroll, Corridan, Olmedilla, Granado, Blanco, Berg, et al. (2007). A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. *British Journal of Nutrition*, 85(04), 499.
- O'Sullivan (2009). Investigation of beta-carotene and Lutein Transport in Caco-2 Cells: Carotenoid-carotenoid Interactions and Transport Inhibition by Ezetimibe. *International Research, for Vitamin and Nutrition*, 79(5-6), 337-347.
- Paetau & Chen (1997). Interactions in the postprandial appearance of beta-carotene and canthaxanthin in plasma triacylglycerol-rich lipoproteins in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66(5), 1133-1143.
- Page, Van Stratum, Degrou, & Renard (2012). Kinetics of temperature increase during tomato processing modulate the bioaccessibility of lycopene. *Food chemistry*, 135(4), 2462-9.
- Parada & Aguilera (2007a). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of food science*, 72(2), R21-32.

## Bibliographie

- Patil, Jayaprakasha, Chidambara Murthy & Vikram (2009). Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(18), 8142-60.
- Pennington (2002). Food Composition Databases for Bioactive Food Components. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15(4), 419-434.
- Pudney, Gambelli & Gidley (2011). Confocal Raman microspectroscopic study of the molecular status of carotenoids in tomato fruits and foods. *Applied Spectroscopy*, 65(2), 127-134.
- Pérez-Conesa, García-Alonso, García-Valverde, Iniesta, Jacob, Sánchez-Siles, Ros et al. (2009). Changes in bioactive compounds and antioxidant activity during homogenization and thermal processing of tomato puree. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 179-188.
- Rao (1998). Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene. *Food Research International*, 31(10), 737-741.
- Rao & Rao (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 55(3), 207-16.
- Rao & Agarwal (1998). Lycopene content of tomatoes and tomato products and their contribution to dietary lycopene. *Food Research International*, 31(10), 737-741.
- Raven, Evert (1999). *biologie végétale* (de Boeck., pp. 17-73).
- Reboul, Richelle, Perrot, Desmoulins-Malezet, Pirisi & Borel (2006). Bioaccessibility of carotenoids and vitamin E from their main dietary sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8749-8755
- Reboul, Borel, Mikail, Abou, Charbonnier, Caris-Veyrat, Goupy et al. (2005). Enrichment of tomato paste with 6% tomato peel increases lycopene and beta-carotene bioavailability in men. *Journal of Nutrition*, 135(4), 790-794.
- Reboul, Thap, Perrot, Amiot (2007). Effect of the main dietary antioxidants (carotenoids, gamma-tocopherol, polyphenols, and vitamin C) on alpha-tocopherol absorption. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(10), 1167-1173.
- Reboul, Thap, Tourniaire, Andre, Juhel, Morange, Amiot (2007). Differential effect of dietary antioxidant classes (carotenoids, polyphenols, vitamin C and vitamin E) on lutein absorption. *British Journal of Nutrition*, 97, 440-446.

## Bibliographie

- Reboul, Borel, Abou, Charbonnier, Caris-veyrat, Goupy & Lairon (2005). Human Nutrition and Metabolism Enrichment of Tomato Paste with 6 % Tomato Peel Increases Lycopene and  $\beta$ -Carotene Bioavailability in Men 1. *Small*, (October 2004), 790-794.
- Renard (1999). Acetylation and methylation of homogalacturonans. 2 : effect on ion-binding properties and conformations. *Carbohydrate Polymers*, 209-216.
- Ribaya-Mercado. (2002). Influence of dietary fat on beta-carotene absorption and bioconversion into vitamin A. *Nutrition Reviews*, 60(4), 104-110.
- Richelle, Enslin, Hager, Groux, Tavazzi, Godin, Berger, Metairon, Quaile, Piguet-Welsch, Sagalowicz (2004). Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(1), 171-177.
- Riso, Brusamolino, Scalfi & Porrini (2004). Bioavailability of carotenoids from spinach and tomatoes. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 14(3), 150-156
- Rock, Loalvo, Emenhiser, Ruffin, Flatt & Schwartz (1998). Bioavailability of beta-carotene is lower in raw than in processed carrots and spinach in women. *The Journal of nutrition*, 128(5), 913-6.
- Rodriguez-Amaya (2010a). Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 726-740.
- Rodriguez-Amaya (2010b). Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 726-740.
- Roodenburg , Leenen, Hof (2000). Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alpha-carotene, beta-carotene, and vitamin E in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71(5), 1187-1193.
- Ruiz, Reich, Bureau, Renard & Audergon (2008). Application of reflectance colorimeter measurements and infrared spectroscopy methods to rapid and nondestructive evaluation of carotenoids content in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(13), 4916-22.
- SONITO. <http://www.sonito.fr/>.
- Sambruy, Ferruzza, Ranaldi, Angelis, (2001). Intestinal cell culture models. *Cell Biology and Toxicology*, 17, 301-317.
- Shi & Le Maguer (2000). Lycopene in tomatoes: Chemical and physical properties affected by food processing. *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(4), 293-334 ST .

## Bibliographie

- Smelt (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 152-158.
- Svelander, Tiback, Ahrne, Langton, Svanberg & Alminger (2010). Processing of tomato: impact on in vitro bioaccessibility of lycopene and textural properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), 1665-1672
- Sérino, Gomez, Costagliola & Gautier (2009a). HPLC assay of tomato carotenoids: validation of a rapid microextraction technique. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(19), 8753-60.
- Sérino, Gomez, Costagliola & Gautier (2009b). HPLC assay of tomato carotenoids: validation of a rapid microextraction technique. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(19), 8753-60.
- Stacewiczapuntzakis (1994). Pharmacokinetics of beta-carotene and canthaxanthin after ingestion of individual and combined doses by human subjects. *Journal of the American College of Nutrition*, 13(6), 665-671.
- Tanaka, Sasaki & Ohmiya, A. (2008a). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 54(4), 733-49.
- Tanaka, Sasaki, & Ohmiya (2008b). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 54(4), 733-49.
- Thakkar, Maziya-Dixon, Dixon & Failla (2007). beta-Carotene micellarization during in vitro digestion and uptake by Caco-2 cells is directly proportional to beta-Carotene content in different genotypes of cassava. *Journal of Nutrition*, 137(10), 2229-2233
- Tiback, Svelander, Colle, Altskar, Alminger, Hendrickx, Ahrne et al. (2009). Mechanical and Thermal Pretreatments of Crushed Tomatoes: Effects on Consistency and In Vitro Accessibility of Lycopene. *Journal of Food Science*, 74(7), E386-E395.
- Mechanical and Thermal Pretreatmen. doi:10.1111/j.1750-3841.2009.01255.x
- Tibäck, Svelander, Colle, Altskär, Alminger, Hendrickx, Ahrné & Langton(2009a). Mechanical and thermal pretreatments of crushed tomatoes: effects on consistency and in vitro accessibility of lycopene. *Journal of food science*, 74(7), E386-95.
- Tyssandier, Reboul, Dumas, Bouteloup-Demange, Armand, Marcand, Sallas, et al. (2003). Processing of vegetable-borne carotenoids in the human stomach and duodenum. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 284(6), G913-23.
- Tyssandier, Cardinault, Caris-Veyrat, Amiot, Grolier, Bouteloup (2002). Vegetable-borne lutein, lycopene, and beta-carotene compete for incorporation into chylomicrons, with no adverse effect on the medium-term (3-wk) plasma status of carotenoids in human. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75(3), 526-534.

## Bibliographie

- Tzouganaki & Koupparis (2002). Development and validation of liquid chromatographic method for the determination of lycopene in plasma. *Analytica Chimica Acta*, 467, 115-123.
- Unlu, Bohn, Francis, Nagaraja, Clinton & Schwartz (2007). Lycopene from heat-induced cis-isomer-rich tomato sauce is more bioavailable than from all-trans-rich tomato sauce in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 98(1), 140-146.
- Van Buggenhout , Sila, Duvetter, Van Loey & Hendrickx (2009). Pectins in processed fruits and vegetables: Part III – Texture engineering. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 105-117.
- van den Berg (1999). Carotenoid interactions. *Nutrition Reviews*, 57(1), 1-10
- van Lieshout, West & van Breemen (2003). Isotopic tracer techniques for studying the bioavailability and bioefficacy of dietary carotenoids, particularly beta-carotene, in humans: a review. *The American journal of clinical nutrition*, 77(1), 12-28.
- Vishnevetsky (1999). Carotenoid sequestration in plants: The role of carotenoid-associated proteins. *Trends Plant Sci*, 4, 232-235.
- Wackerbarth, H., Stoll, T., Gebken, S., Pelters, C., & Bindrich, U. (2009). Carotenoid–protein interaction as an approach for the formulation of functional food emulsions. *Food Research International*, 42(9), 1254-1258.
- Wilbur A Gould.. *Tomato production, processing and technology*. (C. P. INC, Ed.).
- Williams, Boileau & Erdman (1998). Factors influencing the uptake and absorption of carotenoids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 218(2), 106-108 .
- Yeum & Russell (2002a). Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual review of nutrition*, 22, 483-504.
- Yeum & Russell (2002b). Carotenoid bioavailability and bioconversion. *Annual review of nutrition*, 22, 483-504.
- Yonekura & Nagao (2007). Intestinal absorption of dietary carotenoids. *Molecular nutrition & food research*, 51(1), 107-15.
- Zaripheh & Erdman (2002). Symposium: Can Lutein Protect Against Chronic Disease? Factors That Influence the Bioavailability of Xanthophylls 1 , 2, 531-534.
- .



## **Etude de l'impact des procédés de transformation sur la diffusion des caroténoïdes : cas du lycopène de la tomate**

RESUME - Les caroténoïdes sont une famille de molécules lipidiques que l'on trouve en particulier dans les végétaux, et qui ont pour caractéristique visuelle d'être colorés, du jaune au rouge. Ils ont été identifiés comme nutritionnellement actifs par des études épidémiologiques. Afin de pouvoir jouer un rôle dans l'organisme les caroténoïdes doivent être absorbés. Pour ce faire ils doivent être libérés de la matrice alimentaire afin de passer après plusieurs étapes dans la circulation sanguine. Or les caroténoïdes des végétaux sont connus pour être peu biodisponible. Cette biodisponibilité augmente après transformation. L'objectif de ce travail est donc de comprendre l'effet des procédés de fabrication sur la bioaccessibilité, en développant un outil simple permettant aux industriels de l'évaluer facilement. Le lycopène de la tomate a été choisi comme molécule d'intérêt. Dans un premier temps, une méthode d'étude de la diffusion du lycopène entre la matrice végétale et la phase lipidique du bolus alimentaire est mise en place. En utilisant cette méthode avec un large extrait d'huile, seulement 31%±1% du lycopène a pu être extrait du jus de tomate vers la phase huile. Avec des ratio faible (entre 0.11 et 1) huile/tomate, l'extraction du lycopène est limitée par la saturation de l'huile. La diffusion du lycopène ne varie pas significativement avec le pH mais va augmenter lorsque la température varie de 10 °C à 37 °C. A partir de ces résultats sont calculés les facteurs de partition du lycopène dans l'huile ainsi que sa diffusivité. Dans un deuxième temps, des échantillons contrastés à base de tomates sont réalisés par l'utilisation des procédés Hot Break (HB) et Cold Break (CB) afin de vérifier l'impact des procédés de transformation sur les propriétés de diffusion du lycopène. Enfin, le test de diffusion a été appliqué à différentes matrices, produits commerciaux, ou frais transformés en laboratoire afin de vérifier son aptitude à les classer. Ce travail a permis de construire les bases d'un modèle de diffusion du lycopène prenant en compte la première étape de son ingestion, la diffusion vers la phase lipidique. Les résultats obtenus pourront être confrontés à des résultats sur d'autre matrice et ainsi permettre l'élaboration d'un modèle de digestion tenant compte des différents paramètres mis en avant au cours de cette étude.

**Mot clés :** lycopène, diffusion, procédé de transformation, bioaccessibilité.

### **Study of the effect of processing methods on the diffusion of carotenoids: lycopene case of tomato**

RESUME - Carotenoids are natural fat-soluble pigments synthesized by plants, and especially found in relatively high amounts in numerous fruits and vegetables and which have the visual characteristic of being colored from yellow to red. These compounds were identified as being beneficial to health by epidemiological studies. In order to play a role in body carotenoids have to be absorbed. They must be released from the matrix to pass in the lipid phase of the bolus. Or plant carotenoids are known to have a low bioavailability. The bioavailability increases after transformation. The objective of this work is to understand the effect of manufacturing processes on the bioavailability, developing a simple tool allowing manufacturers to easily evaluate Lycopene tomato was selected as molecule of interest. Therefore we designed a model to evaluate these parameters which can modify carotenoids diffusion. Using this model, even with a large excess of oil, only 31%±1% of lycopene could be extracted from tomato juice to the oil phase. At low (between 0,11 and 1) oil/tomato ratio, extraction of lycopene was limited by saturation of the oil phase. The lycopene diffusion did not vary significantly with pH but it doubled when temperature rose from 10 °C to 37 °C. From these results are calculated factors partition of lycopene in oil and its diffusivity. Secondly, contrasting tomato samples were carried out by using the two industrial methods Hot Break (HB) and Cold Break (CB) in order to verify the effect of processing methods on the diffusion properties of lycopene. Finally, the diffusion test was applied to different matrix, commercial products, or fresh products processed in the laboratory to verify its ability to classify them. This work gave stable and repeatable results and may be used for a reliable and quick evaluation of the impact of process on food matrix, which could enhance the carotenoid bioavailability. It is also a powerful tool to study the physico-chemical parameters that may affect this bioaccessibility. Results obtained may be used to develop a new model of digestion with used various parameters highlighted during this study.

**Keywords :** lycopene, diffusion, processing methods, bioaccessibility.