

JAIME ANDRES MOGOLLON

**EFFETS DE LA CONSOMMATION DE CHOCOLAT
SUR LA FONCTION ENDOTHÉLIALE ET LA
TENSION ARTÉRIELLE DES FEMMES ENCEINTES:
UNE ÉTUDE PILOTE.**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en épidémiologie
pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

Résumé

Plusieurs essais cliniques randomisés (ECR) suggèrent un effet bénéfique des flavanols du chocolat sur la tension artérielle (TA) et la fonction endothéliale (FE). Aucun ECR n'a évalué ces effets chez les femmes enceintes. L'objectif de cet ECR pilote est de vérifier la faisabilité d'un ECR de grande envergure évaluant les effets du chocolat sur la FE et la TA de femmes enceintes.

Quarante quatre femmes enceintes ont été randomisées au groupe chocolat riche en flavanols (n=23) ou à teneur faible en flavanols (n=21). À la randomisation, 60, 120 et 180 minutes après la prise unique de chocolat (40 g) et 6 et 12 semaines après une prise quotidienne de chocolat (20 g), la FE, la TA, les concentrations sériques de flavanols et de théobromine (CFT) ont été évaluées.

Après 180 minutes, la consommation de chocolat riche en flavanols s'est accompagnée d'une augmentation significative de flavanols et de théobromine. Aucun changement significatif sur la FE et la TA n'a été observé.

Abstract

Background: Several randomized clinical trials (RCTs) indicate that flavanol-rich chocolate has beneficial effects on flow-mediated dilation (FMD) and blood pressure (BP). However, no RCTs have evaluated these outcomes in pregnant women.

Aims: The objective of this 2-group, parallel, double-blind RCT was to examine the effects of flavanol-rich chocolate on FMD and BP in pregnant women with normal BP.

Methods: Forty-four healthy, pregnant women were randomized to the high-flavanol (n = 23) or low-flavanol (n = 21) chocolate consumption for 12 weeks. At randomization (0, 60, 120 and 180 min after a single 40-g dose of chocolate), 6 and 12 weeks after daily 20-g chocolate intake, we evaluated plasma concentrations of flavanols and theobromine, as well as the FMD and BP.

Results: Plasma epicatechin was significantly increased ($p < 0.001$) 180 min after the consumption of 40-g high-flavanol chocolate compared to low-flavanol chocolate. Theobromine concentrations were significantly higher 180 min and 12 weeks after the intake of experimental chocolate or low-flavanol chocolate ($p < 0.001$). FMD and blood pressure were not different between the 2 groups at all pre-defined time periods. No other significant within-group or between-group changes were observed.

Conclusion: These results confirm the feasibility of a large-scale RCT comparing daily consumption of flavanol-rich chocolate to an equivalent placebo during pregnancy and demonstrate higher plasma concentration of epicatechin in the intervention group.

Keywords: Cacao, chocolate, theobromine, flavanols, pregnant women, hypertension, pregnancy-induced, preeclampsia, epicatechin.

Avant-propos

Ce mémoire présente les résultats de mon projet de maîtrise réalisé sous la supervision de la docteure Sylvie Dodin dans le cadre de ses fonctions de directrice de recherche. Au fil du projet, en tant que premier auteur, j'ai collaboré à la saisie, à l'analyse des données et à la rédaction de la première version de l'article présenté. Cet essai clinique randomisé a été présenté lors de la Journée annuelle de la recherche de la Faculté de Médecine de l'Université Laval, Québec 7 de juin 2011. L'article *"Blood pressure and endothelial function in healthy, pregnant women after acute and daily consumption of flavanol-rich chocolate: a pilot, randomized controlled trial"* a été soumis en Mai 2012 au *Nutrition Journal*.

Au terme de ce projet, je voudrais souligner le travail de ma directrice de recherche la Dr Sylvie Dodin qui a supervisé chacune des étapes de ma maîtrise. Je la remercie spécialement de m'avoir si bien accueilli au sein de l'équipe de recherche. J'aimerais aussi remercier Claudine Blanchet et Carole Thiébault pour leur appui, leur disponibilité et leurs recommandations pertinentes dans mes tâches quotidiennes. Grâce au milieu de travail sain et équilibré qui règne dans cette équipe de recherche j'ai mené à bon terme mon mémoire. Finalement, merci au personnel de l'Université Laval, spécialement du Centre de recherche de l'Hôpital Saint-François d'Assise et L'Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels (INAF).

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract	iii
Avant-propos	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures et annexes	x
Introduction.....	1
CHAPITRE I.....	4
PROBLÉMATIQUE ET ÉTAT DES CONNAISSANCES	4
1.1 Description des connaissances actuelles	4
1.1.1 L'hypertension artérielle induite par la grossesse	4
1.1.1.1 Définition	4
1.1.1.2 L'endothélium vasculaire	5
1.1.1.3 La dysfonction endothéliale : une cible pour la prévention	6
1.1.2 Flavonoïdes alimentaires	7
1.1.2.1 Flavonoïdes et fonction endothéliale.....	8
1.1.2.2 Flavonoïdes et tension artérielle.....	10
1.1.2.3 Flavonoïdes et autres facteurs de risque des maladies cardiovasculaires.....	11
1.1.3 Risques de pré éclampsie dans les études d'observation	12
1.1.4 Mécanismes potentiels responsables des effets du chocolat.....	15
1.2 Objectifs poursuivis par le projet.....	16
1.2.1 Général.....	16
1.2.2 Secondaires.....	16
CHAPITRE II.....	17
MÉTHODOLOGIE.....	17
2.1 Type de recherche	17
2.2 Critères d'inclusion et d'exclusion	17
2.3 Nature des procédés et déroulement de l'étude.....	18
2.4 Description du groupe expérimental et du groupe témoin	21
2.5 Analyse des données	22
2.5.1 Le critère de jugement principal	22
2.5.2 Critères de jugement secondaires.....	24
2.5.3 Co-interventions et co-variables documentées durant le suivi	24
2.5.4 Évaluation des effets secondaires	25
2.6 Analyses statistiques	25
2.7 Considérations éthiques.....	26
2.7.1 Risques et effets secondaires encourus par la participante	26

2.7.2	Analyse et évaluation des avantages et inconvénients reliés au projet..	26
2.7.3	Confidentialité des données	26
2.7.4	Conditions de participation ou de retrait de la participante au projet ...	28
CHAPITRE III	29
RÉSULTATS	29
3.1	Faisabilité de l'essai clinique randomisé de grande envergure	29
3.1.1	Critères d'évaluation de la faisabilité de l'étude :.....	29
3.1.1.1	Méthodes potentielles de recrutement	29
3.1.1.2	Difficultés reliées au recrutement des sujets	29
3.1.1.3	Acceptabilité et adhésion aux interventions	31
3.1.1.4	Adhésion aux procédures en double aveugle.....	31
3.1.1.5	Pertes au suivi.....	32
BLOOD PRESSURE AND ENDOTHELIAL FUNCTION IN HEALTHY, PREGNANT WOMEN AFTER ACUTE AND DAILY CONSUMPTION OF FLAVANOL-RICH CHOCOLATE: A PILOT, RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL		34
3.2	Résumé.....	35
3.3	Abstract.....	36
3.4	Introduction	38
3.5	Patients and methods	39
3.6	Results.....	44
3.7	Discussion.....	46
3.8	Conclusion	51
References	53
CONCLUSION GÉNÉRALE	57
Bibliographie	61

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition des chocolats.....	21
Tableau 2. Modalités de recrutement des participantes.....	30
Tableau 3. Difficultés reliées au recrutement.....	30
Tableau 4. Critères d'acceptabilité de la consommation de chocolat par les femmes enceintes.....	32
Tableau 5. Efficacité du double insu.....	32
Table 1. Chocolate composition (20-g).....	67
Table 2. Demographic characteristics.	68
Table 3. Baseline characteristics of 44 pregnant women by study arm.....	69
Table 4. Acute changes in the plasma concentrations of biomarkers after single dose chocolate intake.....	70
Table 5. Acute changes in methylxanthines concentrations after single dose chocolat intake	71
Table 6. Chronic changes in methylxanthines concentrations after daily consumption of 20-g chocolate	72
Table 7. Acute changes in FMD and BP after single dose chocolate intake.....	73
Table 8 Changes in FMD and BP after daily consumption of 20-g chocolate for 6 and 12 weeks.....	74
Table 9 Differences in energy and macronutrient intakes after 12 weeks of chocolate consumption.....	75
Table 10 Body weight and BMI after chocolate consumption for 12 weeks.....	76

Liste des figures et annexes

Figure 1. Flow diagram of study participants.....	77
Annexe A. Déroulement de l'étude	78

Introduction

L'hypertension artérielle induite par la grossesse complique environ 8% de l'ensemble des grossesses et augmente de cinq fois le risque de mortalité périnatale.¹ Cette hypertension se définit par des valeurs de tension artérielle (TA) supérieures ou égales à 140/90 mm Hg après 20 semaines de gestation chez des femmes ayant antérieurement une TA normale.² Le quart des femmes présentant une hypertension artérielle gravidique développera une pré-éclampsie.³

L'endothélium vasculaire, la couche la plus interne des vaisseaux sanguins, en contact étroit avec le sang est impliqué dans la régulation du tonus vasculaire, favorisant la dilation ou la contraction des vaisseaux sanguins. Au cours de la grossesse normale, la colonisation trophoblastique des artères spiralées supprime l'endothélium ainsi que les tissus élastiques et musculaires.¹ Ces modifications physiologiques permettent l'augmentation du débit sanguin nécessaire au déroulement normal de la grossesse.² L'hypertension gravidique est la manifestation d'une ischémie placentaire liée à un défaut de la seconde invasion trophoblastique des artères spiralées du myomètre survenant vers la fin du 1^{er} trimestre de grossesse. Cette ischémie placentaire est responsable de la libération de facteurs sériques spécifiques de l'endothélium vasculaire. Il en résulte une stimulation de la synthèse de thromboxane A₂ (TXA₂), une diminution de la synthèse de prostaglandines vasodilatatrices et d'oxyde nitrique (NO) et l'apparition de marqueurs biochimiques endothéliaux (fibronectine, facteur VIII) avec pour conséquences, la stimulation de l'activité procoagulante et la disparition de la dilatation physiologique.

Chez les femmes ayant une grossesse normale, la vasodilatation de l'endothélium augmente lors du 3^e trimestre de grossesse comparativement au 1^{er} et 2^e trimestre de grossesse et à des femmes non enceintes.^{4,5} Ces résultats supportent

l'hypothèse d'une augmentation de l'activité du NO lors de la grossesse normale,^{6,7,8} ce qui pourrait contribuer à la diminution de la résistance périphérique. L'endothélium vasculaire devrait donc constituer une cible thérapeutique importante pour la prévention ou le traitement de l'hypertension gravidique.

Plusieurs études suggèrent que les flavonoïdes auraient un effet bénéfique au niveau vasculaire. Il a été estimé qu'une alimentation occidentale typique fournit un apport d'environ 1 g de polyphénols, dont près des deux tiers seraient composés de flavonoïdes.⁹ On retrouve en quantités importantes certains de ces flavonoïdes dans le chocolat (catéchine, épicatechine, procyanidine). Les auteurs de trois méta-analyses¹⁰⁻¹² ont conclu à un effet bénéfique de la consommation de chocolat sur la TA. De plus, les résultats de deux récents essais cliniques^{13,14} réalisés auprès d'adultes présentant une pré-hypertension ou une hypertension artérielle de stade 1, sont en accord avec ceux de la méta-analyse. Une diminution significative de la TA suite à la consommation quotidienne de chocolat noir riche en flavanols comparativement à un chocolat avec peu de flavanols a été observée. Chez les femmes enceintes, les effets de la consommation de chocolat sont controversés. Les résultats d'une étude de cohorte¹⁵ et d'une étude cas témoins¹⁶ suggèrent une association entre la consommation régulière de chocolat et le risque de pré-éclampsie. Cette association n'est cependant pas retrouvée dans une autre étude cas témoins¹⁷.

À notre connaissance, aucun essai clinique n'a évalué les effets spécifiques du chocolat sur la TA de femmes enceintes. La réalisation d'un essai clinique de grande envergure permettra donc d'établir avec rigueur scientifique l'efficacité du chocolat sur ces paramètres. La réalisation d'une étude pilote permettra dans une 1^{ère} étape, de vérifier la faisabilité d'un essai clinique de plus grande envergure et

de tester les différents aspects méthodologiques propres à la mise en place de cet essai clinique.

CHAPITRE I

PROBLÉMATIQUE ET ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Description des connaissances actuelles

1.1.1 L'hypertension artérielle induite par la grossesse

Quoique la recherche sur la pré éclampsie se soit intensifiée ces dernières années, aucune prévention substantielle de ce désordre idiopathique n'est encore disponible. Plusieurs stratégies, telles que les agents anti plaquettaires, les suppléments de calcium, ou les anti oxydants ont fait l'objet de plusieurs essais cliniques dont les résultats sont mitigés.^{1,18} De plus, des données récentes suggèrent une augmentation de l'incidence des petits poids à la naissance associée à la prise d'antioxydants¹⁹.

1.1.1.1 Définition

L'hypertension artérielle gestationnelle est définie par des valeurs de tension artérielle supérieures ou égales à 140/90 mm hg lors de la 2^{ème} moitié de la grossesse chez les femmes ayant une tension artérielle normale avant la grossesse². Entre 15 et 25 % des femmes présentant une hypertension gestationnelle développeront une pré éclampsie (PE), débutant habituellement au cours du 3^{ème} trimestre³. Une histoire personnelle ou familiale de pré éclampsie, la primiparité, l'obésité, et le diabète sont les principaux facteurs de risque de pré éclampsie²⁰. La PE survient chez 2 à 7% des femmes primipares, chez 14% des femmes présentant une grossesse gémellaire, et 18% des femmes ayant eu une PE lors d'une grossesse antérieure²¹.

Chaque année, la PE est responsable de 60,000 décès à travers le monde. Plus de la moitié des femmes présentant une PE accoucheront par césarienne¹. La PE augmente de cinq fois le risque de mortalité périnatale. La PE est la 1^{ère} cause des petits poids de naissance et décès périnataux, et de l'augmentation du risque d'accouchement prématuré et de retard de croissance intra utérin. Les résultats d'une méta-analyse récente suggèrent que les femmes ayant un antécédent de PE ont 4 fois plus de risque de développer ultérieurement une HTA. Ces femmes ont également 2 fois plus de risque de maladie ischémique, d'accident vasculaire cérébral et de thrombophlébite et 1,5 fois plus de risque de mortalité toutes causes confondues que les femmes n'ayant pas cet antécédent²².

1.1.1.2 L'endothélium vasculaire

L'endothélium n'est pas une simple barrière entre le sang circulant et les couches vasculaires sous-jacentes. Il est impliqué à la fois dans la régulation physiologique du tonus vasculaire, dans la régulation de l'homéostasie vasculaire à travers plusieurs interactions complexes et dans les transformations structurales des vaisseaux prenant place lors de manifestations pathologiques. Plus spécifiquement, l'endothélium régule le tonus de l'artère en équilibrant la production de vasodilatateurs, dont le NO, et de vasoconstricteurs²³. Le NO libéré par l'endothélium est synthétisé à partir de la L-arginine sous l'action enzymatique de la NO synthase. L'endothélium contrôle aussi la fluidité sanguine et la coagulation et peut moduler les processus inflammatoires en produisant des cytokines et des molécules d'adhésion. Lors d'une dysfonction endothéliale, un déséquilibre des facteurs homéostatiques de l'endothélium apparaît. Cet état est caractérisé entre autre par une baisse de la production ou de la biodisponibilité du NO.

1.1.1.3 La dysfonction endothéliale : une cible pour la prévention

Le placenta joue un rôle crucial dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle induite par la grossesse. En effet, dans la majorité des cas la PE est la manifestation d'une anomalie de l'invasion trophoblastique²⁴ secondaire des artères spiralées du myomètre à la fin du 1^{er} trimestre, ayant pour conséquence l'augmentation de la résistance utéro placentaire²⁵. Le placenta hypo perfusé libère des facteurs vaso-constricteurs dans la circulation systémique maternelle, responsable de la dysfonction endothéliale menant à l'hypertension et la protéinurie. Un important mécanisme impliqué dans la pathogénie de la PE est le déséquilibre entre les facteurs vasodilatateurs (prostacycline, NO) et vasoconstricteurs (Thromboxane, Angiotensine A-2).^{26,27} Des études récentes confirment l'augmentation des concentrations de L-arginine à 23-25 semaines de grossesse chez les femmes qui développeront ultérieurement une PE²⁸, renforçant le rôle de l'enzyme NO synthétase dans la physiopathologie de la PE.

Chez les femmes enceintes, la mesure de la vasodilatation dépendante de l'endothélium (FMD) de l'artère brachiale est l'une des techniques existantes pour mesurer la fonction endothéliale²⁹⁻³⁴. La FMD est une mesure non invasive validée qui est utilisée pour mesurer la capacité de l'artère à se dilater ou se contracter lorsqu'elle est soumise à une cascade de messagers biochimiques (par hyperémie réactive)³⁵. Un stimulus provoque le relâchement du NO par l'endothélium suivi d'une vasodilatation qui peut être imagée et quantifiée en un index de la fonction vasomotrice. La réactivité de l'artère brachiale à l'hyperémie est *dépendante de l'endothélium*, car la production du NO par l'endothélium est activée via l'acétylcholine et les récepteurs α -adrénergiques³⁵. Par la suite, le NO vient relaxer les cellules musculaires lisses. Il s'agit donc d'une mesure de la capacité de l'endothélium à produire du NO. Plus l'artère brachiale réagit au NO, plus elle est en santé et moins elle favorise le développement de l'athérosclérose. La FMD des

femmes souffrant de PE est significativement plus basse que celles des femmes ayant une grossesse normale^{28,36,37}. Nous avons récemment confirmé que la fonction endothéliale des femmes à risque de pré éclampsie était perturbée et que cette dysfonction endothéliale précède l'apparition des manifestations cliniques de la pré éclampsie. En effet, nos données préliminaires indiquent que la FMD des femmes à risque de pré éclampsie telle que défini par la présence d'incisures proto diastoliques ou « notches » identifiées lors d'un doppler des artères utérines au 1^{er} trimestre de la grossesse était significativement plus faible que celle des femmes ayant une perfusion placentaire normale. Ces résultats supportent l'hypothèse que la dysfonction endothéliale joue un rôle crucial dans la physiopathologie de la PE. L'endothélium vasculaire représente une cible thérapeutique majeure dans la prévention de la PE.

1.1.2 Flavonoïdes alimentaires

Les polyphénols sont les antioxydants les plus abondants dans l'alimentation. On les retrouve particulièrement dans les fruits, les légumes, les céréales, le chocolat, le thé, le café et le vin. Plusieurs centaines de polyphénols ont été identifiés dans les aliments. Les deux principaux sont les flavonoïdes et les acides phénoliques. Il a été estimé qu'une alimentation occidentale typique fournit un apport d'environ 1 g de polyphénols par jour. Les flavonoïdes composeraient près des deux tiers de ces apports alimentaires³⁸. Les flavonoïdes sont divisés en plusieurs classes : flavonols, flavones, flavanones, isoflavones, anthocyanines et flavanols³⁹. Les flavonols, dont la quercétine et le kaempférol, sont les flavonoïdes les plus présents dans l'alimentation. On retrouve entre autre ces flavonols dans les oignons, le brocoli, les pommes, les bleuets, le vin rouge et le thé. Les flavones, qui sont présents en moindre quantité, se retrouvent principalement dans le persil et le céleri. Les flavonones sont présents en grandes concentrations dans les fruits citrins. Les

isoflavones sont présents dans le soya et les produits dérivés du soya principalement sous leur forme α -glycosylée (génistéine, daidzéine et glycitéine). Les anthocyanines sont des pigments hydrosolubles très présents dans les baies, les raisins et le vin rouge. Enfin, les flavanols sont surtout présents dans les produits dérivés du raisin (vin et jus), le thé, le cacao et le chocolat. Ils sont soit sous forme de monomères (catéchines, épicatechines) ou d'oligomères (proanthocyanidines). Les catéchines, les épicatechines et les procyanidines sont les principaux flavanols du cacao.^{39,40} Le chocolat contient des flavanols à des concentrations qui excèdent les autres sources. Dix grammes du chocolat riche en flavanols utilisé dans le cadre de la présente étude fournissent 514 mg de flavanols, 100 ml de vin rouge en fournit 163 mg, 100g de bleuets 13 mg, 200ml de thé vert et de thé noir en fournissent respectivement 90 et 34 mg.^{39,40}

1.1.2.1 Flavonoïdes et fonction endothéliale

De nombreuses études mécanistiques et épidémiologiques suggèrent un effet bénéfique des flavonoïdes sur les facteurs de risque cardio-vasculaires. Les résultats d'une méta analyse regroupant les essais cliniques randomisés ayant pour objectif de déterminer l'importance relative des différentes classes de flavonoïdes et des aliments riche en flavonoïdes sur la fonction endothéliale ont récemment été publiés⁴¹. Les issues principales retenues dans cette revue systématique étaient la fonction endothéliale évaluée par la FMD, la tension artérielle et les lipides sanguins. Cent trente trois études étaient incluses dans cette revue systématique. Les effets aigus et chroniques des flavonoïdes ont été évalués dans 14 et 15 essais cliniques respectivement. Seuls le chocolat et le cacao étaient associés à des effets significatifs sur la fonction endothéliale. Les études portant sur le vin, le raisin, et le thé noir suggéraient un effet plus modeste. Une élévation significative de la tension artérielle systolique et diastolique à été observée à la prise de thé noir. Aucune

donnée sur les effets des autres flavonoïdes présents dans le thé vert, dans les fruits ou les produits dérivés du soja n'a été publiée.

La consommation aigue de chocolat ou de cacao (70-177 mg/j d'épicatéchine) a entraîné une augmentation moyenne de la FMD de 3,99% (intervalle de confiance à 95% : 2,86-5,12%) après 90 à 149 minutes). L'effet maximum était obtenu après 2 heures. La consommation chronique de chocolat augmentait la FMD moyenne de 1,45% (intervalle de confiance à 95% : 0,62-2,28%). Finalement, la consommation de chocolat n'avait aucun impact sur les concentrations du cholestérol HDL et LDL.

Les auteurs d'un essai clinique randomisé ont mesuré les changements de la FMD suite à la consommation aigue et chronique de chocolat contenant des doses croissantes de flavanols (75, 371, 963 mg) chez les patients diabétiques.⁴² La FMD s'élevait de façon significative suite à la consommation aigue ou chronique de chocolat à teneur élevée ou moyenne de flavanols. Aucun effet significatif n'était observé lors de la prise du chocolat le moins riche en flavanols. Un effet dose réponse était observé. Après 30 jours de consommation de chocolat, aucun changement significatif n'a été observé sur le poids, l'indice de masse corporelle, et la circonférence de la taille.

Dans un récent essai clinique randomisé¹³, la consommation chronique de chocolat riche en flavanols (375 mg) chez les patients atteints de maladie coronarienne a entraîné une augmentation de la FMD ($8.4 \pm 0.8\%$ $p < 0.001$) et une diminution de la TA systolique (4.2 ± 0.3 mm Hg $p = 0.013$) et ce, de façon significative suite à la consommation chronique (30 jours) de chocolat riche en flavanols. Aucun effet significatif n'était observé sur la TA lors de la prise du chocolat le moins riche en flavanols.

1.1.2.2 Flavonoïdes et tension artérielle

Les auteurs d'une méta-analyse publiée en 2010, regroupant 10 essais cliniques, incluant au total 297 sujets normo tendus ou présentant une tension artérielle légère, ont conclu à un effet bénéfique du chocolat sur la TA⁴³. Comparativement aux groupes témoins, les changements combinés de la TA systolique et diastolique dans le groupe « chocolat » étaient de -4,5 mm Hg (95% IC, -5,96 à -3,2 mm Hg; P=0.001) et -2,5 mm Hg (95% IC, -3,9 à -1,2 mm Hg; P=0.001) respectivement. Les résultats de cette méta analyse sont en accord avec celle de Hooper et al. discutés plus haut⁴¹.

Les auteurs d'une autre métaanalyse¹⁰ incluant 13 essais cliniques randomisés, rapportent une réduction de TA suite à la consommation de chocolat riche en polyphénols. Comparativement au groupe témoin, la TA systolique baissait de 3,16 mm Hg (IC à 95% : -5,08 à -1,23 mm Hg; P=0.001) et la TA diastolique diminuait de 2,02 mm Hg (IC à 95% : -3,35 à -0,69 mm Hg; P=0.003).

Selon les résultats d'un essai clinique randomisé¹⁴ publié en 2010, une dose quotidienne de flavanols totaux de 1052 mg serait nécessaire pour réduire la TA. Trente deux hommes et 20 femmes ménopausées souffrant d'hypertension légère non traitée (TA >130/85 et <160/100 mmHg) ont été aléatoirement assignés à consommer quotidiennement une boisson de cacao reconstituée contenant 33, 372, 712 ou 1052mg de flavanols de chocolat par jour, pendant 6 semaines. La TA a été mesurée à 0, 3 et 6 semaines. Des réductions significatives de la TA systolique, diastolique et moyenne ($5,3 \pm 5,1$ mmHg p=0.001; $3 \pm 3,2$ mmHg p=0.002 et $3,8 \pm 3,2$ mmHg p=0.0004, respectivement) ont été observées après la consommation de 1052mg de flavanols de chocolat. Aucune réduction de la TA n'a été observée à une dose inférieure. Un effet dose-réponse n'a pas été observé dans cette étude. Aucun changement significatif n'était observé entre les deux groupes pour l'indice

de masse corporelle et les effets secondaires. Ces résultats confirment les résultats des autres métaanalyses publiées.

1.1.2.3 Flavonoïdes et autres facteurs de risque des maladies cardiovasculaires

Les résultats d'une méta analyse regroupant les essais cliniques randomisés ayant pour objectif d'examiner les effets du chocolat, du cacao et des flavan-3-ols sur les principaux facteurs de risque de maladies cardiovasculaires (MCV) ont récemment été publiés⁴⁴. Les principales variables retenues dans cette revue systématique étaient la fonction endothéliale évaluée par la FMD, la tension artérielle, les lipides sanguins, les marqueurs du métabolisme du glucose et de l'insuline, le poids corporel, l'IMC et tour de taille. Les effets aigus et chroniques (courte durée) des flavonoïdes ont été évalués dans quarante-deux études incluses dans cette revue systématique. La consommation aigue de chocolat ou de cacao (>100 mg/j d'épicatéchine) a entraîné une augmentation de la FMD de 3,19% (intervalle de confiance à 95% : 2,04-4,33%) après 2 heures. La consommation chronique de chocolat augmentait la FMD de 1,34% (intervalle de confiance à 95% : 1,00-1,68%). La consommation de chocolat ou de cacao a entraîné une baisse significative des concentrations sériques d'insuline à jeun (-2,65 µU/mL, intervalle de confiance à 95% : -4,65 à -0,65), de la résistance à l'insuline (HOMA-IR -0,67 intervalle de confiance à 95% : -0,98 à -0,36) et une augmentation de l'index de sensibilité (ISI, défini comme le rapport de l'insulinémie à jeun et de la glycémie correspondante) (5,38, intervalle de confiance à 95% : 1,81-8,95). Les concentrations des triglycérides à jeun ont diminué significativement de -0,05 (intervalle de confiance à 95% : -0,09 à -0,01) après de la consommation d'une dose modérée d'épicatéchines (50-100mg/j). Par contre la consommation de chocolat ou de cacao n'a eu aucun impact sur les concentrations du glucose à jeun et sur les concentrations sériques de l'hémoglobine glycosylée (HbA1C) et du cholestérol total et la tension artérielle

systolique. Finalement, les doses élevées d'épicatéchine (>50mg/j) ont eu un effet plus marqué sur la FMD, la tension artérielle systolique et diastolique.

Une récente méta-analyse⁴⁵, regroupant six études de cohorte et une étude transversale, incluant au total 114,009 participants, rapporte une réduction statistiquement significative du risque cardiovasculaire lié à la consommation de chocolat. Cinq des sept études ont rapporté une association bénéfique entre des niveaux élevés de consommation de chocolat et le risque de désordres cardiométaboliques. Comparativement aux consommations les plus faibles, les consommations de chocolat les plus élevées ont été associées à une réduction de 37% dans les maladies cardiovasculaires (RR 0.63 (IC à 95% : 0,44 à 0,90)) et une réduction de 29% des accidents cérébraux vasculaires (RR 0.71 (IC à 95% : 0,52 à 0,98)). Aucune association significative n'a été observée entre la consommation de chocolat et le risque de diabète type 2 chez les hommes et chez les femmes avec l'insuffisance cardiaque (RR 0,95 (IC à 95% : 0,61 à 1,48)). Une seule étude⁴⁶ réalisée auprès d'une population d'hommes et de femmes japonaises a évalué l'association entre la consommation de chocolat et de diabète type 2. Une association significative a été observée (rapport de hasard 0,65 IC 95% : 0,43 à 0,97) et 0,73 IC 95% : 0,48 à 1,13, respectivement).

1.1.3 Risques de pré éclampsie dans les études d'observation

L'association entre consommation de chocolat et risque de PE a été explorée pour la 1^{ère} fois dans le cadre d'une étude de cohorte incluant 2291 femmes enceintes nord-américaines ayant donné naissance à un enfant vivant unique¹⁵. « L'exposition » au chocolat était mesurée d'une part à partir des informations sur la consommation de boissons riche en caféine et de chocolat depuis le début de la grossesse recueillies lors d'une entrevue structurée autour de la 14^{ème} semaine de grossesse. Cette consommation était également évaluée au

cours du 3^{ème} trimestre de grossesse, et lors de la visite post natal, généralement durant l'hospitalisation. D'autre part, les concentrations plasmatiques de théobromine, principal métabolite du chocolat étaient mesurées à partir d'un échantillon de sang recueilli au cordon lors de la délivrance.

Les concentrations sériques de théobromine étaient inversement corrélées au risque de PE avant et après ajustement pour les principales variables confondantes (rapport de cote) (RC = 0,31; intervalle de confiance à 95% : 0,11–0,87), pour le quartile le plus élevé, comparativement au plus bas.¹⁵ Les femmes ayant consommé 5 portions de chocolat ou plus par semaine au cours du 3^{ème} trimestre de grossesse avait une réduction de 40% du risque de pré-éclampsie comparativement aux femmes consommant moins d'une portion de chocolat par semaine (OR = 0,60; IC : 0,30-1,24). Cette différence n'atteignait cependant pas la signification statistique. La consommation individuelle de chocolat est très difficile à standardiser, et comme discuté plus bas, le contenu en polyphénols des chocolats varie de façon notable, selon l'origine du chocolat, sa qualité et son contenu en cacao. De plus, les processus de transformation du chocolat et notamment le processus d'alcalinisation influencent très fortement sa teneur en flavanols. La consommation auto rapportée de chocolat estime généralement de façon inadéquate la consommation actuelle et vraisemblablement sous estime l'association. Les résultats d'une étude cas témoins¹⁶ récente réalisée montrent que la consommation de chocolat était plus élevée chez les femmes enceintes normotendues (80,7%) que chez les femmes atteintes de pré-éclampsie (62,5%) ou les femmes présentant une hypertension gestationnelle (75,8%). De plus, la consommation de chocolat a été associée a un moindre risque de pré-éclampsie (1^{ère} trimestre OR= 0,55, intervalle de confiance à 95% : 0,32-0,95; 3^{ème} trimestre OR= 0,56 intervalle de confiance à 95% : 0,32-0,97). Ces résultats sont également cohérents avec la réduction de 69% du risque de pré-éclampsie (OR = 0,69,

intervalle de confiance à 95% : 0.11-0.87) observée chez les femmes enceintes se situant dans le quartile le plus élevé de théobromine sérique. Par contre, 2 autres études ne sont pas en accord avec ces résultats. Une étude cas-témoins nichée dans une cohorte publiée postérieurement ne supporte pas les précédentes données¹⁷. Selon les auteurs, le risque de pré-éclampsie était plus élevée chez les femmes enceintes ayant des concentrations de theobromine plus élevées (1^{ère} trimestre OR= 2.49, intervalle de confiance à 95% : 1.13-5.48; 3^{ème} trimestre OR= 1.06 intervalle de confiance à 95% : 0.43-2.60). Les concentrations sériques de théobromine n'étaient pas inversement corrélées au risque de PE. Par conséquent, les auteurs ont conclu qu'un contrôle inadéquat des biais et la possibilité de causalité inverse peuvent en partie expliquer les résultats favorables observés dans les études précédentes.

Klebanoff et al¹⁷ ne rapporte aucun effet protecteur de la théobromine mesurée dans le sérum maternel après la 26^e semaine de gestation sur la pré-éclampsie mais une augmentation du risque de pré-éclampsie de façon dose-réponse avec des niveaux croissants de la théobromine mesurées dans le sérum maternel collectés avant 20 semaines de gestation (100 ng/mL OR= 1.12, intervalle de confiance à 95% : 0.97-1.29; 1500 ng/mL OR= 2.49 intervalle de confiance à 95% : 1.13-5.48). De nombreuses différences méthodologiques et les biais inhérents aux études d'observation peuvent en partie expliquer ces discordances. Plus spécifiquement, le type de population étudiée, les moments au cours de la grossesse où ont été mesurés l'exposition, les définitions différentes de la pré-éclampsie et les différences dans les sources de théobromine peuvent avoir fortement influencés les résultats. Les résultats contradictoires de ces 3 études épidémiologiques renforcent l'importance d'évaluer l'effet de la consommation de chocolat à l'aide d'un devis d'essai clinique.

1.1.4 Mécanismes potentiels responsables des effets du chocolat

Les données de la littérature basées sur les modèles animaux, les études épidémiologiques et cliniques convergent vers l'hypothèse que les effets bénéfiques du chocolat sur la fonction endothéliale et la TA s'expliqueraient en grande partie par sa richesse en flavanoïdes et plus spécifiquement en flavanols.^{42,47} La consommation de flavanols a été associée à une vasodilatation artérielle et périphérique et cette association disparaît lors de la consommation de chocolat faible en flavanols. L'augmentation de l'activité endothéliale dépendante du NO jouerait un rôle clé⁴⁸. De plus, la théobromine (3,7 diméthylxanthine), un alcaloïde de la famille des méthylxanthines, composé actif du chocolat, pourrait aussi contribuer aux effets du chocolat sur la fonction endothéliale et la TA. Quoique son action n'ait pas été beaucoup étudiée chez l'humain, quelques données indiquent que la théobromine a été utilisée comme antihypertenseur en raison de ses propriétés vasodilatatrices et relaxantes du muscle lisse⁴⁹⁻⁵¹. Un essai clinique randomisé⁵² ayant pour objectif de vérifier si la consommation de boissons de cacao riches en flavanols et theobromine pourraient baisser la tension artérielle périphérique ou centrale a été publié en 2010. Une dose quotidienne de theobromine de 979mg serait nécessaire pour réduire la TA systolique centrale. Quarante deux hommes et femmes post ménopausées souffrant de préhypertension (TA >130/85 et <139/89 mmHg) et d'hypertension légère (TA >140/90 et <159/99 mmHg) non traitées et présentant un risque faible de maladie cardiovasculaire ont été aléatoirement assignés à consommer quotidiennement une boisson de cacao riche en flavanols contenant 106 ou 979mg de theobromine par jour ou un chocolat placebo, pendant 3 semaines. La TA a été mesurée sur une période de 24 heures à 0 et 3 semaines. Comparativement au groupe placebo, des réductions significatives de la TA systolique centrale ($4,3 \pm 1,4$ mmHg $p=0.003$) ont été observées après la consommation de 979mg de theobromine. Aucune

réduction de la TA n'a été observée à une dose inférieure. Aucun changement significatif n'était observé entre les deux groupes pour la tension artérielle périphérique.

1.2 Objectifs poursuivis par le projet

1.2.1 Général

L'objectif général de cette étude pilote est de vérifier la faisabilité de l'essai clinique de grande envergure.

1.2.2 Secondaires

Les objectifs secondaires de l'étude pilote sont d'évaluer chez les femmes enceintes normo tendues ;

- a) les changements et les écarts-types de la fonction endothéliale et de la tension artérielle systolique et diastolique suite à la consommation aigue et chronique de chocolat noir riche en flavanols durant 12 semaines
- b) les méthodes potentielles de recrutement des participantes et les difficultés reliées à celui-ci.

CHAPITRE II

MÉTHODOLOGIE

2.1 Type de recherche

Étude pilote randomisée à double insu.

2.2 Critères d'inclusion et d'exclusion

Critères d'inclusion :

Cette étude s'adressait à des femmes enceintes en bonne santé non fumeuses qui devaient :

Être âgées entre 18 et 35 ans;

Être entre la 7^e et la 12^e semaine de grossesse (confirmée par échographie);

Avoir une TA normale (<140-90 mm Hg).

Critères d'exclusion :

Les femmes ont été exclues si elles présentaient l'une ou l'autre des conditions suivantes :

Une histoire personnelle de pré éclampsie;

Une grossesse multiple;

Un indice de masse corporelle (IMC) avant la grossesse ≥ 30 ;

Une histoire familiale de MCV prématurée;

Une hypertension chronique, une dysfonction rénale ou une histoire de diabète gestationnel;

Une cholestérolémie totale ≥ 6.00 mmol/l;

Un usage de médicaments pour traiter l'hypertension (bêta-bloquants, diurétiques, inhibiteurs de l'enzyme de conversion, inhibiteurs calciques, inhibiteur des récepteurs d'angiotensine II);

Un usage de médication interférant avec le métabolisme du glucose (insuline, sulfonylurées, méglitinides, biguanides, thiazolidinediones, inhibiteurs des alpha-glucosidases) ou des lipides (statines, fibrates, niacine, résines, inhibiteur de l'absorption du cholestérol);

Un usage de suppléments ou de produits de santé naturels pouvant interférer avec la TA (huiles de poisson, coenzyme Q10, ail);

Un tabagisme actif (toute consommation de produits de tabac);

Une allergie ou intolérance aux noix ou au chocolat.

2.3 Nature des procédés et déroulement de l'étude

Les femmes ont été recrutées via des publicités qui leur ont été remises par les professionnels de la santé préalablement informés de l'existence du projet. Les femmes désireuses de participer à l'étude pilote pouvaient téléphoner à la coordonnatrice de l'étude qui leur expliquait le projet de recherche. Les participantes toujours intéressées à participer à cette étude pilote de 12 semaines, devaient se présenter au Centre de recherche de l'Hôpital Saint-François d'Assise pour un total de quatre visites et au Centre mère-enfant du CHUL pour un total de deux visites.

Visite de pré-randomisation (1^{ère} visite)

Lors de cette visite, les critères d'inclusion et d'exclusion et les risques et bénéfices de l'étude ont été revus en détail. Un formulaire d'information et de consentement approuvé par le Comité d'Éthique a été lu et signé. Selon un protocole pré-établi⁵³, la TA a été mesurée à l'aide d'un moniteur de TA électronique ayant été validé chez

les femmes enceintes, après une période de calme en position assise de 5 minutes, le bras reposant sur une table au niveau du cœur et les pieds touchant le sol. Trois mesures de la TA ont été prises à une minute d'intervalle. Des mesures anthropométriques et un prélèvement sanguin à jeun ont été effectués. Un court questionnaire a été utilisé afin de recueillir les caractéristiques sociales et démographiques, l'usage de tabac, la consommation d'alcool et la médication. Ces caractéristiques ont servi à dresser un portrait de la population à l'étude. Les femmes ont rempli un journal alimentaire⁵⁴ et un journal d'activités physiques^{57,58} de trois jours, incluant un jour de fin de semaine, sept jours avant la visite suivante (randomisation).

Visite de randomisation (2^e visite) et visites de suivi (3^e et 4^e visites)

Les participantes éligibles ont été rencontrées au Centre de recherche de l'Hôpital Saint-François d'Assise entre la 20^e et la 22^e semaine de grossesse.

La cédule de randomisation a été préparée par l'Unité clinique du Centre de recherche de l'Hôpital Saint-François d'Assise. Les participantes ont été appariées pour l'âge et assignées aléatoirement au traitement expérimental (chocolat noir riche en flavonols) ou chocolat noir à teneur faible en flavanols. Dans cette étude pilote, les effets aigus et à moyen terme de la consommation de chocolat ont été évalués. Les effets aigus, c'est-à-dire les effets observés dans les 180 minutes suivant la consommation ponctuelle de 40 g de chocolat, ont été évalués lors de la visite de randomisation seulement. Les effets à moyen terme ont été évalués après 6 et à 12 semaines de consommation des chocolats. Le chocolat riche en flavanols et le chocolat à teneur faible en flavanols ont été distribués en emballage opaque aux participantes pour 12 semaines. Les participantes ont dû consommer 2 carrés de chocolat par jour (20 g/jour) pendant 12 semaines. Toutes les analyses de laboratoire ont été réalisées à l'aveugle. Les participantes ont été vues au Centre de

recherche de l'Hôpital Saint-François d'Assise pour des visites de suivi lors des semaines 6 et 12.

Les participantes devaient éviter de consommer des aliments riches en polyphénols (thé, café, produits chocolatés, jus de fruits, vin) 24 heures avant la visite de randomisation et ne devaient pas avoir pratiqué d'activité physique intense dans les 48 heures précédant la visite de randomisation. Comme certains médicaments, dont l'aspirine et les diurétiques, affectent la TA, les participantes ont dû s'abstenir de consommer ces médicaments pour au moins 24h avant la visite. Des mesures anthropométriques ont été prises et les participantes ont dû remplir un questionnaire de fréquence alimentaire afin d'évaluer leur consommation de flavonoïdes du dernier mois. Lors de la randomisation, les participantes ont dû consommer, à l'intérieur d'une période de 10 minutes, soit a) le chocolat riche en flavanols (40 g) ou b) le chocolat à teneur faible en flavanols (40 g). Des prélèvements sanguins ont été effectués aux temps 0 et 180 minutes. Les mesures de la fonction endothéliale et de la TA ont été effectuées aux temps 0, 60, 120 et 180 minutes.

Les participantes ont dû revenir pour une visite de suivi lors des semaines 6 et 12. Lors de ces deux visites, des mesures de la FMD et de la TA et des mesures anthropométriques ont été prises. Les participantes ont dû remplir un questionnaire de fréquence alimentaire afin d'évaluer leur consommation de flavonoïdes du dernier mois. Des prélèvements sanguins à jeun ont été effectués à chacune de ces visites. Les participantes ont dû remplir un journal alimentaire et un journal d'activités physiques de trois jours, incluant un jour de fin de semaine, sept jours avant la visite de la semaine 12 (Annexe A).

2.4 Description du groupe expérimental et du groupe témoin

Le chocolat riche en flavanols (chocolat noir expérimental) et le chocolat faible en flavanols (chocolat à teneur faible en flavanols) ont été distribués en emballage opaque aux participantes pour 12 semaines.

Le chocolat riche en flavanols utilisé dans cette étude est le chocolat Acticoa de la compagnie Barry Caillebaut. Chaque carré (10 g) de ce chocolat contient 31,7 mg de catéchines et 5,9 mg de caféine.

Le chocolat noir à teneur faible en flavanols a été fourni par la compagnie Barry Caillebaut. Chaque carré (10 g) de ce chocolat contient 6,9 mg de catéchines totaux et 5,9 mg de caféine. Les concentrations de théobromine étaient identiques dans les 2 types de chocolat. Les valeurs nutritives (Tableau 1) du chocolat à teneur faible en flavanols ont été appariées à celles du chocolat expérimental. Les concentrations de flavanols et de théobromine ont été testées de nouveau avant le début de l'étude par le laboratoire de l'Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels (l'INAF).

Tableau 1. Composition des chocolats

Composantes	Chocolat à teneur élevée en flavanols (20 g)	Chocolat à teneur faible en flavanols (20 g)
Énergie (kcal)	102	102
Lipides (g)	7,5	7,5
Glucides (g)	6,5	6,5
Protéines (g)	1,35	1,35
Total Catéchines + Épicatéchines (mg)	64	14
Caféine (mg)	23,6	23,6
Theobromine (mg)	150	150

2.5 Analyse des données

2.5.1 Le critère de jugement principal

Le critère de jugement principal était la mesure de la tension artérielle (TA). La TA a été mesurée à chacune des visites selon un protocole standard.⁵³ Lors de la visite de randomisation, la mesure de la TA a été effectuée aux temps 0, 60, 120 et 180 minutes. Conformément aux recommandations du programme canadien d'éducation à l'hypertension pour le diagnostic et le suivi de l'hypertension, après que la participante ait été assise cinq minutes avec le bras reposant sur une table au niveau du cœur et les pieds touchant le sol, trois mesures de la TA ont été prises à une minute d'intervalle. La TA a été mesurée avec un moniteur électronique de TA validé auprès de la population de femmes enceintes.⁵³

La mesure de la FMD a été effectuée auprès des participantes par sonographie à haute résolution (LogiqBook XP, General Electric). Cette mesure a été effectuée lors de la randomisation et lors des visites des semaines 6 et 12 pour évaluer l'effet chronique de la consommation de chocolat. Lors de la randomisation, des mesures de FMD ont été prises avant la consommation du chocolat riche en flavanols ou du chocolat à teneur faible en flavanols, tandis qu'une mesure à jeun a été effectuée lors des semaines 6 et 12. L'état d'agitation du sujet pouvant faire varier la TA et le diamètre des vaisseaux sanguins, la participante restait allongée, sans bouger et sans produire aucun effort tout au long de l'expérimentation. Dans la salle d'examen, l'intensité lumineuse a été constante et non agressive et le niveau de bruit a été le plus bas possible. La température ambiante a été confortable et constante. Les mesures de FMD ont été toujours effectuées au même moment de la journée, soit entre 8h00 et 12h00.

Avant chaque mesure de la fonction endothéliale, la participante était couchée sur le dos, en position confortable, les bras et les jambes décroisées, pendant 20

minutes et était encouragée à ne pas parler. Le bras utilisé pour les mesures était étendu parallèlement au sol et n'était pas plié. L'avant-bras était en extension et en légère supination dans une position confortable. Les images échographiques ont été obtenues dans une vue longitudinale, dans la région située entre la fosse anté-cubitale et l'aisselle, en médial antérieur. La profondeur a été programmée à 3 cm et les paramètres ajustés afin d'obtenir une vision optimale des parois antérieure et postérieure de l'artère brachiale. La position de la sonde échographique a été déterminée de manière précise.

Une fois les paramètres optimisés et la position de la sonde notée, ces paramètres ont été enregistrés et gardés constants tout au long de l'étude. Les mesures ont été divisées en 2 séquences:

Mesures de base– Dans cette séquence, 50 secondes d'imagerie en 2D M-mode suivi de 10 secondes de Doppler ont été enregistrées afin de calculer la *Velocity Time Integral (VTI)* de 3 battements cardiaques choisis aléatoirement et dont on a fait ensuite la moyenne. Une imagerie Doppler en couleur a été utilisée afin de localiser le flot artériel avant de mesurer la vitesse et afin de confirmer l'interruption et la reprise du flot sanguin suite à l'occlusion à l'aide du brassard et à l'hyperémie réactive.

Hyperémie réactive – L'occlusion de l'avant-bras a été obtenue en gonflant un brassard à environ 1 cm en distal de la fosse ante-brachiale; le brassard a été gonflé à 220 mmHg pendant 5 minutes. Une fois l'obstruction levée, la vitesse sanguine a été enregistrée pendant 10 secondes (premiers 3 battements cardiaques). Après l'enregistrement Doppler, l'imagerie en 2D M-mode a été reprise pour les 2 minutes suivantes.

Analyses (FMD) : Les images digitales ont été enregistrées en fin de diastole (correspondant à l'onde R à l'ECG); ces images ont été analysées par un technicien

expérimenté. Ce dernier n'a pas utilisé les images des 5 premières et dernières secondes de chaque séquence afin d'éviter les artéfacts induits par le déplacement de la sonde échographique au moment où les paramètres de la machine sont ajustés manuellement par le technicien.

Considérant que la dilatation artérielle maximale s'est produite plus probablement entre 60 et 90 secondes, l'imagerie a été optimale durant cet intervalle. Ainsi, 12 images digitales ont été enregistrées à un intervalle de 5 secondes 60 secondes après la levée de l'obstruction par le brassard.

Le diamètre artériel de toutes les images digitales des 2 séquences (mesures de base, hyperémie réactive) a été mesuré à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images prévus à cette fin (Dynamic Endothelial Assessment V2.0, Vasometrix). La FMD a été calculée comme étant la différence relative entre l'état dilaté de l'artère brachiale lors de l'hyperémie réactive et la mesure de base.

2.5.2 Critères de jugement secondaires

a) Variables anthropométriques

À chaque visite, des mesures anthropométriques (poids et taille) ont été prises.

b) Variables plasmatiques

Les échantillons sanguins ont été collectés et conservés à -80°C pour les analyses subséquentes. Les dosages du contenu en catéchines et en caféine dans le plasma ont été effectués dans le laboratoire du Dr Laurent Bazinet à l'Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels (INAF) de l'Université Laval, sous la responsabilité de Pascal Dubé, technicien chef de ce laboratoire.

2.5.3 Co-interventions et co-variables documentées durant le suivi

La consommation de flavonoïdes a été évaluée à l'aide d'un questionnaire de fréquence alimentaire lors des visites de randomisation et des semaines 6 et 12. La

consommation de calories, lipides, glucides, protéines, fibres et polyphénols a été évaluée à l'aide d'un journal alimentaire de trois jours, incluant un jour de fin de semaine, complété par la participante une semaine avant la randomisation et une semaine avant la semaine 12. Ces consommations ont été analysées à l'aide du logiciel *Nutrition Data System for Research (NDS-R)*, version 4.03, développé par le *Nutrition Coordination Center* (Université du Minnesota, Minneapolis, MN). Le niveau d'activité physique a été estimé à l'aide un journal d'activités physiques de trois jours, incluant un jour de fin de semaine, complété par la participante une semaine avant la randomisation et une semaine avant la semaine 12.

2.5.4 Évaluation des effets secondaires

Tous les effets secondaires sérieux ou non ont été rapportés à chacune des visites à l'aide d'une carte journalière remise aux participantes.

2.6 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le support statistique du Centre de recherche de l'Hôpital Saint-François d'Assise. Le logiciel de statistiques SAS version 9.2 a été utilisé pour toutes les analyses statistiques. Toutes les analyses ont été effectuées selon le principe «intention de traiter». Les caractéristiques de base des participantes des deux groupes ont été d'abord comparées. Ensuite, les changements dans les critères de jugement principaux entre la visite de randomisation et les visites subséquentes ont été analysés dans les 2 groupes à l'aide de tests de t non-pairés. La présence d'effets secondaires a été comparée dans les deux groupes. Une valeur $p \leq 0,05$ a été considérée comme indiquant une différence significative.

2.7 Considérations éthiques

2.7.1 Risques et effets secondaires encourus par la participante

La possibilité de petits hématomes, au point de ponction lors des prises de sang, représentait le principal risque encouru. Lors des mesures de la tension artérielle les participantes ont pu ressentir un inconfort et un serrement au niveau du bras lorsque le brassard a été gonflé à 220 mm Hg pendant 4 minutes. Cette sensation disparaissait par elle-même lorsque le brassard était dégonflé.

2.7.2 Analyse et évaluation des avantages et inconvénients liés au projet

La participation à ce projet de recherche n'a pas apporté de bénéfices personnels ou financiers aux participantes autres qu'une évaluation de leur TA et de leur bilan lipidique. De plus, les frais de stationnement ont été remboursés aux participantes à chacune des 4 visites nécessaires au projet de recherche.

2.7.3 Confidentialité des données

Toutes les informations personnelles concernant les participantes ont été tenues confidentielles. Pour préserver leur anonymat, nous avons attribué aux participantes un numéro de code connu seulement par les chercheur(e)s. Ainsi, les participantes n'ont pas été identifiées par leur nom peu importe les circonstances. Seule l'investigatrice principale a eu accès à la liste reliant les codes aux noms des participantes. De plus, les résultats des analyses qui ont été effectuées n'ont pas fait partie du dossier médical des participantes et n'ont pas pu être communiqués à une tierce partie non impliquée dans le présent projet.

Avec l'autorisation des participantes, nous nous sommes engagés à utiliser les renseignements et le matériel biologique (le sang qui a été recueilli) les concernant aux seules fins de ce projet de recherche. Ce matériel sera conservé pour une durée

de cinq ans. Advenant leur désir de cesser de participer en cours de route ou pendant cette période de 5 ans, nous nous sommes engagés à détruire dans l'immédiat, les renseignements et le matériel biologique les concernant. Enfin, les chercheurs réalisant cette étude ne publieront aucun renseignement concernant les participantes de façon individuelle ou nominale.

Les données du projet en elles-mêmes ou combinées aux données provenant d'autres projets, pouvaient notamment être partagées avec les organismes réglementaires canadiens ou d'autres pays, avec d'autres médecins participant au projet et avec le Comité d'éthique de la recherche clinique du CHUL. Ce transfert d'information impliquait que les données pouvaient être transmises dans des pays autres que le Canada. Les données du projet seront conservées pendant 25 ans par le chercheur responsable du projet de recherche.

À des fins de surveillance et de contrôle, le dossier de recherche a pu être et pourra être encore consulté par une personne mandatée par le Comité d'éthique de la recherche clinique du CHUL, par une personne mandatée par le ministre de la Santé et des Services sociaux ou par une personne mandatée par la loi par des organismes gouvernementaux de santé autorisés, tels que Santé Canada et le Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis ainsi que par des représentants du commanditaire. Toutes ces personnes et ces organismes adhèrent à une politique de confidentialité.

Les données du projet de recherche pourront être publiées dans des revues médicales ou partagées avec d'autres personnes lors de discussions scientifiques. Aucune publication ou communication scientifique ne renfermera quoi que ce soit qui puisse permettre d'identifier la participante.

La participante avait et a encore le droit de consulter son dossier de recherche pour vérifier l'exactitude des renseignements recueillis, de faire rectifier ou supprimer

des renseignements périmés ou non justifiés et de faire des copies et ce, aussi longtemps que le chercheur responsable du projet de recherche, l'établissement ou l'institution de recherche détiennent ces informations. Cependant, afin de préserver l'intégrité scientifique du projet de recherche, les participantes avaient accès à certaines de ces informations qu'une fois le projet terminé.

2.7.4 Conditions de participation ou de retrait de la participante au projet

Les participantes avaient le droit de se retirer du projet, en tout temps, par simple avis verbal, sans donner les motifs de leur décision et elles n'ont subi aucun préjudice. Ce protocole de recherche a été soumis et accepté par le comité d'éthique pour la recherche clinique du CHUL avant de débiter le recrutement.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Faisabilité de l'essai clinique randomisé de grande envergure

3.1.1 Critères d'évaluation de la faisabilité de l'étude :

3.1.1.1 Méthodes potentielles de recrutement

Les participantes de cette étude pilote ont été recrutées par les biais de plusieurs stratégies (Tableau 2). Des messages électroniques ont été envoyés à travers le réseau de l'Université Laval et du CHUQ à l'ensemble du personnel et des étudiants. Des affiches publicitaires et des dépliants annonçant le projet de recherche ont été distribués à l'Hôpital Saint-François d'Assise du CHUQ. Finalement, les participantes ont été approchées via 2 unités de médecine familiale (UMF) et un groupe de médecins de famille (GMF). Plus spécifiquement, après que le protocole de recherche ait été présenté et discuté avec les infirmières de ces unités, celles-ci invitaient les femmes enceintes se présentant à leur première visite de soins prénataux à être contactées par téléphone pour recevoir une information détaillée sur le projet. La stratégie des UMFs s'est avérée la stratégie de recrutement la plus efficace. En effet, plus de la moitié des 159 femmes enceintes recrutées, soit 87 femmes (54.7 %) l'ont été par le biais des infirmières.

3.1.1.2 Difficultés liées au recrutement des sujets

Les difficultés liées au recrutement des participantes sont résumées au tableau 3. Une femme enceinte sur 5 ayant accepté d'être rejointe ne répondait pas aux critères d'inclusion, 34% des femmes ont refusé de participer, essentiellement en

raison d'un manque de disponibilité, 13 % des femmes n'ont pas retourné l'appel. Parmi les 132 femmes approchées, 44 ont été finalement randomisées, soit une femme sur 3.

Tableau 2. Modalités de recrutement des participantes. [Nombre (%)]

Stratégie	Femmes rejointes (n=159)
Unité de médecine familiale (UMF)	106 (66,67)
Hôpital Saint-François-d'Assise	64 (40,25)
Laurier	23 (14,47)
Clinique médicale	19 (11,95)
Courriel	26 (16,35)
Affiche	11 (6,92)
Référence d'une amie	11 (6,92)
Autres	5 (3,14)

Tableau 3. Difficultés liées au recrutement. [Nombre (%)]

Difficultés liées au recrutement	Femmes ayant accepté d'être rejointes (n=132)
Ne rencontraient pas les critères d'inclusion	27 (20,45)
Plus de 16 semaines de grossesse	12 (9,09)
Femmes fumeuses	6 (4,55)
Indice de masse corporelle > 30 **	5 (3,79)
Autres critères	4 (3,03)
Ont refusé de participer	45 (34,09)
Manque de disponibilité	35 (26,52)
Femmes pas intéressées à l'étude	7 (5,30)
Autres raisons	3 (2,27)
Autres raisons	60 (45,45)
Femmes n'ayant pas retourné l'appel	18 (13,64)
Raison inconnue	10 (7,58)
Avortement spontané	5 (3,79)
Problème de transport	4 (3,03)
Autres	23 (17,42)

**Avant la grossesse

3.1.1.3 Acceptabilité et adhésion aux interventions

Selon les résultats de cette étude de faisabilité, les participantes ont généralement accepté la consommation régulière de chocolat. Dans les 2 groupes, plus de participantes ont déclaré consommer régulièrement du chocolat après qu'avant l'étude (Tableau 4). Le chocolat à teneur faible en flavanols et le chocolat riche en flavanols ont été généralement bien tolérés. Une seule participante dans le groupe expérimental rapportait des céphalées.

L'observance et l'adhésion à la prise du chocolat riche en flavanols ou au chocolat à teneur faible en flavanols ont été quotidiennement documentées à l'aide d'un journal de bord remis lors de la visite de randomisation aux participantes. Celles-ci étaient invitées à noter le nombre de carrés pris par jour. L'analyse de ce registre quotidien a montré que les participantes ont consommé 96.6% du chocolat qui leur avait été remis à la semaine 6 et 95,6% à la semaine 12. La mesure des concentrations plasmatiques de théobromine a été utilisée comme un marqueur de la consommation du chocolat. L'augmentation significative des concentrations plasmatiques de théobromine dans les deux groupes à 12 semaines confirme une bonne observance à l'intervention (Tableau 6).

3.1.1.4 Adhésion aux procédures en double aveugle

A la fin des 12 semaines de suivi, nous avons confirmé l'efficacité de l'insu auprès de 26 participantes à l'aide de la question suivante : dans quel groupe pensez-vous avoir été assignée (Tableau 5). Ces résultats confirment l'efficacité des procédures d'aveuglement, puisque la majorité des patientes disaient ne pas savoir dans quel groupe elles étaient assignées.

Tableau 4. Critères d'acceptabilité de la consommation de chocolat de femmes enceintes. [Nombre (%)]

Critères d'acceptabilité	Chocolat riche en flavanols (n=12)	Chocolat à teneur faible en flavanols (n=14)
Femmes ayant présenté des difficultés à consommer le chocolat**	3 (25,00)	5 (35,71)
Acceptabilité d'une consommation régulière de chocolat†	11 (91,67)	10 (71,43)
Moment de la journée où la consommation du chocolat a eu lieu		
Repas	7 (58,33)	7 (50,00)
Collation	5 (41,67)	7 (50,00)
Effets indésirables††	1 (8,33)	0 (0)
Prise régulière du chocolat avant l'étude	0 (0)	1 (7,14)
Prise régulière du chocolat après l'étude†††	5 (41,67)	7 (50,00)

**Deux carrés de chocolat par jour

†Un carré de chocolat trois fois par jour

†† Céphalées

†††Deux mois après l'étude

Tableau 5. Efficacité de double insu. [Nombre (%)]

Croyance de participantes	Chocolat riche en flavanols (n=12)	Chocolat à teneur faible en flavanols (n=14)
Avoir été assignée au groupe chocolat riche en flavanols	1 (8,33)	3 (21,43)
Avoir été assignée au groupe chocolat à teneur faible en flavanols	1 (8,33)	1 (7,14)
Ne sait pas dans quel groupe a été assignée	10 (83,33)	10 (71,43)

3.1.1.5 Pertes au suivi

Deux femmes (une dans le groupe chocolat à teneur faible en flavanols et une dans le groupe chocolat riche en flavanols) ont été perdues au suivi aux semaines 6 et 12 (Figure 1). La participante du groupe chocolat à teneur faible en flavanols a abandonné l'étude en raison de la présence de maux de tête et celle du groupe

chocolat riche en flavanols s'est volontairement retirée de l'étude sans donner aucune explication. Une participante du groupe chocolat à teneur faible en flavanols s'est volontairement retirée de l'étude sans mentionner la raison, mais elle a accepté de revenir à la semaine 12.

BLOOD PRESSURE AND ENDOTHELIAL FUNCTION IN HEALTHY, PREGNANT WOMEN AFTER ACUTE AND DAILY CONSUMPTION OF FLAVANOL-RICH CHOCOLATE: A PILOT, RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL

Mogollon, Jaime Andres¹; Bujold, Emmanuel²; Lemieux, Simone³; Mélodie Bourdages⁵; Blanchet, Claudine¹; Bazinet, Laurent³; Couillard, Charles³; Noël, Martin⁴; Dodin, Sylvie¹

¹St. François d'Assise Hospital, Centre hospitalier universitaire de Québec (CHUQ);

²Reproductive Biology Research Center, Research Center, Centre hospitalier de l'Université Laval (CHUL)-CHUQ; ³Department of Food Sciences and Nutrition, Institute of Nutraceuticals and Functional Foods (INAF), Université Laval; ⁴Public Health Research Center, CHUQ, Québec, Canada; ⁵Institute of Nutraceuticals and Functional Foods (INAF), Université Laval, Québec, Canada.

Dr. Sylvie Dodin, M.D., M.Sc., Department of Obstetrics and Gynecology, Research Center, St. François d'Assise Hospital (CHUQ), Université Laval, Québec, QC, Canada G1L 3L5. Telephone: (418) 525-4161. Fax: (418) 525-4427. E-mail: sylvie.dodin@oqy.ulaval.ca

This randomized clinical trial was registered in ClinicalTrials.gov: NCT01659060.

3.2 Résumé

Plusieurs essais cliniques randomisés (ECR) suggèrent un effet bénéfique des flavanols du chocolat sur la tension artérielle (TA) et la fonction endothéliale (FE). Aucun ECR n'a évalué ces effets chez les femmes enceintes. L'objectif de cet ECR pilote est de vérifier la faisabilité d'un ECR de grande envergure évaluant les effets du chocolat sur la FE et la TA de femmes enceintes.

Quarante quatre femmes enceintes ont été randomisées au groupe chocolat riche en flavanols (n=23) ou chocolat à teneur faible en flavanols (n=21). À la randomisation, 60, 120 et 180 minutes après la prise unique de chocolat (40 g) et 6 et 12 semaines après la prise quotidienne de chocolat (20 g), la FE, la TA, les concentrations sériques de flavanols et de théobromine (CFT) ont été évaluées.

Après 180 minutes, la consommation de chocolat riche en flavanols s'est accompagnée d'une augmentation significative des CFT. Aucun changement significatif sur la FE et la TA n'a été observé.

3.3 Abstract

Background: Several randomized clinical trials (RCTs) indicate that flavanol-rich chocolate has beneficial effects on flow-mediated dilation (FMD) and blood pressure (BP). However, no RCTs have evaluated these outcomes in pregnant women.

Aims: The objective of this 2-group, parallel, double-blind RCT was to examine the effects of flavanol-rich chocolate on FMD and BP in pregnant women with normal BP.

Methods: Forty-four healthy, pregnant women were randomized to the high-flavanol (n = 23) or low-flavanol (n = 21) chocolate consumption for 12 weeks. At randomization (0, 60, 120 and 180 min after a single 40-g dose of chocolate), 6 and 12 weeks after daily 20-g chocolate intake, we evaluated plasma concentrations of flavanols and theobromine, as well as the FMD and BP.

Results: Plasma epicatechin was significantly increased ($p < 0.001$) 180 min after the consumption of 40-g high-flavanol chocolate compared to low-flavanol chocolate. Theobromine concentrations were significantly higher 180 min and 12 weeks after the intake of experimental chocolate or low-flavanol chocolate ($p < 0.001$). FMD and blood pressure were not different between the 2 groups at all pre-defined time periods. No other significant within-group or between-group changes were observed.

Conclusion: These results confirm the feasibility of a large-scale RCT comparing daily consumption of flavanol-rich chocolate to an equivalent placebo during pregnancy and demonstrate higher plasma concentration of epicatechin in the intervention group.

Keywords: Cacao, chocolate, theobromine, flavanols, pregnant women, hypertension, pregnancy-induced, preeclampsia, epicatechin.

3.4 Introduction

Preeclampsia (PE), defined as gestational hypertension associated with proteinuria, is one of the most common medical disorders affecting pregnancy,[1] with potentially severe consequences for mother and child, especially in developing countries.[2] It is estimated that 3 to 8% of all pregnancies are impacted by this complication. Every year, PE is responsible for about 60,000 deaths worldwide.[1] More than half of women with PE will undergo caesarean delivery.[1] PE heightens the risk of peri-natal mortality by 5-fold and is a major cause of low birth weight in infants.[1] Numerous studies have suggested that women who develop PE have an increased risk of cardiovascular disease later in life.[3] The cardiovascular manifestations of PE share many characteristics and risk factors with cardiovascular disease, including hypertension, endothelium dysfunction and oxidative stress.[4, 5] Despite intensive research, PE remains an idiopathic disease for which few effective prophylactic measures are available to patients.[2] PE is associated with a placental disease in most cases and is distinguished by generalized maternal dysfunction of the endothelium. Endothelium dysfunction leads to clinical symptoms in the mother.[6, 7] There is strong evidence that maternal nitric oxide (NO) deficiency plays a key role in the development of PE.[8] Therapeutic approaches focusing on up-regulating NO availability may be useful targets in PE prevention. Flavanols, the most common flavonoids in dark chocolate, are potent antioxidants capable of inducing NO-dependent vasodilation. A recent meta-analysis of randomized controlled trials (RCTs) confirmed that flavanol-rich chocolate has a beneficial influence on endothelial function and reduces systolic (SBP) and diastolic blood pressure (DBP).[9] Recent cohort[10] and case-control studies[11] have indicated that chocolate consumption during pregnancy may lower the risk of PE, but their design did not permit the exploration of temporal relationships. Moreover, this

association was not found in another case-control study.[12] The effects of flavanol-rich chocolate in pregnant women have never been investigated clinically.

As endothelial dysfunction is fundamental to PE development we believe that the growing body of literature supporting the hypothesis of a beneficial outcome of flavanol-rich chocolate consumption, through its action on endothelial function and BP regulation, justifies a clinical trial in pregnant women.

The primary objective of this pilot RCT is to test the feasibility of design methods and procedures for later use on a larger scale. The secondary objective is to examine the acute and chronic impact of dark chocolate on FMD and BP in healthy, pregnant women with normal BP.

3.5 Patients and methods

Ethics statement

Protocol and consent form of this study was reviewed and approved by the institutional Ethics Committee of Centre Hospitalier Universitaire de Québec. An information and consent form, approved by the institutional Ethics Committee, was read and signed by the participants.

Trial registration

This randomized clinical trial was registered in ClinicalTrials.gov: Chocolate consumption in healthy pregnant women, identifier: NCT01659060.

Study participants

Between July 2008 and April 2009, we enrolled non-smoking, normotensive women aged 18 to 35 years, with a live fetus between the 7th and 12th weeks of gestation documented by ultrasound. Normal BP was defined as SBP <140 mmHg and DBP <90 mmHg.

We excluded patients with a family history of premature cardiovascular disease, chronic hypertension, renal dysfunction, medication use for treating hypertension or interfering with the metabolism of glucose or lipids, taking supplements or natural health products that may interfere with BP (fish oils, coenzyme Q10, and garlic). Women consuming 1 alcoholic drink per day or more, or suffering from allergies or intolerance to nuts or chocolate were also excluded.

Recruitment and randomisation

Women were recruited through advertisements given to them by healthcare professionals previously informed about the project. Those wishing to participate contacted the Study Coordinator who explained the research project to them. They then presented themselves at the Research Center of Saint-François d'Assise Hospital for a total of 4 visits.

The recruitment protocol included an initial visit during which suitability for randomization was evaluated. Inclusion and exclusion criteria as well as the risks and benefits of the study were reviewed in detail during this pre-randomization visit. An information and consent form, approved by the institutional Ethics Committee, was read and signed. BP was measured 3 times at 3-min intervals and averaged, according to a validated protocol.[13] Anthropometric measurements and fasting blood samples were collected. The blood samples were analyzed for lipid and fasting blood sugar profiles. A questionnaire documenting social and demographic characteristics, tobacco use, consumption of alcohol and medications was completed by all women which were also required to complete a 3-day food record,[14] including a weekend day, and a validated 2-day activity record[15, 16][15, 16] the week before the 2nd visit. Nutrient and food intake results were evaluated with the Nutrition Data System for Research, version 4.03, developed by the Nutrition Coordinating Center, University of Minnesota in Minneapolis.

Eligible healthy, pregnant women were randomly assigned to either high-flavanol dark chocolate (experimental group) or low-flavanol dark chocolate (placebo group). Concealed randomization was generated using computer-aided block randomization (block size was kept secret), with pre-stratification by parity and body mass index (BMI), under the responsibility of an independent statistician. Another statistician undertook treatment allocation independently of the trial team. At the randomization visit participants were instructed to consume in the fasting state 40-g of chocolate within 10 min. The composition of each chocolate bar – energy, nutrients, catechins, epicatechins and theobromine – was quantified by Barry Callebaut (Lebbeke-Wieze, Belgium) and re-evaluated before the beginning of the study at the INAF Laboratory using mass spectrometry (Table 1). All chocolate bars were standardized for their flavanol and theobromine content and matched for caloric load, nutrients and caffeine. All of them were similar in taste and were supplied free in individual, opaque packaging by Barry Callebaut.

Clinical follow-up

During the chronic phase, the women were advised to consume chocolate bars 3 times a day for a total of 20-g daily. Participants were scheduled for 2 follow-up visits at 6 and 12 weeks after randomization. All clinical investigations, laboratory analyses, data collection and assessment were blinded to the randomization allocation.

The participants were asked not to consume other chocolate products during the study and to avoid foods rich in polyphenols or theobromine (tea, coffee, fruit juice, wine) for 24 h before each visit. Intense physical activity was also forbidden for 48 h preceding each visit. Anthropometric measurements were taken at each visit, and the participants completed a food frequency questionnaire (FFQ)

specifically evaluating their polyphenol consumption in the last month. Blood samples were collected, and FMD and BP were quantified.

End points

FMD

The primary endpoint was change in endothelial function, measured as FMD of the brachial artery, as described previously.[17, 18] A compact ultrasound system – LOGIQe from GE Healthcare Technology, and Brachial Analyser version 5 software – recorded these measurements. The test was performed by the same experienced technician in a quiet, dimly-lit room, between 08:00 and 12:00 h (noon). Ambient temperature was comfortable and constant (23.5°C). Before each measurement, the women lay on their back, in a comfortable position, with the arms and feet uncrossed for 15 min. They were encouraged to avoid speaking. The right arm was extended laterally for measurement at a 90-degree angle to the body. The forearm was slightly supine in a comfortable position. Depth was programmed and parameters were adjusted to obtain an optimal view of the anterior and posterior walls of the brachial artery. The ultrasound probe was positioned precisely.

Once these parameters were optimized and the probe position noted, they were recorded and kept constant throughout the study. The right brachial artery was imaged longitudinally just above the antebrachial fossa, and images were captured at the same moment in the cardiac cycle (R wave peak).

BP

BP was measured by a trained, certified nurse blinded to treatment allocation, with an electronic monitor (Microlife 3 BTO-A) after 15 min of rest, back supported, arm supported at the heart level, and cuff placed on the left upper arm. The device achieved British Hypertension Society (BHS) A/A grade accuracy and was validated

in a pregnant population, including PE, according to the BHS protocol.[13] BP was measured 3 times at 3-min intervals at the randomization visit and 0, 60, 120 and 180 min after chocolate bar intake. It was assessed with the same standardized protocol at weeks 6 and 12.

Plasma biomarkers of chocolate intake

Methylxanthines (caffeine, theobromine and theophylline) were simultaneously quantified by high-pressure liquid chromatography (HPLC)[19], by a technician blinded to participant status. Inter- and intra-assay coefficients of variation were 5.2% and 3.7%, respectively.

Plasma flavanol concentrations were measured with standard analysis equipment. Flavanols were purified by solid extraction, followed by HPLC with a fluorescence detection system[20].

Side-effects

Weight change was evaluated at each visit, and digestive and other signs and symptoms (nausea, abdominal pain, constipation, and headache) were documented with a self-administered questionnaire related to the week preceding the visit.

Compliance

Each participant received a telephone reminder in the week preceding each visit. Women were paid an allocation for expenses related to the assessment visits. If a participant missed a visit, the nurse scheduled a new appointment. In addition, study participants recorded their daily intake of chocolate bars on diary cards.

Blinding and contamination bias

The proportion of women who guessed right about group allocation was documented with a short questionnaire at the last visit. To control for

contamination bias, the flavonoid consumption was measured by FFQ in the last month preceding each follow-up visit.

Sample size and statistical analysis

Changes in FMD were defined as a primary endpoint calculated as variations 12 weeks after chocolate intake and expressed as mean differences. The secondary outcome was BP. All analyses were based on intention-to-treat. In the context of this feasibility study, no sample size was calculated and the 44 pregnant women who agreed to participate were included on the basis of recommendations by Thabane et al.[21]

The baseline characteristics of the 2 groups were compared, and factors influencing BP were considered descriptively. Non-paired T tests were performed for planned comparisons (either between or within changes). $p \leq 0.05$ values were considered as significant. The presence of side-effects was compared in the 2 groups.

3.6 Results

We approached 176 women, of whom 132 were excluded as they failed to meet the inclusion criteria ($n=27$), declined to participate ($n=45$) or gave other reasons ($n=60$; 18 women did not return calls, 5 had spontaneous abortions, 4 had transportation problems, and 33 others cited personal reasons). Forty-four pregnant women agreed to participate and were randomized (23 in the high-flavanol chocolate arm and 21 in the low-flavanol chocolate arm) (Figure 1). At randomization, the 2 arms were well balanced with regard to social and baseline characteristics (Tables 2 and 3).

Of the 44 randomized women who participated in the acute phase, 42 (22 and 20 in the high-flavanol and low-flavanol chocolate arms, respectively) had outcomes

available for intention-to-treat analysis. Two women dropped out of the study for reasons not related to the intervention.

Plasma biomarkers of chocolate intake

Plasma epicatechin concentrations increased significantly in the high-flavanol chocolate group at 180 min after intervention compared to low-flavanol chocolate ($p < 0.001$) (Table 4). This dose of high-flavanol chocolate in the current study had no effect on increasing plasma catechin concentrations. After 12 weeks, epicatechin and catechin concentrations were too low to be detectable.

As expected, methylxanthine concentrations were significantly higher at 180 min compared to baseline in the 2 groups (Table 5). More specifically, a significant increase in plasma theobromine concentrations was observed in both groups at 180 min and was slightly but significantly more marked in the experimental group. Therefore, theobromine concentrations served as a marker of chocolate compliance. A significant difference in caffeine concentrations ($p = 0.02$) was also seen in the 2 chocolate groups after single chocolate intake.

Compared to baseline, theobromine concentrations were still significantly higher in high-flavanol and low-flavanol chocolate groups at 6 and 12 weeks, indicating good subject compliance (Table 6). A small but significant difference in plasma theobromine concentrations ($p = 0.03$) was noted between chocolate groups after 12 weeks of chocolate consumption.

FMD and BP

FMD, SBP, DBP and mean arterial BP (MAP) were not significantly affected by acute or chronic consumption of high-flavanol chocolate, as reported in Tables 7 and 8.

No significant changes were observed within or between groups for SBP after 6 or 12 weeks. Although within normal values, DBP increased significantly from baseline

after 6 and 12 weeks only in the low-flavanol chocolate group, but the difference between the 2 groups was not significant. At 12 weeks, MAP rose significantly in the low-flavanol chocolate group compared to baseline, but the difference between the 2 arms was not significant. No other significant BP changes were observed between or within groups.

Side-effects

High-flavanol and low-flavanol chocolate did not significantly increase the intake of energy, proteins, carbohydrates and fats after 12 weeks of chocolate consumption (Tables 9). Total energy consumed by pregnant women was similar in both groups. A significant decrease in the percentage of calories from proteins in the low-flavanol chocolate group (difference: -1.7; 95% CI: -2.8 to -0.5) was apparent after the intervention (Table 9). The contribution of other macronutrients to total energy intake did not change over time for any of the two groups studied.

In both arms, body weight and body mass index (BMI) increased significantly after chocolate consumption for 12 weeks (Table 10), but no significant differences in these parameters were observed between the high-flavanol and low-flavanol chocolate arms.

3.7 Discussion

In healthy, pregnant women with normal BP and without risk of PE, acute and chronic consumption of flavanol-rich chocolate was not associated with significant changes in either FMD, SBP or DBP. Our clinical study provides important insights into the feasibility, acceptability and methodology of a larger clinical trial to evaluate long-term chocolate intake in pregnant women. Our results confirmed the feasibility and good compliance of our intervention and its effectiveness in increasing blood theobromine and flavanol metabolite concentrations.

The association between chocolate consumption and the risk of PE was explored for the first time in a cohort study[10] of 2,291 pregnant North American women who gave birth to a single, living baby. "Exposure" to chocolate was measured in 2 ways: data on the provision of caffeine-rich drinks and chocolate consumption since the beginning of pregnancy were collected during a structured interview around the 14th week of gestation. Consumption was also evaluated during the 3rd trimester of pregnancy in a post-natal interview. On the other hand, the serum concentrations of theobromine were quantified in a blood sample collected from the umbilical cord during delivery. Serum theobromine concentrations were inversely correlated with the risk of PE before and after adjustment for the main confounding factors (odds ratio (OR) = 0.31; 95% CI: 0.11 - 0.87, for the highest compared to the lowest quartile). Women who consumed 5 or more portions of chocolate per week during the 3rd trimester of pregnancy manifested a 40% decrease in PE risk compared to women who consumed less than 1 portion of chocolate per week (OR = 0.60; 95% CI: 0.30 - 1.24). However, this diminution was not significant. A case-control study[12] nested in a cohort does not support the previous finding. According to the authors, unmeasured confounding or reverse causation may account for the positive association previously reported as discussed above. The results of these epidemiologic studies reinforce the importance to assess the effect of chocolate consumption using a clinical trial design.

Although no prospective studies in pregnant women are available, the effects of daily flavanol-rich chocolate intake on endothelial function and BP have already been well documented in other populations.[22, 23] A more recent meta-analysis by Hooper et al., that included 11 studies and 373 participants, suggested improvement of FMD 2 h after chocolate ingestion and its chronic intake.[24] Stronger effects were apparent at higher doses of epicatechin that could be a key contributor to the outcomes observed. They also found a significant effect of

chocolate on DBP and MAP but heterogeneity of the results of the 11 studies included in this meta-analysis was significant. This heterogeneity could be partially explained by BP differences in participants at the start of chocolate intake. Indeed, recent investigations have reported unchanged[25] or no significant change[26] in SBP and DBP after dark chocolate consumption in normotensive, healthy populations. Taubert et al., in their meta-analysis, observed trends towards a marked effect of chocolate intake in patients with high BP.[27]

In our clinical trial, although acute ingestion of our experimental chocolate bars was accompanied by a very significant increase in plasma epicatechin concentrations, daily, chronic epicatechin intake by pregnant women could have been too low to improve BP. In fact, in the meta-analysis by Hooper et al.,²² subgroup analysis by epicatechin dose suggested greater effects on BP at doses exceeding 50 mg, but not with doses less than 50 mg. In our study, pregnant women had to consume 20-g of chocolate daily, which provided less than 50 mg of epicatechin if all chocolate bars provided were eaten.

Other investigations also showed an increment in plasma epicatechin concentrations after acute consumption of flavanol-rich products.[28-30] The amount of experimental chocolate administered in our study had no effect on increasing plasma catechin concentrations. Similar observations have been made previously.[28, 29] Epicatechin is the predominant flavanol in dark chocolate. Moreover, among the flavanols, epicatechin has been reported to occur in a primary bioavailable form.[31] Holt et al.³⁰ suggested that complex mixtures of chocolate dimers and oligomers may be degraded in the gut into epicatechin monomers, which promotes absorption and would explain the low catechin concentrations in plasma.

At 12 weeks, epicatechin was below the limit of detection. Blood sample extraction after a 12-h fast could have been responsible for the low epicatechin concentrations, considering that epicatechin clearance from the plasma compartment is very fast[29] and most absorbed epicatechin is cleared from the blood by that time.[28, 32] Moreover, Taubert et al.[33] excluded the storage of plasma phenols after dark chocolate intake because the short elimination half-lives of flavanols prevented accumulation of plasma levels and thus no flavanols could be detected after 12-h post-intake of flavanol-rich dark chocolate. Nevertheless, after daily dietary chocolate incorporation for 12 weeks, even if epicatechin concentrations were very low, plasma theobromine increased 4-fold, indicating very good compliance, as discussed below. Plasma epicatechin levels should be quantified 2 h after the chocolate dose because of the short elimination half-life of flavanols.

Some limitations[34] of the technique for FMD assessment could also explain our lack of significant effect. Measurement of endothelial function is challenging. Although a number of non-invasive techniques are now available, the most frequently-used method involving FMD of the brachial artery with ultrasound imaging was incorporated in our trial. This gold standard technique is not easy and requires extensive sonographer training as well as labour-intensive image analysis. Also, lack of standardization could influence methodological reproducibility in follow-up studies, particularly among pregnant women. Moreover, in this trial, we adopted M mode during image acquisition of the brachial artery. However, both M and A modes are applied to continuously measure brachial diameter, and these techniques may be subject to error due to tracking drift.[34] In addition, M mode is more variable than B mode; thus, it is difficult to maintain the positional stability of measurements which must be performed at set time points (50 s), limiting reproducibility and showing lower FMD as a result.[35] Furthermore, 40 to 60

patients are typically needed in a parallel-group study design to find significant improvement in FMD.[34] Sample size in our study was likely too small to detect a significant difference between the 2 groups with this method. More novel fingertip-based methodologies, such as pulse amplitude tonometry, which has the potential advantage of an automated, computerized analysis system that minimizes operator dependency and inter-observer variability, would be more appropriate in prospective studies.

It is relevant to point out and discuss the consumption of low-flavanol chocolate bars as placebo to high-flavanol chocolate bars. In fact, our placebo chocolate probably did not have a neutral effect compared to experimental chocolate because it provided similar theobromine concentrations.[24] Although the beneficial outcome of chocolate on FMD and BP has largely been associated with flavanols, a recent clinical trial indicated that theobromine could partly be responsible for the BP-lowering action of chocolate.[36] Our results could have been masked by its effects, which would confirm the importance of carefully selecting an adequate placebo.

Interestingly, after checking the medical records of participants when the study ended, the pregnant women high-flavanol chocolate group had not incurred any kind of disease related to hypertension or PE, whereas a participant in the low-flavanol chocolate group had PE during late pregnancy (result not shown).

Important and significant theobromine concentrations, a good marker of chocolate intake, and the count of unused chocolate bars confirmed good compliance with the intervention during 12-week follow-up, which did not differ across arms. This finding suggests that 20-g chocolate bars could be incorporated in the usual diet of pregnant women for as long as 12 weeks.

Overall, 42 of 44 randomized pregnant women were retained in our study, and only 1 participant was not included in intention-to-treat analysis.

Weight increases linearly during the 2nd and 3rd trimesters of pregnancy, but is associated with escalating physiological weight in pregnancy. Mean gestational weight gain by our pregnant study participants was in accordance with new recommendations of the committee re-examining pregnancy weight guidelines.[37] Caloric intake and nutritional dietary composition did not change significantly during the trial. Although chocolate has high energy density and is perhaps recognized as a fattening food, several studies [33, 38-40] have not discerned any weight increase after daily chocolate intake. In our pilot RCT, participants in the 2 arms were instructed not to add chocolate bars to their usual diet but to use them by replacing foods of similar energy and macronutrient composition. Moreover, to ensure support and motivation for adequate use of chocolate, women were met individually by a dietitian who offered global counseling. These strategies could have a favorable impact on weight gain during pregnancy. Therefore, we can speculate that weight gain was not attributable to chocolate intake.

The participants were in good health at baseline and probably represented mainly females with an interest in health and diet. Therefore we can speculate that it may have contributed to reduce the possibility of a significant chocolate intake effect on FMD and BP. Therefore, our results may not be applicable to high-risk pregnant women.

3.8 Conclusion

The results of this pilot RCT confirm the feasibility of a large RCT and flag important methodological, physiological and clinical elements that need to be taken into account in large-scale clinical studies. Treatment compliance by all

participants was satisfactory. Consumption of flavanol-rich chocolate was not associated with significant changes in FMD, SBP and DBP in pregnant women with normal BP. We cannot rule out that failure to improve could have been due to a ceiling effect.

We could hypothesize that the absence of effects was attributable to our healthy, normotensive female population, among whom only small changes in BP or FMD were to be expected. Nevertheless, as our study results did not show side-effects, it would be pertinent to specifically investigate these outcomes of flavanol-rich chocolate in pregnant women at high risk of PE.

Protocol

Full details of the trial protocol can be requested: sylvie.dodin@oqy.ulaval.ca

Acknowledgments

Thanks to the staff of the University Laval, especially at the St. François d'Assise Hospital Research Centre and the Institute of Nutraceuticals and Functional Foods (INAF). We also thank the women who participated in the study.

References

1. Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M, Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension*, 2003. **41**(3): p. 437-45.
2. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M, Pre-eclampsia. *Lancet*, 2005. **365**(9461): p. 785-99.
3. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams DJ, Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 2007. **335**(7627): p. 974.
4. Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, et al., Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J*, 1993. **7**(6): p. 566-71.
5. Magness RR, Shaw CE, Phernetton TM, Zheng J, Bird IM, Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. II. Pregnancy effects on NO synthase expression. *Am J Physiol*, 1997. **272**(4 Pt 2): p. H1730-40.
6. Redman CWSargent IL, Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*, 2005. **308**(5728): p. 1592-4.
7. Redman CWSargent IL, Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta*, 2009. **30 Suppl A**: p. S38-42.
8. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA, The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **42**(7): p. 1149-60.
9. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, et al., Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*, 2008. **88**(1): p. 38-50.
10. Triche EW, Grosso LM, Belanger K, Darefsky AS, Benowitz NL, et al., Chocolate Consumption in Pregnancy and Reduced Likelihood of Preeclampsia. *Epidemiology*, 2008. **19**(3): p. 459-64.
11. Saftlas AF, Triche EW, Beydoun H, Bracken MB, Does chocolate intake during pregnancy reduce the risks of preeclampsia and gestational hypertension? *Annals of epidemiology*, 2010. **20**(8): p. 584-91.
12. Klebanoff MA, Zhang J, Zhang C, Levine RJ, Maternal serum theobromine and the development of preeclampsia. *Epidemiology*, 2009. **20**(5): p. 727-32.

13. Reinders A, Cuckson AC, Lee JT, Shennan AH, An accurate automated blood pressure device for use in pregnancy and pre-eclampsia: the Microlife 3BTO-A. *BJOG*, 2005. **112**(7): p. 915-20.
14. Goulet J, Nadeau G, Lapointe A, Lamarche B, Lemieux S, Validity and reproducibility of an interviewer-administered food frequency questionnaire for healthy French-Canadian men and women. *Nutr J*, 2004. **3**: p. 13.
15. Bouchard C, Tremblay A, Leblanc C, Lortie G, Savard R, et al., A method to assess energy expenditure in children and adults. *The American journal of clinical nutrition*, 1983. **37**(3): p. 461-7.
16. Schmidt MD, Freedson PS, Pekow P, Roberts D, Sternfeld B, et al., Validation of the Kaiser Physical Activity Survey in pregnant women. *Medicine and science in sports and exercise*, 2006. **38**(1): p. 42-50.
17. Rodes-Cabau J, Noel M, Marrero A, Rivest D, Mackey A, et al., Atherosclerotic burden findings in young cryptogenic stroke patients with and without a patent foramen ovale. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2009. **40**(2): p. 419-25.
18. Bogaty P, Brophy JM, Noel M, Boyer L, Simard S, et al., Impact of prolonged cyclooxygenase-2 inhibition on inflammatory markers and endothelial function in patients with ischemic heart disease and raised C-reactive protein: a randomized placebo-controlled study. *Circulation*, 2004. **110**(8): p. 934-9.
19. Foенander T, Birkett DJ, Miners JO, Wing LM, The simultaneous determination of theophylline, theobromine and caffeine in plasma by high performance liquid chromatography. *Clinical biochemistry*, 1980. **13**(3): p. 132-4.
20. Baba S, Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Takizawa T, et al., Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free radical research*, 2000. **33**(5): p. 635-41.
21. Thabane L, Ma J, Chu R, Cheng J, Ismaila A, et al., A tutorial on pilot studies: the what, why and how. *BMC medical research methodology*, 2010. **10**: p. 1.
22. Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C, Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *The American journal of clinical nutrition*, 2005. **81**(3): p. 611-4.
23. Fraga CG, Actis-Goretta L, Ottaviani JI, Carrasquedo F, Lotito SB, et al., Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress

- in young soccer players. *Clinical & developmental immunology*, 2005. **12**(1): p. 11-7.
24. Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, Kroon PA, Cohn JS, et al., Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *The American journal of clinical nutrition*, 2012.
 25. Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK, Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *Journal of hypertension*, 2003. **21**(12): p. 2281-6.
 26. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Alexopoulos N, Economou E, Andreadou I, et al., Effect of dark chocolate on arterial function in healthy individuals. *American journal of hypertension*, 2005. **18**(6): p. 785-91.
 27. Taubert D, Roesen R, Schomig E, Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis. *Arch Intern Med*, 2007. **167**(7): p. 626-34.
 28. Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, et al., Epicatechin in human plasma: In vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *Journal of Nutrition*, 2000. **130**(8): p. 2109s-2114s.
 29. Richelle M, Tavazzi I, Enslin M, Offord EA, Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *European journal of clinical nutrition*, 1999. **53**(1): p. 22-26.
 30. Engler MB, Engler MM, Chen CY, Malloy MJ, Browne A, et al., Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *Journal of the American College of Nutrition*, 2004. **23**(3): p. 197-204.
 31. Spencer JP, Schroeter H, Shenoy B, Srai SK, Debnam ES, et al., Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. *Biochemical and biophysical research communications*, 2001. **285**(3): p. 588-93.
 32. Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, Zhu QY, Schramm DD, et al., Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *The American journal of clinical nutrition*, 2002. **76**(4): p. 798-804.
 33. Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schomig E, Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 2007. **298**(1): p. 49-60.

34. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, et al., Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *Journal of the American College of Cardiology*, 2002. **39**(2): p. 257-65.
35. Donald AE, Halcox JP, Charakida M, Storry C, Wallace SM, et al., Methodological approaches to optimize reproducibility and power in clinical studies of flow-mediated dilation. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008. **51**(20): p. 1959-64.
36. van den Bogaard B, Draijer R, Westerhof BE, van den Meiracker AH, van Montfrans GA, et al., Effects on peripheral and central blood pressure of cocoa with natural or high-dose theobromine: a randomized, double-blind crossover trial. *Hypertension*, 2010. **56**(5): p. 839-46.
37. Rasmussen KM, Catalano PM, Yaktine AL, New guidelines for weight gain during pregnancy: what obstetrician/gynecologists should know. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 2009. **21**(6): p. 521-6.
38. Buijsse B, Weikert C, Drogan D, Bergmann M, Boeing H, Chocolate consumption in relation to blood pressure and risk of cardiovascular disease in German adults. *European heart journal*, 2010. **31**(13): p. 1616-23.
39. Balzer J, Rassaf T, Heiss C, Kleinbongard P, Lauer T, et al., Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients a double-masked, randomized, controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008. **51**(22): p. 2141-9.
40. Davison K, Coates AM, Buckley JD, Howe PR, Effect of cocoa flavanols and exercise on cardiometabolic risk factors in overweight and obese subjects. *International journal of obesity*, 2008. **32**(8): p. 1289-96.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette étude pilote avait pour but de vérifier la faisabilité d'un essai clinique de grande envergure dont l'objectif principal serait de vérifier l'effet aigu et chronique de la consommation de chocolat riche en flavanols sur la fonction endothéliale des femmes enceintes à risque de prééclampsie. Les objectifs secondaires de cette étude pilote étaient d'évaluer chez les femmes enceintes normotendues les changements et les écarts-types de la fonction endothéliale et de la tension artérielle systolique et diastolique suite à la consommation aiguë et chronique de chocolat noir riche en polyphénols durant 12 semaines. Aussi, l'étude visait à apprécier les méthodes potentielles de recrutement des participantes et les difficultés reliées à celui-ci.

Les résultats de cette étude pilote randomisée confirment la faisabilité d'un essai clinique randomisé de grande envergure et soulève certains éléments méthodologiques, physiologiques et cliniques importants dont il faudra tenir compte lors de la planification de l'essai clinique de grande envergure.

Parmi les éléments à souligner, la stratégie des unités de médecine familiale (UMF) pour le recrutement de participantes à l'étude s'est avérée comme étant la plus efficace, réaliste et facilement applicable. Il est cependant important de noter que sur les 146 participantes approchées, 132 femmes ont accepté d'être rejointes lors de nos activités de recrutement, mais seules 44 ont pu être randomisées soit moins d'un tiers des participantes potentielles. Ces informations sont extrêmement importantes à connaître lors de la réalisation d'un essai clinique de grande envergure, puisque une surestimation des capacités de recrutement peut avoir des implications majeures sur la durée de l'étude et notamment de la période de recrutement et les coûts financiers qui y sont associés. Une estimation non réaliste et trop optimiste des capacités de recrutement peut en effet mettre en péril la

validité de l'étude, si la taille d'échantillon calculée pour atteindre une puissance statistique suffisante ne peut être atteinte dans les délais prévus initialement.

L'augmentation des concentrations plasmatiques de théobromine dans les deux groupes à 12 semaines confirme une bonne observance à l'intervention. L'acceptation du traitement chez toutes les participantes a été satisfaisante, les effets indésirables étant rares. Les procédures à l'aveugle utilisées dans le cadre de l'étude ont été efficaces.

Cette étude de faisabilité est le premier essai clinique randomisé à double insu contrôlé par un placebo comparant l'effet du chocolat riche en flavanols sur la fonction endothéliale et la tension artérielle chez les femmes enceintes. Selon nos résultats, la consommation de chocolat riche en flavanols n'a pas été associée à des changements significatifs ni de la fonction endothéliale ni de la tension artérielle systolique ou diastolique chez les femmes enceintes normotendues. Cette consommation de chocolat n'a pas entraîné d'effets secondaires ni de prise de poids supérieure à celle recommandée pendant la grossesse.

Plusieurs éléments peuvent expliquer ces résultats négatifs. Tout d'abord, nous ne pouvons pas exclure que l'absence d'une amélioration puisse s'expliquer par un effet dit « plancher ». Nos résultats sont concordants avec les résultats de revues systématiques récentes suggérant que l'effet de la consommation de chocolat riche en flavanols sur la fonction endothéliale et la tension artérielle ne s'observe que chez les sujets préalablement hypertendus. Notre essai clinique de grande envergure devrait donc cibler plus spécifiquement une population de femmes à risque de pré éclampsie dont la fonction endothéliale est anormale très précocement au cours de la grossesse.

Dans le cadre de notre étude, les femmes enceintes prenaient pendant 12 semaines 20 g de chocolat par jour, ce qui leur fournissait moins de 50 mg d'épicathéchines

de façon quotidienne. Or, les dernières études suggèrent que des doses d'épicathéchines plus élevées que 50 mg seraient nécessaires pour entraîner des changements significatifs sur la tension artérielle. Ainsi, la prise du chocolat dans le cadre d'un essai clinique randomisé de grande envergure devrait être suffisante pour fournir plus de 50 mg d'épicatéchines.

Quoique nous ayons observé des différences importantes dans les concentrations des épicatechines sériques 180 mn après une consommation de 40 g de chocolat expérimental versus chocolat faible en flavanols, les concentrations plasmatiques des épicatechines étaient sous le seuil de détection 12 semaines après une consommation chronique de 20g de chocolat. Les mesures d'épicatéchines dont la demi-vie est très courte ont été réalisées sur le plasma des participantes à jeun depuis 12h, ce qui explique en grande partie ces résultats. Ainsi le cadre d'un essai clinique de grande envergure, la prise de chocolat devrait être répartie tout au cours de la journée, soit au moins en trois prises.

La technique utilisée pour mesurer la vasodilatation dépendante de l'endothélium (FMD) est une mesure valide dans le cadre des études transversales mais son manque de reproductibilité très dépendante de l'utilisateur limite son utilisation dans le cadre d'études prospectives. La puissance de cette étude de faisabilité était vraisemblablement insuffisante pour être en mesure de détecter une différence significative entre les 2 groupes par cette méthode peu reproductible. Une technique récente permet d'évaluer de façon non invasive et reproductible la FMD. Cette technique utilise un système d'analyse automatisé et informatisé qui minimise la dépendance de l'opérateur et la variabilité entre les observations. Selon des données récentes, cette méthode serait la plus appropriée pour évaluer la fonction endothéliale dans le cadre d'études prospectives.

Finalement, selon des données très récentes, la théobromine pourrait être en partie responsable de l'effet bénéfique du chocolat sur la tension artérielle. Or dans le cadre de notre étude de faisabilité, le chocolat riche en flavanols ne se distinguait du chocolat placebo que par sa teneur élevée en flavanols, les concentrations en théobromine de ces 2 chocolats étant semblables. Le choix d'un chocolat placebo sans flavanols et sans théobromine devrait être comparé au chocolat riche en flavanols dans le cadre de notre essai clinique randomisé futur.

Bibliographie

1. Roberts JM, Pearson G, Cutler J, Lindheimer M. Summary of the NHLBI Working Group on Research on Hypertension During Pregnancy. *Hypertension* 2003;41:437-45.
2. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:S1-S22.
3. Saudan P, Brown MA, Buddle ML, Jones M. Does gestational hypertension become pre-eclampsia? *British journal of obstetrics and gynaecology* 1998;105:1177-84.
4. Faber-Swensson AP, O'Callaghan SP, Walters WA. Endothelial cell function enhancement in a late normal human pregnancy. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology* 2004;44:525-9.
5. Dorup I, Skajaa K, Sorensen KE. Normal pregnancy is associated with enhanced endothelium-dependent flow-mediated vasodilation. *The American journal of physiology* 1999;276:H821-5.
6. Williams DJ, Vallance PJ, Neild GH, Spencer JA, Imms FJ. Nitric oxide-mediated vasodilation in human pregnancy. *The American journal of physiology* 1997;272:H748-52.
7. Anumba DO, Robson SC, Boys RJ, Ford GA. Nitric oxide activity in the peripheral vasculature during normotensive and preeclamptic pregnancy. *The American journal of physiology* 1999;277:H848-54.
8. Cockell AP, Poston L. Flow-mediated vasodilatation is enhanced in normal pregnancy but reduced in preeclampsia. *Hypertension* 1997;30:247-51.
9. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition* 2000;130:2073S-85S.
10. Ried K, Sullivan T, Fakler P, Frank OR, Stocks NP. Does chocolate reduce blood pressure? A meta-analysis. *BMC Med* 2010;8:39.
11. Taubert D, Roesen R, Schomig E. Effect of cocoa and tea intake on blood pressure: a meta-analysis. *Archives of internal medicine* 2007;167:626-34.
12. Desch S, Schmidt J, Kobler D, et al. Effect of cocoa products on blood pressure: systematic review and meta-analysis. *Am J Hypertens* 2010;23:97-103.
13. Heiss C, Jahn S, Taylor M, et al. Improvement of endothelial function with dietary flavanols is associated with mobilization of circulating angiogenic cells in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2010;56:218-24.
14. Davison K, Berry NM, Misan G, Coates AM, Buckley JD, Howe PR. Dose-related effects of flavanol-rich cocoa on blood pressure. *J Hum Hypertens* 2010;24:568-76.

15. Triche EW, Grosso LM, Belanger K, Darefsky AS, Benowitz NL, Bracken MB. Chocolate Consumption in Pregnancy and Reduced Likelihood of Preeclampsia. *Epidemiology* 2008;19:459-64.
16. Saftlas AF, Triche EW, Beydoun H, Bracken MB. Does chocolate intake during pregnancy reduce the risks of preeclampsia and gestational hypertension? *Ann Epidemiol* 2010;20:584-91.
17. Klebanoff MA, Zhang J, Zhang C, Levine RJ. Maternal serum theobromine and the development of preeclampsia. *Epidemiology* 2009;20:727-32.
18. Rumbold A, Duley L, Crowther CA, Haslam RR. Antioxidants for preventing pre-eclampsia. *Cochrane Database Syst Rev* 2008:CD004227.
19. Engler MB, Engler MM, Chen CY, et al. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr* 2004;23:197-204.
20. Duckitt K, Harrington D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ* 2005;330:565.
21. Sibai BM. Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. *Obstetrics and gynecology* 2003;102:181-92.
22. Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams DJ. Pre-eclampsia and risk of cardiovascular disease and cancer in later life: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2007;335:974.
23. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1149-60.
24. Ogge G, Chaiworapongsa T, Romero R, et al. Placental lesions associated with maternal underperfusion are more frequent in early-onset than in late-onset preeclampsia. *J Perinat Med* 2011;39:641-52.
25. Goldman-Wohl D, Yagel S. Regulation of trophoblast invasion: from normal implantation to pre-eclampsia. *Molecular and cellular endocrinology* 2002;187:233-8.
26. Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna H, et al. Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats. *FASEB J* 1993;7:566-71.
27. Magness RR, Shaw CE, Phernetton TM, Zheng J, Bird IM. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. II. Pregnancy effects on NO synthase expression. *The American journal of physiology* 1997;272:H1730-40.
28. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet* 2003;361:1511-7.

29. Savvidou MD, Kametas NA, Donald AE, Nicolaides KH. Non-invasive assessment of endothelial function in normal pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000;15:502-7.
30. Quinton AE, Cook CM, Peek MJ. A longitudinal study using ultrasound to assess flow-mediated dilatation in normal human pregnancy. *Hypertens Pregnancy* 2007;26:273-81.
31. Sierra-Laguado J, Garcia RG, Lopez-Jaramillo P. Flow-mediated dilatation of the brachial artery in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet* 2006;93:60-1.
32. Saarelainen H, Valtonen P, Punnonen K, et al. Subtle changes in ADMA and l-arginine concentrations in normal pregnancies are unlikely to account for pregnancy-related increased flow-mediated dilatation. *Clin Physiol Funct Imaging* 2008;28:120-4.
33. Savvidou MD, Donald AE, Nicolaides KH. Assessment of endothelial function in normal twin pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001;17:220-3.
34. Kametas NA, Savvidou MD, Donald AE, McAuliffe F, Nicolaides KH. Flow-mediated dilatation of the brachial artery in pregnancy at high altitude. *BJOG* 2002;109:930-7.
35. Moens AL, Goovaerts I, Claeys MJ, Vrints CJ. Flow-mediated vasodilation: a diagnostic instrument, or an experimental tool? *Chest* 2005;127:2254-63.
36. Brodzki J, Lanne T, Laurini R, Strevens H, Wide-Swensson D, Marsal K. Vascular mechanical properties and endothelial function in pre-eclampsia with special reference to bilateral uterine artery notch. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 2008;87:154-62.
37. Savvidou MD, Noori M, Anderson JM, Hingorani AD, Nicolaides KH. Maternal endothelial function and serum concentrations of placental growth factor and soluble endoglin in women with abnormal placentation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;32:871-6.
38. Erdman JW, Jr., Balentine D, Arab L, et al. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. *The Journal of nutrition* 2007;137:718S-37S.
39. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2004;79:727-47.
40. Lee KW, Kim YJ, Lee HJ, Lee CY. Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of agricultural and food chemistry* 2003;51:7292-5.
41. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, et al. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr* 2008;88:38-50.

42. Balzer J, Rassaf T, Heiss C, et al. Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients a double-masked, randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:2141-9.
43. Desch S, Schmidt J, Kobler D, et al. Effect of cocoa products on blood pressure: systematic review and meta-analysis. *Am J Hypertens* 2010;23:97-103.
44. Hooper L, Kay C, Abdelhamid A, et al. Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *The American journal of clinical nutrition* 2012.
45. Buitrago-Lopez A, Sanderson J, Johnson L, et al. Chocolate consumption and cardiometabolic disorders: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2011;343:d4488.
46. Oba S, Nagata C, Nakamura K, et al. Consumption of coffee, green tea, oolong tea, black tea, chocolate snacks and the caffeine content in relation to risk of diabetes in Japanese men and women. *Br J Nutr* 2010;103:453-9.
47. Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schomig E. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *Jama* 2007;298:49-60.
48. Kelly CJ. Effects of theobromine should be considered in future studies. *Am J Clin Nutr* 2005;82:486-7; author reply 7-8.
49. Talosi G, Nemeth I, Pinter S. Inhibitory effects of methylxanthines on the pre-eclamptic-like symptoms in ewes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;99:25-32.
50. Cienfuegos-Jovellanos E, Quinones Mdel M, Muguera B, Moulay L, Miguel M, Aleixandre A. Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans. *Journal of agricultural and food chemistry* 2009;57:6156-62.
51. Smit HJ, Gaffan EA, Rogers PJ. Methylxanthines are the psychopharmacologically active constituents of chocolate. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;176:412-9.
52. van den Bogaard B, Draijer R, Westerhof BE, van den Meiracker AH, van Montfrans GA, van den Born BJ. Effects on peripheral and central blood pressure of cocoa with natural or high-dose theobromine: a randomized, double-blind crossover trial. *Hypertension* 2010;56:839-46.
53. Reinders A, Cuckson AC, Lee JT, Shennan AH. An accurate automated blood pressure device for use in pregnancy and pre-eclampsia: the Microlife 3BTO-A. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 2005;112:915-20.
54. Goulet J, Nadeau G, Lapointe A, Lamarche B, Lemieux S. Validity and reproducibility of an interviewer-administered food frequency questionnaire for healthy French-Canadian men and women. *Nutrition journal* 2004;3:13.
55. Sibai B, Dekker G, Kupferminc M. Pre-eclampsia. *Lancet* 2005;365:785-99.

56. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 2005;308:1592-4.
57. Redman CW, Sargent IL. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta* 2009;30 Suppl A:S38-42.
58. Reinders A, Cuckson AC, Lee JT, Shennan AH. An accurate automated blood pressure device for use in pregnancy and pre-eclampsia: the Microlife 3BTO-A. *BJOG* 2005;112:915-20.
59. Bouchard C, Tremblay A, Leblanc C, Lortie G, Savard R, Theriault G. A method to assess energy expenditure in children and adults. *Am J Clin Nutr* 1983;37:461-7.
60. Schmidt MD, Freedson PS, Pekow P, Roberts D, Sternfeld B, Chasan-Taber L. Validation of the Kaiser Physical Activity Survey in pregnant women. *Med Sci Sports Exerc* 2006;38:42-50.
61. Rodes-Cabau J, Noel M, Marrero A, et al. Atherosclerotic burden findings in young cryptogenic stroke patients with and without a patent foramen ovale. *Stroke* 2009;40:419-25.
62. Bogaty P, Brophy JM, Noel M, et al. Impact of prolonged cyclooxygenase-2 inhibition on inflammatory markers and endothelial function in patients with ischemic heart disease and raised C-reactive protein: a randomized placebo-controlled study. *Circulation* 2004;110:934-9.
63. Foenander T, Birkett DJ, Miners JO, Wing LM. The simultaneous determination of theophylline, theobromine and caffeine in plasma by high performance liquid chromatography. *Clin Biochem* 1980;13:132-4.
64. Baba S, Osakabe N, Yasuda A, et al. Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radic Res* 2000;33:635-41.
65. Thabane L, Ma J, Chu R, et al. A tutorial on pilot studies: the what, why and how. *BMC Med Res Methodol* 2010;10:1.
66. Grassi D, Lippi C, Necozione S, Desideri G, Ferri C. Short-term administration of dark chocolate is followed by a significant increase in insulin sensitivity and a decrease in blood pressure in healthy persons. *The American journal of clinical nutrition* 2005;81:611-4.
67. Fraga CG, Actis-Goretta L, Ottaviani JI, et al. Regular consumption of a flavanol-rich chocolate can improve oxidant stress in young soccer players. *Clin Dev Immunol* 2005;12:11-7.
68. Fisher ND, Hughes M, Gerhard-Herman M, Hollenberg NK. Flavanol-rich cocoa induces nitric-oxide-dependent vasodilation in healthy humans. *J Hypertens* 2003;21:2281-6.
69. Vlachopoulos C, Aznaouridis K, Alexopoulos N, Economou E, Andreadou I, Stefanadis C. Effect of dark chocolate on arterial function in healthy individuals. *Am J Hypertens* 2005;18:785-91.

70. Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: In vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *Journal of Nutrition* 2000;130:2109s-14s.
71. Richelle M, Tavazzi I, Enslin M, Offord EA. Plasma kinetics in man of epicatechin from black chocolate. *Eur J Clin Nutr* 1999;53:22-6.
72. Engler MB, Engler MM, Chen CY, et al. Flavonoid-rich dark chocolate improves endothelial function and increases plasma epicatechin concentrations in healthy adults. *J Am Coll Nutr* 2004;23:197-204.
73. Spencer JP, Schroeter H, Shenoy B, Srai SK, Debnam ES, Rice-Evans C. Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;285:588-93.
74. Holt RR, Lazarus SA, Sullards MC, et al. Procyanidin dimer B2 [epicatechin-(4beta-8)-epicatechin] in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *The American journal of clinical nutrition* 2002;76:798-804.
75. Taubert D, Roesen R, Lehmann C, Jung N, Schomig E. Effects of low habitual cocoa intake on blood pressure and bioactive nitric oxide: a randomized controlled trial. *Jama* 2007;298:49-60.
76. Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:257-65.
77. Donald AE, Halcox JP, Charakida M, et al. Methodological approaches to optimize reproducibility and power in clinical studies of flow-mediated dilation. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:1959-64.
78. Rasmussen KM, Catalano PM, Yaktine AL. New guidelines for weight gain during pregnancy: what obstetrician/gynecologists should know. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2009;21:521-6.
79. Buijsse B, Weikert C, Drogan D, Bergmann M, Boeing H. Chocolate consumption in relation to blood pressure and risk of cardiovascular disease in German adults. *Eur Heart J* 2010;31:1616-23.
80. Davison K, Coates AM, Buckley JD, Howe PR. Effect of cocoa flavanols and exercise on cardiometabolic risk factors in overweight and obese subjects. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:1289-96.

Table 1. Chocolate composition (20-g)

Components	High-flavanol chocolate	Low-flavanol Chocolate
Energy (kcal)	102	102
Total fat (g)	7.5	7.5
Carbohydrates (g)	6.5	6.5
Protein (g)	1.35	1.35
Total catechin + epicatechin (mg)	64	14
Caffeine (mg)	23.6	23.6
Theobromine (mg)	150	150

Table 2. Demographic characteristics

Characteristics	High-flavanol chocolate (n=23)	Low-flavanol chocolate (n=21)
Marital status		
Common-law spouse	19 (82.6)	15 (71.4)
Married	4 (17.4)	6 (28.6)
Number of children		
0	14 (60.9)	13 (61.9)
1	7 (30.4)	6 (28.6)
2	2 (8.7)	1 (4.8)
3	0	1 (4.8)
Educational attainment		
University degree	17 (73.9)	15 (71.4)
College or trade certification	5 (21.7)	4 (19.1)
Some university education	0	1 (4.8)
Some college education	0	1 (4.8)
High school diploma	1 (4.4)	0
Women with paid work[*]	23 (100)	19 (90.5)
Average hours worked (per year)[†]	1,717.1 ± 482.7 (n=22)	1,817.5 ± 503.9 (n=19)
Perception of financial situation^{††}		
Sufficient income	13 (56.5)	13 (61.9)
Low income	10 (43.5)	8 (38.1)
Regular alcohol consumption^{†††}	4 (17.4)	1 (4.8)
Smoker^{†††}	0	1 (4.8)

* During the past year

[†] Values are means ± SD

^{††} Perception of women compared to people of their age

^{†††} In the last month

Number (percentage)

Table 3. Baseline characteristics of 44 pregnant women by study arm

Baseline characteristics	High-flavanol chocolate (n=23)	Low-flavanol chocolate (n=21)
Age (years)	28.7 ± 3.17	29.76 ± 3.63
Height (m)	1.64 ± 0.06	1.66 ± 0.04
Weight (kg)	66.07 ± 6.79	64.90 ± 8.14
BMI (kg/m ²)	24.73 ± 2.68	23.61 ± 2.85
Gestational age at enrolment (weeks)	21.13 ± 1.10	21.10 ± 1.61
Blood pressure		
Systolic blood pressure (mmHg)*	109.43 ± 7.65	105.94 ± 7.84
Diastolic blood pressure (mmHg)*	66.80 ± 6.34	64.23 ± 6.24
Mean arterial pressure (mmHg)*	81.01 ± 5.87	78.14 ± 6.48
Flow-mediated dilation (%)	11.86 ± 4.66	13.25 ± 3.80
Plasma biomarkers of chocolate intake		
Theobromine (µg/mL plasma)	0.45 ± 0.43	0.35 ± 0.37
Theophylline (µg/mL plasma)	0.13 ± 0.18	0.07 ± 0.11
Caffeine (µg/mL plasma)	0.58 ± 0.82	0.29 ± 0.46
Plasma flavanol concentrations		
Epicatechin (ng/mL plasma)	4.90 ± 0.00	4.90 ± 0.00
Catechin (ng/mL plasma)	55.99 ± 44.23	44.05 ± 46.68
*Average of 3 measurements		Values are means ± SD

Table 4. Acute changes in the plasma concentrations of biomarkers after single dose chocolate intake

	Low-flavanol Chocolate (n=21)	High-flavanol Chocolate (n=23)	<i>P</i> value of change between treatments
Epicatechins (ng/mL)			
0 min (Baseline)	4.90 ± 0.00	4.90 ± 0.00	-
180min	4.90 ± 0.00	97.02 ± 41.94	<0.0001
<i>P</i> value (180 vs. 0 min)	-	<0.0001	
Catechins (ng/mL)			
0 min (Baseline)	44.05 ± 46.68	55.99 ± 44.23	-
180min	43.62 ± 42.88	59.11 ± 43.50	0.70
<i>P</i> value (180 vs. 0 min)	0.92	0.70	

Table 5. Acute changes in methylxanthines concentrations after single dose chocolate intake

	Low-flavanol Chocolate (n=21)	High-flavanol Chocolate (n=23)	P value of change between treatments
Theobromine (µg/mL)			
0 min (Baseline)	0.35 ± 0.37	0.45 ± 0.43	-
180min	5.47 ± 1.29	6.51 ± 0.08	0.0122
<i>P</i> value (180 vs. 0 min)	<0.0001	<0.0001	
Theophylline (µg/mL)			
0 min (Baseline)	0.07 ± 0.11	0.13 ± 0.18	-
180min	0.12 ± 0.12	0.18 ± 0.13	0.85
<i>P</i> value (180 vs. 0 min)	<0.0001	0.0009	
Caffeine (µg/mL)			
0 min (Baseline)	0.29 ± 0.46	0.58 ± 0.82	-
180min	1.07 ± 0.50	1.54 ± 0.67	0.0201
<i>P</i> value (180 vs. 0 min)	<0.0001	<0.0001	

Table 6. Chronic changes in methylxanthine concentrations after daily consumption of 20-g chocolate

	Low-flavanol Chocolate (n=20)	High-flavanol Chocolate (n=22)	<i>P</i> value of change between treatments
Theobromine (µg/mL)			
Baseline	0.35 ± 0.37	0.45 ± 0.43	-
Week 6	1.44 ± 0.73	1.82 ± 0.76	0.34
Week 12	1.30 ± 0.69	1.87 ± 0.85	0.03
<i>P</i> value (Week 6 vs. Baseline)	<0.0001	<0.0001	
<i>P</i> value (Week 12 vs. Baseline)	<0.0001	<0.0001	
Theophylline (µg/mL)			
Baseline	0.07 ± 0.11	0.13 ± 0.18	-
Week 6	0.24 ± 0.24	0.27 ± 0.29	0.66
Week 12	0.17 ± 0.17	0.27 ± 0.20	0.49
<i>P</i> value (Week 6 vs. Baseline)	0.0001	0.045	
<i>P</i> value (Week 12 vs. Baseline)	0.0003	0.0076	
Caffeine (µg/mL)			
Baseline	0.29 ± 0.46	0.58 ± 0.82	-
Week 6	1.12 ± 1.27	1.30 ± 2.08	0.78
Week 12	0.82 ± 1.15	1.56 ± 2.05	0.34
<i>P</i> value (Week 6 vs. Baseline)	0.004	0.12	
<i>P</i> value (Week 12 vs. Baseline)	0.02	0.03	

Table 7. Acute changes in FMD and BP after single dose chocolate intake

	Low-flavanol Chocolate (n=21)	High-flavanol Chocolate (n=23)	<i>P</i> value of change between treatments
FMD (%)			
0 min (Baseline)	13.3 ± 3.8	11.9 ± 4.7	-
60min	13.0 ± 4.3	10.2 ± 3.1	0.50
120min	12.1 ± 3.0	10.8 ± 4.2	0.99
180min	11.0 ± 2.8	11.6 ± 3.7	0.18
<i>P</i> value (60 vs. 0 min)	0.82	0.18	
<i>P</i> value (120 vs. 0 min)	0.35	0.24	
<i>P</i> value (180 vs. 0 min)	0.16	0.77	
Systolic BP (mmHg)			
0 min (Baseline)	105.9 ± 7.8	109.4 ± 7.6	-
60min	107.0 ± 5.7	110.3 ± 6.8	0.95
120min	105.3 ± 6.0	110.0 ± 7.1	0.49
180min	105.8 ± 5.7	108.7 ± 6.3	0.72
<i>P</i> value (60 vs. 0 min)	0.38	0.39	
<i>P</i> value (120 vs. 0 min)	0.59	0.66	
<i>P</i> value (180 vs. 0 min)	0.86	0.55	
Diastolic BP (mmHg)			
0 min (Baseline)	64.2 ± 6.2	66.8 ± 6.3	-
60min	64.2 ± 5.9	64.5 ± 5.1	0.07
120min	64.0 ± 5.1	66.1 ± 5.6	0.68
180min	64.2 ± 4.9	66.4 ± 5.1	0.81
<i>P</i> value (60 vs. 0 min)	0.98	0.01	
<i>P</i> value (120 vs. 0 min)	0.73	0.36	
<i>P</i> value (180 vs. 0 min)	0.94	0.68	
Mean arterial BP (mmHg)			
0 min (Baseline)	78.1 ± 6.5	81.0 ± 5.9	-
60min	78.5 ± 5.4	79.8 ± 5.2	0.16
120min	77.8 ± 5.1	80.7 ± 5.7	0.92
180min	78.0 ± 4.8	80.5 ± 4.9	0.73
<i>P</i> value (60 vs. 0 min)	0.72	0.08	
<i>P</i> value (120 vs. 0 min)	0.64	0.69	
<i>P</i> value (180 vs. 0 min)	0.90	0.52	

Table 8. Changes in FMD and BP after daily consumption of 20-g chocolate for 6 and 12 weeks

	Low-flavanol Chocolate (n=20)	High-flavanol Chocolate (n=22)	<i>P</i> value of change between treatments
FMD (%)			
Baseline	13.3 ± 3.8	11.9 ± 4.7	-
Week 6	11.4 ± 3.4	10.8 ± 3.9	0.22
Week 12	13.1 ± 3.8	10.4 ± 3.4	0.43
<i>P</i> value (Week 6 vs. Baseline)	0.06	0.32	
<i>P</i> value (Week 12 vs. Baseline)	0.95	0.18	
Systolic BP (mmHg)			
Baseline	105.9 ± 7.8	109.4 ± 7.6	-
Week 6	104.8 ± 6.0	109.4 ± 7.5	0.98
Week 12	106.1 ± 9.7	108.8 ± 8.9	0.49
<i>P</i> value (Week 6 vs. Baseline)	0.69	0.83	
<i>P</i> value (Week 12 vs. Baseline)	0.66	0.60	
Diastolic BP (mmHg)			
Baseline	64.2 ± 6.2	66.8 ± 6.3	-
Week 6	65.4 ± 5.9	68.0 ± 5.0	0.51
Week 12	68.2 ± 6.9	70.5 ± 6.8	0.50
<i>P</i> value (Week 6 vs. Baseline)	0.05	0.42	
<i>P</i> value (Week 12 vs. Baseline)	0.0007	0.01	
Mean arterial BP (mmHg)			
Baseline	78.1 ± 6.5	81.0 ± 5.9	-
Week 6	78.5 ± 5.6	81.8 ± 5.2	0.65
Week 12	80.9 ± 7.5	83.2 ± 7.1	0.45
<i>P</i> value (Week 6 vs. Baseline)	0.20	0.64	
<i>P</i> value (Week 12 vs. Baseline)	0.0081	0.15	

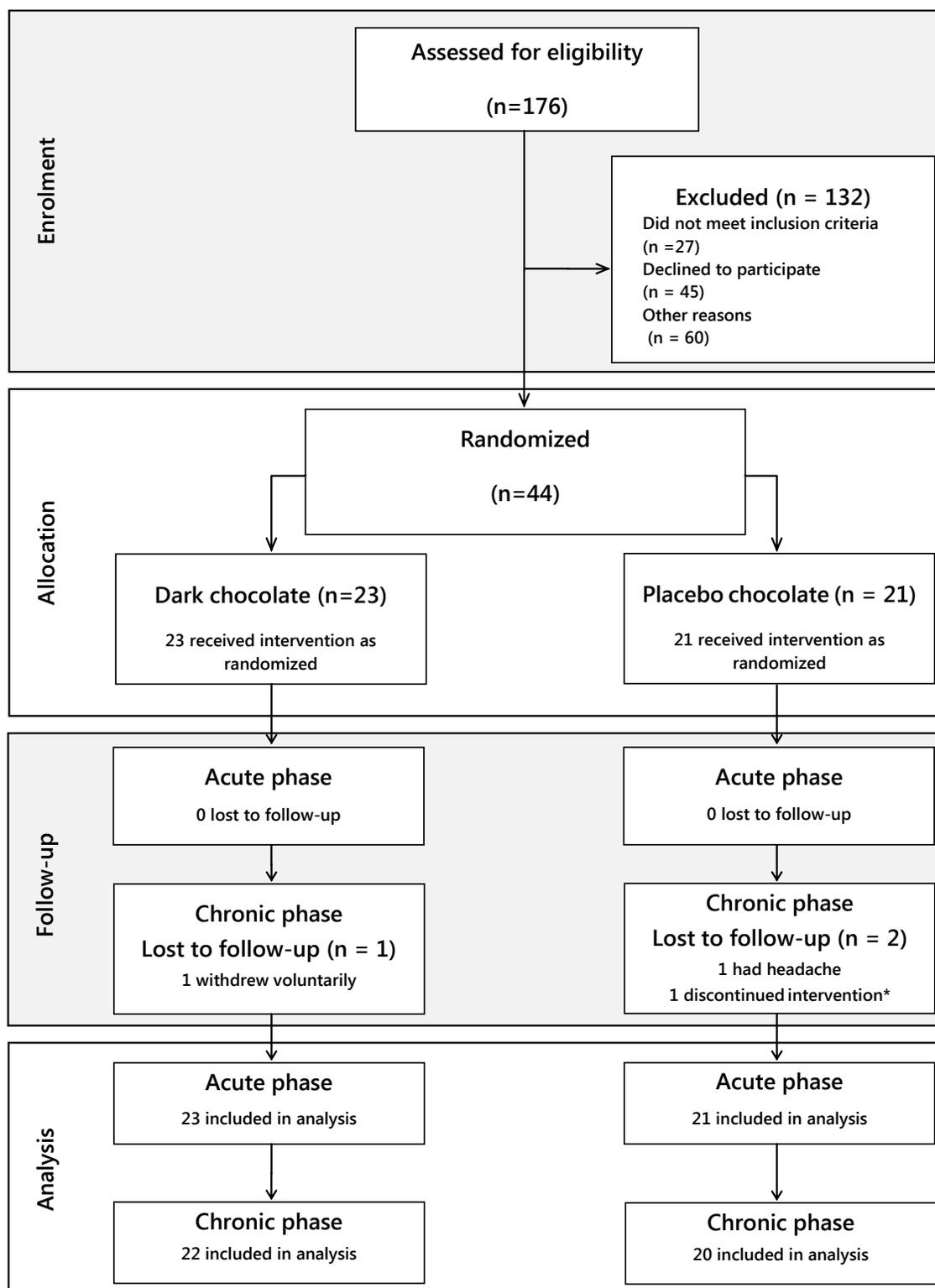
Table 9. Differences in energy and macronutrient intakes after 12 weeks of chocolate consumption

	Low-flavanol Chocolate (n=20)	High-flavanol Chocolate (n=22)	P value of change between treatments
Total energy (Kcal)			
Baseline	2,086 ± 329	2,320 ± 464	-
Week 12	2,178 ± 286	2,251 ± 465	0.18
P value (Week 12 vs. Baseline)	0.28	0.42	
Proteins (g)			
Baseline	88.3 ± 19.7	89.4 ± 18.2	-
Week 12	82.7 ± 13.8	85.0 ± 22.2	0.86
P value (Week 12 vs. Baseline)	0.12	0.39	
Proteins (% energy)			
Baseline	17.0 ± 2.6	15.6 ± 2.4	-
Week 12	15.3 ± 2.3	15.1 ± 2.2	0.86
P value (Week 12 vs. Baseline)	0.13	0.0078	
Carbohydrates (g)			
Baseline	272.2 ± 45.0	305.8 ± 62.8	-
Week 12	284.5 ± 38.1	297.6 ± 64.0	0.19
P value (Week 12 vs. Baseline)	0.33	0.39	
Carbohydrates (% energy)			
Baseline	52.5 ± 5.6	53.0 ± 5.3	-
Week 12	52.4 ± 3.7	53.0 ± 4.9	0.10
P value (Week 12 vs. Baseline)	0.92	0.99	
Lipids (g)			
Baseline	77.3 ± 17.6	89.2 ± 26.9	-
Week 12	83.2 ± 16.3	86.3 ± 23.1	0.25
P value (Week 12 vs. Baseline)	0.22	0.61	
Lipids (% energy)			
Baseline	33.1 ± 3.8	34.2 ± 5.2	-
Week 12	34.2 ± 3.5	34.3 ± 3.7	0.28
P value (Week 12 vs. Baseline)	0.35	0.92	

Table 10. Body weight and BMI after chocolate consumption for 12 weeks

		Low-flavanol Chocolate (n=20)	High-flavanol Chocolate (n=22)	<i>P</i> value of change between treatments
Weight (kg)	Baseline	64.1 ± 7.5	66.6 ± 6.5	-
	Week 12	70.2 ± 8.2	72.9 ± 7.2	0.74
	<i>P</i> value (Week 12 vs. Baseline)	<0.0001	<0.0001	
BMI (kg/m²)	Baseline	23.3 ± 2.6	24.9 ± 2.6	-
	Week 12	25.5 ± 2.9	27.2 ± 2.8	0.58
	<i>P</i> value (Week 12 vs. Baseline)	<0.0001	<0.0001	

Figure 1. Flow diagram of study participants



*The participant withdrew voluntarily from the study without giving a reason, but accepted to return at week 12

Annexe A. Déroulement de l'étude

Méthodologie: déroulement de l'étude

