

Filière Technologies du vivant

Orientation Technologie alimentaire

Diplôme 2007

Nathalie Thurre

*Influence de la variété de fraise
et de la période de récolte
sur les contenus en antioxydants
et en anthocyanes
ainsi que sur la répartition de l'acide ellagique
dans le fruit, les akènes, les feuilles et le rhizome*

Professeur Wilfried Andlauer

Expert Christoph Carlen

SI	TV	EE	IG	EST
X	X	X	X	

Filière / Studiengang : Life Technologies

Confidentiel / Vertraulich

Etudiant / Student Nathalie Thurre	Année scolaire / Schuljahr 2006/07	No TD / Nr. DA TV/2007/56
Proposé par / vorgeschlagen von Agroscope ACW Conthey Christoph Carlen Christoph.carlen@acw.admin.ch		Lieu d'exécution / Ausführungsort Expert / Experte Christoph Carlen


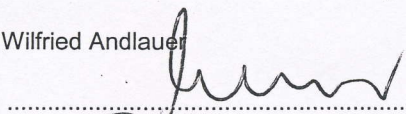
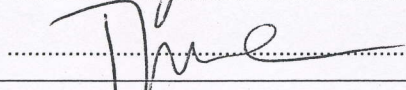
Titre / Titel:
Einfluss der Erdbeersorte, des Reifestadiums und der Ernteperiode auf den Gehalt an Antioxidantien und Anthocyane sowie auf die Verteilung der Ellagsäure (Nüsschen, Fruchtfleisch, Blatt, Rhizom)

Description / Beschreibung:

Der Einfluss folgender Faktoren auf die Verteilung der Anthocyane und der Ellagsäure in Erdbeeren (Frucht, Nüsschen, Rhizome) soll untersucht werden:
1. Sorte
2. Ernteperiode

Objectifs / Ziele:

— Untersuchung der während des Jahres geernteten und tiefgefrorenen Erdbeeren, Blätter und Rhizome auf die ausgewählten Qualitätsparameter (analog der TS).
— Bestimmung der Verteilung der Anthocyane und der Ellagsäure in Frucht, Nüsschen, Blatt und Rhizom der Erdbeeren.

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum Leiter Vertiefungsrichtung Lebensmitteltechnologie  Professeur/Dozent: Wilfried Andlauer  Etudiant/Student: 	Délais / Termine Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags: 03.09.2007 Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts: 23.11.2007 — 12.00 Uhr Exposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten: 30.11.2007 Défenses orales / Mündliche Verfechtungen Woche 49
--	--

Influence de la variété de fraise et de la période de récolte sur les contenus en antioxydants et en anthocyanes ainsi que sur la répartition de l'acide ellagique dans le fruit, les akènes, les feuilles et le rhizome

Einfluss der Erdbeersorte und des Erntedatums auf den Gehalt an Antioxidantien und Anthocyanen sowie auf die Verteilung der Ellagsäure in den Fruchtfleisch, Nüsschen, Blätter und Rhizom

Objectifs

L'objectif de ce travail est de déterminer l'influence de la variété de fraise et de la date de récolte sur les teneurs en sucres, en acidité, en phénols totaux, en anthocyanes totaux et en acide ellagique ainsi que sur l'activité antioxydante de différentes parties du fraisier (chair, akènes, feuilles et rhizome).

Résultats

La variété influence significativement les taux de sucres et d'acidité, tout comme la plupart des composés recherchés. La date de récolte, observée uniquement sur la chair et les akènes, influence également les taux de sucres et d'acidité. Les teneurs en phénols totaux de la chair et des akènes augmentent en l'espace de 7 jours, tout comme l'activité antioxydante et les anthocyanes des akènes. Par contre, l'acide ellagique et les anthocyanes de la chair diminuent. Sur base de la masse sèche, les feuilles contiennent le plus de phénols, l'activité antioxydante la plus haute ainsi qu'une concentration en acide ellagique élevée. Elles ont par contre la teneur en anthocyanes la plus faible. Les rhizomes ont un contenu en anthocyanes et en acide ellagique bas mais un contenu en phénols élevé. Leur activité antioxydante est du même ordre de grandeur que celle des akènes. La chair quant à elle possède l'activité antioxydante et les taux de phénols totaux les plus faibles.

Mots-clés

fraise, chair, akènes, rhizome, phénols, anthocyanes, activité antioxydante, DPPH, acide ellagique, HPLC, ASE

Ziele

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Bestimmung des Einflusses der Erdbeersorte und des Erntedatums auf den Zucker-, Säure-, Phenol-, Anthocyan- und Ellagsäuregehalt sowie auf die antioxidative Kapazität von verschiedenen Teilen der Erdbeerpflanze (Fruchtfleisch, Nüsschen, Blätter und Rhizom).

Resultate

Die Erdbeersorte und das Erntedatum stark beeinflussen den Zucker- und den Säuregehalt, sowie den Großteil der Substanzen. Das Erntedatum, das nur bei dem Fruchtfleisch und den Nüsschen beobachtet wird, auch den Zucker- und den Säuregehalt beeinflusst. Phenolgehalt von dem Fruchtfleisch und den Nüsschen steigen im Laufe von 7 Tagen, sowie die antioxidative Kapazität und die Anthocyane von den Nüsschen. Hingegen verkleinern sich die Ellagsäure und die Anthocyane von dem Fruchtfleisch. Blätter enthalten die meisten Phenole, die höchste antioxidative Kapazität und eine hohe Ellagsäurekonzentration. Sie haben den niedrigsten Anthocyanengehalt. Rhizome haben einen niedrigen Anthocyan- und Ellagsäuregehalt, aber sie besitzen einen hohen Phenolgehalt. Ihre antioxidative Kapazität ist die gleiche als die antioxidative Kapazität von den Nüsschen. Das Fruchtfleisch hat die niedrige antioxidative Kapazität und den niedrigen Phenolgehalt.

Schlüsselwörter

Erdbeer, Fruchtfleisch, Nüsschen, Rhizom, Phenole, Anthocyane, Antioxidative Kapazität, DPPH, Ellagsäure, HPLC, ASE

Table des matières

1. Introduction	4
2. Partie théorique.....	4
2.1. Les composés phénoliques.....	4
2.2. Les anthocyanes	5
2.3. L'acide ellagique.....	5
2.4. L'activité antioxydante	6
3. Matériel.....	7
3.1. Supports végétaux	7
3.2. Produits chimiques	7
3.3. Equipement	8
4. Méthodes	9
4.1. Préparation des échantillons	9
4.2. Extraction des échantillons.....	9
4.3. Détermination de la teneur en eau résiduelle.....	10
4.4. Détermination de la matière sèche des extraits	10
4.5. Dosage de l'acidité totale titrable	10
4.6. Dosage des sucres.....	10
4.7. Dosage des phénols totaux.....	11
4.8. Mesure de l'activité antioxydante	11
4.9. Dosage des anthocyanes totaux	12
4.10. Dosage de l'acide ellagique	13
4.11. Analyse des anthocyanes	13
4.12. Analyse statistique	13
5. Résultats et discussion	14
5.1. Détermination de la teneur en eau résiduelle.....	14
5.2. Détermination de la matière sèche des extraits	14
5.3. Détermination du pourcentage d'akènes.....	15
5.4. Extraction des échantillons.....	16
5.4.1. Extraction des akènes	16

5.4.2. Extraction des feuilles et des rhizomes par solvant accéléré.....	16
5.5. Dosage de l'acidité et des sucres.....	17
5.5.1. Influence de la date de récolte et de la variété.....	17
5.6. Dosage des phénols totaux.....	18
5.6.1. Influence de la date de récolte et de la variété.....	18
5.7. Dosage des anthocyanes totaux.....	20
5.7.1. Influence de la date de récolte et de la variété.....	20
5.8. Détermination qualitative des anthocyanes.....	21
5.9. Dosage de l'acide ellagique.....	23
5.9.1. Influence de la date de récolte et de la variété.....	23
5.10. Mesure de l'activité antioxydante.....	24
5.10.1. Influence de la date de récolte et de la variété.....	24
5.11. Corrélation entre l'activité antioxydante et les phénols totaux.....	26
5.12. Différences selon les parties du fraisier.....	26
5.13. Détermination de la teneur en phénols totaux de la plante sèche.....	30
5.14. Contribution des akènes.....	31
6. Conclusion et perspectives.....	32
7. Remerciements.....	33
8. Bibliographie.....	34
9. Annexes.....	40

Abréviations

MeOH	Méthanol
ASE	Extraction par solvant accéléré
DW	Masse sèche (<i>Dry Weight</i>)
AC	Acide citrique
PS	Plante sèche
GAE	Equivalent d'acide gallique
MSDA	Manuel Suisse des Denrées Alimentaires
Pg-3-glu	Pelargonidine-3-glucoside
Pg-3-mal-glu	Pelargonidine-3-malonylglucoside
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
MS	Spectromètre de masse
DAD	Détecteur à barrette de diodes (<i>Diode Array Detector</i>)
CCM	Chromatographie sur couche mince
t_r	Temps de rétention
DPPH	Diphényl-2,2-pycryl-1-hydrazyle
API	Ionisation à pression atmosphérique
ES	Electrospray

1. Introduction

Plusieurs études ont observé qu'une consommation élevée de fruits et de légumes diminue le risque de maladies cardiovasculaires [1 – 3], de certains cancers [4, 5] et de quelques maladies chroniques [6, 7]. Quelques hypothèses ont été avancées pour expliquer l'effet protecteur qu'ils exerceraient. L'une d'elle concerne la présence de composés phénoliques. Ces substances, présentes dans les aliments d'origine végétale, seraient capables de prévenir certaines maladies grâce à leur pouvoir antioxydant [8].

De nombreuses études ont été menées sur les composés phénoliques contenus dans la chair des fraises mais peu de recherches ont cependant été entreprises sur le contenu de ces composés dans d'autres parties du fraisier comme les akènes, les feuilles ou les rhizomes. Ce travail a comme objectif d'évaluer l'activité antioxydante ainsi que la quantité de phénols totaux, d'anthocyanes totaux et d'acide ellagique contenus dans la chair, les akènes, les feuilles et les rhizomes des fraisiers.

2. Partie théorique

2.1. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques, aussi appelés polyphénols, sont des substances qui se trouvent dans tous les végétaux et plus particulièrement dans les fruits, les légumes, les céréales et les noix, tout comme dans les produits de plantes comme le vin, la bière et le cacao [9].

Il existe dans les végétaux des milliers de composés phénoliques différents [10]. La classe des flavonoïdes représente la plus grande partie des ces composés (2/3), le reste (1/3) étant représenté par les acides phénoliques comme l'acide ellagique ou l'acide gallique [11].

Les flavonoïdes sont divisés en plusieurs groupes dont les plus importants sont les anthocyanes, les flavonols, les flavones et les flavanones. Dans les fraises, les groupes les plus abondants sont les anthocyanes et les flavonols (catéchines, quercétines et kaempferols).

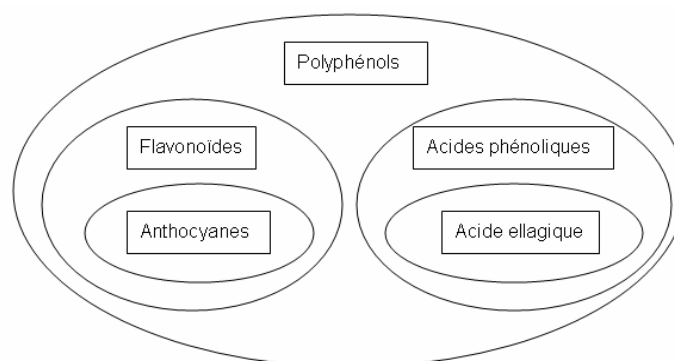


Figure 1 : Principales classes et sous-classes des polyphénols

2.2. Les anthocyanes

Les anthocyanes (du grec *anthos* signifiant fleur et *kyanos* signifiant bleu) sont des pigments naturels qui participent à la coloration de certaines parties de plantes (fleurs, fruits, tiges ou graines) en bleu, rouge, mauve, violet ou rose [12]. La différence de couleur entre les fruits dépend de la nature et de la concentration de ces pigments [13]. Ce sont des dérivés glycosylés d'anthocyanidines qui ont la structure chimique de la figure 2.

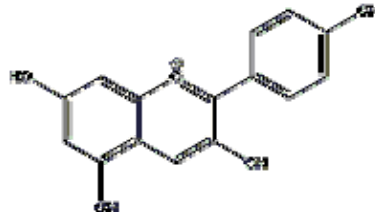


Figure 2 : Structure chimique des anthocyanidines [14]

La structure des anthocyanes, et donc leur couleur aussi, varie avec le pH. A un pH inférieur à 2, ils sont rouges. Lorsque le pH augmente, ils deviennent bleus puis finalement incolores [15]. Les changements de structure qui ont lieu chez les anthocyanes lors d'un changement de pH sont montrés dans la figure 3 :

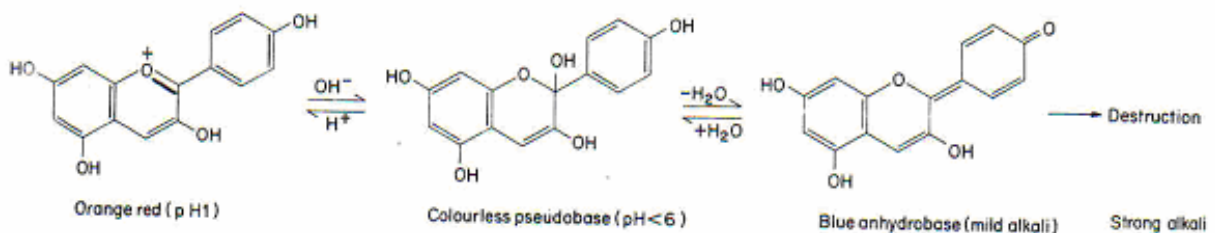


Figure 3 : Changement de structure des anthocyanes selon le pH [13]

Près de 70 anthocyanes différents ont été identifiés dans les fruits [16]. Les anthocyanes les plus courants se trouvant dans les fraises sont le cyanidine 3-glucoside et le pelargonidine 3-glucoside [17 – 19]. Leurs structures sont reprises dans la figure 4 :

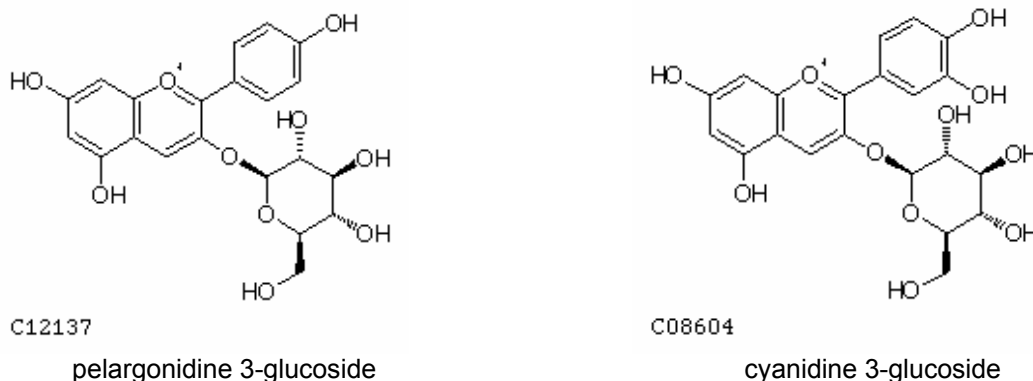


Figure 4 : Structures chimiques du pelargonidine 3-glucoside et du cyanidine 3-glucoside [20]

2.3. L'acide ellagique

En plus des anthocyanes et de leurs nutriments habituels comme les vitamines et les

minéraux, les fraises sont extrêmement riches en acides phénoliques tel que l'acide ellagique. Cet acide est même le principal acide phénolique rencontré chez la fraise [21]. Sa structure chimique est montrée dans la figure 5.

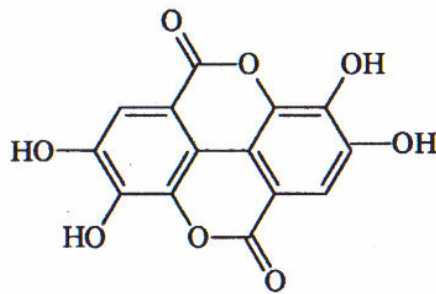


Figure 5 : Structure chimique de l'acide ellagique [9]

2.4. L'activité antioxydante

L'organisme génère en permanence des radicaux libres, qui sont des dérivés du fonctionnement normal du corps mais qui sont aussi produits en plus grand nombre lorsque le corps est agressé (cigarette, pollution, infections, etc.). A cause de leur réactivité (ils possèdent un ou plusieurs électrons libres), les radicaux libres endommagent les cellules en les oxydant (stress oxydatif). Les antioxydants sont des composés réducteurs capables de piéger ces radicaux libres et ainsi d'aider le corps à prévenir l'oxydation.

Bien que le corps soit capable de produire ses propres antioxydants, ils ne suffisent souvent pas à neutraliser toute la quantité de radicaux libres. Il faut donc que les antioxydants proviennent de l'alimentation. De nombreux aliments comme les fruits et les légumes comportent de grandes quantités d'antioxydants.

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les polyphénols. Ces derniers, notamment les flavonoïdes, grâce à leur capacité antioxydante, interviendraient comme agents préventifs contre de nombreuses maladies [20, 22], tout comme les acides phénoliques [23 - 25].

3. Matériel

3.1. Supports végétaux

Les fraises analysées proviennent des trois variétés suivantes : Clery, Sonata et Thutop; elles ont été fournies par l'Agroscope RAC Changins, Centre d'arboriculture et d'horticulture des Fougères à Conthey. La récolte a été réalisée en deux passages durant lesquels seules des fraises mûres et intactes ont été sélectionnées. Le premier passage a été effectué le 14 mai 2007 et le deuxième 7 jours plus tard, soit le 21 mai 2007. Les fraises ont été conservées à -18 °C. Elles ont été partiellement décongelées 3 heures à température ambiante avant chaque analyse.

Les feuilles ainsi que les rhizomes analysés proviennent des fraisiers des trois mêmes variétés. Ils ont été récoltés le 21 mai 2007 puis directement congelés à -18 °C.

3.2. Produits chimiques

Les produits chimiques et les réactifs utilisés lors des différentes analyses sont repris dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Produits chimiques et réactifs utilisés lors des analyses

Produit	Formule	Fabricant	Lot
Hydroxyde de sodium 0.1 M	NaOH	Panreac Quimica	58544 DEN
Méthanol	CH ₃ OH	Pharmacochimie	PT 4600.251
Ethanol	C ₂ H ₅ OH	Pharmacochimie	06-1088
Acide chlorhydrique 37%	HCl	Pharmacochimie	CAS 7647-01-0
Chlorure de potassium	KCl	Merck	104934
Acétate de sodium anhydre	CH ₃ CO ₂ Na	Fluka	71180
Carbonate de sodium monohydraté	Na ₂ CO ₃ · H ₂ O	Ridel-de Haën	13568
Réactif de Folin-Ciocalteu	-	Fluka	47641
Acide gallique	C ₇ H ₆ O ₅	Merck	K18362930
2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl (DPPH)	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	Sigma	083K0830
Trolox 97%	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	Acros Organics	218940050
Acide ellagique	C ₁₄ H ₆ O ₈	Fluka	1064219
Acétonitrile 1 % HPLC-S gradient grade	CH ₃ N	Lab-Scan	C73C11X
Acide formique 98%	CH ₂ O ₂	Fluka	06440/455768/1

3.3. Equipement

- Broyeur Retsch ZM 100 avec tamis annulaire de diamètre 1.0 mm, Allemagne
- Emballeuse sous vide VC 999/09 THDKN, Inauen Maschinen AG, Suisse
- Sacs transparents pour mettre sous vide en Polyacrylate/Polyéthylène 20/70, Inauen Maschinen AG, Suisse
- Extracteur par solvant accéléré (ASE), Dionex 2000, Etats-Unis
- Filtres en cellulose pour cellules d'extraction D28, taille 19.8 mm, Whatman S&S, Angleterre
- Etuve Salvis, Renggli, Suisse, munie d'une pompe à vide MD 4C, VDC Verrerie de Carouge, Suisse
- Titreur potentiométrique Titrand 835, Metrohm, Suisse, couplé au logiciel informatique tiamo™ 1.1
- Réfractomètre digital PR-1, Atago, Japon
- Mixer alimentaire Trisa Electro, Type 6603, Suisse
- Centrifugeuse Suprafuge 22, Heraeus Sepatech, Allemagne
- Balance PM3000, Mettler, Suisse, précision : ± 0.1 g
- Balance AE240, Mettler, Suisse, précision : ± 0.0001 g
- Spectrophotomètre UV-vis Libra S6, Biochrom, Royaume-Uni
- Bain-marie UC-5B/5, Julabo Labortechnik, Allemagne
- HPLC-UV Agilent Series 1200, Hewlett Packard, Etats-Unis
- Détecteur à barrettes de diodes (DAD) Agilent Series 6890, Hewlett Packard, Etats-Unis
- Spectromètre de masse Agilent Series 1100 MSD, Hewlett Packard, Etats-Unis
- Colonne CC 250-4 Nucleosil 100-5 C18, Macherey-Nagel, Allemagne
- Seringues stériles sans latex à usage unique, CE 0543, Codan Medical APS, Danemark
- Filtres à membrane 0.45 μ m, Acrodisc Syringe, Pall, Etats-Unis
- Filtres plissés Ø 100 mm, LS 14 1/2, Schleicher & Schuell, Suisse
- Pilon et mortier en porcelaine, Haldenwanger, Allemagne

4. Méthodes

4.1. Préparation des échantillons

Les fraises ont été partiellement décongelées 3 heures à température ambiante avant d'être homogénéisées à l'aide d'un mixer alimentaire.

Les akènes ont été séparés de la chair des fraises de deux manières différentes. Pour la détermination du pourcentage d'akènes, ces derniers ont été retirés d'un fruit congelé à l'aide d'une pince à épiler. Dans les autres cas, ils ont été séparés de la chair homogénéisée selon la méthode de AABI, SKREDE et WROLSTAD [26]. Les fruits ont été passés à travers un tamis à mailles fines. Les akènes ont ensuite été récoltés puis rincés plusieurs fois avec de l'eau froide.

Les feuilles et les rhizomes ont été séchés à 40 °C pendant 3 jours. L'écorce des rhizomes a été retirée puis les rhizomes ont été précoupés à l'aide d'un sécateur. Les feuilles et les rhizomes ont ensuite été broyés avec un tamis annulaire de 1.0 mm. Le broyat a été conservé dans des sacs en plastique mis sous vide et à l'abri de la lumière afin de limiter son oxydation.

4.2. Extraction des échantillons

L'extraction de la chair des fraises a été faite selon la méthode modifiée de GAO et MAZZA [27]. 30 g de fraises homogénéisées ont été mélangés à 50 ml d'une solution de MeOH/H₂O (72/28, v/v). Le tout a été agité pendant quelques minutes puis centrifugé pendant 15 min à 4500 rpm. Le surnageant a finalement été filtré à travers un filtre plissé.

L'extraction des akènes a été faite selon la méthode modifiée de CHEEL, THEODULOZ *et al.* [28]. 0.01 g d'akènes ont été broyés à l'aide d'un pilon et d'un mortier puis mélangés à 2 ml d'une solution de MeOH/HCl (99/1, v/v). Le tout a été passé au bain à ultrasons pendant 5 min. Le surnageant a finalement été filtré à travers un filtre plissé.

Les feuilles et les rhizomes ont subi une extraction par solvant accéléré (ASE). Environ exactement 5 g de rhizomes broyés et 5 g de terre diatomée (3 g de feuilles broyées et 7 g de terre diatomée) ont été pesés et homogénéisés avant leur introduction dans la cellule d'extraction. Un épuisement (3 passages successifs dans la cellule) de chaque échantillon a été effectué avec un solvant contenant 30 % d'éthanol et une température de 40 °C.

Tableau 2 : Paramètres appliqués lors de l'extraction par solvant accéléré

Paramètres	
Température	40 °C
Pression	100 bar
Préchauffage	0 min
Chauffage	5 min
Extraction statique	10 min
Flush volume	60 %
Purge	60 s

4.3. Détermination de la teneur en eau résiduelle

Plus ou moins exactement 2 g de fraises homogénéisées ont été pesés dans une capsule en nickel contenant environ 10 g de quartz à grains fins. Le tout a été mis à l'étuve à 105 °C pendant 3 heures. Les échantillons ont ensuite été refroidis dans un dessiccateur puis pesés jusqu'à poids constant.

Plus ou moins exactement 1 g d'akènes broyés à l'aide d'un pilon et d'un mortier ont été pesés dans un cristalliseur taré puis mis à l'étuve à 105 °C pendant 16 heures. Les échantillons ont ensuite été refroidis dans un dessiccateur puis pesés jusqu'à poids constant.

Plus ou moins exactement 2 g de feuilles ou de rhizomes séchés et broyés ont été pesés dans un cristalliseur taré puis mis à l'étuve à 105 °C pendant 16 heures. Les échantillons ont ensuite été refroidis dans un dessiccateur puis pesés jusqu'à poids constant.

4.4. Détermination de la matière sèche des extraits

Un volume de 5 ml d'extrait de feuilles ou de rhizomes a été pesé dans un petit cristalliseur taré, puis mis à l'étuve sous vide à 105 °C pendant 3 heures. Les échantillons ont ensuite été refroidis dans un dessiccateur puis pesés jusqu'à poids constant.

4.5. Dosage de l'acidité totale titrable

Le dosage de l'acidité de la chair des fraises (acidité totale titrable) a été fait par titrimétrie selon les méthodes tirées du Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (MSDA) concernant les deux chapitres suivants : Jus de fruits et de légumes, boissons de table [29] et Vins issus de raisin [30].

10 g de fraises homogénéisées ont été mélangés avec de l'eau déminéralisée dans un becher de 50 ml dans un rapport 1 : 1 (m/v). Le titrage à température ambiante a été effectué sous agitation avec une solution d'hydroxyde de sodium 0.1 M jusqu'à un pH de 8.1.

La teneur en acidité totale titrable est donnée en g d'acide citrique (AC) /100 g fruits ; elle est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Acidité totale titrable [g AC /100 g fruits]} = K \cdot a \cdot f$$

où K = facteur de conversion pour le passage en acide citrique [-]
a = quantité de solution d'hydroxyde de sodium 0.1 M utilisée [ml]
f = facteur de la solution d'hydroxyde de sodium 0.1 M [-]

Le facteur de conversion utilisé pour le passage en acide citrique est de 0.64 [29].

4.6. Dosage des sucres

La teneur en sucres des fraises homogénéisées a été évaluée à l'aide d'un réfractomètre. Le résultat est exprimé en % Brix.

4.7. Dosage des phénols totaux

Le contenu en phénols totaux a été déterminé avec le réactif de Folin-Ciocalteu par spectrophotométrie selon la méthode de SIRIWOHARN, WROLSTAD *et al.* [31] en utilisant l'acide gallique comme standard.

Une série de tubes à essai ont été remplis avec 7.5 ml d'eau déminéralisée et 0.5 ml de réactif de Folin-Ciocalteu. Respectivement 0.5 ml d'échantillon (dilué avec de l'eau déminéralisée au besoin), 0.5 ml d'une solution (10/25/50/100/200 ppm) d'acide gallique (standards) et 0.5 ml d'eau déminéralisée (blanc) ont été ajoutés dans chaque tube. Les solutions ont été mélangées à l'aide d'un vortex puis laissées pendant 10 min à température ambiante. 3 ml d'une solution de carbonate de sodium à 20% ont été ajoutés dans chaque tube à essai. Ces derniers ont ensuite été mélangés, déposés dans un bain-marie à 40 °C pendant 20 min puis refroidis directement dans un bain de glace pendant 3 min.

L'absorbance des échantillons et des standards a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV à 755 nm.

La teneur en phénols totaux est donnée en mg d'équivalent d'acide gallique (GAE)/g masse sèche (DW : *dry weight*) ; elle a été déduite de la courbe de calibration (Annexe 1) provenant de la régression linéaire des valeurs obtenues pour les solutions standard et d'après la formule suivante :

$$\text{Phénols totaux [mg GAE /g DW]} = \frac{(A_{Ech} - b) \cdot V \cdot F}{a \cdot Q}$$

- où
- A_{Ech} = absorbance de l'échantillon à 755 nm [-]
 - b = ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage [-]
 - a = pente de la courbe d'étalonnage [-]
 - V = volume de l'extrait [l]
 - F = facteur de dilution [-]
 - Q = quantité de chair homogénéisée, d'akènes, de feuilles ou de rhizomes broyés [g]

4.8. Mesure de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante a été déterminée par spectrophotométrie selon la méthode de BRAND-WILLIAMS *et al.* [32] en utilisant le 2,2-diphény-1-ptycrylhydrazyle (DPPH) comme radical libre.

Une solution de DPPH 0.1 mM ainsi que des solutions standard de Trolox ont été préparées à différentes concentrations (1/1.5/2/3/4 mM) dans du méthanol. 0.1 ml des solutions Trolox/MeOH ont été mélangés à 10 ml de la solution de DPPH/MeOH puis l'absorbance de ces solutions a été mesurée après 30 minutes à 517 nm. 0.1 ml de l'extrait ont été mélangés à 10 ml de la solution de DPPH/MeOH puis l'absorbance de cette solution a été mesurée après 30 minutes à 517 nm.

L'activité antioxydante est donnée en mmol d'équivalent Trolox (TE)/g de masse sèche (DW) ; elle a été déduite de la courbe de calibration provenant de la régression linéaire des valeurs obtenues pour les solutions standard de Trolox (Annexe 1) et d'après la formule suivante :

$$\text{Activité antioxydante [mmol TE /g DW]} = \frac{(A_{Ech} - b) \cdot V}{a \cdot Q}$$

- où A_{Ech} = absorbance de l'échantillon [-]
 b = ordonnée à l'origine de la courbe d'étalonnage [-]
 a = pente de la courbe d'étalonnage [-]
 V = volume de l'extrait [l]
 Q = quantité de chair homogénéisée, d'akènes, de feuilles ou de rhizomes broyés [g]

4.9. Dosage des anthocyanes totaux

Les anthocyanes totaux ont été définis selon la méthode différentielle de pH de GIUSTI et WROLSTAD [33] grâce au fait que la structure des anthocyanes subit une transformation réversible lors d'un changement de pH qui se manifeste par des spectres d'absorption différents.

Les extraits ont été dilués 10 fois dans deux solutions tampon : une solution de chlorure de potassium 0.025 M à pH 1.0 et une solution d'acétate de sodium 0.4 M à pH 4.5. Après 15 min d'incubation à température ambiante, l'absorption des deux extraits a été mesurée à 496 et 700 nm.

La teneur en anthocyanes totaux est donnée en mg de pelargonidine-3-glucoside (Pg-3-glu)/g masse sèche (DW); elle a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Anthocyanes totaux [mg Pg-3-glu/g DW]} = \frac{A \cdot M \cdot F \cdot V \cdot 1000}{\varepsilon \cdot d \cdot Q}$$

- où A = absorbance [-] $\rightarrow A = (A_{\lambda 496} - A_{700nm})_{pH\ 1.0} - (A_{\lambda 496} - A_{700nm})_{pH\ 4.5}$
 M = masse molaire de l'anthocyane prédominant dans l'échantillon [g/mol]
 F = facteur de dilution [-]
 V = volume de l'extrait [l]
 ε = coefficient d'absorption molaire de l'anthocyane prédominant dans l'échantillon [L/cm·mol]
 d = largeur de la cuvette [cm]
 Q = quantité de chair homogénéisée, d'akènes, de feuilles ou de rhizomes broyés [g]

Le coefficient d'absorption molaire appliqué est égal à 15'600 L/cm·mol [33] et le poids moléculaire équivaut à 433.2 g/mol pour le pelargonidine-3-glucoside [34].

4.10. Dosage de l'acide ellagique

L'acide ellagique a été dosé par HPLC-DAD. Les échantillons ont été dilués selon la nécessité (10 ou 20 fois) avec de l'eau déminéralisée; ils ont ensuite été analysés à 260 nm. Une calibration avec l'acide ellagique a été effectuée pour la quantification (Annexe 1). Les détails de la méthode d'analyse sont les suivants :

HPLC-DAD :

- Colonne CC 250-4 Nucleosil 100-5 C18, Macherey-Nagel, Allemagne
- Phase mobile : acétonitrile, acide formique 1 % et eau (tableau 3)
- Débit : 0.8 ml/min
- Température : 45 °C
- Pression maximale : 300 bar
- Détecteur UV : 260 nm
- Volume d'injection : 20 µl
- Temps d'analyse : 40 min

Tableau 3 : Gradient de solvant utilisé pour la méthode par HPLC-DAD et par HPLC-MS

Temps (min)	Acétonitrile [%]	Acide formique 1 % [%]	Eau [%]
0	10	10	80
10	18	10	72
28	23	10	67
35	90	10	-
40	90	10	-

4.11. Analyse des anthocyanes

L'identification des anthocyanes a été rendue possible par une analyse MS. Les échantillons dilués selon la nécessité (10 ou 20 fois) ont été analysés à une longueur d'onde de 518 nm et avec une ionisation positive. Les autres paramètres restent identiques à ceux présentés au point 4.10.

MS mode positif :

- Ionisation : API-ES
- Polarité : positive
- Mode : Scan
- Fragmenteur : 80
- Domaine de masse : 100-1400

4.12. Analyse statistique

Les résultats obtenus ont été traités statistiquement. Le test de Student (test t) a été utilisé lorsque les différences étaient significatives [35]. La plupart des analyses ont été effectuées à triple (n =3).

5. Résultats et discussion

5.1. Détermination de la teneur en eau résiduelle

La teneur en eau résiduelle des différentes parties du fraisier des variétés Clery, Thutop et Sonata a été définie dans le but de rapporter les résultats en fonction de la masse sèche (DW : *dry weight*) et d'ainsi rendre la comparaison des résultats plus aisée (Annexe 2). Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Moyennes et écart-types des teneurs en eau résiduelle des différentes parties des fraisiers des variétés Clery, Thutop et Sonata récoltées le 21.05.07 (n=3)

Variété	Teneur en eau résiduelle [%]			
	Chair	Akènes	Feuilles	Rhizomes
Clery	89.2 ± 0.1	18.4 ± 0.8	10.5 ± 0.9	10.0 ± 0.6
Thutop	89.4 ± 0.1	18.0 ± 0.8	10.2 ± 0.9	9.3 ± 0.5
Sonata	87.9 ± 0.1	18.3 ± 0.6	10.4 ± 1.0	6.6 ± 0.2

Les résultats concernant la teneur en eau résiduelle des feuilles et des akènes sont du même ordre de grandeur pour les trois variétés, que cela soit au niveau des moyennes ou des écarts-types. La teneur en eau de la chair des fraises est inférieure à 90 %. Il est à relever que la chair appartenant à la variété Sonata a une teneur en eau un peu plus faible que les deux autres, d'environ 1.5 %. En ce qui concerne les rhizomes, Sonata possède une teneur en eau plus faible que les autres variétés, de l'ordre de 3-4 %.

5.2. Détermination de la matière sèche des extraits

La teneur en matière sèche des extraits de feuilles et de rhizomes a été déterminée (Annexe 3). Les moyennes ainsi que les écart-types des trois essais figurent dans le tableau 5.

Tableau 5 : Moyennes et écart-types des teneurs en matière sèche des extraits de feuilles et de rhizomes des variétés Clery, Thutop et Sonata récoltées le 21.05.07 (n=3)

Variété	Matière sèche des extraits [%]	
	Feuilles	Rhizomes
Clery	2.72 ± 0.02	2.67 ± 0.06
Thutop	2.58 ± 0.04	2.82 ± 0.01
Sonata	2.50 ± 0.05	2.72 ± 0.03

Connaissant les masses de feuilles et de rhizomes broyés introduites dans les cellules d'extraction ainsi que celle des extraits liquides obtenus à la fin de l'extraction, il est possible de rapporter la teneur en matière sèche aux feuilles et aux rhizomes (tableau 6) (Annexe 4).

Tableau 6 : Moyennes et écart-types des teneurs en matière sèche des feuilles et des rhizomes des variétés Clery, Thutop et Sonata récoltées le 21.05.07 (n=3)

Variété	Matière sèche [%]	
	Feuilles	Rhizomes
Clery	30.0 ± 0.3	18.7 ± 0.2
Thutop	29.1 ± 0.4	20.4 ± 0.1
Sonata	31.1 ± 0.4	18.4 ± 0.2

Par conséquent, pour 100 g de feuilles, on obtient pour les variétés Clery, Thutop et Sonata, respectivement 30, 29 et 31 g de matière sèche dans laquelle se trouvent les composés recherchés. Les résultats concernant les feuilles sont donc du même ordre de grandeur, que cela soit au niveau des moyennes ou des écarts-types. Pour 100 g de rhizomes, on obtient respectivement 19, 20 et 18 g de matière sèche dans laquelle se trouvent les composés recherchés. Ici encore les moyennes et les écarts-types sont du même ordre de grandeur.

5.3. Détermination du pourcentage d'akènes

La fraction des akènes ne constituant qu'une faible proportion du fruit entier, il s'avère intéressant d'établir le pourcentage d'akènes dans le fruit frais afin de pouvoir déterminer la réelle contribution des akènes dans les différents composés recherchés (Annexe 5). Les résultats se situent dans le tableau 7.

Tableau 7 : Pourcentage moyen d'akènes (par rapport au poids total) des variétés Clery, Thutop et Sonata récoltées le 21.05.07 (n=3)

Variété	Partie du fruit	Pourcentage du fruit frais [%]
Clery	Chair	99.0
	Akènes	1.0
Thutop	Chair	98.4
	Akènes	1.6
Sonata	Chair	98.9
	Akènes	1.1

Les pourcentages d'akènes sont du même ordre de grandeur pour les trois variétés. Ils se situent entre 98 et 99 % et correspondent ainsi aux valeurs citées dans la littérature [26, 36].

5.4. Extraction des échantillons

5.4.1. Extraction des akènes

La méthode d'extraction des akènes a été améliorée par rapport à celle utilisée lors du travail de semestre [37]. Afin de permettre une meilleure libération des composés, les akènes ont d'abord été broyés puis le mélange constitué des akènes broyés et du liquide d'extraction a été passé au bain à ultrasons pendant quelques minutes avant filtration.

5.4.2. Extraction des feuilles et des rhizomes par solvant accéléré

Les échantillons de feuilles et de rhizomes ont d'abord été broyés afin d'augmenter la perméabilité des tissus et des cellules. Ils ont ensuite subi une extraction par solvant accéléré (épuisement). Le choix des différents paramètres d'application s'est fait selon les considérations suivantes : l'éthanol a été choisi comme solvant car il a la capacité d'augmenter la solubilité et la dissociation des constituants colloïdaux intracellulaires, ce qui permet d'accroître la pression dans la cellule et de provoquer son éclatement [38]. Compte tenu de la fragilité des composés phénoliques notamment, il est généralement recommandé de travailler sous atmosphère inerte [39]. Les extractions ont été effectuées sous une pression de 100 bar car cette dernière assure une meilleure pénétration du solvant dans la matrice, augmente la température d'ébullition des solvants ainsi que les rendements d'extraction. Pour terminer, les analyses ont été effectuées à une température de 40 °C ; il s'agit de la température habituellement utilisée lors des extractions de matières végétales. Il serait intéressant de poursuivre ce travail en recherchant les paramètres optimaux d'extraction tels que la teneur en éthanol, la température d'extraction ou la taille de la mouture. Il est déjà cependant possible de déterminer l'affinité des phénols totaux pour le solvant utilisé (éthanol 30 %).

En effet, l'épuisement total des feuilles ou des rhizomes peut être déterminé en considérant la diminution de la teneur en phénols totaux lors des triples passages successifs (épuisement) du solvant dans la cellule d'extraction de l'ASE (Annexes 6 et 7). Les taux de recouvrement des extractions obtenus pour les phénols totaux se trouvent dans les tableaux 8 et 9.

Tableau 8 : Taux de recouvrement des extractions effectuées pour les feuilles des variétés Clery, Thutop et Sonata récoltées le 21.05.07

Variété	Taux de recouvrement [%]	
	Après une extraction	Après trois extractions
Clery	84.9	99.2
Thutop	88.4	99.5
Sonata	88.2	99.6

Tableau 9 : Taux de recouvrement des extractions effectuées pour les rhizomes des variétés Clery, Thutop et Sonata récoltées le 21.05.07

Variété	Taux de recouvrement [%]	
	Après une extraction	Après trois extractions
Clery	79.8	98.7
Thutop	78.9	98.9
Sonata	79.6	98.5

Les taux de recouvrement après trois extractions pour les feuilles et les rhizomes démontrent une bonne affinité des phénols pour le solvant utilisé, surtout concernant les feuilles. Il est à noter que les substances contenues dans les feuilles sont extraites plus rapidement que celles se trouvant dans les rhizomes. Les rhizomes comportant notamment de la cellulose et des lipides, il est possible que ces molécules de grande taille rendent l'extraction difficile vu qu'il arrive parfois que ces substances obstruent les conduites de l'appareil et empêche ainsi l'extrait liquide d'atteindre le vial. Une alternative à ce problème serait de modifier le rapport rhizomes broyés/terre diatomée en augmentant la quantité de terre diatomée.

5.5. Dosage de l'acidité et des sucres

5.5.1. Influence de la date de récolte et de la variété

La qualité organoleptique des fraises est composée de divers éléments comme le parfum, le goût et la texture. Les paramètres qualitatifs analysés durant ce travail se sont rapportés au goût (sucres et acidité). Les résultats se trouvent dans le tableau 10 (Annexes 8 et 9).

Tableau 10 : Moyennes et écart-types des teneurs en acidité et en sucres des fraises des variétés Clery, Thutop et Sonata récoltées le 14.05.07 et le 21.05.07 (n=3). Des lettres différentes dans une même colonne indiquent des différences significatives ($p \leq 0.05$).

Variété	Acidité ¹ (g AC /100 g fruits)		Teneur en sucres (% Brix)	
	14.05.07	21.05.07	14.05.07	21.05.07
Clery	7.79 ± 0.04a	7.36 ± 0.05a	8.8 ± 0.1a	10.1 ± 0.1a
Thutop	8.70 ± 0.01b	8.14 ± 0.02b	9.7 ± 0.1b	12.0 ± 0.1b
Sonata	7.23 ± 0.03c	6.69 ± 0.03c	9.3 ± 0.1c	10.4 ± 0.1c

¹ Acidité exprimée en g d'acide citrique (AC) par 100 g de fruits

Les résultats des trois essais concernant l'acidité et le taux de sucres de chaque variété démontrent une bonne reproductibilité étant donné qu'un écart-type inférieur ou égal à 0.1 % est constaté entre les valeurs obtenues.

Des différences significatives peuvent être observées entre les variétés au niveau de l'acidité et du taux de sucres ($p \leq 0.05$). Les taux d'acidité obtenus sont compatibles avec les résultats donnés dans la littérature [40, 41]. Sonata est la fraise qui contient le moins d'acidité (7.0 g/100g de fruits), tandis que Thutop, avec une moyenne de 8.4 g/100g de fruits, est la variété la plus acide. Il est intéressant de relever que Thutop est aussi la fraise la plus sucrée (10.9 % Brix), quelle que soit la date de récolte. Il faut noter que, pris individuellement, le taux de sucres et la teneur en acidité ne constituent pas en eux-mêmes des indicateurs de qualité. Par contre, l'équilibre sucres/acidité est important ; il détermine le caractère doux, équilibré ou acidulé du fruit [42, 43].

Les taux de sucres et d'acidité sont aussi influencés par la date de récolte ($p \leq 0.05$). En effet, toutes les variétés de fraises récoltées lors du premier passage (14.05.07) sont moins

sucrées que celles cueillies le 21.05.2007. L'augmentation de la teneur en sucres des fruits au fur et à mesure des récoltes a déjà été observée par NAVATEL [44] ainsi que par CARLEN, POTELE *et al.* [45]. Elle est probablement liée au changement du rapport feuille/fruit. En effet, le nombre de feuilles par plante est relativement stable durant la période de récolte tandis que celui des fruits diminue à chaque récolte, ce qui entraîne par conséquent une augmentation de la teneur en sucres [46]. L'évolution de l'acidité suit quant à elle une tendance inverse à celle de la teneur en sucres. Les fraises récoltées le 14.05.07 sont en effet plus acides que celles cueillies le 21.05.07, quelle que soit aussi la variété.

5.6. Dosage des phénols totaux

5.6.1. Influence de la date de récolte et de la variété

Les phénols totaux des différentes parties du fraisier ont été mesurés par spectrophotométrie (Annexe 10). Étant donné que les feuilles et les rhizomes n'ont été prélevés qu'à la fin de la récolte, la teneur en phénols totaux de ces éléments n'a été déterminée que pour la date du 21.05.07. Les résultats sont repris dans le tableau 11.

Tableau 11 : Moyennes et écart-types des teneurs en phénols totaux des différentes parties du fraisier des variétés Clery, Thutop et Sonata selon la date de récolte. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois répétitions (n=3). Des lettres différentes dans une même colonne et entre variétés d'une même partie indiquent des différences significatives ($p \leq 0.05$).

Partie du fraisier	Variété	Phénols totaux ¹ [mg GAE/g DW]	
		14.05.07	21.05.07
Chair	Clery	14.07 ± 0.07a	15.44 ± 0.10a
	Thutop	13.62 ± 0.04b	16.56 ± 0.04b
	Sonata	12.96 ± 0.06c	14.99 ± 0.03c
Akènes	Clery	29.63 ± 0.11a	32.17 ± 0.05a
	Thutop	25.70 ± 0.11b	28.22 ± 0.09b
	Sonata	28.44 ± 0.09c	31.13 ± 0.12c
Feuilles	Clery	-	73.55 ± 0.06a
	Thutop	-	70.31 ± 0.09b
	Sonata	-	94.19 ± 0.06c
Rhizomes	Clery	-	58.82 ± 0.04a
	Thutop	-	51.39 ± 0.05b
	Sonata	-	60.89 ± 0.09c

¹ Phénols totaux exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique (GAE) par g de masse sèche (DW)

Les résultats des trois essais de chaque variété et de chaque date de récolte démontrent une bonne reproductibilité étant donné qu'un écart-type inférieur ou égal à 0.1 % est constaté entre les valeurs obtenues.

Des différences significatives peuvent être observées entre les variétés concernant toutes les parties du fraisier ($p \leq 0.05$). La chair de Thutop, avec une moyenne de 15.1 mg GAE/g DW, comporte le plus de phénols. En ce qui concerne les akènes, c'est la variété Clery (moyenne de 30.9 mg GAE/g DW) qui possède la plus grande teneur en

composés phénoliques tandis que les akènes de Thutop en contiennent le moins (moyenne de 27.0 mg GAE/g DW). Les teneurs en phénols totaux de la chair des fraises se situent dans la gamme de valeurs rapportées par KÄHKONNEN *et al.* [47], HEINONEN *et al.* [48] et ZHENG *et al.* [49]. Il est toutefois important de relever qu'il existe une large gamme de teneurs en composés phénoliques dans la littérature. En effet, ces différences sont notamment dues au fait que la quantité de polyphénols varie selon de nombreux paramètres tels que la variété [50], le niveau de fertilisation ou la date de plantation [51, 52]. Les teneurs en phénols totaux des rhizomes se trouvent entre 51.4 et 60.9 mg GAE/g DW et celles des feuilles se situent entre 70.3 et 94.2 mg GAE/g DW selon la variété. Ces derniers résultats correspondent aux valeurs trouvées dans la littérature [53, 54]. Ce sont les feuilles et les rhizomes de Sonata qui contiennent le plus de phénols, avec respectivement 94.2 et 60.9 mg GAE/g DW.

La date de récolte influence aussi la teneur en phénols totaux de la chair et des akènes ($p \leq 0.05$). En effet, les phénols sont plus élevés dans les variétés récoltées le 21.05.07 que dans celles récoltées 7 jours plus tôt. En ce qui concerne la chair, une augmentation d'environ 15.6 % est observée entre les deux dates de récolte, tandis qu'on note une augmentation de près de 9.3 % pour les akènes. Une tendance identique a été observée par PRIOR *et al.* [55] concernant des myrtilles récoltées à maturité à différentes dates.

5.7. Dosage des anthocyanes totaux

5.7.1. Influence de la date de récolte et de la variété

L'influence de la variété sur le contenu en anthocyanes totaux a été observée sur toutes les parties du fraisier tandis que l'influence de la date de récolte n'a été déterminée que sur les akènes et sur la chair (Annexe 11). Les résultats figurent dans le tableau 12.

Tableau 12 : Moyennes et écart-types des teneurs en anthocyanes totaux des différentes parties du fraisier des variétés Clery, Thutop et Sonata selon la date de récolte. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois répétitions (n=3). Des lettres différentes dans une même colonne et entre variétés d'une même partie indiquent des différences significatives.

Partie du fraisier	Variété	Anthocyanes totaux ¹ [mg Pg-3-glu/g DW]	
		14.05.07	21.05.07
Chair	Clery	4.88 ± 0.03a	4.19 ± 0.02a
	Thutop	3.47 ± 0.01b	2.71 ± 0.02b
	Sonata	3.81 ± 0.03c	3.60 ± 0.01c
Akènes	Clery	25.63 ± 0.79a	31.25 ± 0.60a
	Thutop	21.21 ± 0.78b	47.85 ± 0.39b
	Sonata	30.13 ± 0.39c	43.96 ± 0.39c
Feuilles	Clery	-	2.58 ± 0.33a
	Thutop	-	2.12 ± 0.12a
	Sonata	-	1.21 ± 0.19a
Rhizomes	Clery	-	4.53 ± 0.07a
	Thutop	-	4.56 ± 0.07a
	Sonata	-	4.20 ± 0.08a

¹ Anthocyanes totaux exprimés en mg de pelargonidine-3-glucoside (Pg-3-glu) par g de masse sèche (DW)

² Anthocyanes totaux exprimés en µg de pelargonidine-3-glucoside (Pg-3-glu) par g de masse sèche (DW)

Il est à relever que les teneurs en anthocyanes de la chair des fraises sont exprimées en mg Pg-3-glu/g DW, tandis que celles des feuilles, des rhizomes et des akènes sont exprimées en µg Pg-3-glu/g DW, ce qui représente pour ces dernières des valeurs très faibles. En effet, les feuilles de Sonata possèdent par exemple 1.22 µg Pg-3-glu/g DW, ce qui donne 0.00122 mg Pg-3-glu/g DW.

Les résultats montrent que les taux d'anthocyanes totaux contenus dans la chair et les akènes des fraises sont significativement influencés par la variété ($p \leq 0.05$), ce qui n'est pas le cas des taux d'anthocyanes contenus dans les autres parties du fraisier ($p \leq 0.001$). La chair des fraises de la variété Clery et les akènes de Sonata comportent en moyenne le plus d'anthocyanes (respectivement 4.5 mg Pg-3-glu/g DW et 37.0 µg Pg-3-glu/g DW). Les valeurs obtenues pour la chair des fraises sont compatibles avec les résultats donnés dans la littérature [53, 56-59], tout comme celles obtenues pour les akènes [28].

La date de récolte influence les anthocyanes de la chair et des akènes de deux manières différentes. En effet, la teneur en anthocyanes totaux est plus basse dans la chair des fraises récoltées le 21.05.07 ; elle est par contre plus haute pour cette même date chez les akènes.

5.8. Détermination qualitative des anthocyanes

En règle générale, la méthode de choix pour l'analyse des composés phénoliques d'un végétal est la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) [60]. Cette méthode offre de nombreux avantages par rapport aux traditionnelles techniques comme la chromatographie sur couche mince (CCM) : meilleure résolution, temps d'analyse raccourcis, quantification simplifiée [61]. Elle est généralement mise en œuvre sur des phases inverses (par exemple C_{18}), éluées avec des mélanges d'eau, d'alcools et d'acides [39].

La qualification des anthocyanes s'est faite par HPLC-MS étant donné la difficulté de trouver des standards d'anthocyanes et aussi à cause de leur coût élevé. Ces derniers sont en effet relativement instables et difficiles à purifier [61].

La méthode d'éluion et de détection est restée, dans un premier temps, la même que celle développée lors du travail de semestre [37]. Ensuite, la séparation a été améliorée en modifiant le gradient de solvant et en augmentant la température d'analyse à 45 °C. La longueur d'onde utilisée pour détecter les anthocyanes était de 518 nm. Il s'agit de la longueur d'onde habituellement citée dans la littérature pour ces composés [62, 63].

Deux exemples de chromatogramme effectués à 518 nm, l'un pour la chair des fraises et l'autre pour les akènes, sont repris dans les figures 6 et 7.

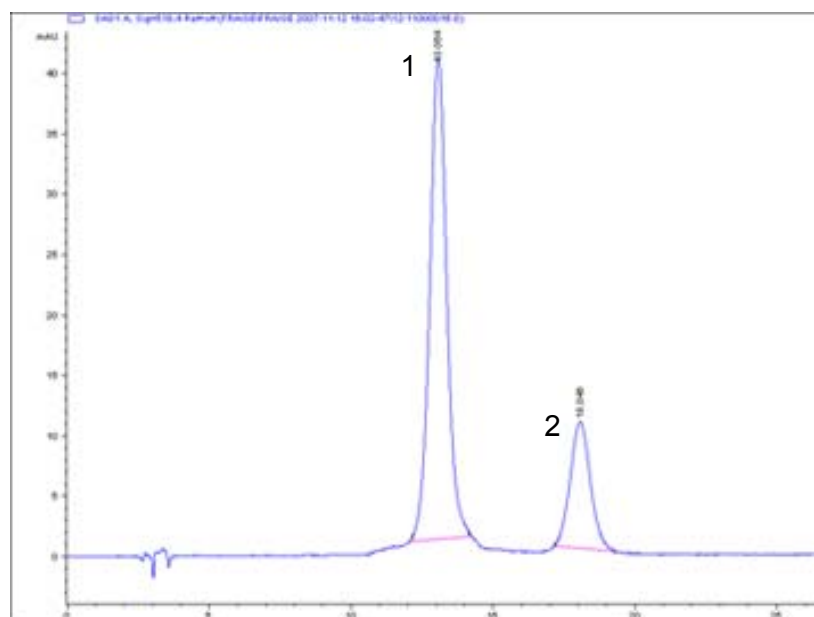


Figure 6 : Chromatogramme HPLC (à 518 nm) des anthocyanes contenus dans la chair de la variété Sonata récoltée le 14.05.07. Les numéros des pics se réfèrent au tableau 13.

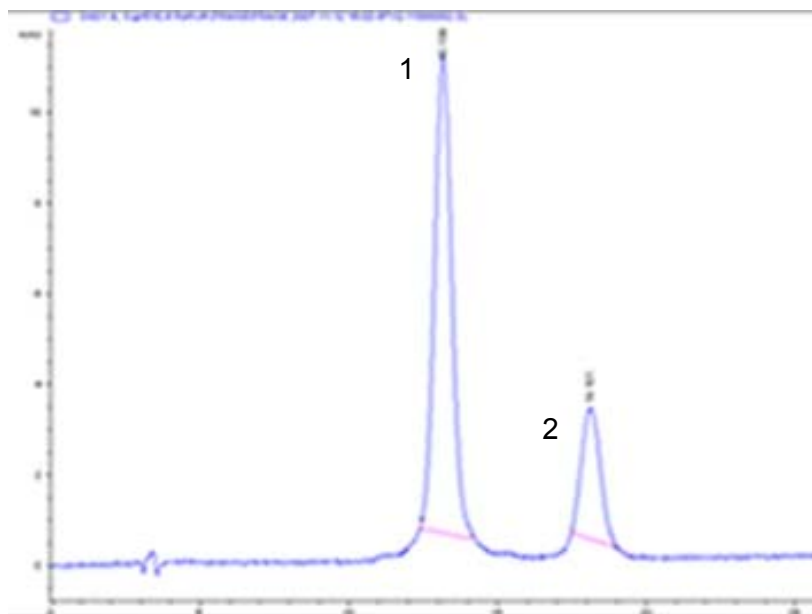


Figure 7 : Chromatogramme HPLC (à 518 nm) des anthocyanes dans les akènes de la variété Sonata récoltée le 14.05.07. Les numéros des pics se réfèrent au tableau 13.

Il est à relever en premier lieu que les chromatogrammes de toutes les variétés de chair et d'akènes sont quasiment identiques au niveau de la séparation des anthocyanes. C'est pour cette raison que seul un exemple de chromatogramme par partie figure en Annexe 12. Les chromatogrammes se ressemblent notamment sur plusieurs points. Ils possèdent en effet chacun deux pics, à environ 13.1 et 18.0 min. Le premier pic possède toujours une aire plus importante que le second. Il faut ensuite noter que les chromatogrammes des feuilles et des rhizomes n'ont pas donné de pics à 518 nm (Annexe 12). Cela est dû au fait que, comme observé au point 5.7.1, les contenus en anthocyanes totaux de ces deux parties du fraisier sont pratiquement nuls (< 0.005 mg Pg-3-glu/g DW); leur concentration est donc trop faible pour être détectée par HPLC.

L'identification des anthocyanes s'est basée sur les spectres de masse des échantillons, plus précisément sur les masses molaires et les fragments détectés (Annexe 13). Le tableau 13 récapitule les fragments obtenus par le détecteur MS en mode positif lors de l'analyse d'extraits de chair et d'akènes.

Tableau 13 : Temps de rétention (tr), masse molaire, pics moléculaires, fragments détectés en mode positif à 518 nm et identification des molécules

Pic n°	tr [min]	Masse molaire [g/mol]	$[M^+]$ (m/z)	Fragments issus de $[M+1]^+$ (m/z)	Identification
1	14.2	432	433	271	Pg-3-glu ^a
2	19.5	518	519	271	Pg-3-mal-glu ^b

^a Pg-3-glu : pelargonidine-3-glucoside

^b Pg-3-mal-glu : pelargonidine-3-malonylglucoside

Le pic n°1 possède un temps de rétention de 14.2 min ; il affiche un pic moléculaire à 433 m/z et un pic de base de 271 m/z. Ce pic de base correspond à la perte d'un hexose (162 amu). La masse moléculaire de ce pic correspond alors au pelargonidine-3-glucoside [64]. Le second pic a un temps de rétention de 19.5 min et un pic moléculaire à 519 m/z. Durant la fragmentation, ce deuxième pic a donc perdu un malonyl (86 amu) et un hexose

(162 amu). Il correspond par conséquent au pelargonidine-3-malonylglucoside [65, 66].

Le premier pic (pelargonidine-3-glucoside) correspond à l'anthocyane le plus abondant, ce qui correspond à la littérature [36, 49, 67, 68]. Par contre, toujours selon la littérature [26, 36, 69], les fraises devraient se composer d'environ 90 % de pelargonidines et de 10 % de cyanidines, notamment le cyanidine-3-glucoside. Ce dernier composé est d'ailleurs souvent considéré comme le deuxième anthocyane principal des fraises. De plus, des études menées sur les fraises ont montré la présence de 13 anthocyanes différents sur un total de 39 variétés de fraises [18]. Tous les anthocyanes n'ont donc pas été détectés puisque ici les pelargonidines correspondent à 100 % des anthocyanes. Le cyanidine-3-glucoside étant par exemple un composé plus polaire que le pelargonidine-3-glucoside, il aurait dû, selon la théorie de la phase inverse, être élué en premier, donc avant 14.2 min. Des améliorations de la méthode sont donc encore à effectuer.

5.9. Dosage de l'acide ellagique

5.9.1. Influence de la date de récolte et de la variété

La méthode de dosage de l'acide ellagique est la même que celle appliquée pour la détermination des anthocyanes. Seule la longueur d'onde a été modifiée (260 nm au lieu de 518 nm). Il s'agit de la longueur d'onde habituellement citée dans la littérature [70 - 72]. Plusieurs composés absorbent à 260 nm. Le pic relatif à l'acide ellagique est celui qui correspond au temps de rétention de 19.2 min (Annexe 14). Sa quantification a été réalisée à l'aide d'une calibration grâce à un standard d'acide ellagique (Annexe 1).

L'influence de la variété sur le contenu en acide ellagique a été observée sur toutes les parties du fraisier tandis que l'influence de la date de récolte n'a été déterminée que sur les akènes et sur la chair (Annexe 15). Les résultats sont repris dans le tableau 14.

Tableau 14 : Teneurs en acide ellagique des différentes parties du fraisier des variétés Clery, Thutop et Sonata selon la date de récolte. Les valeurs correspondent à une seule répétition (n=1).

Partie du fraisier	Variété	Acide ellagique [$\mu\text{g/g DW}$]	
		14.05.07	21.05.07
Chair	Clery	523.1	355.6
	Thutop	471.2	418.5
	Sonata	375.2	330.9
Akènes	Clery	3767.4	2827.7
	Thutop	2884.3	2369.4
	Sonata	4032.1	2847.1
Feuilles	Clery	-	2196.0
	Thutop	-	1383.8
	Sonata	-	2002.9
Rhizomes	Clery	-	277.1
	Thutop	-	219.8
	Sonata	-	299.8

Bien que les résultats ne correspondent qu'à une seule mesure, il est possible d'affirmer que l'acide ellagique de toutes les parties du fraisier est fortement influencé par la variété. De grandes différences en acide ellagique sont en effet trouvées entre les variétés d'une même partie. Par exemple les taux d'acide ellagique de la chair se situent entre 331 et 523 $\mu\text{g/g DW}$, ceux contenus dans les akènes varient en moyenne de 2370 à 4032 $\mu\text{g/g DW}$ et le contenu en acide ellagique des feuilles se trouve entre 1384 et 2196 $\mu\text{g/g DW}$. Cette tendance correspond à la littérature, notamment concernant la chair, les akènes et les feuilles [73, 74]. Aucune référence n'a été trouvée concernant le contenu en acide ellagique des rhizomes.

La date de récolte influence la teneur en acide ellagique de la chair et des akènes. En effet, elle est plus élevée dans les parties récoltées le 14.05.07. En l'espace de 7 jours, une diminution moyenne de 18.4 est observée chez la chair et de 24.1 % chez les akènes.

5.10. Mesure de l'activité antioxydante

5.10.1. Influence de la date de récolte et de la variété

L'activité antioxydante des différentes parties du fraisier a été mesurée à l'aide de la méthode du DPPH (tableau 15). Ce dernier est un radical libre et stable de couleur violette qui perd sa couleur lorsqu'il gagne un proton. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant se fait donc en mesurant par spectrophotométrie la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH [75].

Tableau 15 : Moyennes et écart-types de l'activité antioxydante des différentes parties des fraisières des variétés Clery, Thutop et Sonata selon la date de récolte (Annexe 16). Les valeurs correspondent à la moyenne de trois répétitions (n=3). Des lettres différentes dans une même colonne et entre variétés d'une même partie indiquent des différences significatives ($p \leq 0.05$).

Partie du fraisier	Variété	Activité antioxydante ¹ [$\mu\text{mol TE/g DW}$]	
		14.05.07	21.05.07
Chair	Clery	63.36 \pm 0.07a	64.60 \pm 0.11a
	Thutop	64.65 \pm 0.14b	66.82 \pm 0.11b
	Sonata	65.09 \pm 0.05c	67.30 \pm 0.18c
Akènes	Clery	99.95 \pm 0.28a	102.05 \pm 0.37a
	Thutop	74.95 \pm 0.39b	92.81 \pm 0.17b
	Sonata	94.07 \pm 0.13c	99.35 \pm 0.22c
Feuilles	Clery	-	390.54 \pm 0.89a
	Thutop	-	417.95 \pm 0.55b
	Sonata	-	503.74 \pm 0.86c
Rhizomes	Clery	-	143.66 \pm 0.06a
	Thutop	-	144.84 \pm 0.06b
	Sonata	-	165.06 \pm 0.07c

¹ Activité antioxydante exprimée en μmol d'équivalent Trolox (TE) par g de masse sèche (DW)

Les valeurs de la chair des fraises (moyenne de 65.3 $\mu\text{mol TE/g DW}$) correspondent avec les résultats obtenus par OLSSON *et al.* [76], qui ont rapporté des valeurs se situant selon les variétés entre 4.3 et 9.0 $\mu\text{mol TE/g}$ de fruits (48.3 - 101.1 $\mu\text{mol TE/g DW}$). D'autres valeurs figurent aussi dans la littérature. Cependant, comme il existe de nombreuses méthodes (FRAP, ORAC, TEAC, etc.) et des standards différents (Trolox, α -tocopherol, β -carotène, acide ascorbique, etc.), il est dès lors difficile de comparer les résultats entre eux.

Bien que les valeurs obtenues pour la chair soient proches, il y a tout de même une différence significative entre les différentes variétés ($p \leq 0.05$), ce qui concorde avec les résultats de MEYERS *et al.* [77], WANG *et al.* [40] et SCALZO *et al.* [78]. La variété influence aussi l'activité antioxydante des akènes, des feuilles et des rhizomes ($p \leq 0.05$). Les akènes de Thutop ont une activité antioxydante plus basse que les deux autres variétés de l'ordre de 20-25 %. Les akènes de Clery possèdent l'activité antioxydante la plus élevée avec 101.0 $\mu\text{mol TE/g DW}$ tandis que ses feuilles et ses rhizomes en ont le moins (respectivement 390.5 et 143.7 $\mu\text{mol TE/g DW}$).

L'activité antioxydante de la chair et des akènes est influencée aussi par la date de récolte ($p \leq 0.05$). En effet, elle est plus élevée lors de la récolte du 21.05.07. On observe donc une augmentation moyenne de l'ordre de 2.9 % pour la chair et de 10.5 % pour les akènes en l'espace de 7 jours.

5.11. Corrélation entre l'activité antioxydante et les phénols totaux

La relation entre les phénols totaux et l'activité antioxydante des différentes parties du fraisier est montrée dans la figure 8.

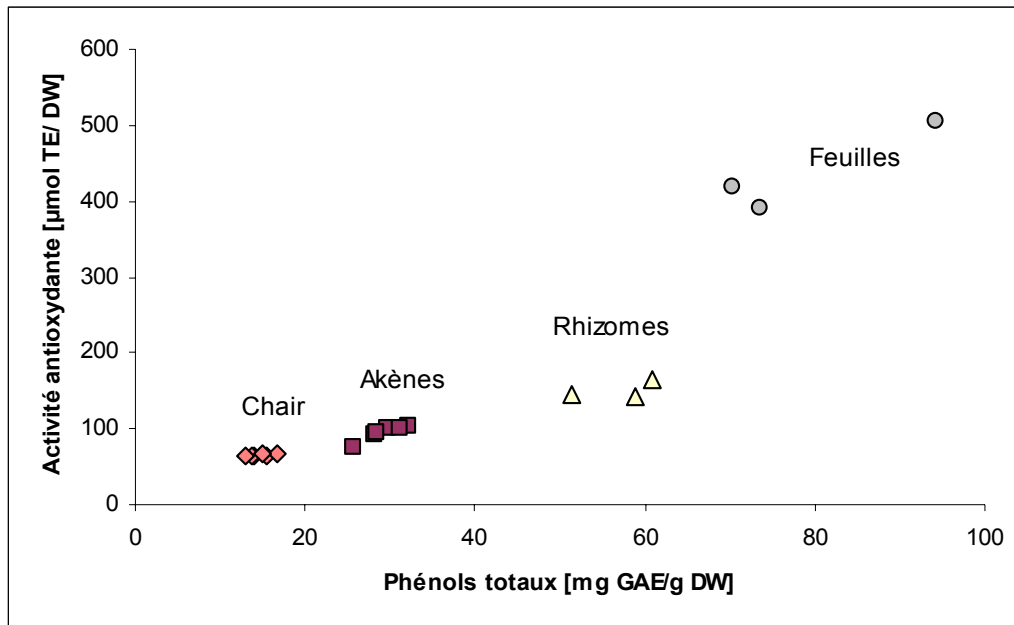


Figure 8 : Relation entre les phénols totaux et l'activité antioxydante des différentes parties du fraisier. Chaque point correspond à la moyenne de trois échantillons.

Il ressort de la figure 8 que l'augmentation du contenu en phénols totaux des extraits entraîne une augmentation de l'activité antioxydante. Cette dernière présente une corrélation linéaire significative avec le contenu en phénols totaux des différentes parties du fraisier ($R^2 = 0.8272$, $p \leq 0.01$) (Annexe 17). Cette tendance est identique à la littérature [28, 53, 79 - 81]. Cela signifie que les polyphénols sont les principaux responsables de l'activité antioxydante des différentes parties du fraisier et donc, qu'ils sont de très bons antioxydants. Cette propriété est due aux groupes phénoliques hydroxyles attachés à leur structure cyclique [82 - 85].

5.12. Différences selon les parties du fraisier

Une comparaison entre les distributions quantitatives des composés phénoliques dans la chair, les akènes, les feuilles et les rhizomes a été menée sur les variétés récoltées le 21.05.07. Pour ce faire, les résultats concernant la chair et les akènes ont été transformés pour être donnés par rapport à la masse sèche (Annexes 10, 11, 15 et 16). Les principaux résultats sont résumés dans les figures 9 à 12.

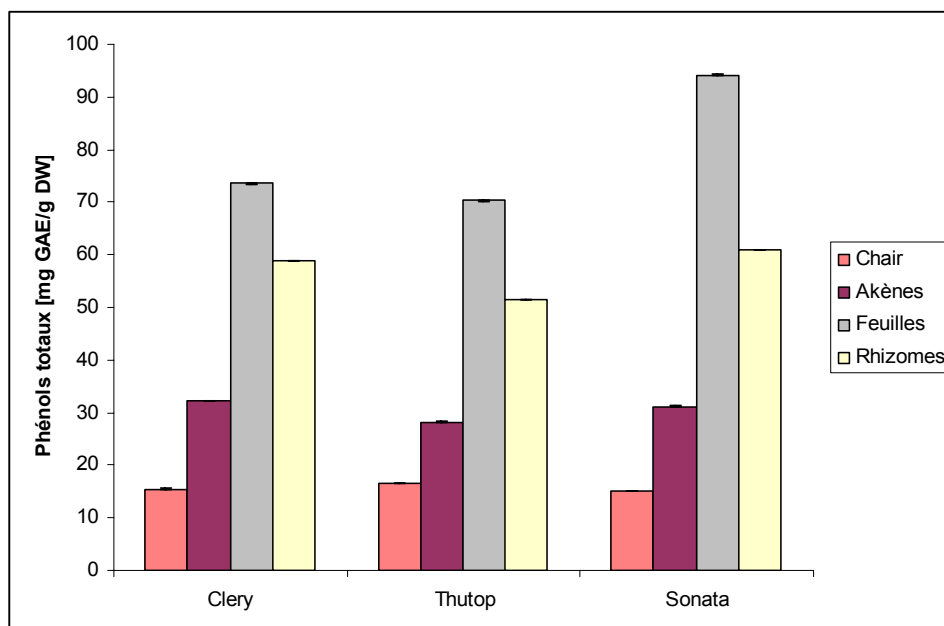


Figure 9 : Phénols totaux contenus dans la chair, les akènes, les feuilles et les rhizomes des variétés Clery, Thutop et Sonata récoltées le 21.05.07. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois répétitions (n=3) et les barres verticales représentent l'erreur standard (\pm).

Bien que les phénols totaux soient influencés par de nombreux paramètres tels que présentés au point 5.6.1, il est possible de regrouper les résultats en deux groupes. En effet les concentrations en phénols totaux de la chair et des akènes sont du même ordre tandis que les contenus en polyphénols des feuilles et des rhizomes se ressemblent aussi.

Sur la base de la masse sèche (DW), les feuilles contiennent le plus de phénols totaux (moyenne de 79.3 mg GAE/g DW). Elles sont suivies par les rhizomes puis par les akènes et, pour terminer, par la chair des fraises. Cette tendance, à savoir que les akènes possèdent plus de phénols que la chair des fraises, a déjà été relevée par CHEEL *et al.* [28] et AABY *et al.* [26]. Ces derniers ont même constaté que les akènes isolés de la chair broyée à l'aide d'un tamis contenaient des niveaux de composés phénoliques plus bas que les akènes séparés manuellement des fraises congelées. Les teneurs réduites en phénols dans les akènes étaient selon eux dues à l'épuisement des composés solubles dans l'eau à cause du rinçage des akènes à l'eau. Cette observation était notamment corrélée au fait que les teneurs en phénols des substances hautement polaires comme les ellagitannins étaient significativement réduits dans les akènes séparés de la chair broyée. Or, les akènes analysés ici ont été séparés de la chair des fraises broyées. Il est donc probable que le contenu en phénols totaux des akènes soit en fait plus élevé. Il serait donc nécessaire de séparer les akènes à la pince à épiler, comme lors de la recherche du pourcentage d'akènes par fruit. Cette méthode requiert cependant énormément de temps, nécessite une grande dextérité et surtout doit être réalisée relativement rapidement avant que les fraises ne décongèlent et ne se transforment en bouillie.

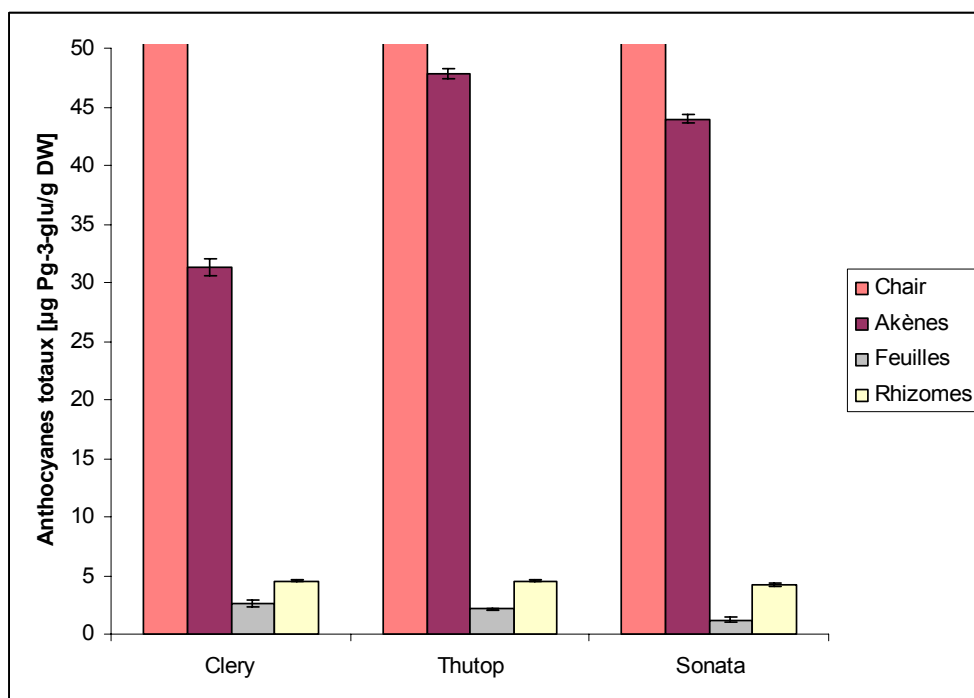


Figure 10 : Anthocyanes totaux contenus dans la chair, les akènes, les feuilles et les rhizomes des variétés Clery, Thutop et Sonata récoltées le 21.05.07. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois répétitions (n=3) et les barres verticales représentent l'erreur standard (\pm).

Il est important de relever en premier lieu que l'échelle de l'axe des ordonnées (axe des y) n'est pas finie. Cette solution a été trouvée afin de pouvoir placer tous les résultats dans le même graphique car de très grandes différences de valeurs ont été trouvées entre les parties du fraisier. En effet, les taux d'anthocyanes totaux de la chair des fraises des trois variétés s'élèvent en moyenne à 3.8 mg Pg-3-glu/g DW, ce qui correspond à près de 100 fois la quantité d'anthocyanes contenus dans les akènes et à près de 1000 fois la quantité d'anthocyanes se trouvant dans les feuilles et les rhizomes. Les valeurs correspondants aux rhizomes et aux feuilles sont quant à elles à peu près semblables.

Toutes les variétés de fraises ont été récoltées à maturité, c'est-à-dire lorsqu'elles ont eu atteint le stade rouge foncé [86]. Or, les anthocyanes sont les principaux responsables de la couleur rouge des fraises. Il est donc normal que les fraises en contiennent en grande quantité. Les valeurs obtenues pour la chair sont similaires à celles que l'on peut trouver dans la littérature [53, 56 - 59]. Les feuilles et les rhizomes ne contiennent pratiquement pas d'anthocyanes, ce qui se vérifie à l'œil nu. En effet, ces deux parties du fraisier ne sont pas rouges mais plutôt vertes pour les feuilles et brunes pour les rhizomes. Quant aux akènes, qui sont plutôt jaunes voire vertes, les valeurs obtenues sont environ 3 fois supérieures aux références littéraires [26]. Une explication pourrait être que les akènes séparés contenaient des restes de chair. Cela est possible car, même si le rinçage à l'eau permettait d'éliminer la plus grande partie de la chair, il restait cependant toujours une sorte de mince filet sur chaque akène difficile à éliminer.

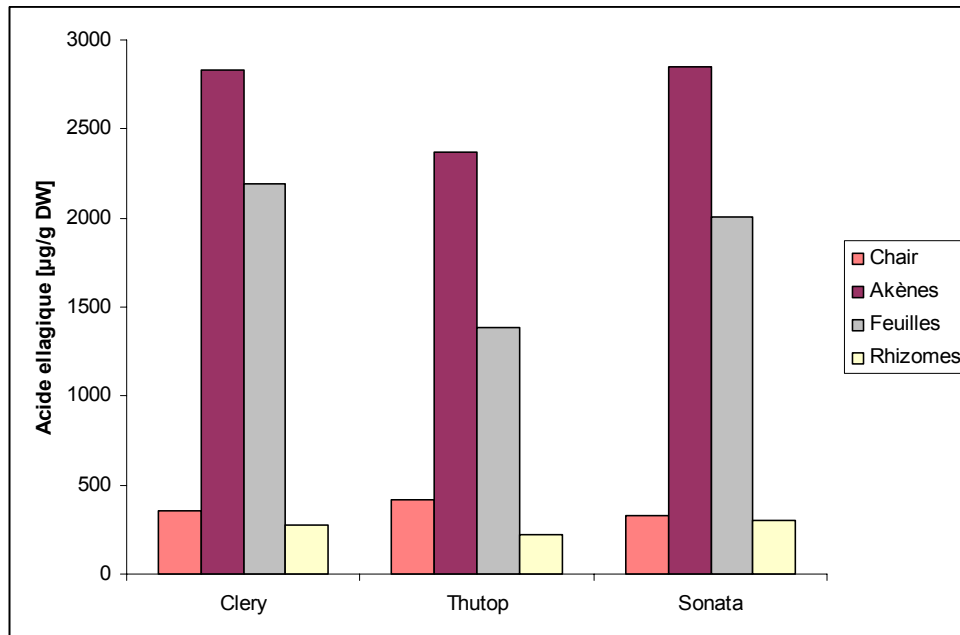


Figure 11 : Acide ellagique de la chair, des akènes, des feuilles et des rhizomes des variétés Clery, Thutop et Sonata récoltées le 21.05.07. Les valeurs correspondent à un seul essai par échantillon (n=1).

Le niveau d'acide ellagique le plus élevé se trouve dans les akènes, puis dans les feuilles, la chair et les rhizomes. La chair et les rhizomes ont des quantités d'acide ellagique qui sont du même ordre. Les valeurs obtenues pour la chair et les akènes des fraises correspondent à celles trouvées dans la littérature [21, 40, 50, 73, 74, 87]. Par contre, celles obtenues pour les feuilles ne correspondent pas avec les résultats des publications [73, 88], dans lesquelles les taux d'acide ellagique sont environ 3 fois plus élevés, ce qui amène le classement suivant : feuilles > akènes > chair.

Il faut relever dès à présent que la même méthode de détection et d'élution a été appliquée ici à tous les extraits (chair, akènes, feuilles et rhizomes). Celle-ci a bien fonctionné pour détecter les anthocyanes et l'acide ellagique des échantillons de chair et d'akènes, mais moins bien pour déterminer l'acide ellagique des extraits de feuilles et de rhizomes. En effet, il a été difficile de déterminer précisément le pic relatif à l'acide ellagique parce qu'il était souvent représenté par un double pic. De même, lorsque celui-ci était simple, sa base était relativement large (Annexe 12). Ces défauts ont donc indéniablement impliqués des erreurs, erreurs qui auraient certainement pu être détectées grâce aux écart-types si les analyses avaient été répétées.

Aucune référence n'a été trouvée pour les rhizomes mais certainement que les valeurs obtenues sont trop basses pour la même raison qu'évoquée au paragraphe précédent.

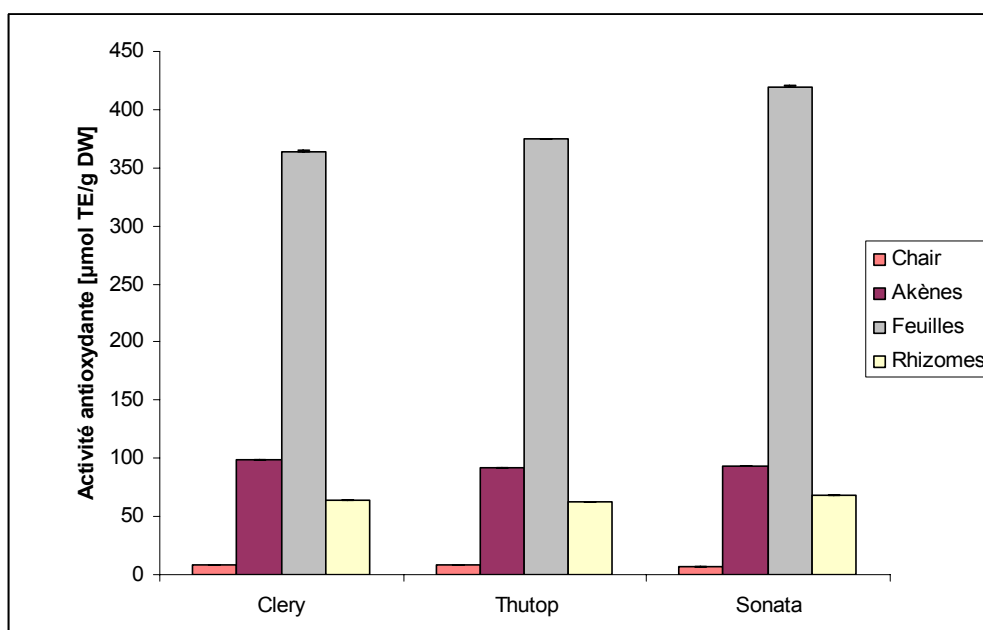


Figure 12 : Activité antioxydante de la chair, des akènes, des feuilles et des rhizomes des variétés Clery, Thutop et Sonata récoltées le 21.05.07. Les valeurs correspondent à la moyenne de trois répétitions (n=3) et les barres verticales représentent l'erreur standard (\pm).

Les feuilles possèdent la plus haute activité antioxydante, avec une moyenne de 437.4 $\mu\text{mol TE/g DW}$. Viennent ensuite les akènes, puis les rhizomes et finalement la chair des fraises. Il a déjà été observé que les akènes ont une activité antioxydante plus élevée que celle de la chair [26] et que l'activité antioxydante des feuilles est plus élevée chez les feuilles que chez la chair [53]. Ces deux tendances confirment les résultats obtenus pour l'activité antioxydante des différentes parties du fraisier, à la différence près qu'aucune donnée n'existe sur l'activité antioxydante des rhizomes.

5.13. Détermination de la teneur en phénols totaux de la plante sèche

La teneur en phénols totaux de la plante sèche (PS) a été déterminée sur les extraits ayant subi une triple extraction par ASE, c'est-à-dire sur les échantillons de feuilles et de rhizomes. Elle est déterminée en considérant un épuisement total (Annexes 6 et 7). Les résultats sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Teneur en % plante sèche des phénols totaux pour les feuilles et les rhizomes des variétés Clery, Thutop et Sonata récoltées le 21.05.07

Variété	Teneur en phénols totaux [% PS]	
	Feuilles	Rhizomes
Clery	8.7	7.1
Thutop	8.3	6.2
Sonata	11.1	7.3

La valeur moyenne des feuilles (9.4 %) est plus élevée que celle des rhizomes (6.9 %), de l'ordre de 2.5 %. Cette tendance est la même que celle observée au point 5.12, à savoir que les feuilles ont une teneur en phénols totaux plus élevée que les rhizomes.

5.14. Contribution des akènes

La réelle contribution des akènes dans les composés analysés par rapport au fruit a été déterminée grâce aux valeurs figurant dans le tableau 7. Les résultats, calculés à partir de la masse fraîche, sont donnés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Contribution moyenne (%) des akènes et de la chair des fraises récoltées le 21.05.07 dans les phénols, les anthocyanes et l'acide ellagique

Variété	Partie du fruit	Contribution [%]		
		Phénols totaux	Anthocyanes totaux	Acide ellagique
Clery	Chair	86.1	99.9	53.8
	Akènes	13.9	0.1	46.2
Thutop	Chair	89.9	99.9	45.4
	Akènes	10.1	0.1	54.6
Sonata	Chair	81.2	99.9	51.4
	Akènes	18.8	0.1	48.6

Les akènes contribuent en moyenne à 14.3 % des phénols totaux, ce qui concorde avec les résultats de AABY *et al.* [26], et à 50.2 % de l'acide ellagique. Il est à relever que, chez la variété Thutop, la contribution des akènes pour l'acide ellagique est plus élevée que celle de la chair, ce qui n'est pas le cas chez les autres variétés. La contribution en anthocyanes est quasi nulle pour les akènes ; ce fait a déjà été observé par CHEEL *et al.* [28].

6. Conclusion et perspectives

Durant ce travail, l'influence de la variété et de la date de récolte a été observée sur les teneurs en sucres et en acidité ainsi que sur les phénols, les anthocyanes, l'acide ellagique et l'activité antioxydante de plusieurs parties du fraisier (chair, akènes, feuilles et rhizomes).

Les échantillons ont d'abord été préparés puis extraits. Les feuilles et les rhizomes ont subi une extraction par solvant accéléré (ASE), ce qui a permis de déterminer l'affinité des phénols pour le solvant utilisé ainsi que la teneur en phénols totaux de la plante sèche (PS). La teneur en eau résiduelle a été définie pour tous les échantillons afin de rapporter les résultats en fonction de la masse sèche (DW) et d'ainsi rendre la comparaison des résultats plus aisée.

L'influence de la variété et de la date de récolte a d'abord été observée sur les contenus en sucres et en acidité des fruits. Il ressort que ces deux paramètres varient fortement d'une variété à l'autre et que les fraises récoltées le 21.05.07 sont toutes plus sucrées et moins acides que celles récoltées le 14.05.07.

L'influence de la variété a ensuite été étudiée sur les phénols totaux, les anthocyanes totaux, l'acide ellagique et l'activité antioxydante de la chair, des akènes, des feuilles et des rhizomes du fraisier. L'analyse statistique révèle que la variété influence significativement la plupart des composés recherchés. C'est le cas par exemple des anthocyanes contenus dans la chair et les akènes, de l'activité antioxydante, des phénols totaux et de l'acide ellagique contenus dans toutes les parties du fraisier.

L'influence de la date de récolte n'a été examinée que sur la chair et sur les akènes étant donné que les feuilles et les rhizomes n'ont été prélevés qu'après la dernière récolte. En l'espace de 7 jours, c'est-à-dire du 14.05.07 au 21.05.07, on remarque que les teneurs en phénols totaux des deux parties augmentent, tout comme l'activité antioxydante et les anthocyanes des akènes. Par contre, l'acide ellagique et les anthocyanes de la chair diminuent, respectivement de 21 et de 14 %.

Pour terminer, un classement sous forme de graphiques des différentes parties du fraisier concernant les composés cités plus haut a été effectué. Il ressort que, sur la base de la masse sèche, les feuilles contiennent le plus de phénols totaux, l'activité antioxydante la plus haute ainsi qu'une concentration en acide ellagique élevée. Elles ont par contre la teneur en anthocyanes la plus faible parmi toutes les parties du fraisier. Les rhizomes quant à eux ont un contenu en anthocyanes et en acide ellagique bas mais un contenu en phénols élevé. Leur activité antioxydante est du même ordre que celle des akènes. La chair quant à elle possède l'activité antioxydante et le taux de phénols totaux les plus faibles.

Une recherche des différents anthocyanes a été effectuée sur les extraits par HPLC-MS. Le pelargonidine-3-glucoside et le pelargonidine-3-malonylglucoside sont les seuls anthocyanes à avoir été détectés. D'autres substances étaient attendues, comme par exemple le cyanidine-3-glucoside. Des améliorations restent donc encore à apporter à la méthode.

La corrélation entre les phénols totaux et l'activité antioxydante a été prouvée ($R^2 = 0.8272$), ce qui démontre que les phénols sont les principaux responsables de l'activité antioxydante et donc, qu'ils sont de très bons antioxydants.

Ce travail a permis de mettre en lumière la quantité importante de phénols ainsi que le haut potentiel antioxydant des akènes et des feuilles du fraisier, qui s'avèrent être bien plus élevés que ceux de la chair. Les feuilles et les akènes étant généralement considérés comme des déchets (lors de la production de purées ou de jus de fraises, les akènes sont séparés puis éliminés, de même que les feuilles une fois la récolte terminée), il serait intéressant de pouvoir les récupérer pour les extraire et concentrer les composés phénoliques obtenus. Le but serait ensuite d'enrichir des aliments dépourvus de ces

composés organiques comme par exemple des barres céréales ou des mélanges pour thés.

7. Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier le professeur Wilfried Andlauer pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un sujet aussi intéressant et actuel.

Je tiens à remercier ensuite la petite équipe du laboratoire des plantes, à savoir Julien Héritier et Nadia Marcon pour leurs précieux conseils ainsi que pour leur disponibilité tout au long de ce travail. Un remerciement plus particulier à Christèle Bastian pour m'avoir notamment aidé à utiliser le broyeur ainsi que l'ASE.

Je remercie également chaleureusement Pascal Jacquemettaz, du laboratoire de chimie analytique, pour sa gentillesse, sa bonne humeur et sa disponibilité. Son expérience et ses grandes compétences ont permis l'accomplissement de ce travail, moi qui n'avais que des connaissances assez légères concernant les méthodes HPLC-DAD et MS.

8. Bibliographie

- [1] BAZZANO L. A., SERDULA M. K., LIU S., 2003. Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease, *Current atherosclerosis reports* **5**, 492-499
- [2] HERTOOG M. G. L., FESKENS E. J. M., KROMHOUT D., 1997. Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk, *The Lancet* **349**, 699
- [3] KNEKT P., JARVINEN R., REUNANEN A., MAATELA J., 1996. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study, *British Medical Journal* **312**, 478-481
- [4] SCALBERT A., JOHNSON I., SALTMARSH M., 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond, *American Journal of Clinical Nutrition* **81**, 215s-217s
- [5] HERTOOG M. G. L., HOLLMAN P. C. H., KATAN M. B., 1992. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 2379-2383
- [6] LAMPE J., 1999. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies, *American Journal of Clinical Nutrition* **70**, 475s-490s
- [7] NICOLI M. C., ANESE M., PARPINEL M., 1999. Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables, *Trends in Food Science and Technology* **10**, 94-100
- [8] URQUIAGA I., LEIGHTON F., 2000. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress, *Biological Research* **33**, 55-64
- [9] KING A., YOUNG G, 1999. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals, *Journal of the American Dietetic Association* **99**, 213-218
- [10] HANNUM S.M., 2004. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **44**, 1-17
- [11] HARBORNE J. B., 1993b. The flavonoids : advances in research since 1986. Chapman and Hall, Londres, 1-22
- [12] MAZZA G., MINIATI E., 1993. Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains, CRC Press, Boca Raton, p. 1-2
- [13] GROSS J., 1987. Pigments in Fruits, Food Science and Technology, A series of Monographs, Series Editor, Academic Press, Londres, p. 75
- [14] EduSCOL, Formation continue, Ressources des Ecoles normales supérieures, CultureSciences-Chimie, Dossiers, Chimie et questions de société, Articles, Fruits et légumes, polyphénols et santé, article rédigé par SCALBERT A., avril 2004, site consulté le 2 juin 2007
www.cultureciences.chimie.ens.fr/dossiers-chimie-societe-article-FruitsPolyphenol.html#note7
- [15] NYMAN N. A., KUMPULAINEN J. T., 2001. Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 4183-4187
- [16] SHAHIDI F., NACZK M., 1995. Food phenolics : sources, chemistry, effects, applications. Technomic Publishing Co, Lancaster, p. 84-85

- [17] FULEKI T., 1969. The anthocyanins of strawberry, rhubarb, radish and onions, *Journal of Food Science* **34**, 365-369
- [18] BAKKER J., BRIDLE P., BELLWORTHY S. J., 1994. Strawberry juice colour: a study of the quantitative and qualitative pigment composition of juices from 39 genotypes, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **64**, 31-37
- [19] HONG V., WROLSTAD R. E., 1990. Use of HPLC separation photodiode array detection for characterization of anthocyanins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38**, 708-715
- [20] GenomeNet, DBGET: Web of molecular biology databases, Bioinformatics Center, Institute for Chemical Research, Kyoto University, Japan, site consulté le 2 juin 2007 www.genome.ad.jp/dbget-bin/www_bget?compound+C12137
- [21] HÄKKINEN S., KÄRENLAMPI S., HEINONEN M. *et al.*, 1998. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77**, 543-551
- [22] PAGANGA G., MILLER N., RICE-EVANS C. A., 1999. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Radical Research* **30**, 153-162
- [23] FRANKEL E. N., KANNER J., GERMAN J. B. *et al.*, 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine, *The Lancet* **341**, 454-457
- [24] LARANJINHA J. A. N., ALMEIDA L. M., MADEIRA V. M. C., 1994. Reactivity of dietary phenolic acids with peroxy radicals: antioxidant activity upon low density lipoprotein peroxidation, *Biochemical Pharmacology* **48**, 487-494
- [25] MAAS J. L., GALLETTA G., STONER G. D., 1991. Ellagic acid, an anticarcinogen in fruits, especially in strawberries: a review, *Hortscience* **26**, 10-14
- [26] AABY K., SKREDE G., WROLSTAD R. E., 2005. Phenolic composition and antioxidant activities in flesh and achenes of strawberries (*Fragaria ananassa*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 4032-4040
- [27] GAO L., MAZZA G., 1995. Characterization, quantification, and distribution of anthocyanins and colorless phenolics in sweet cherries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 343-346
- [28] CHEEL J., THEODULOZ C., RODRIGUEZ J. *et al.*, 2007. Free radical scavenging activity and phenolic content in achenes and thalamus from *Fragaria chiloensis* ssp. *Chiloensis*, *F. vesca* and *F. x ananassa* cv. Chandler, *Food Chemistry* **102**, 36-44
- [29] Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (MSDA), chapitre 28A, « Jus de fruits et de légumes, boissons de table », Méthode d'analyse 7.1 : Acidité titrable, Office fédéral de la santé publique, Berne, 1989, 76-77
- [30] Manuel Suisse des Denrées Alimentaires (MSDA), chapitre 30A, « Vins issus de raisins », Méthode d'analyse 5.1 : Dosage de l'acidité totale titrable, Office fédéral de la santé publique, Berne, 1989, 61-63
- [31] SIRIWOHARN T., WROLSTAD R. E., FINN C. E. *et al.*, 2004. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. hybrids) anthocyanins, polyphenolics and antioxidant properties, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 8021-8030

- [32] BRAND-WILLIAMS W., CUVELIER M. E., BERSET C., 1995. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie* **28**, 25-30
- [33] GIUSTI M., WROLSTAD R. E., 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Units F1.2.1- F1.2.13
- [34] GIUSTI M., RODRIGUEZ-SAONA L. E., WROLSTAD R. E., 1999. Spectral characteristics, molar absorptivity and color of pelargonidin derivatives, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 4631-4637
- [35] GROGG A.-F., 2001, Support de cours de statistique appliquée, chapitre 4 « Notions d'analyse statistique », HEVs Sion, p. 37-42
- [36] AABY K., WROLSTAD R. E. *et al.*, 2007. Polyphenol composition and antioxidant activity in strawberry purees ; impact of achene level and storage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 5156-5166
- [37] THURRE N., 2007. Influence de la période de récolte sur l'activité antioxydante, la teneur en sucres et en acidité, la quantité de phénols totaux, d'anthocyanes totaux et d'acide ellagique dans les akènes et dans la chair des fraises, HEVs, Sion
- [38] JONES R. P., 1989. Biological principles for the effects of ethanol, *Enzyme and Microbial Technology* **11**, 130-152
- [39] BRUNETON J., 1993. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 2^{ème} édition, Lavoisier, Paris, p. 239-243 et 355-360
- [40] WANG S. Y., ZHENG W., GALLETTA G. J., 2002. Cultural system affects fruits quality and antioxidant capacity in strawberries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 6534-6542
- [41] CORDENUNSI B. R., NASCIMENTO J. R. O, LAJOLO F. M., 2000. Physico-chemical changes related to quality of five strawberry fruit cultivars during cool-storage, *Food Chemistry* **83**, 167-173
- [42] GREEN A., 1971. The biochemistry of fruits and their products, Academic Press, London, Vol. 2, p. 375-410
- [43] STURM K., KORON D., STAMPAR F., 2003. The composition of fruit of different strawberry varieties depending on maturity stage, *Food Chemistry* **83**, 417-422
- [44] NAVATEL J. C., 1998. Pour une fraise de qualité : quelle variété choisir ? *Le fruit belge* **471**, 4-10
- [45] CARLEN C., POTEI A. M., BELLON C., ANÇAY A., 2005. Qualité des fraises : effets de la variété, du rapport feuille/fruit, de la période de récolte et du stade de maturité, *Revue suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* **37**, 87-93
- [46] HENRIOT C., CARLEN C., ANÇAY A., 2002. Influence de la photosynthèse, de la surface foliaire et du rendement sur la qualité gustative des fraises, *Revue suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* **34**, 125-130
- [47] KÄHKÖNEN M. P., HOPIA A. I., HEINONEN M., 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 4076-4082

- [48] HEINONEN I. M., MEYER A. S., FRANKEL E. N., 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 4107-4112
- [49] ZHENG Y., WANG S. Y. *et al.*, 2007. Changes in strawberry phenolics, anthocyanins and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments, *Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie* **40**, 49-57
- [50] REKIKA D., KHANIZADEH M., YANG R., 2005. Antioxidant capacity and phenolic content of selected strawberry genotypes, *Hortscience* **40**, 1777-1781
- [51] HERNANZ D., RECAMALEZ A. *et al.*, 2007. Assessment of the differences in the phenolic composition of five strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in two different soilless systems, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 1846-1852
- [52] ANTONEN M., HOPPULA K., NESTBY R. *et al.*, 2006. Influence of fertilization, mulch color, early forcing, fruit order, planting date, shading, growing environment and genotype on the contents of selected phenolics in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 2614-2620
- [53] WANG S. Y., LIN H.-S., 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry and strawberry varies with cultivar and development stage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 140-146
- [54] OERTEL B., KEUTGEN N., LENZ F., 2001. Responses of strawberry to long-term elevated atmospheric ozone concentrations. Changes of soluble phenol contents in leaves, *Gartenbauwissenschaft* **66**, 164-171
- [55] PRIOR R., CAO G., MARTIN A. *et al.*, 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 2686-2693
- [56] AYALA-ZAVALA J. F., WANG S. Y., WANG C. Y., GONZALEZ-AGUILAR G. A., 2004. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit, *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie* **37**, 687-695
- [57] CORDENUNSI B. R., NASCIMENTO J. R. O., GENOVESE M. I. *et al.*, 2002. Influence of cultivar on quality parameters and chemical composition of strawberry fruits grown in Brazil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 2581-2586
- [58] WOODWARD J. R., 1972. Physical and chemical changes in developing strawberry fruits, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **23**, 465-473
- [59] KLOPOTEK Y., OTTO K., BÖHM V., 2005. Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins and antioxidant capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**, 5640-5646
- [60] SANTOS-BUELGA C., GARCIA-VIGUERA C., TOMAS-BARBERAN F. A., 2003. On-line identification of flavonoids by HPLC coupled to diode array detection, *Methods in Polyphenol Analysis*, 92-127
- [61] DURST R. W., WROLSTAD R. E., 2001. Separation and characterization of anthocyanins by HPLC, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, Units F1.3.1- F1.3.13
- [62] KÄHKÖNEN M. P., HEINÄMÄKI J. *et al.*, 2003. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 1403-1411

- [63] GOIFFON J.-P., MOULY P. P., GAYDOU E. M., 1999. Anthocyanic pigment determination in red fruit juices, concentrated juices and syrups using liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta* **382**, 39-50
- [64] SEERAM N., LEE R, SCHEULLER S., HEBER D., 2004. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy, *Food Chemistry* **97**, 1-11
- [65] AABY K., EKEBERG D., SKREDE G., 2007. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 4395-4406
- [66] LOPES-DA-SILVA F., DE PASCUAL-TERESA S. *et al.*, 2002. Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection, *European Food Research and Technology* **214**, 248-253
- [67] GIL M., HOLCROFT D., KADER A., 1997. Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 1662-1667
- [68] MÄÄTTÄ-RIIHINEN K., KAMAL-ELDIN A., TÖRRÖNEN A. R., 2004. Identification and quantification of phenolic compounds in berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae), *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 6178-6187
- [69] BRIDLE P., GARCA-VIGUERA C., 1997. Analysis of anthocyanins in strawberries and elderberries. A comparison of capillary zone electrophoresis and HPLC, *Food Chemistry* **59**, 299-304
- [70] SIRIWOHARN T., WROLSTAD R. E, DURST R. W, 2005. Identification of ellagic acid in blackberry juice sediment, *Food Chemistry and Toxicology* **70**, 189-197
- [71] ATKINSON C. J., DODDS P. A., FORD Y. Y. *et al.*, 2006. Effects of cultivar, fruit number and reflected photosynthetically active radiation on *Fragaria x ananassa* productivity and fruit ellagic acid and ascorbic acid, *Annals of Botany* **97**, 429-441
- [72] KOSAR M., KAFKAS E. *et al.*, 2004. Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 1586-1589
- [73] MAAS J. L., WANG S. Y., GALLETTA G. J., 1991. Evaluation of strawberry cultivars for ellagic acid content, *Hortscience* **26**, 66-68
- [74] WILLINER M., PIROVANI M., GÜEMES D., 2003. Ellagic acid content in strawberries of different cultivars and ripening stages, *Journal of the Science of Food and Agriculture* **83**, 842-845
- [75] ROLLAND Y., 2004. Antioxydants naturels végétaux, *Oléagineux, Corps gras, Lipides* **11**, 419-424
- [76] OLSSON M. E., EKVAL J., GUSTAVSSON K.-E. *et al.*, 2004. Antioxidants, low molecular weight carbohydrates and total antioxidant capacity in strawberries (*Fragaria x ananassa*): effects of cultivar, ripening and storage, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 2490-2498
- [77] MEYERS K. J., WATKINS C. B., PRITTS M. O., LIU R. H., 2003. Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 6887-6892
- [78] SCALZO J., POLITI A., PELLEGRINI N. *et al.*, 2005. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit, *Nutrition* **21**, 207-213
- [79] KALT W., FORNEY C. F., MARTIN A., PRIOR R. L., 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after storage of small fruits, *Journal of Agricultural and*

- [80] ZHENG W., WANG S. Y., 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 502-509
- [81] SUN J., CHU Y., WU X., LIU R. H., 2002. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 7449-7454
- [82] RICE-EVANS C., MILLER N. J., 1996. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food, *Biochemical Society Transactions* **24**, 790-795
- [83] RICE-EVANS C., MILLER N. J., BOLWELL P. G. *et al.*, 1995. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Radical Research* **22**, 375-383
- [84] WANG H., CAO G., PRIOR R. L., 1997. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 304-309
- [85] WANG S. H., ZHENG W., 2001. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**, 4977-4982
- [86] RISSIER G., NAVATEL J. C., VESCHAMBRE D., 1997. La fraise: plant et variétés. Edition Ctifl-Ciref, Paris, p. 103
- [87] DANIEL E. M., KRUPNICK A. S. *et al.*, 1989. Extraction, stability and quantification of ellagic acid in various fruits and nuts, *Journal of food composition and analysis* **2**, 338-349
- [88] The Ohio State University, Midwest small fruit & grape net, Evaluation of ellagic acid content of Ohio berries – Final report, site consulté le 4 septembre 2007
www.ag.ohio-state.edu/~sfgnet/racid_final.html

9. Annexes

- Annexe 1 : Droites de calibration
- Annexe 2 : Teneur en eau résiduelle
- Annexe 3 : Epuisement et matière sèche des extraits de feuilles et de rhizomes
- Annexe 4 : Matière sèche exprimée par rapport aux feuilles et aux rhizomes
- Annexe 5 : Pourcentage d'akènes
- Annexe 6 : Epuisement et teneur en polyphénols (% PS) des feuilles lors de l'ASE
- Annexe 7 : Epuisement et teneur en polyphénols (% PS) des rhizomes lors de l'ASE
- Annexe 8 : Teneur en acidité de la chair
- Annexe 9 : Teneur en sucres de la chair
- Annexe 10 : Phénols totaux contenus dans la chair, les akènes, les feuilles et les rhizomes
- Annexe 11 : Anthocyanes totaux contenus dans la chair, les akènes, les feuilles et les rhizomes
- Annexe 12 : Exemples de chromatogrammes HPLC à 260 et 518 nm de la chair, des akènes, des feuilles et des rhizomes
- Annexe 13 : Exemple de spectres MS des anthocyanes contenus dans la chair
- Annexe 14 : Temps de rétention de l'acide ellagique
- Annexe 15 : Acide ellagique contenu dans la chair, les akènes, les feuilles et les rhizomes
- Annexe 16 : Activité antioxydante de la chair, des akènes, des feuilles et des rhizomes
- Annexe 17 : Corrélation entre les phénols totaux et l'activité antioxydante