

**INRS-Institut Armand-Frappier**

**ETUDE DES PROPRIETES ANTIOXYDANTES  
ET ANTIMUTAGENES DE COMPOSES  
PHENOLIQUES ISSUS DE L'ERABLE**

**Par**

**Mylène Thériault**

**Mémoire présenté  
pour l'obtention  
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en microbiologie appliquée**

**Jury d'évaluation**

**Président du jury et  
examineur interne**

Darakshan Ahmad, INRS-Institut Armand-  
Frappier

**Examineur externe**

Inteaz Alli  
Food Science and Agricultural Chemistry  
McGill University

**Directrice de recherche**

Monique Lacroix, INRS-Institut Armand-  
Frappier

**Codirecteur de recherche**

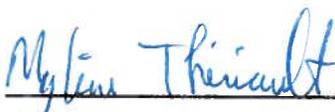
Selim Kermasha, professeur invité  
Food Science and Agricultural Chemistry  
McGill University

## Résumé

Dans le cadre d'une étude sur les composés nutraceutiques, les propriétés antioxydantes et antimutagènes de composés phénoliques extraits de la sève et du sirop d'érable ont été évaluées. Le contenu en phénols totaux de ces extraits a été analysé au HPLC.

Les propriétés antioxydantes ont été évaluées selon deux méthodes, soit la méthode évaluant l'inhibition de la peroxydation des lipides et celle mesurant le pouvoir de piégeage des radicaux libres. Les propriétés antioxydantes ont été évaluées par une microtechnique basée sur l'inhibition de l'oxydation de liposomes et les propriétés antiradicalaires par une méthode colorimétrique utilisant le N,N-diethyl-p-phenylenediamine, basée sur la capacité de capter les radicaux libres émis lors de l'électrolyse d'une solution saline. Un test Umu a été utilisé afin d'évaluer les propriétés antimutagènes *per se* et des métabolites des composés phénoliques de la sève et du sirop d'érable. Des extraits de phénols totaux ainsi que des extraits séparés, soient les composés glycosylés et les composés aglycones, ont été analysés à différentes périodes de la saison de récolte de la sève 2002.

Les profils d'élution des extraits de phénols totaux ont démontré une variation saisonnière. L'étude des propriétés antioxydantes a démontré en général une bonne capacité de piéger les radicaux libres et d'inhiber la peroxydation lipidique pour les composés phénoliques totaux, glycosylés et aglycones de la sève et du sirop d'érable. Les composés glycosylés extraits des produits de l'érable démontraient toutefois une meilleure activité antioxydante que les composés aglycones. Pour ce qui est de l'étude des propriétés antimutagènes, aucune antimutagénicité *per se* n'a été démontrée. Par contre, les métabolites des composés phénoliques semblaient présenter une activité antimutagène, surtout les composés aglycones extraits du sirop d'érable.

  
Étudiante

  
Directrice de recherche

## Remerciements

Je tiens à remercier mes directeurs de recherche, les professeurs Monique Lacroix et Selim Kermasha, ainsi que leurs équipes respectives pour le support apporté. Canh, Stéphane S., Stéphane C., Mathieu, Roxanne, Anne-Sophie, Patrick et Simon merci et ce fut un réel plaisir de travailler avec vous. Merci également à Jacinthe Côté, Dr. W. Madani et Mireille Véga pour leur aide.

Je voudrais également remercier le CORPAQ pour le support financier apporté pour la réalisation de cette étude, ainsi que le Centre de recherche, de développement et de transfert technologique en acériculture (ACER) pour les échantillons des produits de l'érable fournis.

Des attentions spéciales tout d'abord à mon conjoint François, sans le soutien duquel, ce projet n'aurait peut-être pas été mené à terme. Merci et que l'avenir nous sourie. Merci également à Lise et Claude pour leur générosité. Finalement, de gros remerciements vont à mes parents et mes chères soeurs, pour leurs encouragements. Papa, maman, je vous dédie ce mémoire pour votre bienveillance à mon égard et votre appui chaleureux dans mes différents projets. François, à toi est également dédié ce mémoire pour ta présence si bienfaisante dans ma vie.

## Table des matières

<u>Résumé</u> .....	ii
<u>Remerciements</u> .....	iii
<u>Table des matières</u> .....	iv
<u>Liste des figures</u> .....	vi
<u>Liste des tableaux</u> .....	vii
<u>Introduction</u> .....	1
<u>1. Revue de littérature</u> .....	2
<u>1.1. Nutraceutiques</u> .....	2
<u>1.2. Les composés nutraceutiques de source végétale</u> .....	2
<u>1.3. Les composés phénoliques de source végétale</u> .....	3
<u>1.4. Classification des composés phénoliques et flavonoïdes</u> .....	6
<u>1.4.1. Acides phénoliques et phénylpropanoïdes</u> .....	6
<u>1.4.2. Les flavonoïdes</u> .....	9
<u>1.5. Les propriétés des flavonoïdes</u> .....	13
<u>1.5.1. Propriétés protectrices des végétaux contre le stress oxydatif</u> .....	14
<u>1.6. L'érable comme produit nutraceutique</u> .....	17
<u>1.6.1. Extraction des composés phénoliques</u> .....	21
<u>1.6.2. Séparation des composés phénoliques libres et glycosylés</u> .....	22
<u>1.6.3. Quantification des polyphénols</u> .....	24
<u>1.7. Mesures des propriétés antioxydantes</u> .....	25
<u>1.7.1. Mesure de l'oxydation des lipides</u> .....	26
<u>1.7.2. Mesure des radicaux libres</u> .....	28
<u>1.8. Propriétés antimutagènes</u> .....	29
<u>1.8.1. Test de mutagénéicité et d'antimutagénéicité</u> .....	30
<u>1.9. Phénols comme source de nutraceutiques</u> .....	32
<u>1.10. Hypothèse</u> .....	32
<u>1.11. Objectif général</u> .....	32
<u>1.11.1. Objectifs de l'étude</u> .....	33
<u>1.11.2. Approches expérimentales pour atteindre les objectifs</u> .....	33
<u>2. Matériel et méthodes</u> .....	35
<u>2.1. Matériel</u> .....	35
<u>2.2. Extraction des composés phénoliques et flavonoïdes des produits de l'érable (phénols totaux)</u> .....	37
<u>2.2.1. Séparation des extraits de phénols totaux</u> .....	37
<u>2.2.2. Dosage HPLC des extraits de phénols totaux</u> .....	38
<u>2.3. Mesure des propriétés antioxydantes</u> .....	39
<u>2.3.1. Mesure de l'inhibition de la peroxydation de liposomes</u> .....	39
<u>2.3.2. Évaluation du pouvoir de piégeage des radicaux libres</u> .....	41
<u>2.4. Propriétés antimutagènes</u> .....	43
<u>2.4.1. Propriétés antimutagènes <i>per se</i></u> .....	43
<u>2.4.2. Propriétés antimutagènes des métabolites</u> .....	44
<u>2.5. Analyse statistique</u> .....	46

<u>3.</u>	<u>Résultats</u> .....	47
3.1.	<u>Extraction des composés phénoliques</u> .....	47
3.2.	<u>Dosage des phénols totaux des extraits d'érable</u> .....	48
3.3.	<u>Analyse HPLC des extraits phénoliques totaux</u> .....	51
3.4.	<u>Séparation des extraits de phénols totaux</u> .....	60
3.5.	<u>Propriétés antioxydantes</u> .....	62
3.5.1.	<u>Propriétés antioxydantes des composés phénoliques standards</u> .....	62
3.5.2.	<u>Propriétés antioxydantes d'extraits de phénols totaux</u> .....	66
3.5.3.	<u>Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques glycosylés et aglycones</u> ....	71
3.6.	<u>Propriétés antimutagènes</u> .....	75
3.6.1.	<u>Propriétés antimutagènes <i>per se</i> d'extraits de phénols totaux</u> .....	75
3.6.2.	<u>Propriétés antimutagènes des métabolites d'extraits de phénols totaux</u> ...	80
3.6.3.	<u>Antimutagénéicité <i>per se</i> d'extraits de phénols glycosylés et aglycones</u> ..	82
3.6.4.	<u>Propriétés antimutagènes de métabolites d'extraits de phénols séparés</u> ...	86
<u>4.</u>	<u>Discussion</u> .....	90
4.1.	<u>Extraction des composés phénoliques</u> .....	90
4.2.	<u>Séparation des extraits de phénols totaux</u> .....	90
4.3.	<u>Dosage des phénols totaux des extraits d'érable</u> .....	91
4.4.	<u>Analyse HPLC des composés phénoliques</u> .....	91
4.5.	<u>Propriétés antioxydantes</u> .....	93
4.5.1.	<u>Propriétés antioxydantes de standards phénoliques</u> .....	93
4.5.2.	<u>Propriétés antioxydantes d'extraits de phénols totaux</u> .....	94
4.5.3.	<u>Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques séparés (glycosylés et aglycones)</u> .....	95
4.6.	<u>Propriétés antimutagènes</u> .....	96
4.6.1.	<u>Antimutagénéicité <i>per se</i> et des métabolites d'extraits de phénols totaux</u>	97
4.6.2.	<u>Antimutagénéicité <i>per se</i> et des métabolites d'extraits phénoliques séparés (glycosylés et aglycones)</u> .....	98
	<u>Conclusion</u> .....	99
	<u>Références</u> .....	100

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Sentiers de biosynthèse des composés phénoliques .....	5
<b>Figure 2.</b> Structure du squelette de base des flavonoïdes .....	6
<b>Figure 3.</b> Structure des acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique.....	7
<b>Figure 4.</b> Structures des principales classes de composés phénoliques .....	12
<b>Figure 5.</b> Effets des radicaux libres sur les membranes cellulaires.....	16
<b>Figure 6.</b> Formation du chromophore produit par la condensation du malondialdéhyde et de l'acide thiobarbiturique .....	27
<b>Figure 7.</b> Courbe étalon du dosage des phénols totaux par HPLC.....	49
<b>Figure 8.</b> Chromatogrammes des composés phénoliques standards .....	52
<b>Figure 9.</b> Chromatogrammes d'analyse HPLC d'extraits de composés phénoliques de sève d'érable à : a) 0 %, b) 25 %, c) 50 %, d) 75 % et e) 100 % de la saison obtenu à l'aide d'un détecteur UV à barrettes de diode à 280 nm. ....	55
<b>Figure 10.</b> Chromatogrammes d'analyse HPLC d'extraits de composés phénoliques de sirop d'érable obtenus à a) 0%, b) 25%, c) 50%, d) 75% et e) 100% de la saison à l'aide d'un détecteur UV à barrettes de diode à 280 nm.....	57
<b>Figure 11.</b> Pouvoir de piégeage des radicaux libres et quantité de phénols totaux d'extraits de phénols de sève d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002.....	68
<b>Figure 12.</b> Pouvoir de piégeage des radicaux libres et quantité de phénols totaux d'extraits de phénols de sirop d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002.....	68
<b>Figure 13.</b> Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique et quantité de phénols totaux d'extraits de phénols de sève d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002.....	69
<b>Figure 14.</b> Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique et quantité de phénols totaux extraits de sirop d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002.....	69
<b>Figure 15.</b> Turbidité de la culture de <i>Salmonella typhimurium</i> à différentes concentrations de l'agent mutagène. ....	76
<b>Figure 16.</b> Unités $\beta$ -galactosidase de la culture de <i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/pSK1002 à différentes concentrations de l'agent mutagène. ....	76

## Liste des tableaux

<b><u>Tableau 1. Masse moyenne des extraits de phénols totaux (acides phénoliques et flavonoïdes) récupérés d'échantillons de sève et de sirop d'érable recueillis à différentes périodes de la saison</u></b> .....	47
<b><u>Tableau 2. Concentration équivalent d'acide gallique, d'extraits de phénols totaux de sève et de sirop d'érable recueillis à différentes périodes de la saison des sucres 2002</u></b> .....	50
<b><u>Tableau 3. Analyse HPLC des composés phénoliques standards</u></b> .....	54
<b><u>Tableau 4. Masse moyenne des extraits de phénols totaux séparés (glycosylés et aglycones) sur résine XAD-2 récupérée d'échantillons de sève et de sirop d'érable recueillis à différentes périodes de la saison des sucres 2002</u></b> .....	61
<b><u>Tableau 5. Pouvoir antioxydant des acides phénoliques standards obtenus par les deux méthodes</u></b> .....	64
<b><u>Tableau 6. Pouvoir antioxydant des flavonoïdes standards analysés par les deux méthodes</u></b> .....	65
<b><u>Tableau 7. Pouvoir antioxydant des composés phénoliques glycosylés standards analysés par les deux méthodes</u></b> .....	65
<b><u>Tableau 8. Pouvoir de piégeage des radicaux libres d'extraits de phénols totaux de sève et de sirop d'érable recueillis à différentes périodes de la saison</u></b> .....	70
<b><u>Tableau 9. Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique d'extraits de phénols totaux de sève et de sirop d'érable recueillis à différentes périodes de la saison</u></b> .....	70
<b><u>Tableau 10. Pouvoir de piégeage des radicaux libres de la partie glycosylée d'extraits de phénols de sève et de sirop d'érable séparés sur résine XAD-2 à différentes périodes de la saison des sucres 2002</u></b> .....	72
<b><u>Tableau 11. Pouvoir de piégeage des radicaux libres de la partie aglycone d'extraits de phénols de sève et de sirop d'érable séparés sur résine XAD-2 à différentes périodes de la saison des sucres 2002</u></b> .....	72
<b><u>Tableau 12. Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique de la partie glycosylés d'extraits de phénols de sève et de sirop d'érable séparés sur résine XAD-2 à différentes périodes de la saison des sucres 2002</u></b> .....	74
<b><u>Tableau 13. Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique de la partie aglycone d'extraits de phénols de sève et de sirop d'érable séparés sur résine XAD-2 à différentes périodes de la saison des sucres 2002</u></b> .....	74
<b><u>Tableau 14. Propriétés antimutagènes <i>per se</i> de phénols totaux extraits de sève d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002</u></b> .....	79
<b><u>Tableau 15. Propriétés antimutagènes <i>per se</i> de phénols totaux extraits de sirop d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002</u></b> .....	79
<b><u>Tableau 16. Propriétés antimutagènes des métabolites des extraits phénoliques totaux de sève d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002</u></b> .....	81
<b><u>Tableau 17. Propriétés antimutagènes des métabolites d'extraits phénoliques totaux de sirop d'érable à différentes périodes de la saison</u></b> .....	81
<b><u>Tableau 18. Propriétés antimutagènes <i>per se</i> de la partie glycosylée d'extrait de sève d'érable à différentes périodes de la saison</u></b> .....	83

<b><u>Tableau 19. Propriétés antimutagènes <i>per se</i> de la partie aglycone d'extrait de sève d'érable à différentes périodes de la saison</u></b> .....	83
<b><u>Tableau 20. Propriétés antimutagènes <i>per se</i> de la partie glycosylée d'extrait de sirop d'érable à différentes périodes de la saison</u></b> .....	85
<b><u>Tableau 21. Propriétés antimutagènes <i>per se</i> de la partie aglycone d'extrait de sirop d'érable à différentes périodes de la saison</u></b> .....	85
<b><u>Tableau 22. Propriétés antimutagènes des métabolites des composés phénoliques glycosylés extraits de sève d'érable à différentes périodes de la saison</u></b> .....	87
<b><u>Tableau 23. Propriétés antimutagènes des métabolites des composés phénoliques aglycones extraits de la sève d'érable à différentes périodes de la saison</u></b> .....	87
<b><u>Tableau 24. Propriétés antimutagènes des métabolites de la partie glycosylée d'extrait de sirop d'érable à différentes périodes de la saison</u></b> .....	89
<b><u>Tableau 25. Propriétés antimutagènes des métabolites de la partie aglycone d'extrait de sirop d'érable à différentes périodes de la saison</u></b> .....	89

## Introduction

Les végétaux sont depuis longtemps utilisés par l'homme pour se nourrir, mais également pour se guérir. L'érable (*Acer sacharum*) est un arbre ayant une grande valeur économique au Québec. Comme tous les végétaux, il produit des composés nutraceutiques, tels que des vitamines, des minéraux et des composés phénoliques. Ces derniers ont été rapportés posséder plusieurs effets bénéfiques pour la santé, tels la prévention de maladies comme le cancer et les maladies cardiovasculaires. Des composés phénoliques ont été extraits de la sève et du sirop d'érable selon une méthode mise au point par Kermasha et ses collaborateurs (1995). La séparation et la caractérisation des composés phénoliques et flavonoïdes des produits de l'érable a également été étudié par Deslauriers (2000) et Côté (2003). La bioactivité *in vitro* de ces composés a été évaluée pendant cette étude par l'analyse de leurs propriétés antioxydantes et antimutagènes.

Les propriétés antioxydantes ont été évaluées selon deux méthodes, soit la méthode évaluant l'inhibition de la peroxydation des lipides et celle mesurant le pouvoir de piégeage des radicaux libres. Les propriétés antioxydantes ont été évaluées par la microtechnique basée sur l'inhibition de l'oxydation de liposomes (Lessard, 1995) et les propriétés antiradicalaires par la méthode colorimétrique utilisant le N,N-diethyl-p-phenylenediamine, basée sur la capacité de capter les radicaux libres émis lors de l'électrolyse d'une solution saline (Le Tien *et al.*, 2001). Le test Umu tel que décrit par Oda *et al.* (1985), a été utilisé afin d'évaluer les propriétés antimutagènes *per se* et des métabolites des composés phénoliques de la sève et du sirop d'érable. Des extraits de phénols totaux ainsi que des extraits séparés soient les composés glycosylés et les composés aglycones, ont été analysés à différentes périodes de la saison de récolte de la sève 2002. L'étude des propriétés antioxydantes a démontré en général une bonne capacité de piéger les radicaux libres et d'inhiber la peroxydation lipidique. Pour ce qui est de l'étude des propriétés antimutagènes, les métabolites des composés phénoliques semblent plus actifs que les composés *per se*.

# **1. Revue de littérature**

## **1.1. Nutraceutiques**

Les recherches en sciences alimentaires et pharmaceutiques se tournent de plus en plus vers les nutraceutiques (Katan, 1999). De fait, le secteur des aliments fonctionnels est en pleine expansion au niveau mondial et il représente un des secteurs ayant la croissance la plus dynamique. Les nutraceutiques ont été définis à l'origine par Dr Steve DeFelice de la « Foundation for Innovation in Medicine » en 1989 comme étant toute substance, aliment ou partie d'un aliment qui procure des bienfaits pour la santé incluant la prévention et le traitement de maladies (Schmidl et Labuza, 2000). Les nutraceutiques et les aliments fonctionnels peuvent donc être considérés comme des éléments alimentaires dont on a démontré les avantages physiologiques ou qui réduisent les risques de maladies chroniques, au-delà de leurs simples fonctions nutritionnelles de base (DiRienzo, 2000). Au nombre de ces produits, on trouve les aliments entiers, les additifs alimentaires, les suppléments de vitamines et de minéraux, certaines herbes et épices, les éléments nutritifs végétaux et les probiotiques. On obtient les nutraceutiques de sources végétales, animales, marines ou microbiennes.

## **1.2. Les composés nutraceutiques de source végétale**

Les plantes constituent une source importante de nutraceutiques. En effet, il est connu depuis des siècles que des dérivés d'origine végétale possèdent un large spectre d'activité biologique (Nijveldt *et al.*, 2001). Le règne végétal offre autant un réservoir d'aliments que de suppléments vitaminiques ou de molécules d'intérêt pharmaceutique. En effet, depuis les premiers temps de l'histoire de l'homme, les plantes ont servi non seulement à nourrir les populations, mais aussi à guérir des maladies (plantes médicinales), à améliorer la conservation et le goût des aliments (épices, herbes). De plus, plusieurs études ont illustré la présence d'une relation inversement proportionnelle entre la consommation de végétaux (fruits et légumes) et l'incidence de maladies dégénératives,

tels le cancer, les maladies cardiovasculaires et les cataractes (Block, 1992). D'autres effets bénéfiques contre les maladies ont été attribués à des composantes végétales, tels des effets anti-inflammatoire, antihépatotoxique, antibactérien, antiviral, antiallergique, antithrombique, antimutagène et antioxydant (Kaur et Kapoor, 2001).

Les effets protecteurs des plantes ont été attribués, en grande partie, aux antioxydants présents dans celles-ci, incluant les nutriments antioxydants tels les vitamines A, C, E et le  $\beta$ -carotène, mais aussi les caroténoïdes mineurs et les phénols des plantes, comme les composés phénoliques et les flavonoïdes (Rice-Evans *et al.*, 1996).

Depuis quelques années, les composés phénoliques et les flavonoïdes attirent l'attention et constituent le sujet de nombreuses études en regard aux propriétés antioxydantes. Ces molécules ont été extraites de plusieurs plantes, en particulier de fruits, de légumes, de noix et de boissons comme le thé et le vin rouge (Escarpa et Gonzalez, 2001).

### **1.3. Les composés phénoliques de source végétale**

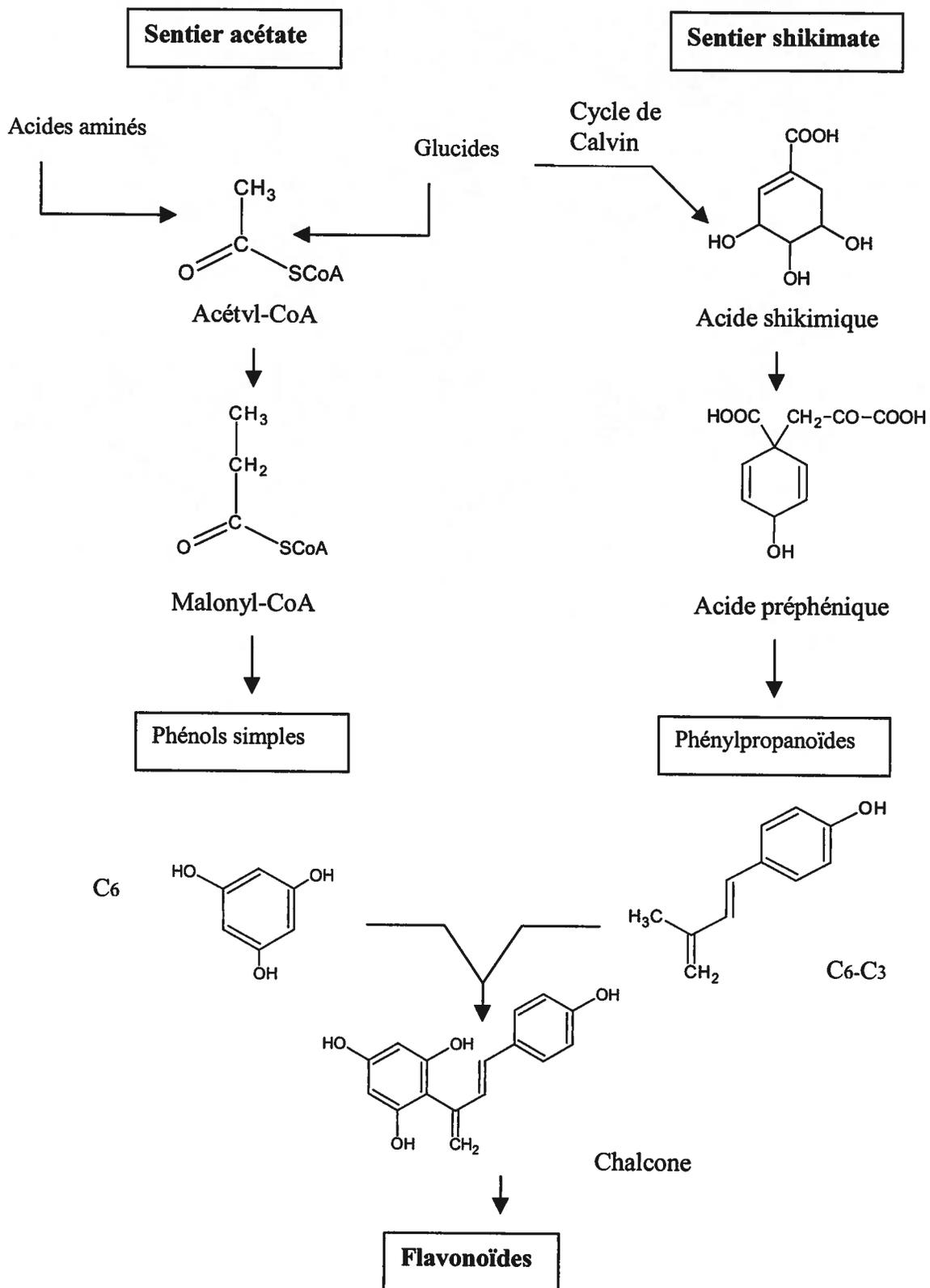
Les composés phénoliques comprenant une grande variété de substances retrouvées dans tous les types de tissus des plantes; ils constituent fréquemment les métabolites secondaires les plus abondants chez les fruits (Macheix, Fleuriet et Billot, 1990). Ils ont une vaste distribution parmi le règne végétal et leur présence a été rapportée dans plusieurs fruits et légumes, herbes et épices, produits de l'érable, plantes médicinales et boissons tels le vin, et le thé (Macheix, Fleuriet et Billot, 1990 ; Kermasha *et al.*, 1995 ; Rice-Evans *et al.*, 1996).

Le terme polyphénol peut être redéfini de façon plus précise du point de vue chimique comme étant un composé organique naturel qui possède au moins un anneau aromatique avec un ou plusieurs groupements hydroxyles rattachés à cette structure. Ces groupements fonctionnels peuvent toutefois être substitués par des esters, méthyle-ester, glycosides ou autres groupements. Les composés phénoliques, largement distribués dans le règne végétal, proviennent de sous-produits du métabolisme des plantes. Ils peuvent

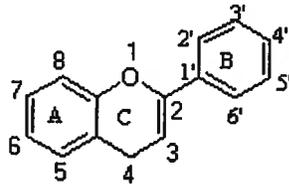
donc s'accumuler comme produits de deux sentiers métaboliques distincts : le sentier acétate et le sentier shikimate (figure 1). De plus, par un sentier intermédiaire ils peuvent produire des flavonoïdes, le groupe le plus important et le plus nombreux des composés phénoliques (Escarpa et Gonzalez, 2001). Les flavonoïdes, dont la structure est illustrée à la figure 2, proviennent en fait de ces deux sentiers. En effet, le noyau A provient du sentier acétate et le noyau B dérive des glucides par l'intermédiaire de l'acide shikimique.

Les composés phénoliques et flavonoïdes, appartenant à la grande famille des phénols, sont caractérisés par la présence d'un résidu phénol dans leur structure. La diversité retrouvée chez les composés repose sur de multiples patrons d'hydroxylation, de méthylation et de glycosylation sur des positions diverses autour de la molécule (Bors *et al.*, 1998).

Les milliers de polyphénols extraits de plantes ont été regroupés en différentes classes. La classification de ces composés est basée sur le nombre d'atomes de carbone constitutif et ensuite en regard à la structure du squelette de base de la molécule (Macheix, Fleuriet et Billot, 1990).



**Figure 1.** Sentiers de biosynthèse des composés phénoliques (Escarpa et Gonzalez, 2001)



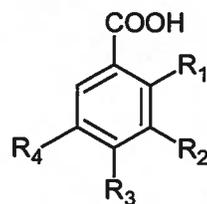
**Figure 2.** Structure du squelette de base des flavonoïdes

## 1.4. Classification des composés phénoliques et flavonoïdes

### 1.4.1. Acides phénoliques et phénylpropanoïdes

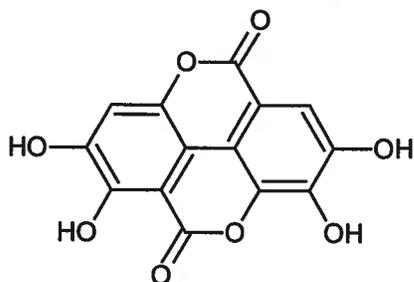
Les acides phénoliques sont divisés en deux classes différentes, les acides hydroxybenzoïques (AHB) et les acides hydroxycinnamiques (AHC). Ces derniers dérivent de deux molécules non phénoliques, les acides benzoïques et cinnamiques respectivement.

Les AHB et AHC ont des structures similaires, toutefois une chaîne éthylénique attachée à l'anneau aromatique différencie les AHC (figure 3). La présence d'un double lien dans la chaîne latérale des AHC mène à l'existence possible de deux isomères : *cis* et *trans*. Les composés natifs sont principalement de forme *trans*, mais l'isomérisation peut survenir durant l'extraction, la purification et l'exposition à la lumière (Macheix, Fleuriet et Billot, 1990). Les AHB sont fréquemment présents sous forme de dérivés tels que la forme glycosylée, mais ils peuvent aussi être sous forme d'acide libre après hydrolyse (acide, basique ou enzymatique). D'autre part, les AHC apparaissent seulement sous forme aglycone lorsque les conditions d'extraction ne sont pas contrôlées, ou lors d'une contamination microbienne ou lors du procédé de transformation. Les AHC sont par conséquent très souvent sous forme d'ester de glucose, de glucoside et peuvent être liés à des flavonoïdes ou des lignines (Macheix, Fleuriet et Billot, 1990). Généralement, les acides phénoliques sont trouvés sous forme combinée dans les fruits, sous forme soluble dans la vacuole ou sous forme insoluble, liée à des composantes de la paroi cellulaire (Macheix et Fleuriet, 1998).

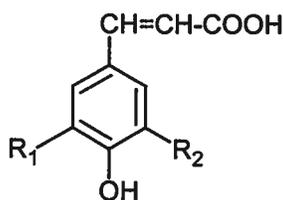


### Acide hydroxybenzoïque (AHB)

R1 = R4 = H ; R2 = OCH <sub>3</sub> ; R3 = OH	⇒ Acide vanillique
R1 = R4 = H ; R2 = R3 = OH	⇒ Acide protocatéchuique
R1 = R2 = R3 = OH	⇒ Acide gallique
R1 = H ; R2 = R4 = OCH <sub>3</sub> ; R3 = OH	⇒ Acide syringique
COOH → CHO ; R1 = R4 = H ; R2 = OCH <sub>3</sub> ; R3 = OH	⇒ Vanilline
COOH → CHO ; R1 = H ; R2 = R4 = OCH <sub>3</sub> ; R3 = OH	⇒ Syringaldéhyde
COOH → CH <sub>2</sub> COOH ; R1 = R4 = H ; R2 = OCH <sub>3</sub> ; R3 = OH	⇒ Acide homovanillique



⇒ Acide ellagique



### Acide hydroxycinnamique (AHC)

R1 = R2 = H	⇒ Acide p-coumarique
R1 = OH ; R2 = H	⇒ Acide caféique
R1 = OCH <sub>3</sub> ; R2 = H	⇒ Acide férulique
R1 = R2 = OCH <sub>3</sub>	⇒ Acide sinapique
COOH → CHO ; R1 = H ; R2 = OCH <sub>3</sub>	⇒ Coniféral
COOH → CH <sub>2</sub> COOH ; R1 = H ; R2 = OCH <sub>3</sub>	⇒ Coniférol

**Figure 3.** Structure des acides hydroxybenzoïque et hydroxycinnamique.

### Les acides hydroxybenzoïques et leurs dérivés

Le contenu en acides hydroxybenzoïques des fruits est généralement faible. Parmi les composés retrouvés dans les AHB les acides protocatéchique, ellagique et gallique sont les plus abondants. Certains fruits de la famille des Rosaceae, en particulier la mûre, possèdent un contenu élevé en acide protocatéchique et gallique. La présence d'acide syringique a été rapportée dans les raisins et sa distribution apparaît très limitée dans les fruits. L'acide protocatéchique est trouvé sous forme glycosylée dans les fruits mous. L'acide vanillique fait également partie de la composition de plusieurs fruits (raisins, cerises, fraises) et sa forme native consiste souvent en des combinaisons avec le glucose (Macheix, Fleuriet et Billot, 1990). Selon Macheix et Fleuriet (1998), les acides vanillique et syringique pourraient provenir, du moins partiellement, de la dégradation de certaines zones lignifiées du fruit tels le noyau, les graines et les téguments.

Les monomères de lignine retrouvés dans la sève d'érable sont connus pour être précurseur des composés responsables de la saveur. Selon Potter et Fagerson (1992), la formation de la vanilline et du syringaldéhyde serait due à l'oxydation et l'hydrolyse alcaline de ces composés phénoliques issus de la lignine.

La plupart des composés identifiés dans la sève, le concentré et le sirop d'érable proviennent des dérivés de lignine d'*Acer saccharum*. Les AHB et leurs dérivés trouvés dans ces produits de l'érable, sont les acides vanillique, syringique et homovanillique, ainsi que la vanilline et le syringaldéhyde (Kermasha *et al.*, 1995). Ces résultats rejoignent ceux rapportés par Potter et Fagerson (1992), qui ont décelé la présence de vanilline, et des acides homovanillique, syringique et vanillique dans le sirop d'érable.

### Les acides hydroxycinnamiques et dérivés

Les acides hydroxycinnamiques offrent une plus grande diversité et quantité comparativement aux acides hydroxybenzoïques. Les AHC font parti également des phénylpropanoïdes et les composés les plus ubiquitaires sont les acides férulique, sinapique, caféique et p-coumarique. Dans la tomate par exemple, les acides p-coumarique et férulique sont présents sous forme de glycoside et comme esters de

glucose, tandis que l'acide caféique est retrouvé sous forme de caféoyl-glucose. Les dérivés d'AHC, les sucres et les acides hydroxy sont présents simultanément dans de nombreux fruits (pommes, tomates, et cerises). L'évaluation du contenu en AHC dans les fruits révèle d'énormes variations intra spécifique et entre cultivars. Par exemple, dans les bleuets, 2 g d'AHC/kg de poids frais a été retrouvé alors que dans les Cucurbitaceae, seulement des traces ont été retrouvées (Hermann, 1989). La proportion relative de chaque AHC constitue une bonne caractéristique du fruit au stade mature (Macheix et Fleuriet 1998).

En 1995, Kermasha et ses collaborateurs ont identifié dans la sève, le concentré et le sirop d'érable les acides hydroxycinnamiques suivants : acides p-coumarique, férulique, sinapique, coniférol et coniféral. Ces résultats concordent avec ceux de Potter et Fagerson (1992) qui ont rapporté la présence de coniféral et coniférol dans le sirop d'érable.

#### **1.4.2. Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes sont des substances polyphénoliques de faible poids moléculaire qui possèdent le même squelette de base de quinze carbones ( $C_6-C_3-C_6$ ). La structure générique des flavonoïdes et le système de numérotation utilisé pour distinguer les positions des carbones autour de la molécule sont illustrés à la figure 2. Les trois anneaux phénoliques sont nommés anneau A, B et C (ou pyranne). Les activités biochimiques des flavonoïdes et de leurs métabolites dépendent de leur structure chimique et de l'orientation relative des différents groupes sur la molécule (Escarpa et Gonzalez, 2001).

##### **Les flavanols**

Les flavanes sont des flavonoïdes caractérisés par une chaîne de 3 carbones saturée (figure 4). Deux types peuvent exister, les flavan-3,4-diols et les flavanols. Parmi les flavanes on reconnaît les catéchines, les épicatechines qui sont des monomères. Il y a également les procyanines qui sont des oligomères de ces molécules. Les flavanols (catéchines) constituent les flavonoïdes les plus largement retrouvés. Ils possèdent deux carbones asymétriques (2,3) et peuvent par conséquent former quatre isomères. Les (+)-

et (-)- catéchines ont les atomes d'hydrogène numérotés 2 et 3 en configuration *trans*, tandis qu'ils sont en *cis* chez les épicatechines (Spanos et Wrolstad, 1992). (+)-Catéchine est généralement plus abondante que (-)-épicatechine avec une moyenne atteignant 79 % dans la peau des baies et 50 % dans les graines (Bourzeix *et al.*, 1986).

#### Les flavanones

Ce type de flavonoïde se caractérise par une structure C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> dans laquelle la chaîne C<sub>3</sub> saturée, comporte un atome d'oxygène en position 4 (figure 4). Les flavanones correspondent à des flavones dont la double liaison entre les carbones 2 et 3 est saturée, d'où le nom dihydroflavones parfois employé. Ils possèdent un groupe hydroxyle en position 3 et sont donc aussi parfois appelés dihydroflavonols. En raison de la saturation qui existe entre les carbones 2 et 3, les flavanones possèdent un carbone asymétrique en position 2. Les flavanones constituent un groupe minoritaire au sein des flavonoïdes et sont rarement retrouvés dans les fruits, sauf dans les agrumes où ils sont les polyphénols majoritaires. Les flavanones sont surtout présents sous forme aglycones dans les agrumes, mais la structure glycosylée prédomine dans les autres plantes (Escarpa et Gonzalez, 2001).

#### Les flavonols

Les flavonols sont des flavonoïdes caractérisés par une chaîne insaturée de 3 carbones, comprenant une double liaison entre les C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub> et par la présence de groupement hydroxyle en position 3 (figure 4). Une glycosylation en position 3 peut donner lieu à des flavonoïdes glycosylés telles la rutine et la quercitrine. Dans les fruits, les glycosides de seulement quatre aglycones sont retrouvés, kaempférol, quercétine, myricétine et isorhamnetine. Les deux plus communs étant la quercétine et le kaempférol. La combinaison de la quercétine et du kaempférol est de loin la plus fréquente chez les fruits (Macheix, Fleuriet et Billot, 1990).

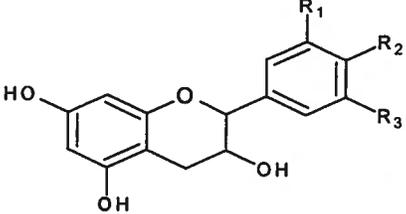
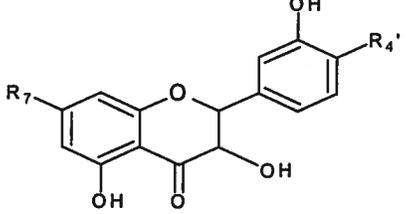
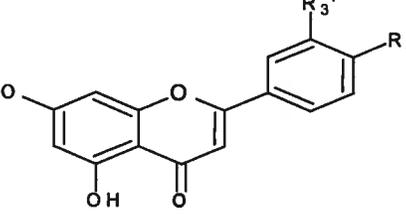
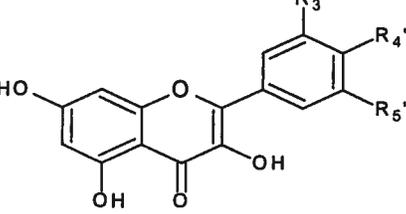
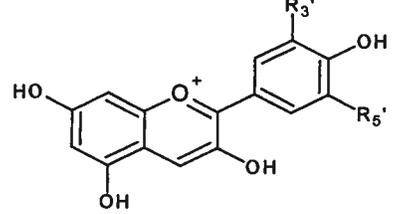
#### Les chalcones

Les chalcones sont caractérisées par un squelette de 15 carbones et une chaîne 3C ouverte. Les chalcones naturelles sont toutes hydroxylées aux noyaux A et B et il y a de

nombreux dérivés méthoxylés. Bien qu'un nombre important de chalcones ait été identifié dans les fleurs, le bois, et l'écorce de végétaux, les données sur les chalcones de fruits restent rares (Bohm, 1982).

#### Les flavonoïdes glycosides

La glycosylation survient préférentiellement sur le groupement hydroxyle en position 3. Les 3-O-monoglycosides prédominent dans les fruits et autres parties de la plante. Les glycosides de flavonols ont été retrouvés acylés avec les acides p-coumarique, férulique, caféique, p-hydroxybenzoïque, gallique, acétique et malonique, mais ils ont rarement été trouvés dans les fruits. En contraste avec le nombre élevé de glycosides de flavonols connus dans le règne végétal (environ 250), seulement une cinquantaine de composés ont été identifiés dans les fruits et la plupart de ceux-ci sont des glycosides de la quercétine (Harborne et Williams, 1975). Le glycoside de flavonol le plus courant est la quercétine 3-glucoside (isoquercitrine), qui a été trouvée dans 80% des fruits examinés (Harborne, 1964).

Flavanols		$R_1 = R_2 = \text{OH}; R_3 = \text{H} \Rightarrow \text{Catéchine}$ $R = \text{Épicatéchine}$
Flavanones		$R_4' = \text{OCH}_3; R_7 = \text{OH} \Rightarrow \text{Hesperitine}$ $R_4' = \text{OCH}_3; R_7 = \text{Rhamnose-glucose} \Rightarrow \text{Hesperidine}$
Flavones		$R_4' = \text{OH} \Rightarrow \text{Apigénine}$ $R_3' = R_4' = \text{OH} \Rightarrow \text{Luteoline}$
Flavonols		$R_3' = R_4' = \text{OH} \Rightarrow \text{Quercétine}$ $R_4' = \text{OH} \Rightarrow \text{Kaempférol}$ $R_3' = R_4' = R_5' = \text{OH} \Rightarrow \text{Myricétine}$
Anthocyanidines		$R_3' = \text{OH}; R_5' = \text{H} \Rightarrow \text{Cianydine}$ $R_3' = R_5' = \text{OH} \Rightarrow \text{Delphinidine}$ $R_3' = R_5' = \text{OCH}_3 \Rightarrow \text{Malvidine}$ $R_3' = \text{OCH}_3; R_5' = \text{OH} \Rightarrow \text{Pétunidine}$

**Figure 4.** Structures des principales classes de composés phénoliques (Escarpa et Gonzalez, 2001)

## 1.5. Les propriétés des flavonoïdes

Les flavonoïdes appartiennent à une classe récemment populaire, les “phytochemicals”, qui sont des produits de plante ayant un effet potentiel bénéfique pour la santé humaine. Puisque ces composés sont des métabolites secondaires, ils font partie intégrante de l'alimentation humaine. Ils sont aussi considérés comme étant les principes actifs de plusieurs plantes médicinales (Bors *et al.*, 1998).

Afin de procurer leurs effets bénéfiques, les flavonoïdes doivent être métabolisés et absorbés par l'organisme. Les données concernant l'absorption, le métabolisme et l'excrétion des flavonoïdes sont contradictoires et rares. Des études ont démontré que la quercétine est absorbée en quantité significative (Hollman *et al.*, 1995 ; Gee et Johnson, 2001). De plus, la forme du flavonoïde semble influencer le taux d'absorption. Hollman et ses collaborateurs (1995) ont suggéré que la forme glycosylée (liée à une molécule de sucre) soit mieux absorbée par rapport à la forme aglycone (flavonoïde seul ou non lié à une autre molécule). Par contre, la catéchine, qui est trouvée naturellement sous forme non glycosylée, est absorbée de façon relativement efficace (Nijveldt *et al.*, 2001). Les flavonoïdes, qui bien qu'ayant été surtout étudiés sous forme aglycone, existent généralement sous forme glycosylée dans la nature. Le clivage du polyphénol libre se ferait possiblement dans le tube gastro-intestinal (Gee et Johnson, 2001). D'autres études ont montré une absorption préférentielle de glycosides de flavonols, par rapport aux aglycones, dans le petit intestin. D'autre part, des glycosides de la quercétine provenant d'oignons ont été mieux absorbés que des glycosides purifiés chez des patients en santé ayant subis une iléostomie (Rice-Evans, 2001).

La propriété des flavonoïdes ayant été le plus décrit dans la littérature est certainement leur capacité d'agir comme antioxydant (Nijveldt *et al.*, 2001). Cette propriété est très importante, puisque cette capacité d'agir comme vidangeur de radicaux libres confère d'autres effets biologiques aux flavonoïdes tels, des propriétés antiallergique, anti-inflammatoire, antithrombique, antibactérienne, antivirale et antimutagène. En fait, ces effets peuvent être le résultat d'une action combinée entre le pouvoir de piégeage des

radicaux libres et la capacité d'interagir avec les fonctions de certaines enzymes (ex. enzymes protéolytiques des neutrophiles). Ceci est dû au fait que ces polyphénols sont multifonctionnels et peuvent agir comme agents réducteurs, donateurs d'atomes d'hydrogène, étancheurs d'oxygène singulet et même dans certains cas comme agent chélateur de métal (Benavente-Garcia 1997). Des études ont énoncé que certains flavonoïdes peuvent réduire l'activation du complément et ainsi diminuer la réponse inflammatoire. Les effets anti-athérosclérotiques ont été associés à l'inhibition de l'oxydation des molécules de LDL, qui elles, s'attaquent aux parois endothéliales des vaisseaux sanguins sous l'action des radicaux libres. La formation de caillots sanguins peut être prévenue également puisque certains flavonols semblent être pourvus de propriétés anti-thrombiques. Certains flavonoïdes ont aussi été signalés posséder un effet antiviral. Ces molécules peuvent interagir à différentes étapes du cycle de réplication des virus. De fait, il a été rapporté dans la littérature que la quercétine aurait des capacités anti-infectives et antirépliquatives (Nijveldt *et al.*, 2001).

### **1.5.1. Propriétés protectrices des végétaux contre le stress oxydatif**

L'importance de l'oxydation dans le corps humain et dans la nourriture a été largement reconnue. Le phénomène d'oxydation est le transfert d'électrons d'un atome à un autre et il constitue une part essentielle de notre métabolisme et de la vie en aérobie en général. En effet, l'oxygène est l'accepteur d'électron dans ce système qui produit de l'énergie sous forme d'ATP (Pietta, 2000). Toutefois, des problèmes peuvent survenir quand le flux d'électrons devient découplé (transfert d'électrons non appariés, seuls), ce qui produit des radicaux libres.

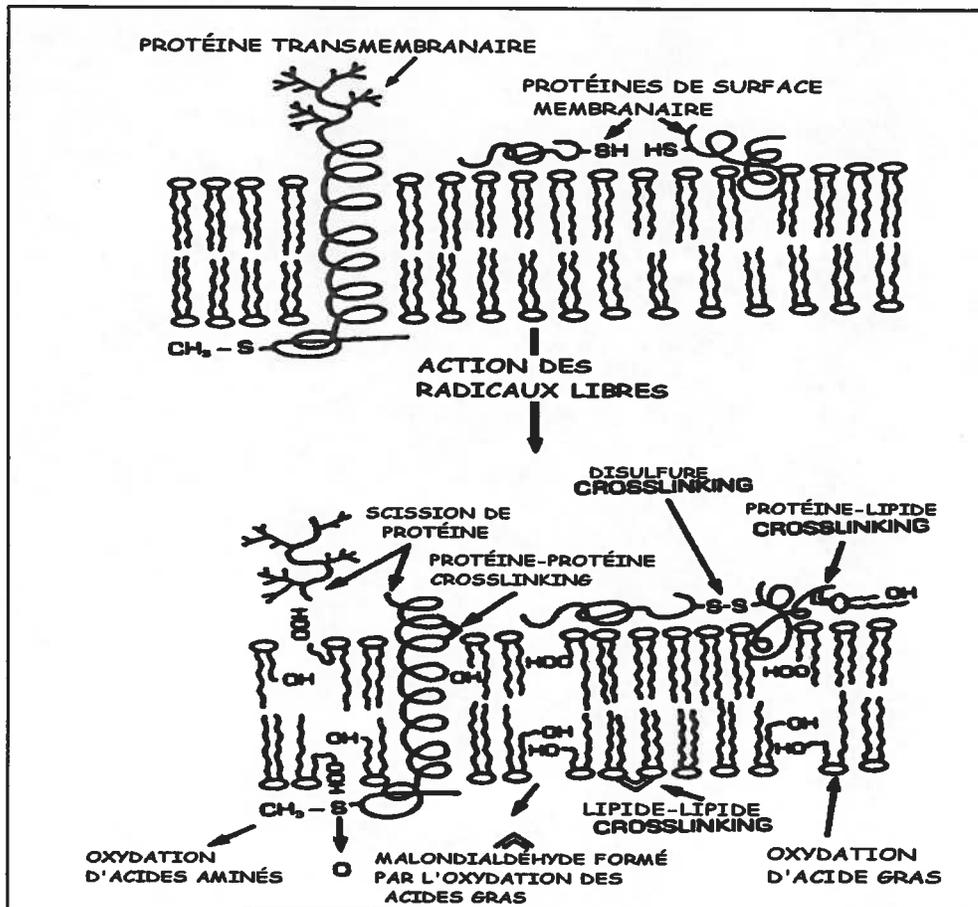
Un radical libre est défini comme n'importe quelle espèce ou groupe d'atomes, capables d'exister en indépendance et qui contient un ou plusieurs électrons appariés (électron qui occupe une orbitale atomique ou moléculaire à lui seul). La présence d'un ou plusieurs électrons appariés rend l'espèce légèrement attirée par un champ magnétique et quelques fois font que celle-ci soit très réactive (Halliwell et Gutteridge, 1985). Plusieurs sortes de radicaux libres existent en chimie et en biologie. Les radicaux peuvent facilement être

formés par le bris d'un lien covalent si les électrons de chaque paire d'électrons partagés restent avec chaque atome du lien covalent. Ce processus se nomme fission homolytique. L'énergie requise pour dissocier le lien covalent peut être fournie par la chaleur, les radiations électromagnétiques ou autres. Les radicaux libres les plus réactifs sont ceux de l'oxygène (ROS). Ils sont impliqués dans plusieurs phénomènes biologiques, sont associés au vieillissement et maladies dégénératives telles que le cancer, la sclérose en plaque, la maladie de Parkinson, les maladies auto-immunes et la démence sénile. Il y a une augmentation des évidences impliquant les radicaux libres dans une variété de systèmes régulateurs in vivo, ainsi que dans les dommages infligés aux membranes cellulaires (figure 5) (Halliwell et Gutteridge, 1985).

Les réactions oxydatives sont essentielles à la survie des cellules. Par contre, l'oxydation des lipides membranaires peut engendrer la destruction des protéines cellulaires, de l'ADN, des enzymes et provoquer l'arrêt de la respiration cellulaire. Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre dans le statut antioxydant, c'est-à-dire entre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les mécanismes de défense et de réparation de l'organisme.

Les mécanismes de défense endogènes de l'organisme contre les méfaits de l'oxydation incluent des enzymes comme la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathione peroxydase, en plus de substances telles la vitamine E, l'acide urique et les albumines sériques. En plus de ces mécanismes de défense endogènes, la consommation d'antioxydants dans la diète apporte un complément de protection contre le stress oxydatif.

Un nombre de phénomènes chimiques et physiques peuvent initier l'oxydation qui survient continuellement en présence de substrats convenables jusqu'à ce qu'un mécanisme de défense soit activé. Ces substrats incluent l'oxygène, les acides gras poly insaturés, les phospholipides, le cholestérol et l'ADN. L'oxydation des lipides est une cause importante de l'altération des lipoprotéines de faible densité (LDL).



**Figure 5.** Effets des radicaux libres sur les membranes cellulaires (Halliwell et Gutteridge, 1985)

Les dérivés de la peroxydation lipidique sont les plus étudiés en recherche sur le stress oxydatif. La plupart des membranes cellulaires des mammifères sont riches en acides gras poly insaturés (PUFA) et sont donc très sensibles au stress oxydatif. La peroxydation lipidique débute par le départ d'un atome d'hydrogène d'un PUFA, ce qui forme un radical lipidique. Ce radical se stabilise par réarrangement en un diène conjugué. L'addition d'une molécule d'oxygène forme un hydroperoxyde lipidique. Les peroxydes lipidiques peuvent ensuite être dégradés en produits de scission ou de réarrangement et certains sont suffisamment réactifs pour former des produits tertiaires (figure 5). L'oxydation des lipides peut avoir lieu de trois façons : par réaction en chaîne initiée par des radicaux libres, par photo oxydation et par réaction enzymatique.

#### **1.6. L'érable comme produit nutraceutique**

*Acer saccharum* est un arbre important économiquement au Canada. En effet, communément appelé érable à sucre, il produit la sève d'érable utilisée pour fabriquer le sirop d'érable. Comme tous végétaux, l'érable produit ces métabolites secondaires que sont les composés phénoliques, ce qui rend l'érable intéressant non seulement pour la production de sirop, mais également pour la production de ces composés à valeur nutraceutique que sont les flavonoïdes. De plus, la saveur unique du sirop d'érable en fait un produit populaire autant pour les industries que pour les consommateurs. De fait, une préférence pour la consommation d'aliments naturels a résulté en une utilisation du sirop d'érable comme alternative au sucre (Anon, 1984).

Environ 70 % de la production mondiale de sève d'érable concentrée est récoltée au Canada et 90 % provient du Québec. En 1992, 16 milliards de litres de sirop d'érable, ayant une valeur sur le marché de 45 millions de dollars, ont été produits. Même si la majorité de la sève d'érable concentrée produite est consommée comme sirop ou utilisée pour aromatiser les confitures, les desserts et le tabac, 5 à 20 % de la production est classifié de moins bonne qualité dû à des défauts de saveur, de couleur, de goût et d'apparence. Une des façons de disposer de cette sève de moins bonne qualité, est d'en

mélanger 1 litre avec 60 litres de sève concentrée de qualité standard. Cette pratique diminue la qualité des produits de l'érable et à long terme, cela peut compromettre l'industrie des produits de l'érable au Québec (Morin *et al.*, 1995).

La réglementation québécoise stipule que le sirop d'érable doit avoir un contenu de substance sèche réfractométrique de 66 % à 20 °C et doit être constitué de sève d'érable concentrée seulement (Dumont *et al.*, 1993). La densité minimum du sirop d'érable de 66 °Brix est non seulement un pré-requis légal dans la plupart des États, mais plusieurs raisons pratiques justifient le contrôle de la densité du produit final.

#### La chimie du sirop d'érable

Le sirop d'érable pur est composé majoritairement de sucre (90-100 % sucrose et 0-10 % glucose). On y retrouve également des composés chimiques tels des acides aminés, des protéines, des composés phénoliques, des composés carbonyles, des acides organiques et, à un niveau de trace, des vitamines. Une importante quantité de matériel minéral dissous dans le sirop d'érable a également été rapportée (Willits et Hills, 1996). De plus, dû au traitement thermique que subi la sève d'érable, le sirop d'érable contient des composés de la réaction de Maillard, tels les alkylpyrazines (Alli *et al.*, 1990 et Belford *et al.*, 1991).

Stuckel et Low (1996) ont étudié la composition chimique, le pH et le degré Brix de 80 échantillons de sirop d'érable pur produit en Amérique du Nord. Il est important de connaître la composition chimique du sirop d'érable, car la tentation d'en altérer le contenu en ajoutant des additifs sucrants peu cher est grande et aussi pour des raisons nutritionnelles (Morselli, 1975).

Le glucide principal retrouvé dans le sirop d'érable est le sucrose. On retrouve également du glucose et du fructose en moins grande quantité. Des différences dans les concentrations de ces trois glucides peuvent être dues à l'âge des échantillons de sirop d'érable analysés, car le niveau de monosaccharides augmente avec la durée d'entreposage. De plus grandes concentrations de glucose et de fructose pourraient être

attribuées au processus de fabrication et/ou à la charge microbienne de l'échantillon (Whalen et Morselli, 1985).

La valeur de degré Brix obtenue est corrélée au contenu en glucides puisqu'environ 99 % des solides totaux présents dans le sirop d'érable sont des sucres et principalement du sucrose (Stuckel et Low, 1996). Le pH des échantillons varie entre 5.64 et 7.90 et avait une valeur moyenne de 6.66. La variation du pH des échantillons peut être reliée à une contamination microbienne, au retrait des acides organiques ou à la conversion des composés de saveurs durant l'évaporation de la sève (Robinson *et al.*, 1989; Willits et Hills, 1996).

Les principaux acides organiques présents dans le sirop d'érable sont les acides malique, citrique, succinique et fumarique. Les minéraux majoritairement retrouvés sont le calcium, le potassium et le magnésium. Finalement, une étude a suggéré que le contenu du sirop d'érable en minéraux puisse être utilisé afin d'établir l'origine du sirop, puisque c'est une variable où une différence statistique significative a été démontrée entre diverses régions géographiques (Stuckel et Low, 1996).

#### La production de sirop d'érable

La sève est collectée de l'érable à sucre (*Acer Saccharum*) tôt au printemps quand les températures fluctuent entre le gel la nuit (-5 à -10<sup>0</sup>C) et le dégel le jour (5 à 10<sup>0</sup>C). La sève est une substance liquide claire qui ressemble à de l'eau et dont le goût est légèrement sucré. La sève contient tous les précurseurs requis pour le développement de saveur et de couleur caractéristiques du sirop d'érable (Willits et Hills, 1996).

Une fois récoltée, le sucre de la sève est concentrée à une valeur de degré Brix de 66.5. Ceci est accompli par évaporation de l'eau ou par osmose inverse suivie d'une évaporation à chaud. La saveur caractéristique unique et la couleur ambre du sirop d'érable est développée durant ce procédé d'évaporation (93-110 <sup>0</sup>C pendant 1.5 h) (Willits et Hills, 1996).

### Composition chimique de la sève d'érable

Plusieurs facteurs sont responsables des changements biochimiques, survenant à l'érablière et dans les contenants d'entreposage avant évaporation. Ceci détermine en partie les variations de tons de coloration ambre entre les grades de couleur de sirop aussi bien que de saveur. Tous les constituants biochimiques de la sève d'érable n'ont pas été identifiés. Il est important d'identifier et de comprendre les rôles et interactions des précurseurs de la couleur et de la saveur du sirop d'érable présents dans la sève. Ceci afin de permettre le contrôle de la qualité de la production du sirop (Willits et Hills, 1996).

La solution initiale de sève d'érable représente une solution dans laquelle le sucrose est le constituant majeur. De plus, la présence de quantités mineures de sucres réducteurs (Jones et Alli, 1987), d'acides organiques (Mollica et Morselli, 1986), de minéraux (Kuentz *et al.*, 1976), de composés azotés (Morselli et Whalen, 1986) et de composés phénoliques (Kermasha *et al.*, 1995) a été rapportée. L'interaction de ces composés durant le procédé d'évaporation est responsable de la saveur associée au sirop d'érable pur.

Le sucrose est le sucre le plus prévalent, constituant 98-99 % de la matière sèche de la sève. Un faible pourcentage (2 % ou moins) d'acides aminés, d'acides organiques, de composés phénoliques, d'hormones, de minéraux et de sels, et d'autres composés, fait que la sève est ce liquide physiologique responsable de la croissance de l'arbre, au bon pH et possédant un pouvoir tampon (Willits et Hills, 1996).

### Changement chimique de la sève dus aux micro-organismes

La sève d'érable dans les vaisseaux de l'arbre est au départ stérile, mais devient contaminée durant la récolte, l'entreposage et la production (Dumont *et al.*, 1993). Les effets de cette contamination ne peuvent, à première vue, ne pas être détectés par le producteur, sauf quand la sève devient trouble et d'apparence laiteuse. La sève est un milieu de croissance idéal pour les micro-organismes, poussant plus rapidement dans la sève tiède parce qu'ils ont une source de carbone et d'azote, de phosphore mélangé à de

l'oxygène. Une activité enzymatique accélérée dans la sève change ses propriétés biochimiques (Whalen et Morselli, 1985).

Kermasha et ses collaborateurs (1995) ont identifié 10 composés phénoliques majeurs dans la sève d'érable, le concentré de sève et le sirop. Ceux-ci incluent, l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide homovanillique, le coniférol, la vanilline, le syringaldéhyde, l'acide p-coumarique, l'acide sinapique, l'acide férulique et le coniféral. Deslauriers (2000) a poursuivi l'étude des composés phénoliques et flavonoïdes de la sève et du sirop d'érable et y a retrouvé tout comme Kermasha, la vanilline, le coniférol, le syringaldéhyde et l'acide p-coumarique, par contre les acides vanillique, homovanillique, syringique, férulique et sinapique tout comme le coniféral n'ont pas été retrouvés dans son étude. De plus, la présence possible d'acide protocatéchique, de catéchine, d'épicatéchine, de flavanols et de dihydroflavonols a été rapportée pour la première fois dans les produits de l'érable par Deslauriers (2000). Côté (2003) a par la suite également démontré la présence de catéchine, d'épicatéchine, de flavanols, de dihydroflavonols et de composés apparentés à la flavone dans les produits de l'érable.

### **1.6.1. Extraction des composés phénoliques**

L'isolement des composés phénoliques d'un échantillon de matrice est généralement le pré-requis d'une analyse compréhensive. Les méthodes d'extraction peuvent varier d'extraction exhaustive avec procédures de pré-concentration, à de simples extractions liquide-liquide ou de filtration. L'extraction de ces composés de la matrice qui les contient est nécessaire pour l'analyse quantitative (Antolovich *et al.*, 2000). La fidélité entre les composés phénoliques du matériel de départ et celle des extraits isolés, fournit la base théorique pour l'évaluation des techniques analytiques. Par conséquent, les conditions employées devraient être aussi douce que possible afin d'éviter l'oxydation, la dégradation thermique et autres changements chimiques et biochimiques de l'échantillon (Antolovich *et al.*, 2000).

Le choix d'une méthode d'extraction pour les composés phénoliques dépend de leur solubilité. Cette propriété est influencée en grande partie par le fait que les composés soient glycosylés, dans lequel cas ils sont plus polaires ou libres (moins polaire) (Bohm, 1998). Les composés phénoliques glycosylés sont plus solubles dans l'eau et les aglycones sont plus solubles dans le méthanol. L'efficacité de l'extraction est donc influencée par le ratio méthanol/eau (Hertog *et al.*, 1992).

Si l'extraction est faite à partir de composantes de la vacuole de plante, alors les composés phénoliques retrouvés seront de forme glycosylés et un solvant très polaire sera requis. Dans ce cas, un solvant composé de différents pourcentages d'acétone et d'eau, d'éthanol ou méthanol est préférable (Antolovich *et al.*, 2000). Une méthode commune d'extraction des composés phénoliques est une extraction liquide-liquide à l'aide de méthanol 50 % et des concentrations variables de HCl (0.6 ou 1.2 M) (Hakkinen *et al.*, 1998, 1999, Hertog *et al.*, 1992). D'autres processus d'extraction ont été rapportés et ceux-ci utilisaient du méthanol avec 1 % de 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol pour l'extraction de composés phénoliques de pommes et de poires (Escarpa et Gonzalez, 1998, Escarpa et Gonzalez, 1999).

Kermasha et ses collaborateurs (1995) ont testé différentes méthodes d'extraction pour la caractérisation de composés phénoliques et furfurals des produits de l'érable. Selon cette étude, la méthode permettant de récupérer le plus de composés était celle utilisant l'acétate d'éthyle avec un pourcentage de recouvrement moyen de 87.6 %. Le pourcentage moyen pour les autres méthodes de l'étude était de 82.2 % pour la méthode utilisant le Sep-Pak, 62.9 % par lyophilisation, 44.3 % avec du diéthyl-éther et 41.8 % avec Supelclean.

### **1.6.2. Séparation des composés phénoliques libres et glycosylés**

Les composés phénoliques de la diète seraient apparemment peu absorbés dans l'intestin, car ils sont pour la plupart présents sous forme conjuguée avec des sucres (glycosides). La glycosylation crée un lien  $\beta$ -glycosidique très stable et de ce fait, très résistant à

l'hydrolyse par les enzymes pancréatiques (Hollman *et al.*, 1995, Kühnau, 1976). Par conséquent, les études sur les composés phénoliques portent généralement sur la caractérisation et la quantification des fractions aglycones dans les produits végétaux. Toutefois, des études récentes ont démontré que les composés phénoliques glycosylés étaient mieux absorbés que les formes aglycones, libres (Hollman *et al.*, 1995).

Des études ayant tenté d'isoler et de caractériser les composés polyphénoliques glycosylés, certaines utilisaient des mécanismes de rétention sélective à l'aide d'absorbant en phase solide (Mateo et Jimenez, 2000). En lavant à l'eau après adsorption, les constituants glycosylés étaient élués, tandis que les constituants aglycones, moins polaires, étaient retenus. Une élution avec un solvant organique permettait par la suite de récupérer la fraction libre ou aglycone (Mateo et Jimenez, 2000).

Différentes méthodes ont été proposées afin d'extraire les précurseurs glycosides de différents aliments. Une méthode utilisant une colonne de verre contenant une phase inverse adsorbante C<sub>18</sub> a été développée. Après avoir lavé avec de l'eau et élué les composés glycosylés avec une solution d'acide acétique 20 %, les composés aglycones ont été élués en deux fractions avec de l'acide acétique 30 % et du méthanol. L'utilisation de cartouche d'extraction en phase solide d'un gramme a amélioré la méthodologie, les composés hydrophiles ont été élués avec l'eau, les composés libres avec du dichlorométhane et les glycosylés avec le méthanol. Cette méthode a été améliorée quelques années plus tard, mais le désavantage est la variabilité des séparations obtenues selon l'origine des cartouches commerciales (Mateo et Jimenez, 2000).

D'autre part, des chercheurs de Montpellier ont développé une autre méthode de séparation utilisant une résine Amberlite XAD-2 comme phase stationnaire, parce que celle-ci s'est avérée posséder une excellente capacité d'adsorption des terpénols libres du jus de raisin (Gunata *et al.*, 1985, 1988 et 1990). L'élution des terpénoïdes libres a été effectuée avec du pentane et par la suite, les terpénoïdes glycosylés ont été élués à l'aide d'acétate d'éthyle. Des modifications à cette méthode ont été suggérées et les composés phénoliques libres (non glycosylés) ont été élués avec du pentane:dichlorométhane dans un

ratio 2:1, afin d'améliorer l'extraction et cette technique est toujours fréquemment employée pour la séparation de flavonoïdes libres et liés dans les fruits (Mateo et Jimenez, 2000). Néanmoins, même avec lavage extensif des billes adsorbantes, la résine Amberlite XAD-2 retient le glucose libre en plus des glycosides adsorbés.

Côté (2003) a utilisé des produits modèles d'un composé glycosylé, la rutine d'une part, et d'autre part, d'un aglycone, la quercétine, ainsi qu'une série de cartouches d'extraction en phase solide, incluant C<sub>18</sub> Extract-Clean, DSC-18, DPA-6S, Oasis HLB et Amberlite XAD-2. Elle a démontré que l'Amberlite XAD-2 était la colonne la plus appropriée pour la séparation des composés phénoliques glycosylés.

### 1.6.3. Quantification des polyphénols

Une méthode traditionnelle pour déterminer le contenu en flavonoïdes dans les aliments est la spectroscopie d'absorption UV-Vis. Ces tests de mesure colorimétriques reposent sur la réaction entre les flavonoïdes et des réactifs de sélectivité variable. Le Folin-Ciocalteu est un de ces réactifs. Dans ce cas, le contenu en flavonoïdes est mesuré en tant que phénols totaux.

Le HPLC est l'instrument par excellence pour l'étude des flavonoïdes. Il permet de séparer, quantifier et caractériser des composés avec une haute résolution. La détection par HPLC se base sur l'absorption UV-Vis. L'utilisation de détecteur à barrettes de diode permet d'obtenir des scans de différentes longueurs d'onde, ce qui s'avère très utile (Mattila *et al.*, 2000). Le détecteur électrochimique est également pratique et peut s'utiliser seul ou en combinaison avec un autre type de détecteur dans le but d'optimiser la détection des composés.

De nombreuses méthodes de séparation des flavonoïdes de produits végétaux ont été rapportées dans la littérature (Mattila *et al.*, 2000; Escarpa et Gonzalez, 2001). Kermasha *et al.* (1995) ont combiné les détecteurs UV à barrettes de diode (280 et 320 nm) et

électrochimique (600 mV) afin de déterminer les composés phénoliques des produits de l'érable.

### 1.7. Mesures des propriétés antioxydantes

Un antioxydant est défini selon Gutteridge (1994), comme étant toute substance qui lorsque présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat.

Les méthodes de mesure du comportement antioxydant peuvent être divisées en deux grandes catégories, soit l'activité dans les aliments ou la bio activité chez l'humain. Dans le cas des systèmes alimentaires, le besoin est de mesurer l'efficacité d'un antioxydant à protéger la nourriture contre la dégradation due à l'oxydation. Une sous-catégorie de l'étude des antioxydants alimentaires implique, en plus de la mesure de l'activité dans l'aliment, une vue prédisant l'impact diététique et l'activité *in vivo* (Antolovich *et al.*, 2002).

La mesure de l'activité antioxydante de certaines composantes *in vivo* requiert la définition du type de formation des radicaux libres. Au moins quatre différents types peuvent être identifiés soit la réaction de Fenton, les réactions de pores et lésions mitochondriales menant à l'apoptose, la formation de radicaux libres chimiquement induite et la formation de peroxydes d'hydrogène *in vivo* (Antolovich *et al.*, 2002).

#### La réaction de Fenton

Un mélange de peroxyde d'hydrogène et de sel ferrique réagit avec plusieurs molécules organiques, tel qu'observé par Fenton en 1894. La réactivité est due à la formation de radicaux hydroxyles :



Puisque le constituant majeur des cellules vivantes est l'eau, une exposition de celles-ci aux radiations ionisantes tels les rayons-X et les rayons gamma, résultera en la production

de radicaux hydroxyles. Les radicaux hydroxyles sont responsables en grande partie des dommages provoqués à l'ADN et aux membranes cellulaires par les radiations ionisantes (Halliwell et Gutteridge, 1985).

### **1.7.1. Mesure de l'oxydation des lipides**

#### Méthode de l'odométrie

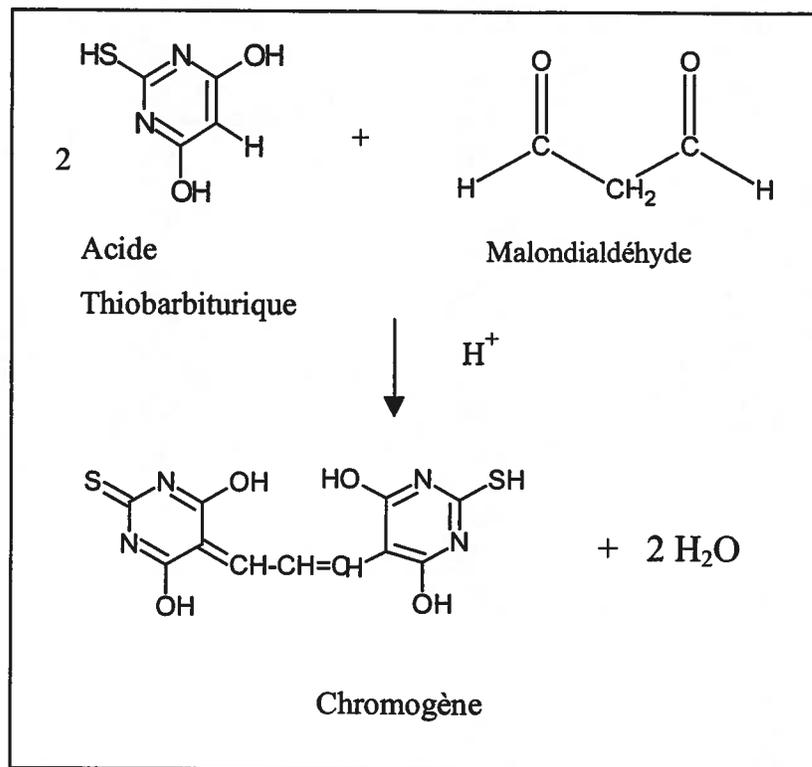
L'iodométrie permet de mesurer le contenu en hydroperoxyde (R-O-O-H) et peroxyde (R-O-O-R) de lipides (Antolovich *et al.*, 2002). Le PV est communément calculé à partir d'une méthode de titrage iodométrique développée il y a 60 ans. Dans cette méthodologie, les hydroxydes et peroxydes oxydent les ions iodure d'une solution aqueuse d'iode. Cette dernière est titrée avec une solution standard de thiosulfate et d'amidon qui sert d'indicateur.

#### Méthode basée sur la mesure des diènes conjugués

Les diènes conjugués résultent de l'oxydation des lipides et sont mesurés à une longueur d'onde de 230-235 nm (Antolovich *et al.*, 2002). Cette technique de mesure de diènes conjugués utilise comme substrats des substances contenant des acides gras poly insaturés et l'oxydation est initiée par l'addition d'ions cuivre, fer, AAPH, DDPH ou de traitement thermique. La quantification des diènes conjugués peut être effectuée par le calcul de l'augmentation d'unité d'absorbance par unité de masse d'échantillon pour un temps donné.

#### Dosage du malondialdéhyde (MDA) par conjugaison avec l'acide thiobarbiturique (TBA)

La méthode de mesure des substances qui réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBARS) existe depuis plus de 40 ans et elle constitue la méthode la plus communément utilisée pour détecter l'oxydation des lipides. Ce procédé consiste à mesurer par spectrophotométrie (530-535 nm) le produit chromogénique formé entre le malondialdéhyde (MDA) et l'acide thiobarbiturique (TBA) (figure 6).



**Figure 6.** Formation du chromophore produit par la condensation du malondialdéhyde et de l'acide thiobarbiturique (Antolovich *et al.*, 2002)

Mesure de la formation d'hexanal (Antolovich *et al.*, 2002)

La dégradation des produits primaires de l'oxydation des lipides génère plusieurs substances comme des époxydes, des cétones, des hydrocarbures et des aldéhydes saturés et insaturés tel l'hexanal. Différentes mesures de ces produits finaux plus ou moins stables sont utilisées. Le test 'anisidine value' par exemple, mesure les 2-alkénals. La production d'éthane et de pentane peut également être mesurée par chromatographie en phase gazeuse.

### 1.7.2. Mesure des radicaux libres

#### Mesure des cations ABTS

Ce test, basé sur la mesure de l'inhibition de la production de radicaux cation ABTS ( $ABTS^{•+}$ ), ne requiert pas de substrat comparativement à ceux mesurant de l'oxydation des lipides. La capacité relative d'un antioxydant à donner un atome d'hydrogène pour retirer les  $ABTS^{•+}$  générés en milieu aqueux peut donc être mesurée spectrophotométriquement à 734 nm (Antolovich *et al.*, 2002).

#### Radical diphenylpicrylhydrazyle (DPPH)

Ce test consiste à mesurer la diminution de l'absorbance du radical DPPH à 517 nm. La méthode permet donc d'évaluer l'efficacité antiradicalaire de différents antioxydants en mesurant la quantité d'antioxydant nécessaire pour diminuer de 50 % la concentration de DPPH (Antolovich *et al.*, 2002).

#### Évaluation par spectrométrie de résonance paramagnétique électronique (RPE)

La RPE (ESR) est la seule technique analytique qui peut détecter spécifiquement les radicaux libres impliqués dans les procédés d'oxydation (Antolovich *et al.*, 2002). Toutefois, bien que cette méthode soit sensible pour mesurer des radicaux libres stables comme le di-tert-butyl nitroxyde, elle n'est pas sensible pour mesurer les radicaux libres réactifs de très courte durée de vie, comme le radical hydroxyle ( $10^{-9}$ s). Pour pallier à ce problème, différentes techniques ont été utilisées tels la radiolyse pulsée, la photolyse à UV, des systèmes de flux continue et la plus utilisée, la 'spin trapping'.

#### Autres mesures de l'activité antioxydante

##### Essai FRAP

La méthode FRAP ( pour 'ferric reducing antioxidant power') ou de pouvoir antioxydant réducteur ferrique, est basé sur la réduction d'un analogue de ferriox, le complexe  $Fe^{3+}$  de tripyridyltriazine ( $Fe(TPTZ)^{3+}$ ) par les antioxydants en milieu acide (Benzie et Strain, 1996).

Mesure de la capacité d'absorbance des radicaux de l'oxygène ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Ce test très utilisé consiste à mesurer la capacité des antioxydants à inhiber la fluorescence d'une protéine très fluorescente comme la  $\beta$ -phycoérythrine ( $\beta$ -PE) ou la R-phycoérythrine (R-PE), qui elle-même, est attaquée par des radicaux libres générés par décomposition thermique de l'AAPH. L'activité antioxydante mesurée par cette méthode est proportionnelle à l'inhibition de la perte d'intensité de fluorescence provoquée par les radicaux peroxydes. Wang et collaborateurs (1996) l'ont utilisé pour mesurer l'activité antioxydante de plusieurs fruits et jus.

Mesure du piégeage des radicaux totaux (Total radical trapping antioxidant parameter) (TRAP)

Ce test a été largement utilisé afin de déterminer l'activité antioxydante totale basée sur la mesure de consommation d'oxygène durant une réaction contrôlée. L'oxydation de lipides contrôlée est induite par décomposition thermique de l'AAPH (Wayner *et al.*, 1985).

### **1.8. Propriétés antimutagènes**

Le terme antimutagène est utilisé pour décrire un agent qui réduit le nombre de mutations induites ou générées spontanément dans des circonstances particulières, tel un stress oxydatif ou en présence d'agent mutagène (Chen et Yen, 1997). Les dommages à l'ADN sont considérés comme étant une cause majeure de carcinogénèse. Ces dommages peuvent être causés par exemple, par les radiations ionisantes, les radicaux libres et des produits chimiques toxiques mutagènes. L'antimutagénécité est la capacité d'inhiber les mutations de l'ADN, la mutagenèse. Par ailleurs, un certain nombre de tests a été élaboré afin de détecter les carcinogènes dans l'environnement en posant comme prémisse, que les produits mutagènes sont carcinogènes.

L'antimutagénécité peut être accomplie de plusieurs façons : par l'interception de l'agent mutagène avant qu'il n'atteigne sa cible; en prévenant la formation d'un intermédiaire actif; ou en interférant avec les processus mutagéniques après que les dommages primaires

à l'ADN ont été initiés. L'interférence au cours des processus de mutation, est une réaction qui prévient la conversion d'une lésion primaire de l'ADN en mutation. Ceci peut se faire par une augmentation de la fidélité du système de réparation, occasionnant moins de mutants induits, ou par une inhibition de la réparation. Dans ce dernier cas, la lésion de l'ADN mènerait à la mort cellulaire au lieu d'une mutation (Zeiger, 2000).

### **1.8.1. Test de mutagénéité et d'antimutagénéité**

Les tests de détection rapide de la mutagénéité STTs (pour Short-term tests), ont été conçus pour être rapides, simples à utiliser et peu chers (Cabrera, 2000). Les STTs bactériens ont été utilisés plus communément dans les études de mutagenèse. L'utilisation de bactérie facilite les études et est représentatif, puisque les carcinogènes chimiques s'attaquent à l'ADN, donc autant bactérien qu'humain. Depuis quelques années, les STTs ont été utilisés effectivement afin de détecter les mutagènes et les carcinogènes potentiels, mais de plus en plus pour identifier des antimutagènes et de potentiels anticarcinogènes. Les tests les plus utilisés retrouvés dans la littérature sont décrits ici.

#### **Test de Ames**

Le test de détection rapide de mesure de la mutagénéité et de l'antimutagénéité le plus utilisé est sans nul doute le test de Ames (McAnn et Ames, 1976). Il consiste à utiliser différentes souches de *Salmonella* spp., généralement quatre, possédant des mutations histidines (*his*) diverses. Pour ce faire, le produit chimique à tester est placé sur une gélose dans laquelle il n'y a pas d'histidine et sur laquelle un mutant *His*<sup>-</sup> de *Salmonella* a été appliqué. Si le produit chimique peut réverser la mutation *his*, des colonies de révertant *his*<sup>+</sup> vont apparaître autour de l'agent chimique sur la gélose. Les *Salmonella* comportant des mutations *his* diverses doivent être utilisées afin d'optimiser la détection des mutations. En effet, différents agents mutagènes causent différentes mutations et ils possèdent tous des sites de mutagenèse préférés 'hot spots'. L'ajout d'enzymes hépatiques de rat permet d'évaluer la mutagénéité après métabolisation par le foie.

Aussi, chaque substance doit donc être étudiée pour chacune des souches bactériennes, en absence et en présence d'enzyme de foie de rat (Maron et Ames, 1983).

#### Le test SOS chromotest

Le SOS chromotest est une méthode colorimétrique de mesure de la génotoxicité (Quillardet *et al.*, 1982). La souche PQ37 de *Escherichia coli* (sulA : :lacZ) a été utilisée dans ce test et ainsi la conversion du 5-bromo-4-chloro-2-inolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal) par la  $\beta$ -galactosidase en un composé bleu a été mesurée (McDaniels *et al.*, 1990).

#### Le test de l'induction de prophage

Le test de l'induction de prophage été utilisé par Rossman *et al.* (1984) pour détecter la génotoxicité d'une variété de substances. Ce test consiste à induire le prophage lambda dans *Escherichia coli* et comparativement au test de Ames, il n'utilise qu'une seule souche dans laquelle le génome entier est la cible des mutations par les agents toxiques (Cabrera, 2000). Ce test requiert de petite quantité d'échantillon et un grand nombre de concentrations peuvent être testées en même temps.

#### Test Umu

Le test umu est un test colorimétrique basé sur la production de  $\beta$ -galactosidase provoquée par l'expression du gène *umuC* fusionné au gène *lacZ* en réponse à des mutations de l'ADN (Oda *et al.*, 1985). Le gène *umu*, qui est responsable du système S.O.S., est induit par les agents mutagènes. Ainsi, le plasmide pSK1002 contenant le gène de fusion *umuC-lacZ* a été introduit dans *Salmonella typhimurium* TA1535. Cette souche bactérienne génétiquement modifiée permet donc de mesurer le niveau d'expression du gène *umu*, en mesurant l'activité de la  $\beta$ -galactosidase.

## **1.9. Phénols comme source de nutraceutiques**

La recherche dans les domaines alimentaires et pharmaceutiques met de plus en plus l'accent sur les nutraceutiques. Plusieurs études ont associé les composés phénoliques et flavonoïdes à une fonction nutraceutique de par leurs propriétés antioxydantes. En effet, le pouvoir antioxydant des composés phénoliques est relié à d'autres effets biologiques chez l'humain tel, des effets anti-inflammatoire, anti-hépatotoxique, antibactérien, antiviral, antiallergique, antithrombique, antimutagène et anticarcinogène (Nijveldt *et al.*, 2001). Le paradoxe français est un exemple de la fonction nutraceutique des phénols du vin rouge sur la santé cardiovasculaire. Les polyphénols de l'huile d'olive présents dans la diète méditerranéenne mettent également en lumière l'implication des composés phénoliques sur les bienfaits de ce type d'alimentation (Nijveldt *et al.*, 2001).

Kermasha et ses collaborateurs (1995) ont démontré que le contenu en phénols du sirop d'érable était de moins de 1 %. De plus, Deslauriers (2000) et Côté (2003) ont caractérisé ces composés phénoliques. Bien que les propriétés antioxydantes et antimutagènes de ces composés phénoliques et flavonoïdes ont été démontré chez différents produits végétaux, aucune étude n'a jusqu'ici démontré l'effet des composés phénoliques du sirop d'érable comme nutraceutique. C'est ce que l'étude présente tentera de montrer.

## **1.10. Hypothèse**

Nous émettons comme hypothèse que certains composés phénoliques naturellement présents dans la sève et le sirop d'érable, ont un pouvoir antioxydant et antimutagène.

## **1.11. Objectif général**

Évaluer à l'aide de méthodes simples et rapides les propriétés antioxydantes et antimutagènes de produits de l'érable.

### **1.11.1. Objectifs de l'étude**

Les objectifs de la présente étude consistent à :

1. Extraire les composés phénoliques de la sève et du sirop d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002
2. Doser le contenu en phénols totaux des extraits de composés phénoliques de la sève et du sirop d'érable pour les différentes périodes de la saison des sucres
3. Séparer les composés phénoliques glycosylés des aglycones des extraits de sève et de sirop d'érable
4. Évaluer des propriétés antioxydantes et antiradicalaires de composés phénoliques standards contenus dans les produits d'érable et d'extraits de phénols totaux et séparés (glycosylés et aglycones) de la sève et du sirop d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002
5. Mesurer les propriétés antimutagènes *per se* et de leurs métabolites d'extraits de composés phénoliques totaux et séparés (glycosylés et aglycones) de la sève et du sirop d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002

### **1.11.2. Approches expérimentales pour atteindre les objectifs**

1. L'extraction des composés phénoliques et flavonoïdes de la sève et du sirop d'érable sera effectuée par extraction dans de l'acétate d'éthyle tel que défini par Kermasha *et al.* (1995) et modifiée par Deslauriers (2000) et Côté (2003) pour des volumes de 500 mL de sève ou de sirop dilué.
2. Le dosage des extraits de phénols des produits de l'érable sera effectué par HPLC sur colonne C<sub>18</sub> avec un gradient binaire d'eau acidifiée et d'acétonitrile selon une modification de la méthode utilisée pour la séparation des phénols du vin (Bourzeix *et al.*, 1986).

3. La séparation des composés phénoliques glycosylés et aglycones se fera par chromatographie sur une colonne contenant de la résine Amberlite XAD-2 selon une méthodologie de chercheurs de Montpellier (Gunata *et al.*, 1985) modifiée par Côté (2003). L'élution sera effectuée à l'aide de 2 solvants. Une solution aqueuse à 60 % de méthanol afin de récupérer les composés glycosylés et une solution méthanol : acétonitrile (1 :1) afin d'éluer les composés aglycones.
  
4. L'évaluation des propriétés antioxydantes sera effectuée à l'aide de deux méthodes. La première utilisant la mesure du pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique (Esterbauer *et al.*, 1982), modifiée en microtechnique par Lessard (1995). Cette méthode consiste à mettre en présence du fer, des liposomes d'acide linoléique et à mesurer par spectrophotométrie à 540 nm la réaction colorimétrique produisant des TBARS. La deuxième méthode utilisant le pouvoir de piégeage des radicaux libres (Le Tien *et al.*, 2001), consistant à soumettre à l'électrolyse une solution saline et à prélever une aliquote de la solution électrolysée et à produire une réaction colorimétrique avec le DPD et mesurer au spectrophotomètre à 515nm la solution.
  
5. La mesure des propriétés antimutagènes se fera par l'utilisation du test *Umu* (Oda *et al.*, 1985). Les propriétés antimutagènes *per se* et celles des métabolites seront analysées. L'étude *per se* met en présence les composés phénoliques et l'agent mutagène dichromate de potassium avec une culture de *Salmonella typhimurium* contenant le gène de fusion *umuC-lacZ*. Afin de mesurer l'antimutagénicité des métabolites, les composés phénoliques sont mis en présence de la bactérie et l'agent mutagène quercétine en solution avec la fraction S9 de foie de rat contenant les enzymes du complexe P450. L'évaluation du pouvoir antimutagène se fait par la mesure de l'inhibition de la production de  $\beta$ -galactosidase chez *S. typhimurium* contenant le gène *umuC-lacZ* ayant été mis en présence d'un agent mutagène et d'un composé phénolique.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Matériel**

Des standards de composés phénoliques : vanilline, acide vanillique, acide p-coumarique, acide protocatéchique, acide cafféique, acide syringique, acide sinapique et acide férulique ainsi que la rutine, quercétine, (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, hespéretine, kaempferol, myricétine, coniférol, coniféral, hespéridine, acide homovanillique et le syringaldéhyde (grade ACS) proviennent de Sigma-Aldrich Ltd (St. Louis, MO, USA).

#### **Échantillons de produits de l'érable**

Les échantillons de sève d'érable ont été obtenus du Centre de recherche, de développement et de transfert technologique en acériculture, ACER, St-Hyacinthe, Qc, Canada. Les échantillons ont été recueillis à différentes périodes de la saison des sucres 2002 soit 0, 25, 50, 75 et 100 % de la saison (0 étant le début et 100 % la fin de la saison). Quatre échantillons de sève et de sirop d'érable ont été obtenus pour chaque période de la saison des sucres 2002. Le degré Brix, qui est défini comme étant la substance sèche réfractométrique à 20 °C, a été fourni par les producteurs suivant la réglementation québécoise (Gouvernement du Québec, 1983), qui stipule que le sirop d'érable doit être de 66 % de substance sèche réfractométrique à 20 °C. La sève d'érable à 2 °Brix a été entreposée congelée dans des contenants de 4 litres. Au laboratoire, elle a été décongelée et gardée dans des contenants de 500 mL. La décongélation doit être faite rapidement pour éviter la multiplication des microorganismes, ainsi les échantillons sont mis sous l'eau à 25 °C et agités vigoureusement régulièrement. La sève a été filtrée sur papier filtre Whatman no.1 (Whatman International Ltd., Maidstone, U.K.) sous vide pour enlever les résidus et contaminants. Le sirop d'érable a été conservé dans des contenants de verre et congelé. Le sirop a été préalablement filtré par le producteur. Une dilution est faite avec le sirop d'érable qui est à 66 °Brix pour le rendre à 2 °Brix et ainsi permettre de travailler dans les mêmes conditions d'extraction que la sève. Le sirop est donc dilué 33 fois avec de l'eau déionisée, ce qui veut dire que 15 mL de sirop d'érable sont contenus dans un volume total de 500 mL.

### Souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée pour le test Umu est *Salmonella choleraesuis* (aussi appelé typhimurium) TA1535, portant le plasmide pSK1002. La souche provient de la DSMZ (Braunschweig, B.S., Allemagne). Le plasmide pSK1002 contient des gènes qui codent pour la résistance à l'ampicilline et le gène *umuC* couplé au *lacZ* qui codent respectivement pour le système S.O.S. de réparation de l'ADN et pour l'enzyme  $\beta$ -galactosidase.

### Milieu de culture

Le milieu de croissance indiqué pour *S. choleraesuis* TA1535/pSK1002 avec gène de résistance à l'ampicilline est le milieu TGA (Whong *et al.*, 1986). Il est composé de 1 % de tryptone peptone (Difco, New Jersey, NJ, USA), 0.5 % chlorure de sodium (Laboratoires Mat, Québec, Qc, Canada), 0.2 % glucose (Gibco, New Jersey, NJ, USA) et 20  $\mu$ g/mL Ampicilline (Sigma).

### Solution de fraction S9

La solution contenant la fraction S9 de foie de rat mâle (Winstar) traité à l'Aroclor-1254 (InVitro Technologies, Baltimore, MDA, USA) qui est riche en enzymes hépatiques du type cytochrome P-450, est mélangée à une solution contenant les facteurs nécessaires à son activité. La solution est donc composée de 1 mL de fraction S9, 10 mL de tampon phosphate stérile 0.2 M pH 7,4 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  +  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Laboratoires Mat), 0.4 mL de solution stérile de 0.4 M  $\text{MgCl}_2$  (Baker, New Jersey, NJ, USA) + 1.65 M KCl (Fisher, New Jersey, NJ, USA); 7.7 mL d'eau distillée stérile; 0.1 mL de 1 M glucose-6-phosphate (Sigma-Aldrich) stérile et 0.8 mL de 1 M  $\beta$ -nicotinamide adénine ( $\beta$ -NAD) (Sigma-Aldrich) stérile. La solution doit être gardée à 4 °C et la fraction S9 et le NAD ne sont ajoutés qu'en dernier.

## **2.2. Extraction des composés phénoliques et flavonoïdes des produits de l'érable (phénols totaux)**

L'extraction des composés phénoliques et flavonoïdes de la sève et du sirop d'érable a été effectuée selon des modifications à la méthode rapportée par Kermasha *et al.* (1995). Les échantillons de sève d'érable (500 mL) et de sirop d'érable dilué (1/3) (500 mL) ont été ajustés à un pH de 7 avec du HCl (1 N). Ensuite, 3 extractions ont été effectuées à partir de l'échantillon. La première extraction utilisant un volume d'acétate d'éthyle de 500 mL et les deux autres, un volume de 250 mL. Les extractions ont été faites à l'aide d'une ampoule à décanter de 2 L en agitant pendant dix minutes. La phase organique (phase supérieure), contenant les composés phénoliques a été récupérée après chaque extraction et gardée à 4 °C. Aux phases organiques recueillies a été ajoutée 100 mL d'eau déionisée afin d'éliminer les sucres restant dans la phase organique. Les résidus aqueux de la phase organique ont été enlevés avec du sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). La phase organique contenant les sels de sulfate de sodium anhydre a été filtrée sur filtre Whatman no.1. L'évaporation complète de l'acétate d'éthyle a été effectuée à l'aide d'un système d'évaporation automatique SpeedVac (Savant System, Holbrook, NY, USA). L'extrait sec a été dissous dans du méthanol et séché sous azote dans des vials pré-pesés.

### **2.2.1. Séparation des extraits de phénols totaux**

La méthode utilisée afin de séparer les composés phénoliques glycosylés, des composés aglycones, contenus dans des extraits phénoliques de sève et de sirop d'érable, est basée sur une méthode modifiée rapportée par Gunata *et al.* (1985).

#### **Préparation de la fraction glycosilée**

Cinq milligrammes d'extrait de phénols totaux de l'érable ont été dissous dans 1 mL de méthanol. Ensuite, la colonne (SR 10/50, Amersham Biosciences Corp., Baie-d'Urfé, Qc, Canada) contenant la résine Amberlite XAD-2 (300mm x 100 mm i.d.) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a été conditionné avec 10 mL de méthanol 100 % (grade HPLC, Fisher, New Jersey, NJ, USA). L'extrait a par la suite été introduit dans la colonne afin

d'en séparer les fractions glycosilée et aglycone. Dans un premier temps les phénols glycosilés ont été élués avec une solution aqueuse de méthanol (60 %) (198 mL) à un débit de 0.5 mL/min et ont été recueillis dans des bouteilles ambrées. Le solvant a été enlevé de la fraction par évaporation utilisant le système d'évaporation automatique SpeedVac (System Savant). L'échantillon ainsi obtenu a été barboté à l'azote et gardé au congélateur à -20 °C jusqu'au moment de l'analyse.

#### Isolement de la fraction aglycone

Dans un deuxième temps, après la fraction glycosilée recueillie, la fraction aglycone est récupérée. Cette dernière a été éluée de la colonne contenant la résine XAD-2 utilisant 289 mL de solvant méthanol:acétonitrile (Fisher) (1:1, v/v). Pour ce faire, les premiers sept millilitres recueillis ont servi à conditionner la colonne. Ensuite, les 282 mL suivants ont été recueillis dans une bouteille de 300 mL ambrée et le solvant évaporé au SpeedVac (System Savant). L'échantillon sec obtenu a été dissous dans 300 µL de méthanol et finalement séché sous azote dans un vial pré-pesé et entreposé à -20 °C pour analyses ultérieures.

#### 2.2.2. Dosage HPLC des extraits de phénols totaux

Le dosage des phénols totaux de la sève et du sirop d'érable a été effectué à l'aide d'un HPLC équipé d'une pompe et d'un injecteur modèle 230 de Varian (Varian, Walnut Creek, CA, USA) et d'une colonne analytique Varian C<sub>18</sub> (4.60 x150mm, particules : 5 µm) connectés à un détecteur modèle 330 UV-visible à barrettes de diode. Les composés phénoliques ont été élués suivant un gradient binaire. Les solvants A et B étaient composés d'acide formique (Fluka Chemika, Buchs, Suisse), d'acétonitrile (Laboratoires Mat) et d'eau déionisée respectivement dans un rapport 1 : 5 : 94 pour le solvant A et de 1 : 30 : 69 pour le solvant B. Le gradient d'éluion par palier passait de t = 0 : 100 % de A, à t = 15 minutes : 90 % de A, ensuite à t = 50 minutes : 100 % de B jusqu'à la fin (t = 60 minutes). Le volume d'injection était de 20 µL, le débit était de 0.7 mL/min et la détection s'est effectuée à 280 nm.

La concentration en phénols totaux exprimée en équivalent d'acide gallique a été déterminée à l'aide d'une courbe étalon établie à des concentrations de 5 à 17.5 x 10<sup>-3</sup> % (p/v) de solution d'acide gallique dissout dans le même solvant que les échantillons de phénols d'érable (méthanol 10 %).

La concentration en phénols totaux (%) a été déterminée en prenant l'aire sommée des pics pour les différents extraits de phénols et en rapportant ces valeurs à la courbe étalon de l'acide gallique.

### **2.3. Mesure des propriétés antioxydantes**

Les propriétés antioxydantes des standards de composés phénoliques (énumérés à la section 2.1) et des extraits de phénols de sève et de sirop d'érable ont été mesurés selon deux méthodes. La première mesurant la capacité d'inhiber la peroxydation lipidique et la deuxième, le pouvoir de piégeage des radicaux libres.

#### **2.3.1. Mesure de l'inhibition de la peroxydation de liposomes**

Cette microtechnique est basée sur la technique de peroxydation non enzymatique des microsomes de foie de rat (Esterbauer *et al.*, 1982) modifiée par Lessard (1995). Cette méthode dose par spectrophotométrie la concentration de TBARS (thiobarbituric reactive substances) produits lors de la peroxydation de liposomes en présence de fer et d'acide ascorbique. Le malondialdéhyde (MDA) forme par traitement à la chaleur en milieu acide, un produit de condensation chromogénique avec l'acide thiobarbiturique (TBA).

#### **Préparation de la solution de liposomes**

Les liposomes ont été préparés selon la méthode de Batzri et Korn (1973) modifiée sans sonication. Cette méthode consiste à mélanger selon un ratio de 2:15:3 ; de l'acide linoléique (99 %) (Sigma), de l'éthanol (95 %) et du tampon phosphate 20 mM (pH 7,4). Ensuite, 1 mL de ce mélange est prélevé à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille

calibre 26 et injecté rapidement dans 9 mL de tampon phosphate 20 mM, dans un vial ambré. La solution de liposomes est rapidement barbotée à l'azote afin de prévenir l'auto-oxydation.

#### Préparation des solutions pour contrôles

Les contrôles positifs sont l'acide ascorbique (vitamine C) (Laboratoires Mat) pour les composés hydrosolubles tandis que l' $\alpha$ -tocophérol (vitamine E) (Sigma) est utilisé pour les composés liposolubles. Des solutions de chacun de ces composés sont préparées à une concentration de 1.25 mg/mL. Des dilutions sont par la suite effectuées afin d'obtenir des concentrations finales respectives de 313 et 79  $\mu$ g/mL. Les contrôles négatifs sont constitués d'eau distillée pour les composés hydrosolubles ou d'éthanol pour les liposolubles.

#### Préparation du milieu réactionnel (liposomes)

Le milieu réactionnel contient 4 mL de la solution de liposomes, 2.25 mL de tampon phosphate 20 mM (pH 7.4) et 0.25 mL de solution d'acide ascorbique (3.1 mg/mL).

Les échantillons (1.3 mg/mL) et les contrôles positif et négatif sont répartis (25  $\mu$ L) dans la microplaque (96 puits). Le milieu réactionnel (65  $\mu$ L) est ajouté à l'aide d'une pipette multichannel. Ensuite, 10  $\mu$ L de solution de FeCl<sub>3</sub> (Sigma) à 4.3mg/mL est ajouté aux puits.

La microplaque est incubée à 37 °C pour 15 minutes. Cent cinquante microlitres d'une solution fraîche d'un mélange (1 : 2) d'une solution de SDS 10 % (Sigma) et d'une solution d'acide thiobarbiturique (0.67 %) (Sigma) sont répartis dans la microplaque. La réaction colorimétrique est produite à 80 °C pendant 30 minutes et à 20 °C pendant 30 minutes supplémentaires. Le contenu en TBARS est évalué par une mesure de densité optique (D.O.) à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre automatique (Microplate Autoreader EL 309, Biotek Instruments, Winooski, VT, USA).

## Calcul de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante est calculée à l'aide de la formule suivante (Lessard, 1995) :

$$\frac{((\text{moy D.O.ctl}^-) + (\text{E.T.D.O.ctl}^-)) - (\text{D.O.échant.})}{((\text{moy D.O.ctl}^-) + (\text{E.T.D.O.ctl}^-)) - (\text{moy D.O.ctl}^+)} \times 100 = \% \text{ activité antioxydante}$$

où: moy. D.O.ctl<sup>-</sup> = moyenne des D.O. des contrôles négatifs.

E.T. D.O.ctl<sup>-</sup> = écart-type des D.O. des contrôles négatifs

moy. D.O.ctl<sup>+</sup> = moyenne des D.O. des contrôles positifs à 313 µg/mL.

D.O. échant. = D.O. de l'échantillon analysé à une concentration donnée dans ce cas-ci 313 µg/mL.

Les contrôles négatifs sont ceux où il n'y a pas d'antioxydant. La densité optique de ces contrôles est plus élevée puisque plus de TBARS sont formés par l'oxydation complète des liposomes. Les contrôles positifs sont des antioxydants connus (vitamine C et E) et le pouvoir antioxydant est mesuré par rapport à la densité optique de ces contrôles positifs.

### 2.3.2. Évaluation du pouvoir de piégeage des radicaux libres

La détermination du pouvoir antioxydant mesurant la capacité de piégeage des radicaux libres a été effectuée selon la méthode de Le Tien *et al.* (2001). Deux cents microlitres de l'échantillon à tester (1.25 mg/mL) est ajouté dans une cellule contenant 3 mL de solution saline 0.15 M et est soumis à l'électrolyse utilisant un générateur (modèle 1000/500, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) pour une minute à un courant continu de 400 V, 10 mA.

#### Contrôles

La réaction est calibrée en utilisant pour contrôle négatif la solution saline non électrolysée à laquelle est ajoutée 200 µL du solvant ayant servi à dissoudre l'échantillon à tester. Ceci représente une capacité de piégeage des radicaux libres de 100 %. La solution saline électrolysée contenant 200 µL du solvant dans lequel est dissous l'échantillon analysé constitue le contrôle positif et forme 100 % de radicaux libres, représentant 0 % de pouvoir de piégeage des radicaux libres.

### Évaluation du contenu en radicaux libres

Après électrolyse, un volume de 200  $\mu$ L de la solution traitée est prélevé et ajouté à une cuvette pour spectrophotométrie. Deux millilitres d'une solution de N,N, diéthyl-p-phenylenediamine (DPD) (Sigma-Aldrich) à 25 mg/mL est ajouté à la solution traitée. Les particules oxydées réagissent instantanément avec le DPD et produisent une coloration rouge qui est mesurée au spectrophotomètre (modèle UV4 de Unicam, Cambridge, Ang., UK) à 515nm.

Le pouvoir antioxydant est représenté par la capacité d'une substance à empêcher l'accumulation de produits de l'oxydation tels que les radicaux libres de l'oxygène. Ces produits qui réagissent avec le DPD empêchant l'apparition de la coloration rouge de l'échantillon à 515 nm. Une relation inverse est observée entre la capacité oxydante et la mesure de la densité optique.

### Calcul du pouvoir de piégeage des radicaux libres

Le pourcentage de piègeur de radicaux libres ou de pouvoir antioxydant est calculé suivant cette équation (LeTien *et al.*, 2001):

$$\text{Pouvoir de piégeage des radicaux (\%)} = 100 - \left[ \frac{DO_{\text{échantillon}} - DO_{\text{ctl-}}}{DO_{\text{ctl+}} - DO_{\text{ctl-}}} \times 100 \right]$$

où  $DO_{\text{échantillon}}$  représente la densité optique à 515nm, de la solution électrolysée (solution saline contenant 200 $\mu$ L de composés phénoliques 1.25 mg/mL) et  $DO_{\text{ctl+}}$  est la densité optique du contrôle positif soit, la solution saline électrolysée, additionnée du solvant, en absence de composés phénoliques.  $DO_{\text{ctl-}}$  est la densité optique du contrôle négatif.

Un composé ayant un pouvoir antioxydant de 100 % est un composé capable de réduire complètement le niveau de radicaux libres dans la solution saline pendant l'électrolyse.

Pour les deux méthodes utilisées, nous avons classé un antioxydant ainsi : un composé ayant un fort pouvoir antioxydant est un composé ayant un pouvoir antioxydant supérieur

ou égal à 70 %. Un composé possédant une activité antioxydante entre 40 et 70 % est considéré antioxydant moyen. Une substance ayant un pouvoir antioxydant en dessous de 40 % est considérée n'avoir aucune activité antioxydante.

#### **2.4. Propriétés antimutagènes**

Le test Umu tel que défini par Oda *et al.* (1985), a été utilisé pour l'étude des propriétés antimutagènes. Le test se base sur la mesure de la production de  $\beta$ -galactosidase par *Salmonella typhimurium* (TA1535/pSK1002) portant un plasmide contenant un gène de fusion *umuC-lacZ*. Ce gène est responsable de la production de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase lorsqu'il y a mutation de l'ADN de la bactérie. En effet, le gène *umuC* code pour le système SOS de réparation de l'ADN chez la bactérie et *lacZ* pour la production de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase. Les composés à tester sont mis en présence d'agents mutagènes et l'antimutagénéicité est mesurée par rapport à un contrôle contenant seulement le produit mutagène. Les propriétés antimutagènes ont été évaluées *per se* et après métabolisation hépatique par fraction S9 de foie de rat.

##### **2.4.1. Propriétés antimutagènes *per se***

L'évaluation des propriétés antimutagènes *per se* des composés phénoliques extraits de la sève et du sirop d'érable a été effectuée. Les extraits phénoliques totaux ainsi que les glycosylés et aglycones ont été analysés.

##### **Agent mutagène**

Le dichromate de potassium (Sigma-Aldrich, Oakville, Ont., Canada) solubilisé dans l'eau distillée est utilisé comme produit mutagène pour l'étude de l'antimutagenecité *per se*. Il est mis en solution dans l'eau distillée et utilisé à une concentration pour ce test de 84  $\mu\text{g/mL}$ .

## Contrôles

Le contrôle positif est composé de la culture bactérienne mise en présence du produit mutagène seul soit le dichromate de potassium. Le contrôle négatif est la culture bactérienne avec le solvant utilisé pour dissoudre les produits à tester soit une solution aqueuse de méthanol à 10 % pour les extraits glycosylés et totaux et méthanol 100 % pour les composés aglycones.

### 2.4.2. Propriétés antimutagènes des métabolites

Les propriétés antimutagènes des extraits phénoliques totaux, glycosylés et aglycones ont également été évaluées après métabolisation hépatique. Pour ce faire, une fraction S9 de foie de rat traité à l'Aroclor est utilisée. Cette fraction contient des enzymes du cytochrome P450 qui sont responsables pour la plupart des réactions métaboliques xénobiotiques.

## Agent mutagène

La quercétine, solubilisée dans une solution aqueuse de NaOH 0.33 N à une concentration de 313 µg/mL est le produit mutagène utilisé pour l'étude de l'antimutagénéicité après action de la fraction S9 ou après action des enzymes hépatiques (Oda *et al.*, 1985).

## Contrôles

Le contrôle positif est composé de la culture bactérienne mise en présence du produit mutagène seul c'est-à-dire, la quercétine et de solution de fraction S9. Le contrôle négatif ou blanc est la culture bactérienne avec les solvants utilisés pour dissoudre les extraits phénoliques de l'érable, soit le méthanol à 10 % pour les composés glycosylés et méthanol 100 % pour les composés aglycones.

## Test Umu

*Salmonella choleraesuis* a été cultivée pendant 16 heures à 37 °C dans le milieu TGA (Whong *et al.*, 1986). La culture a été diluée 1/10 dans le milieu TGA et incubée à 37 °C

pendant deux heures ou jusqu'à ce que la D.O. de la culture soit de 0.25-0.3 afin de permettre l'obtention d'une culture bactérienne en phase logarithmique de croissance. Ensuite, 1 mL de culture bactérienne ou de milieu TGA (blanc) a été distribué dans des tubes à essai. Le tampon phosphate (0.1 M) stérile à pH 7.4 a été utilisé pour les tests d'antimutagénicité *per se*. La solution de fraction S9 a été ajoutée pour l'évaluation de l'antimutagénicité des produits de dégradation des composés. Le tampon phosphate ou la solution S9 étaient ajoutés dans chaque tube selon le cas à un volume de 208  $\mu$ L. Quarante-deux microlitres de produit à analyser (composés testés) ou du solvant dans lequel il a été dissous (contrôle négatif) a été ajouté dans chaque tube. Les échantillons de composés phénoliques utilisés ont une concentration de 2.5 mg/mL. Finalement, 42  $\mu$ L du produit mutagène, le dichromate de potassium (84  $\mu$ g/mL) pour l'antimutagénicité *per se* ou quercétine (313  $\mu$ g/mL) pour l'antimutagénicité après métabolisation hépatique, a été ajouté aux tubes contenant le mélange. Ce mélange a été incubé avec agitation durant 2h à 37 °C.

Par la suite, 50  $\mu$ L du mélange a été prélevé pour déterminer l'activité de la  $\beta$ -galactosidase et la mesure de densité optique à 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) a été prise avec le mélange restant afin de mesurer la croissance bactérienne.

#### Dosage de la $\beta$ -galactosidase

Les 50  $\mu$ L de culture bactérienne prélevées précédemment ainsi que 100 $\mu$ L d'O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) (Sigma) ont été ajoutés à des tubes à essai contenant 450  $\mu$ L de tampon B, préparé tel que rapporté par Whong *et al.* (1986) avec 16.1 g de  $Na_2HPO_4$ , 5.5 g de  $NaH_2PO_4$  (Laboratoires Mat), 0.75 g de KCl (Fisher), 0.25 g de  $MgSO_4 - 7H_2O$  (Baker), 1 g de SDS (Sigma), 2.7 mL de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma) et 1 L d'eau distillée à pH 7. Ensuite, les tubes ont été mis dans un bain à 28 °C pendant 25 minutes. La réaction enzymatique a été arrêtée par l'ajout de 400  $\mu$ L de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) (1 M) (Fisher). La densité optique à 420 nm et à 550 nm a été prise à l'aide d'un spectrophotomètre (modèle UV4 de Unicam, Cambridge, Ang., UK).

## Antimutagénéicité

Le pouvoir d'inhibition de la mutagénéicité est calculé comme suit :

$$\text{Antimutagénéicité (\%)} = (\text{unité } \beta\text{-gal ctl}^+ - \text{unité } \beta\text{-gal échantillon}) / \text{unité } \beta\text{-gal ctl}^+ \times 100$$

Les unités  $\beta$ -galactosidase sont calculées selon la formule de Miller (1972) :

$$1000 \times (\text{DO}_{420\text{nm}} - 1.75 \text{ DO}_{550\text{nm}}) / T \times V \times \text{DO}_{600\text{nm}}$$

où : T est le temps (min) de la réaction enzymatique, V le volume (mL) de culture bactérienne ou d'enzyme,  $\text{DO}_{420\text{nm}}$  la densité optique à 420 nm servant à mesurer la  $\beta$ -galactosidase,  $\text{DO}_{550\text{nm}}$ , la densité optique à 550 nm mesurant l'interférence des débris cellulaires et  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  la densité optique à 600 nm, mesurant la turbidité de la culture cellulaire.

### 2.5. Analyse statistique

Cette expérience a été effectuée en utilisant trois échantillons analysés en duplicata. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SPSS pour Windows. L'analyse de la variance a été faite par ANOVA et les différences significatives entre les moyennes ont été déterminées par Duncan's multiple range test ( $p \leq 0.05$ ).

### 3. Résultats

#### 3.1. Extraction des composés phénoliques

L'extraction des composés phénoliques d'échantillon de sève et de sirop d'érable à différentes périodes de la saison a permis d'obtenir les quantités moyennes en fonction de la période saisonnière et ces résultats sont présentés au tableau 1. Les résultats montrent que les quantités de composés phénoliques moyennes extraits de la sève sont similaires ( $p > 0.05$ ) jusqu'à 75 % de la saison avec des valeurs entre 3.79 et 4.10 mg. Alors qu'à la fin de la saison, une quantité significativement ( $p \leq 0.05$ ) plus grande est extraite de la sève donnant une valeur de 6.58 mg.

Pour ce qui est du sirop, même si une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) est observée à 25 et 50 % de la saison, avec des valeurs respectives de 4.58 et 4.51 mg, une augmentation de 56 % est observée à 100 % de la saison, donnant une valeur maximum de 12.01 mg comparativement à 5.30 mg au début de la saison.

**Tableau 1.** Masse moyenne des extraits de phénols totaux (acides phénoliques et flavonoïdes) récupérés d'échantillons de sève et de sirop d'érable recueillis à différentes périodes de la saison

Périodes de la saison (%) <sup>a</sup>	Masse sèche (mg)/500 mL de sève ou sirop dilué <sup>b</sup>	
	Sève	Sirop
0	4.10 ± 0.91a	5.30 ± 0.53b
25	3.79 ± 0.49a	4.58 ± 0.52a
50	3.95 ± 0.84a	4.51 ± 0.51a
75	3.96 ± 0.43a	5.16 ± 0.46ab
100	6.58 ± 0.68b	12.01 ± 0.93c

<sup>a</sup> 0 % équivaut au début de la saison et 100 % à la fin de la saison.

<sup>b</sup> Les extraits ont été obtenus à partir d'un volume de 500 mL de sève et de 500 mL de sirop dilué (1:33)

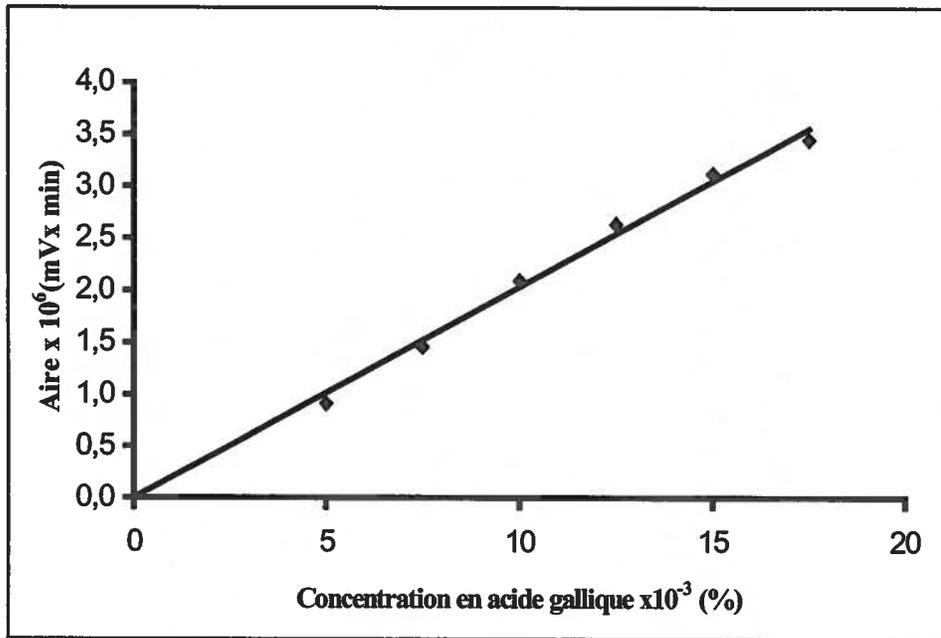
Les résultats représentent la moyenne de triplicata ± écart-type et les lettres différentes d'une même colonne indiquent une différence significative entre les moyennes ( $p > 0.05$ ).

### 3.2. Dosage des phénols totaux des extraits d'érable

La concentration en phénols totaux des extraits, exprimée en équivalent d'acide gallique, a été mesurée par la somme des aires sous la courbe de chacun des pics des chromatogrammes illustrés aux figures 8 et 9 et d'une courbe standard d'acide gallique (figure 7).

Le tableau 2 démontre que les extraits de sirop contiennent en général plus de composés phénoliques que la sève. À 75 % de la saison, il y a une baisse de la concentration de phénols totaux retrouvés aussi bien dans la sève que dans le sirop, suivie d'une hausse significative ( $p \leq 0.05$ ) à la fin de la saison.

Du début à la moitié de la saison, le contenu phénolique de la sève est stable avec des valeurs allant de 16.51 à 19.02 x 10<sup>-3</sup> équivalents acide gallique. À 75 % de la saison, une baisse significative ( $p \leq 0.05$ ) survient avec une valeur de 8.51 x 10<sup>-3</sup> équivalents acide gallique. En fin de saison, une hausse significative donne la valeur maximale pour la sève de 24.69 x 10<sup>-3</sup> équivalents acide gallique. Pour ce qui est du sirop, le contenu en phénols totaux diminuent significativement entre 0 et 25 %, de 63.81 à 54.88 x 10<sup>-3</sup> équivalents acide gallique. Une baisse significative ( $p \leq 0.05$ ) est observée à 50 et 75 % de la saison avec des valeurs respectives de 34.71 et 17.81 x 10<sup>-3</sup> équivalents acide gallique. À la fin de la saison, le contenu augmente significativement et atteint la valeur de 59.41, qui est comparable à celles obtenues en début de saison.



**Figure 7.** Courbe étalon du dosage des phénols totaux par HPLC

L'équation de la droite est :  $y = 2.03 \times 10^7 x$  ;  $R^2 = 0.991$

**Tableau 2.** Concentration équivalent d'acide gallique, d'extraits de phénols totaux de sève et de sirop d'érable recueillis à différentes périodes de la saison des sucres 2002

Périodes de la saison (%) <sup>a</sup>	Equivalent acide gallique x10 <sup>-3</sup> (%) <sup>b</sup>	
	Sève	Sirop
0	16.51 ± 0.28b	63.81 ± 1.36d
25	17.13 ± 1.68b	54.88 ± 4.30c
50	19.02 ± 1.95b	34.72 ± 4.26b
75	8.51 ± 0.67a	17.81 ± 2.57a
100	24.69 ± 1.28c	59.41 ± 3.74c

<sup>a</sup> 0 % équivaut au début de la saison et 100 % à la fin de la saison.

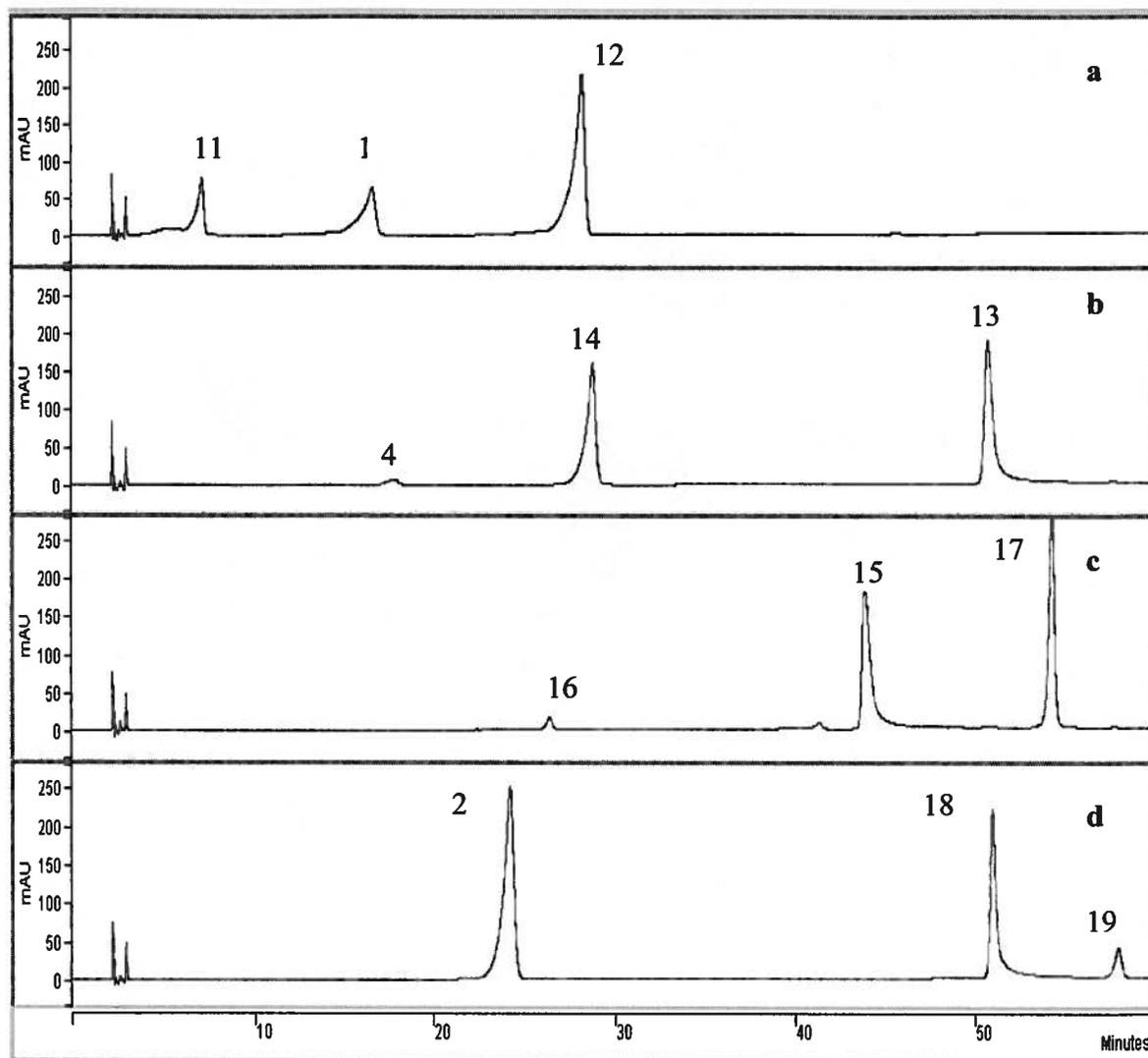
<sup>b</sup> Equivalent acide gallique est mesuré à l'aide du HPLC, les résultats obtenus représentent la moyenne de duplicata ± écart-type et les lettres différentes d'une même colonne indiquent une différence significative entre les moyennes ( $p > 0.05$ ).

### 3.3. Analyse HPLC des extraits phénoliques totaux

L'analyse au HPLC des extraits de phénols totaux a permis d'évaluer le profil et le contenu en acides phénoliques et en flavonoïdes. Le profil d'élution des composés phénoliques standards est présenté à la figure 8. De plus, au tableau 3 il peut être observé que les acides vanillique (16.87 min), homovanillique (17.18 min) et la (+)-catéchine (17.59 min) ont des temps de rétention similaires. Les résultats montrent également que les acides chlorogénique (20.86 min), caféique (20.93 min) et syringique (21.68 min) sont élués pratiquement en même temps. Les acides phénoliques autant hydroxybenzoïques que hydroxycinnamiques éluent avant 35 minutes (min) sauf pour l'acide éllagique qui élue à 38.13 min. Les acides hydroxybenzoïques sont élués avant les hydroxycinnamiques. Les flavonoïdes éluent la plupart après 35 min, à l'exception de la (+)-catéchine (17.59 min) et de l'(-)-épicatéchine (26.71 min).

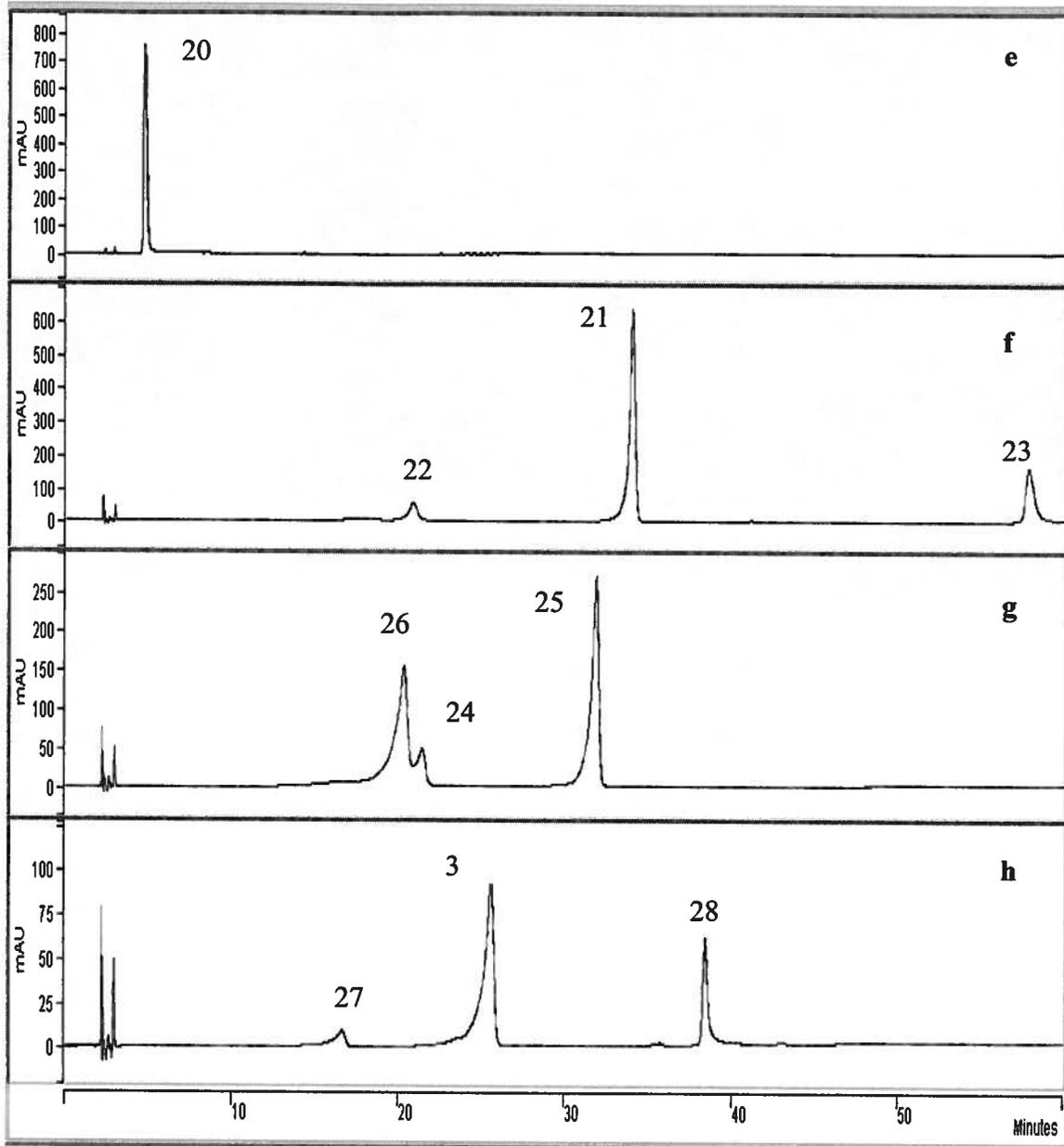
La figure 8 illustre les différents chromatogrammes des composés phénoliques totaux extraits de la sève d'érable au cours de la saison. Les profils d'élution en début de saison ont une certaine similarité (figure 8a et b). À 50 % de la saison (figure 8c), les pics 2 (22.85 min) et 3 (26.45 min) diminuent significativement d'intensité par rapport au début de la saison. Les pics 4 (35.0 min) et 5 (36.5 min) sont des pics majeurs qui sont présents du début à la fin de la saison. Le pic 6 (48.56 min) qui est élué à la fin est également présent durant toute la saison. Il y a augmentation de l'intensité des pics 1, 4, 5 et 6 entre 0 et 50 % de la saison, suivi d'une baisse à 75 % de la saison, pour finalement augmenter de nouveau à la fin de la période saisonnière.

La figure 9 montre les chromatogrammes des extraits de phénols totaux du sirop d'érable aux différentes périodes de la saison. Les résultats indiquent que les profils d'élution à 0 et 25 % de la saison (figure 9a et 9b) sont pratiquement identiques. De plus, le pic 6 (48.56 min) est retrouvé à toutes les périodes de la saison en intensité semblable, ce pic était également présent dans la sève (figure 8). À 75 % de la saison, l'apparition de deux pics, 7 et 8, respectivement à 3.85 et 6.00 min est observable (figure 9d). À la fin de la saison (figure 9e), ces deux pics, 7 et 8 sont prédominants.



**Figure 8.** Chromatogrammes des composés phénoliques standards

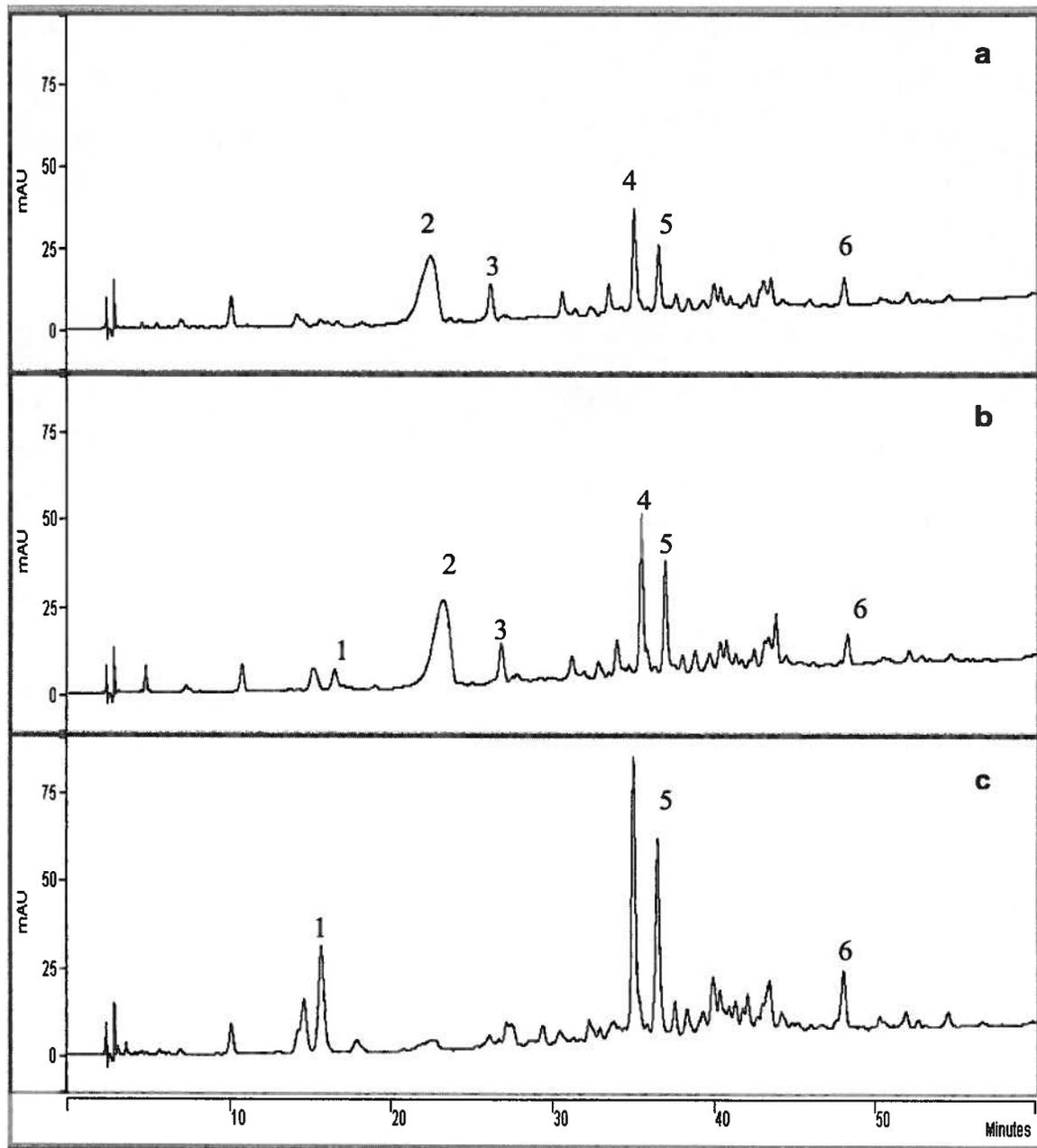
**a)** acide protocatéchuique (11), acide vanillique (1), acide p-coumarique (12) ;  
**b)** syringaldéhyde (4), quercétine (13), catéchine (14) ; **c)** myricétine (15),  
 épicatechine (16), hespétine (17) ; **d)** vanilline (2), lutéoline (18), 4'-  
 hydroxyflavanone (19) ; **e)** acide gallique (20) **f)** acide sinapique (21), acide  
 chlorogénique (22), kaempferol (23) ; **g)** acide syringique (24), acide férulique  
 (25), acide caféique (26) ; **h)** coniférol (3), acide homovanillique (27), acide  
 ellagique (28)



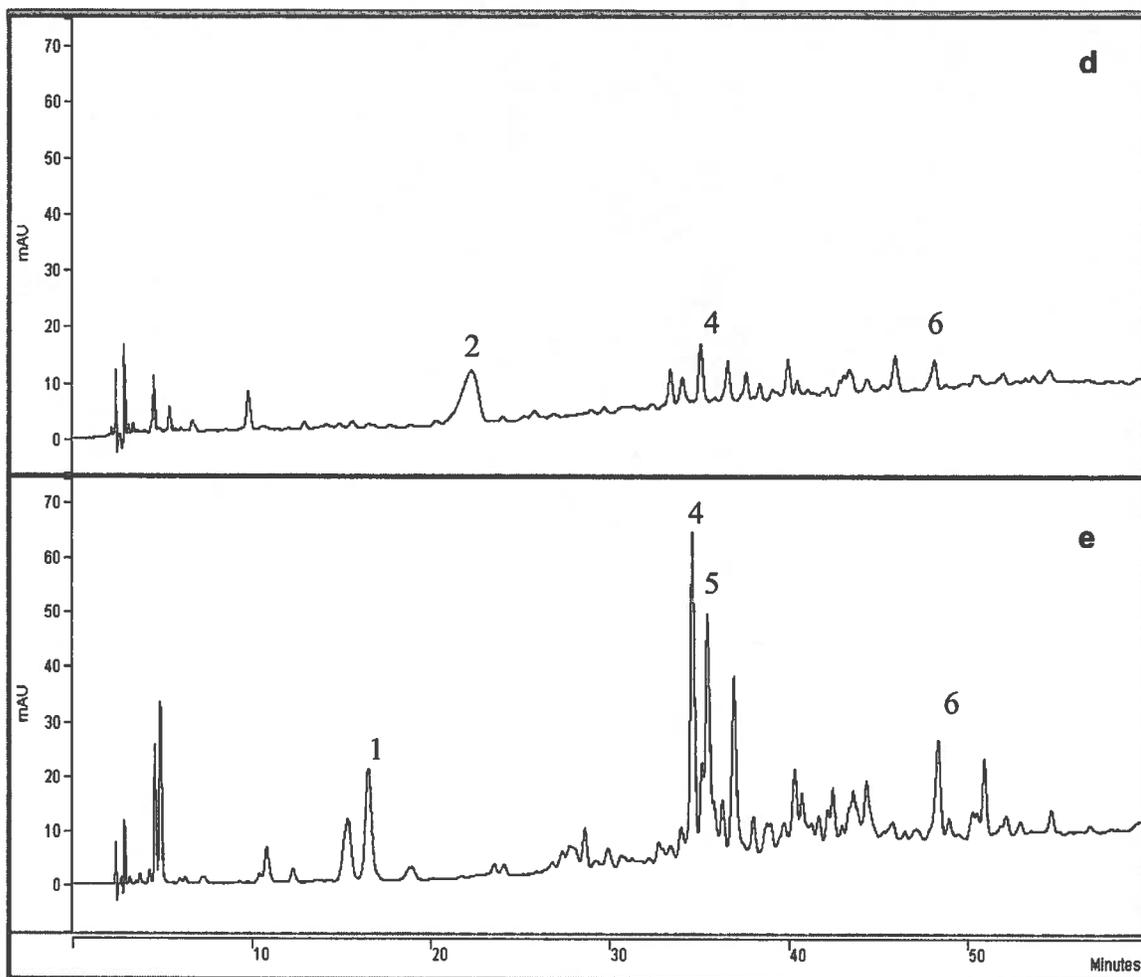
**Tableau 3.** Analyse HPLC des composés phénoliques standards

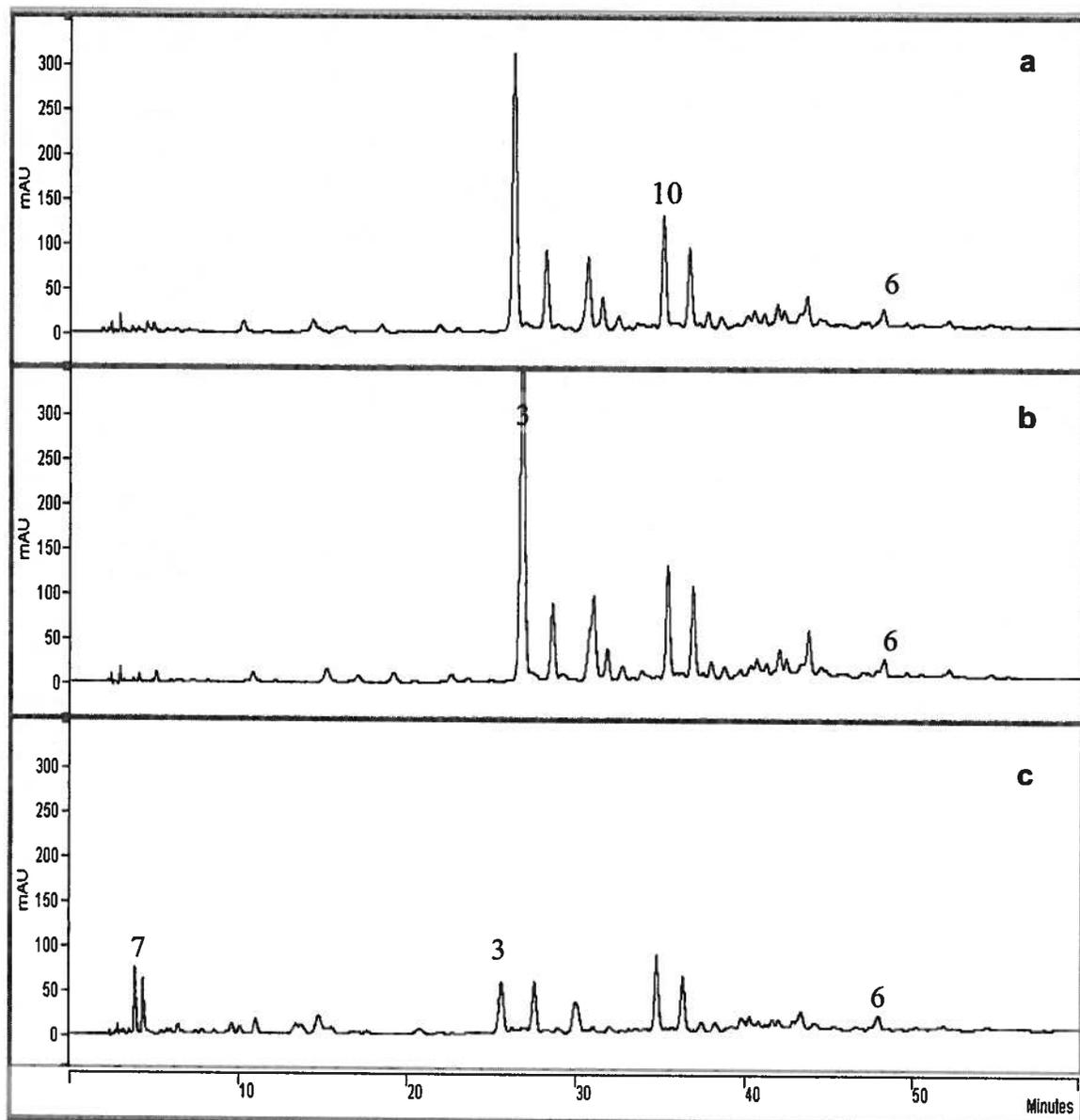
Composés standards	Temps de rétention <sup>a</sup> (min)	N° pic	Écart-type <sup>b</sup>	$\lambda_{\max}$ (nm) <sup>c</sup>
Acide gallique	4.73	20	0.04	216, 271
Acide protocatéchuique	7.47	11	0.58	219, 259, 294
Acide vanillique	16.87	1	0.49	220, 260, 292
Acide homovanillique	17.18	27	0.81	217, 279
(+)-Catéchine	17.59	14	0.21	226, 278
Acide chlorogénique	20.86	22	0.11	223, 239, 289, 327
Acide caféique	20.93	26	0.95	220, 248, 298, 324
Acide syringique	21.68	24	0.43	218, 274
Vanilline	24.15	2	0.02	226, 279, 309
Coniférol	26.32	3	1.05	216, 263, 296
(-)-Épicatéchine	26.71	16	0.57	226, 278
Syringaldéhyde	28.68	4	0.02	228, 308
Acide p-coumarique	28.76	12	0.93	230, 309
Acide férulique	32.21	25	0.55	219, 237, 296, 323
acide sinapique	33.84	21	0.13	234, 324
Acide ellagique	38.13	28	0.35	253, 367
Myricétine	43.73	15	0.07	253, 375
Quercétine	50.44	13	0.21	255, 373
Lutéoline	50.91	18	0.04	252, 350
Hespéretine	54.14	17	0.06	228, 287
kaempferol	57.49	23	0.31	265, 368
4'-hydroxyflavanone	58.06	19	0.18	254, 324

<sup>a</sup> Temps de rétention moyen<sup>b</sup> Écart-type des temps de rétention moyen<sup>c</sup> Longueurs d'onde des maxima d'absorbance

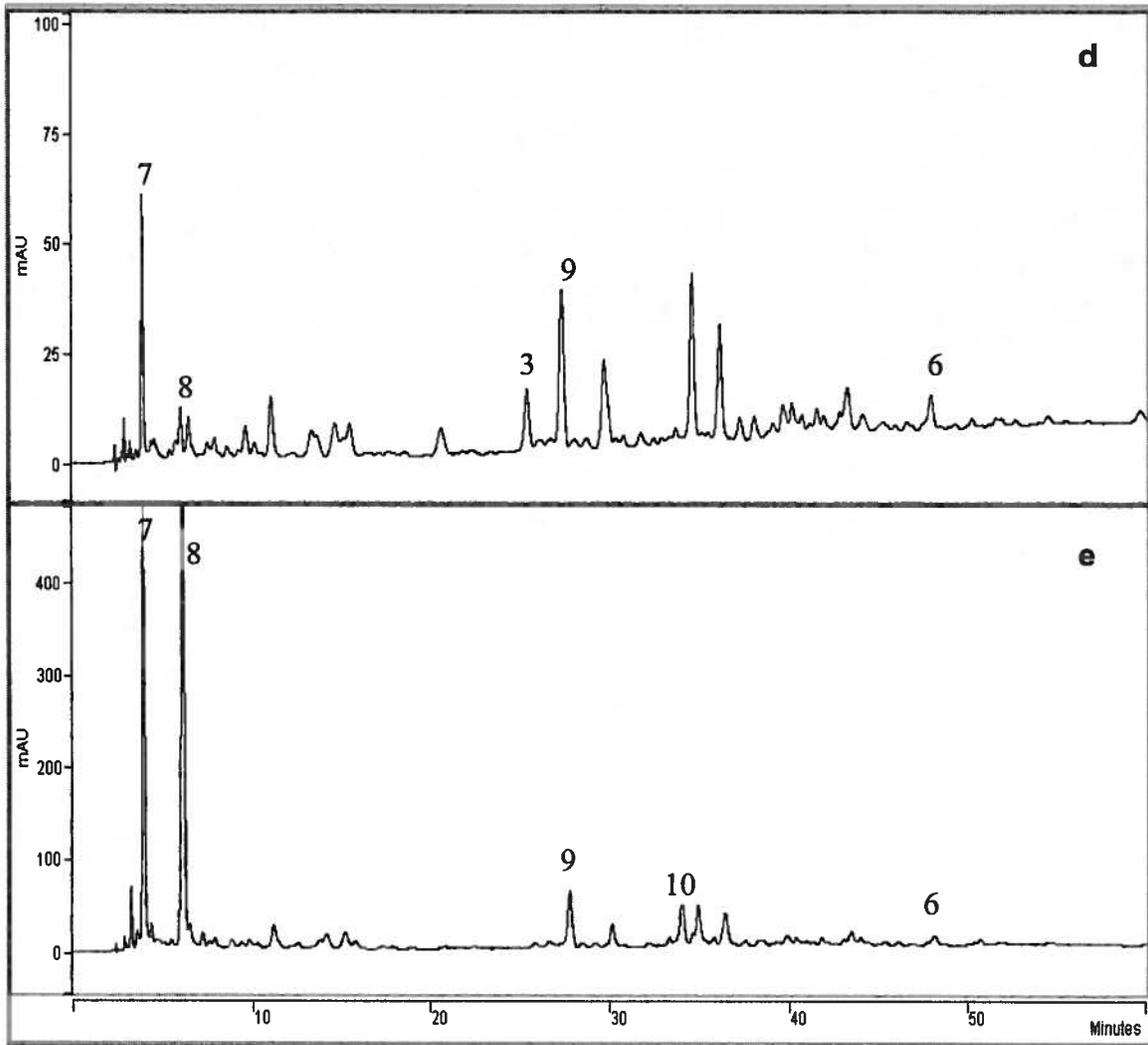


**Figure 9.** Chromatogrammes d'analyse HPLC d'extraits de composés phénoliques de sève d'érable à : a) 0 %, b) 25 %, c) 50 %, d) 75 % et e) 100 % de la saison obtenu à l'aide d'un détecteur UV à barrettes de diode à 280 nm.





**Figure 10.** Chromatogrammes d'analyse HPLC d'extraits de composés phénoliques de sirop d'érable obtenus à a) 0%, b) 25%, c) 50%, d) 75% et e) 100% de la saison à l'aide d'un détecteur UV à barrettes de diode à 280 nm.



La comparaison des chromatogrammes illustrés aux figures 9 et 10 et des valeurs affichées au tableau 3, pour les composés phénoliques standards, a permis de tenter d'établir une identification. Le pic 1 (16.43 min), un acide hydroxybenzoïque (figure 2), est similaire à celui obtenu pour l'acide vanillique. En effet, le temps de rétention et les maxima d'absorbance correspondent à ceux du standard. La vanilline est aussi un composé retrouvé aux différentes périodes de la saison dans la sève d'érable et peut être associée au pic 2 (24.90 min). Le pic 3 (26.45 min), qui appartient à la classe des acides hydroxybenzoïques semblerait être le coniférol. Le pic 4 (28.32 min) serait par comparaison au standard le syringaldéhyde. Le pic 5 serait un acide hydroxycinnamique contenu de son temps d'élution et de son profil d'absorbance. Le composé représenté au pic 6 appartiendrait à la famille des flavonols. Les pics 7 et 8 illustreraient des composés de dégradation ou des phénols simples tel un dérivé d'acide hydroxybenzoïque. Les pics 9 et 10 retrouvés dans les extraits phénoliques de sirop d'érable (figure 10) seraient de la classe des acides hydroxycinnamiques.

### 3.4. Séparation des extraits de phénols totaux

Les extraits de composés phénoliques totaux obtenus après extraction dans l'acétate d'éthyle ont par la suite été élués à l'aide de deux solvants sur une colonne contenant de la résine XAD-2 afin de séparer les composés glycosylés et aglycones. Les quantités de ces composés (glycosylés et aglycones) sont illustrées au tableau 4.

Les résultats montrent que le contenu en composés glycosylés est stable dans la sève, avec des valeurs variant entre 2.49 et 3.03 mg. Dans le sirop, les quantités varient un peu plus que dans la sève. En effet, les valeurs obtenues à 25 et 50 % de la saison sont significativement différentes ( $p \leq 0.05$ ) entre elles et avec les autres valeurs étant respectivement de 4.83 et 2.74 mg. Il n'y a pas de différence significative ( $p > 0.05$ ) entre les valeurs à 0, 75 et 100 % de la saison et celles-ci sont respectivement de 3.90, 3.65 et 3.80 mg. Les quantités de composés aglycones varient plus que les glycosylés durant la saison. Une hausse significative ( $p \leq 0.05$ ) est remarquée à mi-saison pour la sève, tandis que pour le sirop, l'augmentation survient à 75 % de la saison pour atteindre 2.08 mg. En général, la quantité de composés glycosylés des extraits est plus élevée que la quantité des aglycones.

Les résultats montrent que dans la sève il y a une augmentation graduelle de 1.44 à 3.23 mg entre 0 et 75 % de la saison. Aucune différence significative n'est présentée pour les valeurs à 50 et 75 % de la saison, indiquant un maximum à mi-saison. À la fin de la saison, une baisse significative ( $p \leq 0.05$ ) est observable. Dans le sirop, les valeurs sont plus faibles avec un optimum observé de 2.08 mg à 75 % de la saison. On observe aussi une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) à 1.23 à la fin de la saison.

**Tableau 4.** Masse moyenne des extraits de phénols totaux séparés (glycosylés et aglycones) sur résine XAD-2 récupérée d'échantillons de sève et de sirop d'érable recueillis à différentes périodes de la saison des sucres 2002

Produit de l'érable	Période de la saison (%) <sup>a</sup>	Masse (mg) <sup>b</sup>	
		Glycosylés	Aglycones
Sève	0	3.00 ± 0.19ab	1.44 ± 0.27a
	25	2.49 ± 0.44a	1.90 ± 0.26bc
	50	2.64 ± 0.17a	3.08 ± 0.11d
	75	2.63 ± 0.24a	3.23 ± 0.22d
	100	3.03 ± 0.34ab	2.10 ± 0.28c
Sirop	0	3.90 ± 0.15c	1.40 ± 0.03a
	25	4.83 ± 0.21d	1.48 ± 0.04ab
	50	2.74 ± 0.18a	1.19 ± 0.25a
	75	3.65 ± 0.21bc	2.08 ± 0.15c
	100	3.80 ± 0.38c	1.23 ± 0.21a

<sup>a</sup> 0 % équivaut au début de la saison et 100 % à la fin de la saison.

<sup>b</sup> Les extraits ont été obtenus après élution de 16 heures sur résine XAD-2 avec deux solvants différents (Méthanol 60 % et Méthanol: acétonitrile 1:1).

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

### **3.5. Propriétés antioxydantes**

Les propriétés antioxydantes des standards de composés phénoliques et des extraits phénoliques totaux et séparés de la sève et du sirop d'érable ont été analysées par deux méthodes. La première mesurant le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique et la deuxième le pouvoir de piégeage des radicaux libres.

#### **3.5.1. Propriétés antioxydantes des composés phénoliques standards**

Les résultats d'analyse du pouvoir antioxydant des standards d'acides phénoliques sont illustrés au tableau 5. Les valeurs d'activité antioxydante montrent que l'acide caféique avec une valeur de  $101 \pm 3 \%$ , est l'acide phénolique ayant le meilleur pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique. Par contre, il a un plus faible pouvoir de piégeage des radicaux libres dont la valeur obtenue est de  $67 \pm 5 \%$ . Le syringaldéhyde a le meilleur pouvoir de piégeage des radicaux libres ( $96 \pm 3 \%$ ) des acides phénoliques analysés et inhibe à une valeur de  $49 \pm 6 \%$  la peroxydation lipidique.

Des groupes de composés ayant des propriétés distinctes peuvent être observés au tableau 5 pour les deux méthodes d'évaluation de l'activité antioxydante. En effet, il n'y a pas de différence significative ( $p > 0.05$ ) entre le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique de l'acide homovanillique ( $62 \pm 4 \%$ ), de la vanilline ( $58 \pm 6 \%$ ) et du syringaldéhyde ( $49 \pm 6 \%$ ) et ce pouvoir est faible. Le groupe constitué des acides protocatéchuique, syringique, férulique et sinapique démontre un bon pouvoir antioxydant qui se situe entre 79 et 97 %. Aucune différence significative n'a d'ailleurs été observée entre ces composés.

Pour ce qui est du pouvoir de piégeage des radicaux libres, les acides vanillique ( $69 \pm 4 \%$ ), homovanillique ( $76.6 \pm 0.5 \%$ ) et syringique ( $79 \pm 3 \%$ ) ainsi que le coniféral ( $71 \pm 2 \%$ ) offrent une activité antioxydante moyenne et similaire. Il n'y a pas de différence significative ( $p > 0.05$ ) entre l'activité antioxydante de la vanilline ( $91 \pm 4 \%$ ), du syringaldéhyde ( $96 \pm 3 \%$ ), et des acides p-coumarique ( $90 \pm 3 \%$ ) férulique ( $94 \pm 3 \%$ ) et

sinapique ( $88 \pm 7 \%$ ) en regard au pouvoir de piégeage des radicaux libres. L'acide protocatéchuique a la plus faible valeur,  $41 \pm 2 \%$ .

Les flavonoïdes ont été étudiés pour leurs propriétés antioxydantes et en général ils démontrent un meilleur pouvoir antioxydant que les acides phénoliques (tableau 6). La quercétine est le flavonoïde qui présente le meilleur pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique donnant une valeur de  $105 \pm 5 \%$ . Les 2'-hydroxyflavnanone, 4'-hydroxyflavanone et 6'-hydroxyflavanone, ainsi que l'hespéretine ont un très faible pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique avec des valeurs respectives de  $48 \pm 6$ ,  $37 \pm 6$ ,  $59 \pm 5$  et  $46 \pm 6 \%$ . De plus, aucune différence significative ( $p > 0.05$ ) n'est observable entre ces valeurs. En fait, parmi les flavanones étudiés, seules la catéchine et l'épicatéchine affichaient un très bon pouvoir antioxydant de  $98 \%$ .

Pour ce qui est de la capacité à piéger les radicaux libres de l'oxygène, elle est très bonne pour les flavonols étudiés variant entre 93 et 95 %. De plus, aucune différence significative ( $p > 0.05$ ) n'a été observée. Les 4'-hydroxyflavnanone et 6'-hydroxyflavanone affichaient un pouvoir de piégeage des radicaux libres élevé, toutefois significativement plus faible ( $p \leq 0.05$ ) que les autres flavonoïdes étudiés. Les valeurs respectives observées étaient de  $85 \pm 2$  et  $86 \pm 5 \%$ . Les autres flavanones analysées, soient la 2'-hydroxyflavanone, l'hespéretine, la catéchine et l'épicatéchine, affichaient des valeurs respectives de  $90 \pm 3$ ,  $95 \pm 5$ ,  $95 \pm 5$  et  $91 \pm 5 \%$ .

Les composés phénoliques glycosylés standards analysés présentaient un bon pouvoir de piégeage des radicaux libres. La rutine, un composé glycosylé de quercétine, avait le meilleur pouvoir antioxydant et antiradicalaire parmi les composés étudiés (tableau 7). En effet, la rutine a montré un pouvoir de piégeage des radicaux libres de 100 %. La quercitrine, un autre composé glycosylé de la quercétine, possède un faible pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique ( $58 \pm 4 \%$ ), mais un très bon pouvoir de piégeage des radicaux libres avec une valeur de  $94 \pm 3 \%$ . L'hesperidine et la rhoifoline ont tous deux une capacité de piéger les radicaux libres de 85 %.

**Tableau 5.** Pouvoir antioxydant des acides phénoliques standards obtenus par les deux méthodes

<b>Acides phénoliques</b>	<b>Méthode 1</b>	<b>Méthode 2</b>
	(%)	(%)
Acide vanillique	28 ± 1a	69 ± 4bc
Acide homovanillique	62 ± 4c	77 ± 1cd
Vanilline	58 ± 6c	91 ± 4ef
Acide protocatéchuique	86 ± 6d	41 ± 2a
Acide syringique	87 ± 4d	79 ± 3cd
Syringaldehyde	49 ± 6bc	96 ± 3f
Acide p-coumarique	40 ± 9b	90 ± 3def
Acide caféique	101 ± 3e	67 ± 5b
Acide férulique	79 ± 5d	94 ± 3ef
Acide sinapique	97 ± 2d	88 ± 7def
Coniferal	N/A	71 ± 2bc

**Méthode 1 :** test de l'inhibition de la peroxydation des lipides

**Méthode 2 :** test de la mesure de l'élimination des radicaux libres de l'oxygène

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

**Tableau 6.** Pouvoir antioxydant des flavonoïdes standards analysés par les deux méthodes

Flavonoïdes	Méthode 1	Méthode 2
<b>Flavonols</b>	(%)	(%)
Kaempférol	87 ± 6b	93 ± 4b
Myricétine	95 ± 4bc	94 ± 1b
Lutéoline	81 ± 3a	95 ± 3b
Quercétine	105 ± 5c	95 ± 4b
<b>Flavanones</b>		
2'-hydroxyflavanone	48 ± 6ab	90 ± 3b
4'-hydroxyflavanone	37 ± 6a	85 ± 2a
6'-hydroxyflavanone	59 ± 5b	86 ± 5a
Hespéretine	46 ± 6ab	95 ± 5b
(+)-Catéchine	98 ± 3c	95 ± 4b
(-)-Épicatéchine	98 ± 2c	91 ± 5b

**Méthode 1** : test de l'inhibition de la peroxydation des lipides

**Méthode 2** : test de la mesure de l'élimination des radicaux libres de l'oxygène

Les moyennes d'une même colonne et d'un même groupe suivies de lettres différentes sont significativement différentes ( $p > 0.05$ )

**Tableau 7.** Pouvoir antioxydant des composés phénoliques glycosylés standards analysés par les deux méthodes

Composés phénoliques glycosylés	Méthode 1	Méthode 2
	(%)	(%)
Hesperidine	N/A	85 ± 2a
Rhoifoline	N/A	85 ± 6a
Quercitrine	58 ± 4	94 ± 3b
Rutine	N/A	100 ± 4c

**Méthode 1** : test de l'inhibition de la peroxydation des lipides

**Méthode 2** : test de la mesure de l'élimination des radicaux libres de l'oxygène

**Note** : sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

### 3.5.2. Propriétés antioxydantes d'extraits de phénols totaux

Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits de phénols totaux recueillis de la sève et du sirop d'érable durant la saison sont présentés, pour les deux méthodes, aux figures 10 à 13.

Le pouvoir de piégeage des radicaux libres de la sève est représenté à la figure 10. Les résultats montrent que les valeurs sont proportionnelles avec la concentration en phénols totaux. Le pouvoir de piégeage des radicaux libres est de 82.95 % au début de la saison pour atteindre un plateau entre le quart jusqu'après mi-saison avec une valeur comparable à 97 %. Ensuite, une baisse à 67 % est observée à 75 % de la saison et remonte significativement ( $p \leq 0.05$ ) à une valeur de 75.24 % à la fin de la saison (figure 10).

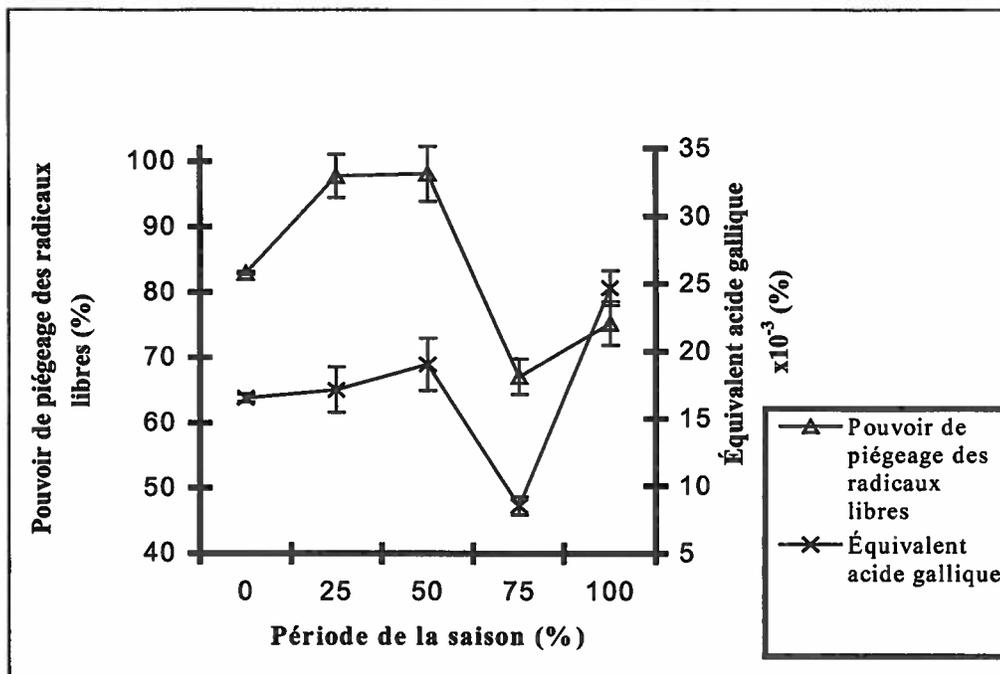
Pour ce qui est des extraits de phénols totaux du sirop d'érable (figure 11), une concordance avec la concentration en phénols totaux est également observable. Par contre, le profil est différent de la sève, de telle sorte que le pouvoir de piégeage des radicaux libres est de 84 % en début de saison et descend significativement ( $p \leq 0.05$ ) à une valeur de 73 % à mi-saison. À 75 % de la saison, le pouvoir antiradicalaire augmente significativement ( $p \leq 0.05$ ) à une valeur de 99 % et demeure stable jusqu'à la fin de la saison.

Les profils d'inhibition de la peroxydation lipidique des extraits de phénols totaux de la sève et du sirop d'érable sont illustrés aux figures 12 et 13 respectivement. Les extraits de sève démontrent une diminution de leur pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique au cours de la saison. Il est de 84.86 % au début de la saison, subit une hausse significative ( $p \leq 0.05$ ) et atteint une valeur de 96.67 % au quart de la saison. Une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) est ensuite observée jusqu'à la fin de la saison et valeur de 42.57 % de pouvoir antioxydant est obtenue (figure 12).

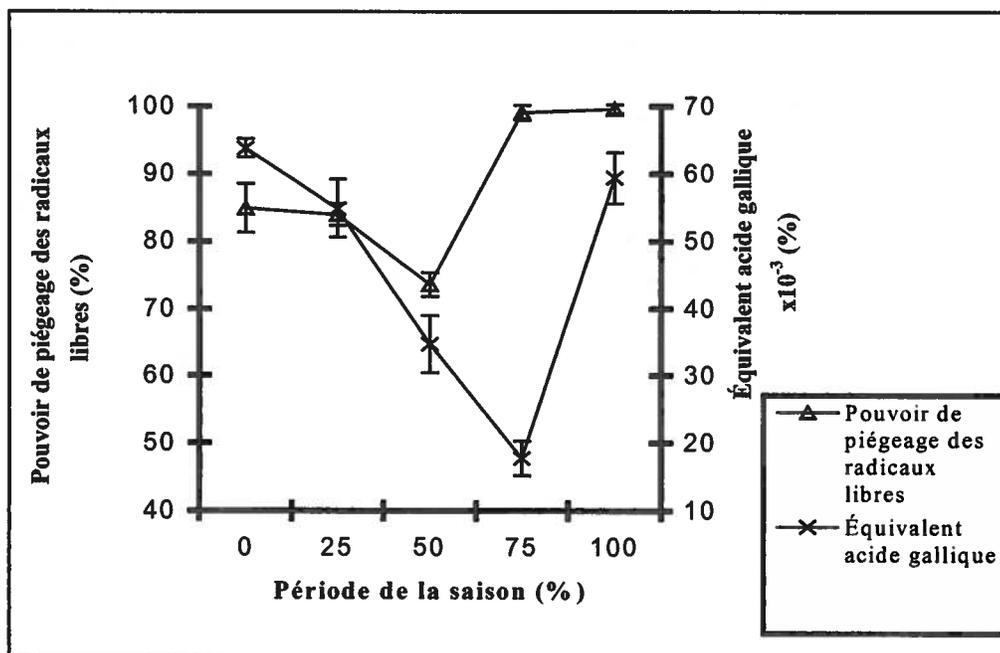
Pour les extraits de phénols totaux de sirop d'érable, le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique est de 83.78 % au début de la saison (figure 13). Il subit une

baisse significative ( $p \leq 0.05$ ) à 25 % de la saison et atteint un minimum de 73.19 %. Une hausse significative ( $p \leq 0.05$ ) suit, jusqu'à atteindre un maximum de pouvoir antiperoxydation lipidique de 95.58 % à 50 % de la saison. Finalement, une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) est observée à 75 % de la saison avec une valeur de 75 % et demeure stable à 100 % de la saison à une valeur de 76 %.

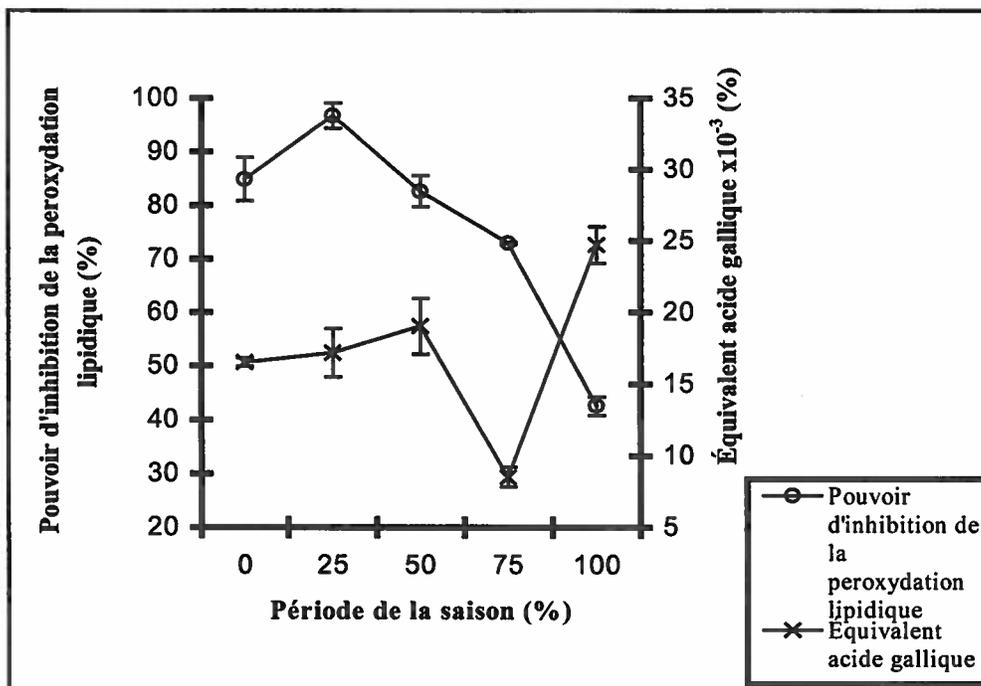
Contrairement au pouvoir de piégeage des radicaux libres, le pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique ne semble pas être en relation avec la concentration de phénols totaux (figures 12 et 13). En effet, le contenu en phénols totaux diminue jusqu'à 75 % de la saison et remonte significativement ( $p \leq 0.05$ ) à la fin de la saison.



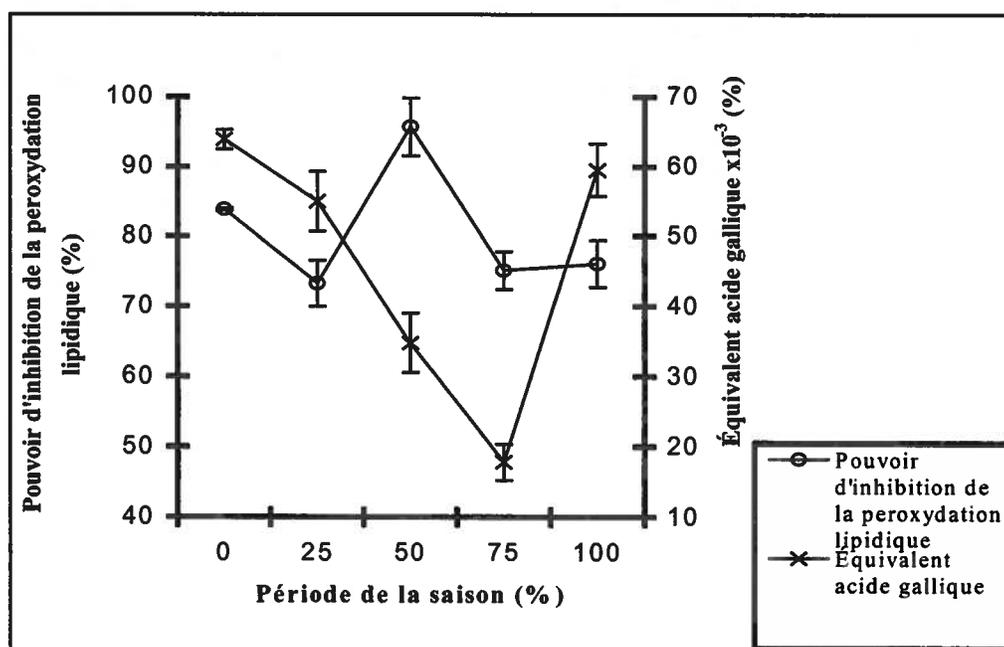
**Figure 11.** Pouvoir de piégeage des radicaux libres et quantité de phénols totaux d'extraits de phénols de sève d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002.



**Figure 12.** Pouvoir de piégeage des radicaux libres et quantité de phénols totaux d'extraits de phénols de sirop d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002.



**Figure 13.** Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique et quantité de phénols totaux d'extraits de phénols de sève d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002.



**Figure 14.** Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique et quantité de phénols totaux extraits de sirop d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002.

**Tableau 8.** Pouvoir de piégeage des radicaux libres d'extraits de phénols totaux de sève et de sirop d'érable recueillis à différentes périodes de la saison

Périodes de la saison (%) <sup>a</sup>	Pouvoir de piégeage des radicaux libres (%) <sup>b</sup>	
	Sève	Sirop
0	82.95 ± 0.20c	84.93 ± 3.61b
25	97.75 ± 3.27d	84.00 ± 1.65b
50	98.10 ± 4.18d	73.62 ± 1.77a
75	67.09 ± 2.69a	99.10 ± 1.04c
100	75.24 ± 3.36b	99.63 ± 0.64c

<sup>a</sup> 0 % équivaut au début de la saison et 100 % à la fin de la saison.

<sup>b</sup> Pouvoir de piégeage des radicaux libres mesuré à l'aide de la méthode de LeTien *et al.* 2001., résultats obtenus représentent la moyenne de triplicata ± écart type et les lettres différentes indiquent une différence significative entre les moyennes ( $p > 0.05$ ).

**Tableau 9.** Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique d'extraits de phénols totaux de sève et de sirop d'érable recueillis à différentes périodes de la saison

Périodes de la saison (%) <sup>a</sup>	Pouvoir de d'inhibition de la peroxydation des lipides (%) <sup>b</sup>	
	Sève	Sirop
0	84.86 ± 4.10c	83.78 ± 3.44b
25	96.67 ± 2.36d	73.19 ± 2.44a
50	82.59 ± 2.89c	95.58 ± 1.21c
75	72.88 ± 0.20b	75.04 ± 1.72a
100	42.57 ± 1.66a	76.02 ± 4.12a

<sup>a</sup> 0 % équivaut au début de la saison et 100 % à la fin de la saison.

<sup>b</sup> Pouvoir de d'inhibition de la peroxydation lipidique mesuré à l'aide de la méthode de Lessard, 1995.

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

### **3.5.3. Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques glycosylés et aglycones**

Le pouvoir antioxydant des fractions glycosylées et aglycones obtenues après séparation des extraits phénoliques totaux a également été analysé pour la sève et le sirop d'érable. Les résultats du pouvoir de piégeage des radicaux libres des parties glycosylées de la sève et du sirop d'érable sont décrits au tableau 10. Pour la sève d'érable, il n'y a pas de différence significative ( $p > 0.05$ ) entre le pouvoir de piégeage des radicaux libres à 0 et 50 % de la saison avec des valeurs respectives de 95.42 % et 97.75 %. Par contre, une baisse significative ( $p \leq 0.05$ ) est observée à 25 % de la saison avec une valeur de 77.98 %. Également, à 75 % de la saison une baisse importante survient et la valeur atteinte est de 69.50 %. En fin de saison, une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) permet d'obtenir une valeur de 87.78 %.

Les propriétés antioxydantes des extraits glycosylés du sirop ont des valeurs supérieures à 90 %. À 0 et 50 % de la saison, le pouvoir antioxydant est similaire avec des valeurs de 94.7 %. À 25 % de la saison, une hausse significative ( $p \leq 0.05$ ) donne une valeur de 96.84 %. À 75 % de la saison, une diminution significative ( $p \leq 0.05$ ) est observée et la valeur obtenue est de 90.51 %. Le meilleur pouvoir de piégeage des radicaux libres (98 %) est atteint à la fin de la saison après avoir subi une augmentation significative.

**Tableau 10.** Pouvoir de piégeage des radicaux libres de la partie glycosylée d'extraits de phénols de sève et de sirop d'érable séparés sur résine XAD-2 à différentes périodes de la saison des sucres 2002

Périodes de la saison (%) <sup>a</sup>	Pouvoir de piégeage des radicaux libres (%) <sup>b</sup>	
	Sève	Sirop
0	95.42 ± 3.59d	94.77 ± 0.4b
25	77.98 ± 1.97b	96.84 ± 0.5c
50	97.75 ± 0.82d	94.72 ± 0.3b
75	69.50 ± 1.13a	90.51 ± 0.61a
100	87.78 ± 1.71c	98.05 ± 2.81d

<sup>a</sup> 0 % équivaut au début de la saison et 100 % à la fin de la saison.

<sup>b</sup> Pouvoir de piégeage des radicaux libres mesuré à l'aide de la méthode de LeTien *et al.* (2001). Résultats obtenus représentent la moyenne de triplicata ± écart-type et les lettres différentes indiquent une différence significative entre les moyennes ( $p > 0.05$ ).

**Tableau 11.** Pouvoir de piégeage des radicaux libres de la partie aglycone d'extraits de phénols de sève et de sirop d'érable séparés sur résine XAD-2 à différentes périodes de la saison des sucres 2002

Périodes de la saison (%) <sup>a</sup>	Pouvoir de piégeage des radicaux libres (%) <sup>b</sup>	
	Sève	Sirop
0	48.19 ± 1.58b	39.86 ± 1.54a
25	48.28 ± 6.60b	47.24 ± 0.39b
50	89.09 ± 7.58c	79.57 ± 2.94d
75	46.33 ± 0.55b	42.44 ± 3.13ab
100	33.21 ± 4.22a	61.32 ± 2.29c

<sup>a</sup> 0 % équivaut au début de la saison et 100 % à la fin de la saison.

<sup>b</sup> Pouvoir de piégeage des radicaux libres mesuré à l'aide de la méthode de LeTien *et al.* (2001). Résultats obtenus représentent la moyenne de triplicata ± écart-type et les lettres différentes indiquent une différence significative entre les moyennes ( $p > 0.05$ ).

Les résultats du pouvoir de piégeage des radicaux libres de la partie aglycone des extraits phénoliques de la sève et du sirop d'érable se trouvent au tableau 11. La fraction aglycone de la sève affiche un faible pouvoir de piégeage des radicaux libres de 48 % au début de la saison et demeure stable jusqu'à 25 % de la saison. À mi-saison, une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) porte le résultat à un maximum de 89 %. Une diminution significative suit ensuite jusqu'à la fin de la saison où une valeur minimale de 33.21 % est obtenue.

Pour ce qui est du sirop, il y a une hausse significative ( $p \leq 0.05$ ), qui porte le résultat de 39.86 % au début de la saison à 47.24 % à 25 % de la saison. À mi-saison, un maximum d'activité antioxydante de 79.57 % est atteint. Ensuite, une baisse significative ( $p \leq 0.05$ ) à 75 % de la saison donne une valeur de 42.44 %. Finalement, une hausse significative ( $p \leq 0.05$ ) en fin de saison permet d'obtenir un pouvoir de piégeage des radicaux libres de 61.32 %.

La capacité d'inhiber la peroxydation lipidique est très élevée pour les fractions glycosylées de la sève d'érable (tableau 12). Les résultats supérieurs à 100 % indiquent que les extraits phénoliques ont un pouvoir supérieur à celui du composé standard utilisé comme contrôle, soit l'acide ascorbique. En effet, au début de la saison, 113.24 % de pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique est observé. Un maximum de 122.46 % à 25 % de la saison est obtenu et il n'y a aucune différence significative entre cette valeur et celle trouvée à 75 % de la saison (120.63 %). Une baisse significative ( $p \leq 0.05$ ) se produit à la fin de la saison, bien que la valeur atteinte soit de 103.69 %.

Pour ce qui est du sirop d'érable, une valeur maximum de 123.14 % est obtenue à 25 % de la saison pour le sirop. Une baisse significative ( $p \leq 0.05$ ) de l'activité antioxydante survient en fin de saison et la valeur obtenue est de 16.89 %. Ce résultat indique qu'il n'y a aucun pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique à 100 % de la saison pour les composés glycosylés du sirop d'érable.

**Tableau 12.** Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique de la partie glycosylés d'extraits de phénols de sève et de sirop d'érable séparés sur résine XAD-2 à différentes périodes de la saison des sucres 2002

Périodes de la saison (%) <sup>a</sup>	Pouvoir d'inhibition de la peroxydation des lipides (%) <sup>b</sup>	
	Sève	Sirop
0	113.24 ± 2.66b	107.89 ± 2.85c
25	122.46 ± 2.03d	123.14 ± 1.93d
50	116.86 ± 2.46bc	100.94 ± 5.31c
75	120.63 ± 2.87cd	70.25 ± 4.09b
100	103.69 ± 1.02a	16.89 ± 4.12a

<sup>a</sup> 0 % équivaut au début de la saison et 100 % à la fin de la saison.

<sup>b</sup> Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique mesuré par la microtechnique utilisant des liposomes.

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

**Tableau 13.** Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique de la partie aglycone d'extraits de phénols de sève et de sirop d'érable séparés sur résine XAD-2 à différentes périodes de la saison des sucres 2002

Périodes de la saison (%) <sup>a</sup>	Pouvoir d'inhibition de la peroxydation des lipides (%) <sup>b</sup>	
	Sève	Sirop
0	67.48 ± 3.65b	99.35 ± 1.52b
25	82.73 ± 0.32c	95.41 ± 0.44b
50	96.78 ± 1.45d	127.44 ± 2.67c
75	40.13 ± 0.71a	164.51 ± 3.43d
100	84.67 ± 4.09c	89.75 ± 1.70ab

<sup>a</sup> 0 % équivaut au début de la saison et 100 % à la fin de la saison.

<sup>b</sup> Pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique mesuré par la microtechnique utilisant des liposomes.

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

Les fractions aglycones démontrent de plus faibles propriétés antioxydantes. Une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) du pouvoir d'inhibition de la peroxydation survient dans la sève partant d'une valeur de 67.48 % au début de la saison et atteignant un maximum de 96.78 % à mi-saison (tableau 13). Une baisse significative ( $p \leq 0.05$ ) se produit à 75 % de la saison, donnant le faible résultat de 40.13 %, pour ensuite augmenter à 84.67 % à la fin. Le pouvoir d'inhiber la peroxydation des lipides semble meilleur pour les extraits aglycones du sirop que de la sève. En effet, à 0 et 25 % de la saison il est similaire et respectivement de 99.35 et 95.41 %. Une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) porte les résultats supérieurs à 100 % à mi-saison avec un maximum de 164.51 % à 75 % de la saison. Par la suite, la valeur redescend significativement ( $p \leq 0.05$ ) à 89.75 % à la fin de la saison.

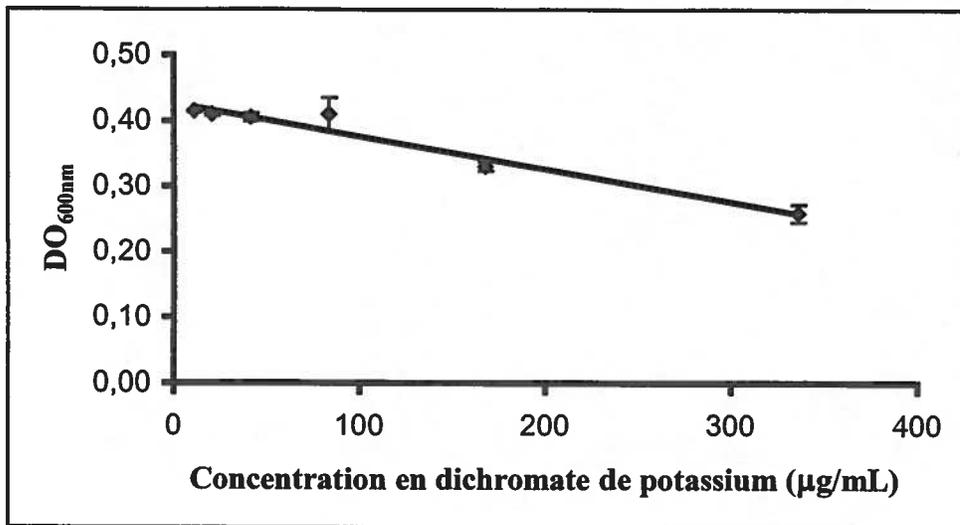
### **3.6. Propriétés antimutagènes**

Les propriétés antimutagènes des extraits phénoliques totaux et séparés ont été analysées afin d'évaluer l'antimutagénicité *per se* et de leurs métabolites.

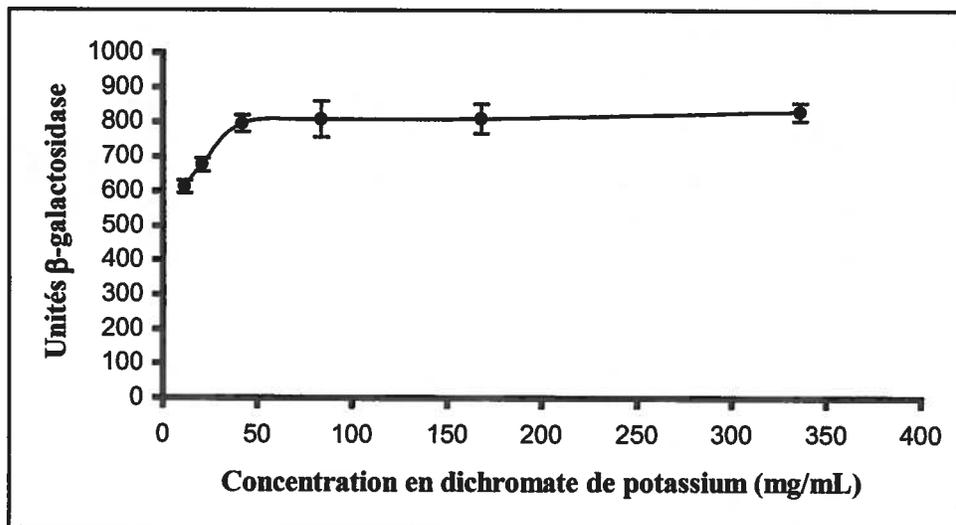
#### **3.6.1. Propriétés antimutagènes *per se* d'extraits de phénols totaux**

La concentration de dichromate de potassium utilisée pour l'étude de l'antimutagénicité *per se* a été évaluée et les résultats de cette analyse sont présentés aux figures 14 et 15.

La concentration de dichromate de potassium choisie a été de 84 mg/mL, puisqu'à cette concentration d'agent mutagène l'activité de l'enzyme  $\beta$ -galactosidase est maximale et la culture bactérienne ne fait que commencer à être affecter.



**Figure 15.** Turbidité de la culture de *Salmonella typhimurium* à différentes concentrations de l'agent mutagène.



**Figure 16.** Unités β-galactosidase de la culture de *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 à différentes concentrations de l'agent mutagène.

Les résultats de l'analyse des propriétés antimutagènes *per se* des extraits de phénols totaux de sève et de sirop d'érable sont illustrés aux tableaux 14 et 15. Les unités  $\beta$ -galactosidase, qui représentent l'activité enzymatique spécifique de la  $\beta$ -galactosidase produite par la bactérie *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 en réponse à l'induction du système SOS de réparation de l'ADN de la bactérie, démontrent qu'il n'y a pas de différence significative ( $p > 0.05$ ) entre le contrôle et les échantillons recueillis à 0 et 25 % de la saison. Des valeurs respectives de 442.31, 426.79 et 436.68 unités ont été observées pour le contrôle et les extraits de sève d'érable à 0 et 25 % de la saison (tableau 14). À la mi-saison, une baisse significative de l'activité enzymatique survient ( $p \leq 0.05$ ) donnant une valeur de 408.24 unités, suivie d'une hausse significative ( $p \leq 0.05$ ) à 75 % de la saison pour atteindre une activité de 508.98 unités. Toutefois, une baisse significative ( $p \leq 0.05$ ) à 387.35 unités est observée à la fin de la saison. Le pourcentage d'antimutagénéicité calculé montre qu'au début de la saison il n'y a pas d'effet antimutagène significatif. À la mi-saison, une faible hausse, mais significative ( $p \leq 0.05$ ), est observée donnant une valeur de 7.7 %, pour ensuite descendre sous zéro à 75 % de la saison et remonter significativement ( $p \leq 0.05$ ) à la fin de la saison pour atteindre 12.45 % d'antimutagénéicité.

Les valeurs d'unités  $\beta$ -galactosidase démontrent, qu'au début de la saison (0 et 25 %) les échantillons de sirop ne sont pas significativement différents ( $p > 0.05$ ) du contrôle avec des valeurs respectives de 396.02 et 405.31 unités, d'où les valeurs d'antimutagénéicité nulles (tableau 15). À mi-saison et ce, jusqu'à la fin de la saison, les valeurs d'unités  $\beta$ -galactosidase augmentent significativement ( $p \leq 0.05$ ), avec des valeurs respectives de 488.63, 524.43, 506.74 unités à 50, 75 et 100 % de la saison. Les valeurs de pourcentage d'antimutagénéicité montrent qu'il n'y a aucun pouvoir antimutagène *per se* pour les extraits de phénols totaux du sirop d'érable quelque soit la période de la saison. Les valeurs d'unités  $\beta$ -galactosidase démontrent, qu'au début de la saison (0 et 25 %) les échantillons de sirop ne sont pas significativement différents ( $p > 0.05$ ) du contrôle avec des valeurs respectives de 396.02 et 405.31 unités, d'où les valeurs d'antimutagénéicité nulles (tableau 15). À mi-saison et ce, jusqu'à la fin de la saison, les valeurs d'unités  $\beta$ -galactosidase augmentent significativement ( $p \leq 0.05$ ), avec des valeurs respectives de

488.63, 524.43, 506.74 unités à 50, 75 et 100 % de la saison. Les valeurs de pourcentage d'antimutagénécité montrent qu'il n'y a aucun pouvoir antimutagène *per se* pour les extraits de phénols totaux du sirop d'érable quelque soit la période de la saison.

**Tableau 14.** Propriétés antimutagènes *per se* de phénols totaux extraits de sève d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002

Échantillons <sup>a</sup>	Unités $\beta$ -galactosidase <sup>c</sup>	% Antimutagénéicité <sup>d</sup>
contrôle <sup>b</sup>	442.31 $\pm$ 17.69c	N/A
0	426.79 $\pm$ 12.69bc	3.51
25	436.68 $\pm$ 16.98bc	1.27
50	408.24 $\pm$ 6.79ab	7.70
75	508.98 $\pm$ 26.28d	-15.07
100	387.25 $\pm$ 8.24a	12.45

<sup>a</sup> Les échantillons sont les extraits phénoliques obtenus à différentes périodes de la saison 0 étant le début et 100 % la fin de la saison en présence de l'agent mutagène

<sup>b</sup> Le contrôle est le mélange contenant seulement l'agent mutagène

<sup>c</sup> Les unités  $\beta$ -galactosidase représentent l'activité enzymatique spécifique

<sup>d</sup> Le pourcentage d'antimutagénéicité

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

**Tableau 15.** Propriétés antimutagènes *per se* de phénols totaux extraits de sirop d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002

Échantillons <sup>a</sup>	Unités $\beta$ -galactosidase <sup>c</sup>	% Antimutagénéicité <sup>d</sup>
contrôle <sup>b</sup>	402.31 $\pm$ 25.90a	N/A
0	396.02 $\pm$ 9.51a	1.56
25	405.31 $\pm$ 26.46a	-0.75
50	488.63 $\pm$ 27.01b	-21.45
75	524.43 $\pm$ 14.11b	-30.35
100	506.74 $\pm$ 11.13b	-25.96

<sup>a</sup> Les échantillons sont les extraits phénoliques obtenus à différentes périodes de la saison 0 étant le début et 100 % la fin de la saison en présence de l'agent mutagène

<sup>b</sup> Le contrôle est le mélange contenant seulement l'agent mutagène

<sup>c</sup> Les unités  $\beta$ -galactosidase représentent l'activité enzymatique spécifique

<sup>d</sup> Le pourcentage d'antimutagénéicité

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

### 3.6.2. Propriétés antimutagènes des métabolites d'extraits de phénols totaux

Les résultats des propriétés antimutagènes après métabolisation hépatique des extraits de phénols totaux de sève et de sirop d'érable sont présentés aux tableaux 16 et 17. Les données d'unités  $\beta$ -galactosidase démontrent que seules les valeurs des échantillons à 0 et 100 % de la saison sont significativement ( $p \leq 0.05$ ) différents du contrôle avec des valeurs respectives de 492.56 et 484.45 unités comparativement à 571.16 unités pour le contrôle (tableau 16). Les valeurs à 25, 50 et 75 % de la saison sont respectivement de 569.77, 556.49 et 520.04 unités et aucune différence n'a été signalée entre ces échantillons. De plus, il n'y a pas de différence significative ( $p > 0.05$ ) entre les valeurs à 75 et 100 % de la saison. L'antimutagénéité des métabolites des extraits de sève d'érable indique qu'au début de la saison un pourcentage de 13.76 % est observé. Il y a ensuite une baisse au quart de la saison où une valeur de 0.24 % est présentée. À mi-saison, la valeur reste stable avec 2.57 % d'activité et 8.95 % à 75 % de la saison. Une hausse significative ( $p \leq 0.05$ ) survient en fin de saison pour atteindre un maximum de 15.18 %.

Les métabolites des extraits phénoliques totaux de sirop d'érable démontrent un faible pourcentage d'antimutagénéité (tableau 17). Les unités  $\beta$ -galactosidase confirment qu'il n'y a pas de différence significative ( $p > 0.05$ ) entre les valeurs des échantillons à 0, 25, 50 et 75 % de la saison et le contrôle, qui sont respectivement de 625.22, 597.03, 614.11 et 652.99 comparativement à 621.47 unités pour le contrôle. Une baisse significative ( $p \leq 0.05$ ) de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase est observée à 100 % de la saison où une valeur de 529.12 unités est obtenue. Pour ce qui est des valeurs du pourcentage d'antimutagénéité, elles sont respectivement de -0.6, 3.93, 1.18 et -5.07 unités, à 0, 25, 50 et 75 % de la saison. À 100 % de la saison, une faible hausse porte la valeur à 14.86 % d'activité antimutagène.

**Tableau 16.** Propriétés antimutagènes des métabolites des extraits phénoliques totaux de sève d'érable à différentes périodes de la saison des sucres 2002

Échantillons <sup>a</sup>	Unités $\beta$ -galactosidase <sup>c</sup>	% Antimutagénéicité <sup>d</sup>
contrôle <sup>b</sup>	571.16 $\pm$ 22.93b	N/A
0	492.56 $\pm$ 12.00a	13.76
25	569.77 $\pm$ 23.92b	0.24
50	556.49 $\pm$ 33.35b	2.57
75	520.04 $\pm$ 33.06ab	8.95
100	484.45 $\pm$ 24.08a	15.18

<sup>a</sup> Les échantillons sont les extraits phénoliques obtenus à différentes périodes de la saison 0 étant le début et 100 % la fin de la saison en présence de l'agent mutagène

<sup>b</sup> Le contrôle est le mélange contenant seulement l'agent mutagène

<sup>c</sup> Les unités  $\beta$ -galactosidase représentent l'activité enzymatique spécifique

<sup>d</sup> Le pourcentage d'antimutagénéicité

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

**Tableau 17.** Propriétés antimutagènes des métabolites d'extraits phénoliques totaux de sirop d'érable à différentes périodes de la saison

Échantillons <sup>a</sup>	Unités $\beta$ -galactosidase <sup>c</sup>	% Antimutagénéicité <sup>d</sup>
contrôle <sup>b</sup>	621.47 $\pm$ 39.70b	N/A
0	625.22 $\pm$ 35.98b	-0.60
25	597.03 $\pm$ 1.65b	3.93
50	614.11 $\pm$ 18.78b	1.18
75	652.99 $\pm$ 42.52b	-5.07
100	529.12 $\pm$ 40.91a	14.86

<sup>a</sup> Les échantillons sont les extraits phénoliques obtenus à différentes périodes de la saison 0 étant le début et 100 % la fin de la saison en présence de l'agent mutagène

<sup>b</sup> Le contrôle est le mélange contenant seulement l'agent mutagène

<sup>c</sup> Les unités  $\beta$ -galactosidase représentent l'activité enzymatique spécifique

<sup>d</sup> Le pourcentage d'antimutagénéicité

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

### 3.6.3. Antimutagénicité *per se* d'extraits de phénols glycosylés et aglycones

Les résultats des propriétés antimutagènes *per se* des fractions glycosylées et aglycones des extraits phénoliques de sève et de sirop d'érable sont représentés aux tableaux 18 à 21. Les composés phénoliques glycosylés extraits de la sève d'érable démontrent une faible antimutagénicité *per se* (tableau 18). Les unités  $\beta$ -galactosidase affichent des valeurs, pour les échantillons de 0 à 100 % de la saison, significativement supérieures ( $p \leq 0.05$ ) au contrôle et sont respectivement de 400.75, 370.66, 409.69, 400.68 et 391.81 unités. Pour ce qui est des pourcentages obtenus ils sont tous inférieurs à zéro quelle que soit la période saisonnière ce qui indique qu'aucune activité antimutagène *per se* n'est démontrée pour les composés glycosylés de la sève d'érable.

À la lumière des résultats obtenus, les composés phénoliques aglycones de la sève d'érable ne présentent aucune activité antimutagène *per se* (tableau 19). À 0 % de la saison, la valeur d'unité  $\beta$ -galactosidase est de 481.07 unités et est significativement plus élevée ( $p \leq 0.05$ ) que le contrôle affichant une valeur de 307.10 unités. Une baisse significative ( $p \leq 0.05$ ) survient en fin de saison et les valeurs à 75 et 100 % de la saison n'ont pas de différence significative entre elles ( $p > 0.05$ ) et sont respectivement de 421.24 et 431.35 unités. Les valeurs de pourcentage d'antimutagénicité s'avèrent plus basses que celles des composés glycosylés de la sève et des valeurs de -56.6, -37.17 et -40.46 % à 0, 75 et 100 % de la saison affichent un léger potentiel mutagène.

**Tableau 18.** Propriétés antimutagènes *per se* de la partie glycosylée d'extrait de sève d'érable à différentes périodes de la saison

Échantillons <sup>a</sup>	Unités $\beta$ -galactosidase <sup>c</sup>	% Antimutagénéité <sup>d</sup>
Contrôle <sup>b</sup>	346.01 $\pm$ 12.45a	N/A
0	400.75 $\pm$ 7.63d	-15.82
25	370.66 $\pm$ 14.77bc	-7.12
50	409.69 $\pm$ 16.84d	-18.40
75	400.68 $\pm$ 11.59d	-15.80
100	391.81 $\pm$ 2.25cd	-13.24

<sup>a</sup> Les échantillons représentent la culture bactérienne en présence des extraits phénoliques et de l'agent mutagène. Les chiffres 0, 25, 50, 75 et 100 sont les différentes périodes de la saison. 0 étant le début et 100 % la fin de la saison

<sup>b</sup> Les contrôles contiennent seulement l'agent mutagène et la culture bactérienne

<sup>c</sup> Les unités  $\beta$ -galactosidase représentent l'activité enzymatique spécifique

<sup>d</sup> Le pourcentage d'antimutagénéité

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

**Tableau 19.** Propriétés antimutagènes *per se* de la partie aglycone d'extrait de sève d'érable à différentes périodes de la saison

Échantillons <sup>a</sup>	Unités $\beta$ -galactosidase <sup>c</sup>	% Antimutagénéité <sup>d</sup>
Contrôle <sup>b</sup>	307.10 $\pm$ 45.81a	N/A
0	481.07 $\pm$ 3.31c	-56.65
25	N/A	N/A
50	N/A	N/A
75	421.24 $\pm$ 19.59b	-37.17
100	431.35 $\pm$ 14.17b	-40.46

<sup>a</sup> Les échantillons représentent la culture bactérienne en présence des extraits phénoliques et de l'agent mutagène. Les chiffres 0, 25, 50, 75 et 100 sont les différentes périodes de la saison. 0 étant le début et 100 % la fin de la saison

<sup>b</sup> Les contrôles contiennent seulement l'agent mutagène et la culture bactérienne

<sup>c</sup> Les unités  $\beta$ -galactosidase représentent l'activité enzymatique spécifique

<sup>d</sup> Le pourcentage d'antimutagénéité

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

Les résultats d'antimutagénicité *per se* obtenus pour les composés phénoliques glycosylés extraits du sirop d'érable sont similaires à ceux de la sève. Les valeurs de pourcentage d'antimutagénicité obtenues s'avèrent toutes négatives (tableau 20). Les unités  $\beta$ -galactosidase des échantillons présentent des valeurs significativement supérieures ( $p > 0.05$ ) au contrôle. Il n'y a pas de différence significative ( $p > 0.05$ ) pour les valeurs à 0 et 100 % de la saison qui sont respectivement de 375.73 et 378.9 unités. À 75 % de la saison, la valeur d'unité  $\beta$ -galactosidase est de 425.54 unités et est significativement ( $p \leq 0.05$ ) plus élevée que le contrôle qui a une valeur de 336.32 unités. Pour ce qui est du pourcentage d'antimutagénicité, les résultats observés sont respectivement de -14.75, -26.53 et -12.66 % à 0, 75 et 100 % de la saison. Les composés glycosylés du sirop d'érable ne présentent donc aucune activité antimutagène *per se*.

Pour ce qui est des composés aglycones du sirop, ils ne démontrent aucune activité antimutagène *per se* tout comme les extraits glycosylés (tableau 21). Les valeurs d'unités  $\beta$ -galactosidase des échantillons à 0 et 100 % de la saison sont respectivement de 434.53 et 376.18 unités et ces valeurs sont significativement ( $p > 0.05$ ) supérieures au contrôle. De plus, la valeur obtenue à 0 % de la saison est significativement supérieure ( $p \leq 0.05$ ) à celle obtenue à 100 % de la saison. Les résultats montrent que l'antimutagénicité *per se* des extraits de composés aglycones du sirop d'érable est de -31.25 et -13.63 % au début et à la fin de la saison respectivement. Il n'y a donc aucune activité antimutagène.

**Tableau 20.** Propriétés antimutagènes *per se* de la partie glycosylée d'extrait de sirop d'érable à différentes périodes de la saison

Échantillons <sup>a</sup>	Unités $\beta$ -galactosidase <sup>c</sup>	% Antimutagénéité <sup>d</sup>
Contrôle 1 <sup>b</sup>	336.32 $\pm$ 14.40a	N/A
0	375.73 $\pm$ 5.48b	-14.75
25	N/A	N/A
50	N/A	N/A
75	425.54 $\pm$ 16.93c	-26.53
100	378.90 $\pm$ 13.59b	-12.66

<sup>a</sup> Les échantillons représentent la culture bactérienne en présence des extraits phénoliques et de l'agent mutagène. Les chiffres 0, 25, 50, 75 et 100 sont les différentes périodes de la saison. 0 étant le début et 100 % la fin de la saison

<sup>b</sup> Les contrôles contiennent seulement l'agent mutagène et la culture bactérienne

<sup>c</sup> Les unités  $\beta$ -galactosidase représentent l'activité enzymatique spécifique

<sup>d</sup> Le pourcentage d'antimutagénéité

Note : sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

**Tableau 21.** Propriétés antimutagènes *per se* de la partie aglycone d'extrait de sirop d'érable à différentes périodes de la saison

Échantillons <sup>a</sup>	Unités $\beta$ -galactosidase <sup>c</sup>	% Antimutagénéité <sup>d</sup>
Contrôle 1 <sup>b</sup>	331.07 $\pm$ 14.61a	N/A
0	434.53 $\pm$ 5.08c	-31.25
100	376.18 $\pm$ 9.21b	-13.63

<sup>a</sup> Les échantillons représentent la culture bactérienne en présence des extraits phénoliques et de l'agent mutagène. Les chiffres 0, 25, 50, 75 et 100 sont les différentes périodes de la saison. 0 étant le début et 100 % la fin de la saison

<sup>b</sup> Les contrôles contiennent seulement l'agent mutagène et la culture bactérienne

<sup>c</sup> Les unités  $\beta$ -galactosidase représentent l'activité enzymatique spécifique

<sup>d</sup> Le pourcentage d'antimutagénéité

Note : sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

### 3.6.4. Propriétés antimutagènes de métabolites d'extraits de phénols séparés

Les propriétés antimutagènes des métabolites d'extraits de composés phénoliques glycosylés et aglycones de sève et de sirop d'érable sont présentées aux tableaux 22 à 25.

Les résultats de phénols glycosylée récoltés des extraits de sève d'érable indiquent que du début jusqu'à 75 % de la saison, le pourcentage d'antimutagénéité est similaire (tableau 22). Les unités  $\beta$ -galactosidase obtenues au début de la saison (0 et 25 %) ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ) du contrôle et entre elles. Elles sont respectivement de 556.86 et 527.03 unités comparativement à 574.06 unités pour le contrôle. Par contre, une baisse significative ( $p \leq 0.05$ ) survient à 75 % de la saison pour atteindre une valeur de 467.41 unités. À la fin de la saison, la valeur est de 678.32 unités soit une centaine d'unités plus élevée que le témoin et significativement plus élevée ( $p \leq 0.05$ ) que les autres valeurs. Partant d'une valeur d'antimutagénéité de 3.0 % au début de la saison, il y a une légère augmentation à 25 % de la saison avec un résultat de 8.19 % jusqu'à 75 % de la saison avec une valeur de 18.58 %. À la fin de la saison par contre, une baisse importante se produit et donne une valeur de -18.16 %.

Les propriétés antimutagènes des métabolites des extraits aglycones de la sève d'érable sont présentées au tableau 23. Les valeurs d'unités  $\beta$ -galactosidase à 0, 25 et 75 % de la saison sont significativement différentes ( $p > 0.05$ ) entre elles et par rapport au contrôle. Elles sont respectivement de 449.33, 525.43 et 276.49 unités par rapport à 360.02 unités pour le contrôle. Au début de la saison, les valeurs d'antimutagénéité illustrées sont négatives. La valeur minimale obtenue se trouve à 25 % de la saison et est de -45.94 % affichant donc une mutagénéité potentielle. À 75 % de la saison par contre, il y a une augmentation significative ( $p \leq 0.05$ ) du pourcentage d'antimutagénéité et cette valeur atteint 23.2 % ce qui est légèrement antimutagène.

**Tableau 22.** Propriétés antimutagènes des métabolites des composés phénoliques glycosylés extraits de sève d'érable à différentes périodes de la saison

Échantillons <sup>a</sup>	Unités $\beta$ -galactosidase <sup>c</sup>	% Antimutagénéité <sup>d</sup>
Contrôle <sup>b</sup>	574.06 $\pm$ 28.68b	N/A
0	556.86 $\pm$ 20.98b	3.00
25	527.03 $\pm$ 17.32b	8.19
50	N/A	N/A
75	467.41 $\pm$ 20.42a	18.58
100	678.32 $\pm$ 13.73d	-18.16

<sup>a</sup> Les échantillons représentent la culture bactérienne en présence des extraits phénoliques et de l'agent mutagène. Les chiffres 0, 25, 50, 75 et 100 sont les différentes périodes de la saison. 0 étant le début et 100 % la fin de la saison

<sup>b</sup> Les contrôles contiennent seulement l'agent mutagène et la culture bactérienne

<sup>c</sup> Les unités  $\beta$ -galactosidase représentent l'activité enzymatique spécifique

<sup>d</sup> Le pourcentage d'antimutagénéité

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

**Tableau 23.** Propriétés antimutagènes des métabolites des composés phénoliques aglycones extraits de la sève d'érable à différentes périodes de la saison

Échantillons <sup>a</sup>	Unités $\beta$ -galactosidase <sup>c</sup>	% Antimutagénéité <sup>d</sup>
Contrôle <sup>b</sup>	360.02 $\pm$ 10.12b	N/A
0	449.33 $\pm$ 19.55c	-24.81
25	525.43 $\pm$ 25.44d	-45.94
50	N/A	N/A
75	276.49 $\pm$ 20.96a	23.20
100	N/A	N/A

<sup>a</sup> Les échantillons représentent la culture bactérienne en présence des extraits phénoliques et de l'agent mutagène. Les chiffres 0, 25, 50, 75 et 100 sont les différentes périodes de la saison. 0 étant le début et 100 % la fin de la saison

<sup>b</sup> Les contrôles contiennent seulement l'agent mutagène et la culture bactérienne

<sup>c</sup> Les unités  $\beta$ -galactosidase représentent l'activité enzymatique spécifique

<sup>d</sup> Le pourcentage d'antimutagénéité

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

Les résultats des propriétés antimutagènes après métabolisation hépatique des extraits phénoliques glycosylés de sirop d'érable sont présentés au tableau 24. Les unités  $\beta$ -galactosidase indiquent qu'il n'y a pas de différence significative ( $p > 0.05$ ) entre les valeurs à 0 et 100 % de la saison, qui sont respectivement de 389.06 et 399.19 unités. Par ailleurs, ces données sont significativement inférieures ( $p \leq 0.05$ ) au contrôle ayant une valeur de 468.13 unités. À 25 % de la période saisonnière, une hausse significative est observée ( $p \leq 0.05$ ), avec une valeur de 447.15 unités, toutefois, cette valeur reste inférieure au contrôle. Un minimum de 293.02 unités est obtenu à 75 % de la saison, cette valeur est donc significativement différente ( $p > 0.05$ ) du contrôle et des autres valeurs. Les résultats du pourcentage d'antimutagénéité présentent une valeur de 16.89 % au début de la saison. À 25 % de la saison, une baisse est observée avec une valeur de 4.48 %. Ensuite, un maximum de 37.41 % est atteint à 75 % de la saison. Finalement, à 100 % de la saison, une diminution porte la valeur à 14.73 %.

Les résultats des propriétés antimutagènes après métabolisation hépatique des extraits phénoliques aglycones de sirop d'érable sont présentés au tableau 25. Les unités  $\beta$ -galactosidase ne présentent aucune différence significative ( $p > 0.05$ ) entre les valeurs à 0 et 25 % de la saison, qui sont respectivement de 255.38 et 254.25 unités. Il en va de même pour les valeurs à 75 et 100 % de la saison, qui sont respectivement de 303.84 et 303.90 unités. Les valeurs à travers la saison sont significativement différentes ( $p \leq 0.05$ ) du contrôle qui a une valeur de 427.08 unités.

Les valeurs de pourcentage d'antimutagénéité les plus élevées de la présente étude sont celles des composés phénoliques aglycones extraits du sirop d'érable. En effet, une activité antimutagène est observée en début de saison, avec un pourcentage d'inhibition de la mutagénéité de 42.33 %. À 25 % de la saison, le pourcentage d'antimutagénéité demeure stable avec une valeur de 40.47 %. À 75 % de la saison, une baisse est observée avec une valeur de 28.84 %. À la fin de la saison, le résultat est similaire avec une valeur de 28.86 %.

**Tableau 24.** Propriétés antimutagènes des métabolites de la partie glycosylée d'extrait de sirop d'érable à différentes périodes de la saison

Échantillons <sup>a</sup>	Unités $\beta$ -galactosidase <sup>c</sup>	% Antimutagénéité <sup>d</sup>
Contrôle 1 <sup>b</sup>	468.13 $\pm$ 51.28c	N/A
0	389.06 $\pm$ 15.71b	16.89
25	447.15 $\pm$ 19.83c	4.48
50	N/A	N/A
75	293.02 $\pm$ 0.25a	37.41
100	399.19 $\pm$ 13.47b	14.73

<sup>a</sup> Les échantillons représentent la culture bactérienne en présence des extraits phénoliques et de l'agent mutagène. Les chiffres 0, 25, 50, 75 et 100 sont les différentes périodes de la saison. 0 étant le début et 100 % la fin de la saison

<sup>b</sup> Les contrôles contiennent seulement l'agent mutagène et la culture bactérienne

<sup>c</sup> Les unités  $\beta$ -galactosidase représentent l'activité enzymatique spécifique

<sup>d</sup> Le pourcentage d'antimutagénéité

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

**Tableau 25.** Propriétés antimutagènes des métabolites de la partie aglycone d'extrait de sirop d'érable à différentes périodes de la saison

Échantillons <sup>a</sup>	Unités $\beta$ -galactosidase <sup>c</sup>	% Antimutagénéité <sup>d</sup>
Contrôle 1 <sup>b</sup>	427.08 $\pm$ 32.68c	N/A
0	255.38 $\pm$ 19.89a	40.20
25	254.25 $\pm$ 6.34a	40.47
50	N/A	N/A
75	303.90 $\pm$ 12.02b	28.84
100	303.84 $\pm$ 12.07b	28.86

<sup>a</sup> Les échantillons représentent la culture bactérienne en présence des extraits phénoliques et de l'agent mutagène. Les chiffres 0, 25, 50, 75 et 100 sont les différentes périodes de la saison. 0 étant le début et 100 % la fin de la saison

<sup>b</sup> Les contrôles contiennent seulement l'agent mutagène et la culture bactérienne

<sup>c</sup> Les unités  $\beta$ -galactosidase représentent l'activité enzymatique spécifique

<sup>d</sup> Le pourcentage d'antimutagénéité

**Note :** sur une même colonne, deux moyennes suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p > 0.05$ ).

## **4. Discussion**

### **4.1. Extraction des composés phénoliques**

Les extractions de composés phénoliques de la sève d'érable ont donné des quantités en extraits phénoliques totaux semblables pour les différents échantillons recueillis tout au long de la saison. Par contre, une variation plus importante a été observée pour les masses des extraits de sirop d'érable. Ceci pourrait être expliqué par le fait que le sirop contient différents produits, comme des composés de la réaction de Maillard, qui ont un poids moléculaire élevé et peuvent être extraits en même temps que les composés phénoliques et ce faisant, font augmenter la masse des extraits (Akochi *et al.*, 1994).

### **4.2. Séparation des extraits de phénols totaux**

Les quantités de composés phénoliques glycosylés et aglycones obtenus après séparation des extraits phénoliques totaux sur résine XAD-2 ont montré que la sève et le sirop d'érable contenait moins de composés aglycones que de glycosylés. Ceci semble concorder avec la littérature. En effet, les acides phénoliques et les flavonoïdes se retrouvent dans la nature surtout sous forme glycosylé, ils peuvent aussi être liés à des acides organiques (Schuster et Herrman, 1985; Macheix, Fleuriet et Billot, 1990; Escarpa et Gonzalez, 2001). Les composés aglycones étant plus instables ils sont rarement retrouvés seuls dans la nature, sauf pour la catéchine et l'épicatéchine qui sont des composés ubiquitaires aglycones. De plus, les extraits de sirop d'érable renferment plus de composés glycosylés que la sève, bien qu'au cours de l'extraction les échantillons de sirop ont été dilués afin d'avoir les mêmes conditions que la sève. Le traitement thermique de la sève créerait donc de nouveaux composés glycosylés. Les résultats obtenus par Côté (2003) semblaient indiquer que la sève d'érable récoltée vers la fin de la saison des sucres contient des niveaux plus élevés de composés phénoliques glycosylés que la sève récoltée en début de saison. Pour ce qui est du sirop, ce serait la situation

inverse, une quantité de composés phénoliques glycosylés inférieure est observée vers la fin de la saison.

#### **4.3. Dosage des phénols totaux des extraits d'érable**

Les résultats ont illustré une diminution de la concentration en phénols totaux à 75 % de la saison. Les concentrations, qui tendent à diminuer au cours de la saison particulièrement dans le sirop d'érable, voient apparaître une augmentation significative à la fin de la saison. Ceci peut être expliqué par une synthèse périodique de composés phénoliques comme moyen de défense de l'arbre dans le but de le protéger contre les micro-organismes qui peuvent se développer dans la sève plus la température augmente tout au cours de la saison ou d'autres éléments nuisibles de l'environnement, tels les rayons ultraviolets qui peuvent affecter l'arbre (Escarpa et Gonzalez, 2001).

#### **4.4. Analyse HPLC des composés phénoliques**

Le profil d'élution des composés phénoliques standards obtenu s'apparente à celui rapporté par Kermasha et ses collaborateurs (1995), où l'acide gallique, l'acide protocatéchique, la catéchine, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'épicatéchine, l'acide p-coumarique et l'acide férulique ont été élués dans le même ordre.

Les résultats ont également démontré que les acides hydroxybenzoïques (AHB) étaient moins retenus par la phase stationnaire que les acides hydroxycinnamiques (AHC). Les flavonoïdes eux, sont les composés phénoliques les plus retenus par la phase stationnaire. La différence structurelle entre les AHB et AHC est la présence de la chaîne éthylénique supplémentaire des AHC. Celle-ci serait responsable de la plus grande hydrophobicité des AHC comparée aux AHB. Pour ce qui est des flavonoïdes, ce serait la présence d'un groupement fonctionnel keto en position 4 sur le noyau qui expliquerait les temps de rétention plus élevés des flavonoïdes. De plus, l'absence de ce groupement fonctionnel chez la (+)-catéchine et l'(-)-épicatéchine expliquerait leurs temps de rétention moins élevés. Cette fonction keto en position 4, augmente l'hydrophobicité de la molécule de

flavonoïde en formant une structure plane, en anneau, non polaire comportant six composantes. L'hydrophobicité est démontrée par le fait que les composés sont insolubles dans l'eau (Wulf et Nagel, 1976).

Les profils d'éluion ont montré que les composés phénoliques retrouvés dans la sève et le sirop d'érable étaient similaires du début jusqu'à la mi-saison. La variation survenant à 50 % de la saison peut-être due à un changement climatique, notamment un réchauffement, ou encore à une contamination d'origine microbienne, qui fait synthétiser périodiquement des composés bioactifs tels des flavonoïdes, pour se protéger contre l'envahisseur (Nijveldt *et al.*, 2001).

Certains acides phénoliques ont été identifiés dans la sève et le sirop d'érable par contre, les flavonoïdes contenus dans ces extraits d'érable n'ont pu être identifiés bien que différents composés standards ont été comparés. Une étude plus poussée avec différents standards de flavonoïdes pourrait être poursuivie ou encore une analyse à l'aide du LC-MS confirmerait plus précisément le contenu en flavonoïdes.

D'autre part, le cycle flavone des flavonoïdes peut être clivé et former des acides phénoliques comme produit de dégradation, en particulier des acides hydroxybenzoïques (Rice-Evans *et al.*, 2001). Ceci peut expliquer les pics obtenus en fin de saison pour le sirop d'érable. Ceux-ci étant apparentés à l'acide gallique, se retrouvaient en concentration beaucoup plus grande que les autres composés de l'extrait, indiquant que l'échantillon a été réduit surtout à des phénols simples. La détermination des flavonoïdes est donc rendue plus complexe que celle des acides phénoliques dû au processus de dégradation. Un flavonol a tout de même été identifié et il s'est avéré présent autant dans la sève que le sirop d'érable. De plus, pour ce qui est de la synthèse des acides phénoliques, ces composés apparaissent en début de sentiers métaboliques. Ils sont également des intermédiaires dans la synthèse des flavonoïdes, ils sont donc conséquemment plus présents dans l'arbre tout au cours de la saison (Escarpa et Gonzalez, 2001).

#### **4.5. Propriétés antioxydantes**

Les deux méthodes de mesure des propriétés antioxydantes utilisées permettaient d'évaluer deux propriétés distinctes des composés phénoliques : le pouvoir d'inhiber la peroxydation lipidique et la capacité de piéger les radicaux libres. Les résultats ont démontré que les valeurs pour les deux tests ne pouvaient être comparées entre elles. En effet, le premier test imitait *in vitro* la propriété de protéger les bicouches lipidiques des membranes cellulaires. Le second, la capacité de piéger les radicaux libres de l'oxygène d'une solution aqueuse.

##### **4.5.1. Propriétés antioxydantes de standards phénoliques**

L'analyse des propriétés antioxydantes des composés phénoliques standards a démontré que les flavonoïdes sont généralement meilleurs antioxydants que les acides phénoliques, et ce, autant pour inhiber la peroxydation lipidique que pour piéger les radicaux libres.

En général, parmi les acides phénoliques illustrés dans le tableau 5, les acides hydroxycinnamiques affichent de meilleures propriétés antioxydantes que les acides hydroxybenzoïques. En effet, Rices-Evans et ses collaborateurs (1996) ont rapporté que tous les acides phénoliques évalués avaient des valeurs de TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) inférieures à celles des flavonoïdes. De plus, les hydroxycinnamates étaient généralement plus actifs que les hydroxyphénylacétates et les hydroxybenzoates (Heim *et al.*, 2002).

L'activité antioxydante des flavonoïdes *in vitro*, dépend de l'arrangement des groupes fonctionnels autour de la structure du noyau. L'arrangement spatial des substituants est peut-être un facteur plus déterminant de l'activité antioxydante que le squelette du flavan seulement. La configuration et le nombre de groupements hydroxyles influencent plusieurs mécanismes d'activité antioxydante. La capacité de piégeage des radicaux libres est en premier lieu attribuée à la réactivité élevée des substituants hydroxyles. Les groupements hydroxyles particulièrement sur l'anneau B sont les plus significatifs, ils peuvent donner un atome d'hydrogène et un électron à des radicaux hydroxyles et

peroxydes. D'autre part, une structure 3'4'-catéchol dans l'anneau B augmente fortement l'inhibition de la peroxydation lipidique (Heim *et al.*, 2002).

Les résultats de la présente étude ont démontré que les flavonols avaient en général un meilleur pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique que les autres flavonoïdes étudiés. Ceci peut s'expliquer par le fait que les flavones et flavonols ont généralement un catéchol sur l'anneau B. Par contre, le kaempférol n'a pas cette structure sur l'anneau B et possède tout de même un bon pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique (tableau 6). De fait, d'autres mécanismes peuvent expliquer cette propriété, telle la présence de groupements hydroxyles ou méthyles sur l'anneau B. La catéchine et l'épicatéchine ont également un catéchol sur l'anneau B, ce qui peut expliquer leur pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique supérieur aux autres flavanones (tableau 6).

#### **4.5.2. Propriétés antioxydantes d'extraits de phénols totaux**

Les résultats de l'activité antioxydante des extraits phénoliques totaux ont affiché certaines divergences. En effet, en général une relation entre la concentration en composés phénoliques et l'activité antioxydante est notée. Ceci est retrouvé dans la littérature puisque la concentration en phénols totaux d'un extrait influence directement l'activité antioxydante. Par contre, ce n'est pas l'unique facteur. La nature des composés est très importante. Bien que le pouvoir antioxydant des composés individuels influence le résultat, les diverses combinaisons de composés phénoliques se retrouvant dans les extraits font varier également l'activité antioxydante. En effet, des phénomènes de synergie peuvent survenir expliquant une activité antioxydante plus forte lorsque la concentration phénolique totale tend à diminuer.

Les composés influençant le plus l'activité antioxydante sont en général les composés flavonoïques, élués vers la fin des chromatogrammes. En effet, les flavonoïdes présentent un meilleur pouvoir antioxydant et sont élués après 35 minutes. De plus, les variations dans l'intensité des pics après 35 minutes au cours de la saison correspondent avec les

variations du pouvoir d'inhibition de la peroxydation lipidique et de piégeage des radicaux libres de la sève. Par contre pour le sirop, la situation est différente. Une augmentation de la concentration de composés élués avant 10 minutes, donc vraisemblablement des acides phénoliques tels des hydroxybenzoïques, est observée en fin de saison et est corrélé avec une augmentation de l'activité antioxydante. Ceci pourrait être expliqué par des réarrangements se produisant entre les molécules de phénols simples pendant le traitement thermique. La température de la sève ainsi que son pH pendant l'ébullition peuvent influencer le contenu en composés phénoliques du sirop d'érable (Akochi *et al.*, 1997). Par ailleurs, bien que les traitements thermiques ont souvent été considérés comme étant la cause d'une déplétion des antioxydants naturels, ces traitements utilisant la chaleur ont été rapportés pouvoir également induire la formation de composés possédant des propriétés antioxydantes. Le développement de produits durant la réaction de Maillard (MRP) est entre autres le cas. Des études ont noté que les MRP formés durant un traitement thermique intense ou un entreposage prolongé présentent généralement de fortes propriétés antioxydantes, se manifestant par le bris de la chaîne d'oxydation, l'activité de piégeage de l'oxygène et la diminution du taux d'oxydation des lipides (Anese *et al.*, 1993; 1999; Bressa *et al.*, 1996; Nicoli *et al.*, 1997). L'activité antioxydante des produits de la réaction de Maillard serait attribuée au poids moléculaire élevé des composés de couleur brune formés durant les étapes de la réaction (Kaur et Kapoor, 2001).

#### **4.5.3. Pouvoir antioxydant des extraits phénoliques séparés (glycosylés et aglycones)**

Le pouvoir antioxydant varie également selon que les composés phénoliques se retrouvent sous la forme aglycone ou glycosylée. Selon Heim et ses collaborateurs (2002), les composés aglycones ont un meilleur pouvoir antioxydant que leurs équivalents glycosylés. Les résultats pour les standards de composés phénoliques, obtenus dans la présente étude tendent dans cette direction, puisque tel qu'illustré aux tableaux 6 et 7, l'hespérétine (aglycone) a un pouvoir de piégeage des radicaux libres supérieur à l'hespérédine (glycosylée). La quercétine (aglycone) a également un pouvoir

de piégeage des radicaux libres et d'inhibition de la peroxydation lipidique supérieur à la quercitrine (glycosylée). Par contre, la rutine est différente puisqu'elle n'a pas un pouvoir inférieur à la quercétine. Ceci a également été observé dans la littérature et bien que la cause en est peu claire, elle implique des différences reliées à la méthodologie (Heim *et al.*, 2002). En effet, la rutine atténue un peu moins la formation de MDA dans le test de peroxydation des liposomes que la quercétine (Arora *et al.*, 1998). Par contre, la quercétine a une valeur de TEAC deux fois plus élevée que celle de la rutine (Lien *et al.*, 1999).

D'autre part, les résultats obtenus pour les composés glycosylés extraits de la sève et du sirop d'érable démontrent une activité antioxydante supérieure aux aglycones. Il a par ailleurs été rapporté dans la littérature que d'autres facteurs influencent l'activité antioxydante des composés glycosylés tels le nombre, la position et la structure des groupements glycosydiques. Par exemple, la capacité à retarder l'accumulation d'hydroperoxydes dans les bicouches lipidiques membranaires est plus grande pour la quercétine aglycone que pour ses équivalents 3-, 4'- et 7-O-glucosides, mais la forme 4'-glucide réduit plus significativement l'action des hydroperoxydes que les formes 3- et 7-O-glucosides (Heim *et al.*, 2002). De plus, la nature du groupement glycosydique influence l'activité antioxydante. En effet, que le groupement soit du glucose, du rhamnose ou du rutinose est très relevant, par exemple, sur la quercétine, un groupement rhamnose réduit significativement la capacité de piéger les radicaux libres générés par des neutrophiles comparativement à un groupement rutinose (Limasset *et al.*, 1993).

#### **4.6. Propriétés antimutagènes**

Les composés phénoliques et leurs métabolites analysés pour leurs propriétés antimutagènes ont démontré des activités comutagéniques et antimutagéniques. Les résultats les plus probants d'antimutagénicité ont été observés pour les extraits séparés de sirop d'érable.

#### 4.6.1. Antimutagénicité *per se* et des métabolites d'extraits de phénols totaux

Les résultats d'analyse de l'antimutagénicité des extraits phénoliques totaux de la sève et du sirop d'érable n'ont démontré aucune activité significative d'antimutagénicité *per se*. Par contre bien que l'activité antimutagène des métabolites ne soit pas élevée, elle est supérieure à celle des composés *per se*. Le mutagène de référence utilisé pour l'étude de l'antimutagénicité *per se* est le dichromate de potassium, un oxydant fort. Bien que les flavonoïdes aient des propriétés antioxydantes, ils ne s'avèrent pas posséder la capacité d'inhiber les mutations produites par cet agent mutagène. Il a été rapporté que les composés phénoliques servent d'écrans contre les rayons ultraviolets (Escarpa et Gonzalez, 2001). Ils ont donc comme propriétés de prévenir les mutations infligées par les radiations UV. Pour ce qui est des mutations occasionnées par des agents mutagènes chimiques tel le dichromate de potassium, elles peuvent être plus dommageables pour l'ADN de la bactérie puisque qu'en contact plus direct et donc échapper au mécanisme de protection des composés phénoliques. Aussi, les composés phénoliques totaux représentent un extrait brut, donc il est impossible d'associer les propriétés antimutagènes à une structure particulière de composé phénolique.

D'autre part, l'activation enzymatique des composés phénoliques les rend généralement plus actifs. L'effet antimutagène en présence de fractions S9 peut donc être dû à une inhibition de l'activité des enzymes du cytochrome P-450. Par exemple, la mutagénicité de la quercétine est activée par les enzymes du complexe P-450, par contre les extraits phénoliques totaux et séparés de la sève et du sirop d'érable peuvent quelque peu inhiber cette mutagénicité. Miyazawa et ses collaborateurs (2001) ont isolé de *Pueraria lobata* un composé phénolique démontrant un effet suppressif sur l'expression du gène *umu* dans la réponse SOS de *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 à des agents mutagènes chimiques. Il s'est avéré que ce composé avait un effet surtout envers les agents chimiques qui nécessitaient une activation métabolique pour agir en tant que mutagène.

Aussi, les composés phénoliques étudiés étant des extraits bruts, plusieurs phénomènes peuvent se produire et interférer avec l'activité antimutagène. De la synergie ou encore de

la co-inhibition peuvent survenir. Certains auteurs associent l'antimutagénicité aux propriétés antioxydantes des composés phénoliques, puisque les radicaux libres qui attaquent les cellules peuvent endommager l'ADN. De fait, l'inhibition de la mutagénicité n'est pas basée sur un mécanisme spécifique. Ces différents mécanismes d'activité antimutagènes incluent une liaison directe des composés aux agents mutagènes, des modifications aux enzymes métaboliques et une activité antioxydante (Krul *et al.*, 2001).

#### **4.6.2. Antimutagénicité *per se* et des métabolites d'extraits phénoliques séparés (glycosylés et aglycones)**

L'activité antimutagène des métabolites d'extraits phénoliques aglycones de sirop d'érable est celle dont le résultat est le plus élevé dans la présente étude. Cet en début de saison que ces valeurs ont été trouvées, ce qui signifierait que des composés présents dans la sève, mais qui n'offraient pas d'activité antimutagène, subissent des réarrangements au cours du traitement thermique les rendant aptes à inhiber l'antimutagénicité de la quercétine. Pour ce qui est des composés glycosylés autant pour la sève que pour le sirop, les résultats des propriétés antimutagènes sont semblables et relativement faibles comparativement aux composés aglycones, qui sont plus actifs dans le sirop que dans la sève. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les extraits aglycones du sirop diffèrent de ceux de la sève, puisque ayant été altérés par le procédé de fabrication du sirop d'érable et que des composés de la réaction de Maillard par exemple, puissent être présents dans l'extrait et ajouter à l'activité antimutagène. En effet, il a été rapporté que les produits de la réaction de Maillard (MRPs) ont des caractéristiques antioxydantes et antimutagènes (Kaur et Kapoor, 2001).

## Conclusion

Un intérêt grandissant a été porté sur les aliments fonctionnels et nutraceutiques. De nombreuses études se sont penchées sur les propriétés antioxydantes et antimutagènes de différents composés phénoliques extraits des plantes. Bien que le contenu en composés phénoliques de l'érable avait auparavant été évalué, aucune étude n'avait encore porté sur leurs propriétés antioxydantes et antimutagènes.

Une variation saisonnière a été observée pour le contenu en composés phénoliques sur les profils d'élution. Aussi, cette variation saisonnière a influencé les propriétés antioxydantes et antimutagènes. En général, le sirop renferme des bio-ingrédients avec une plus grande antimutagénicité tandis que la sève a une activité antioxydante légèrement supérieure. L'effet de la période saisonnière est relié à la température et la contamination microbienne, qui influence la synthèse de composés phénoliques. La structure des acides phénoliques et des flavonoïdes, mais aussi les interactions des différents éléments présents dans la sève, ainsi que le procédé de fabrication du sirop d'érable influencent les activités antioxydantes et antimutagènes.

Cette étude *in vitro* donne des résultats intéressants sur les propriétés antioxydantes et antimutagènes des composés phénoliques de l'érable, mais il serait également utile d'étudier *in vivo* ou dans un modèle gastro-intestinal, l'absorption de ces composés, afin de connaître l'ampleur de la valeur nutraceutique associée à ces composés phénoliques.

## Références

- AKOCHI, K. E., I. Alli, S. Kermasha, V. Yaylayan et J. Dumont. 1994. Quantitation of Alkylpyrazine in Maple Syrup, Maple Flavors and Non-Maple Syrups. Food Research International, vol. 27, p. 451-457.
- AKOCHI, K. E., I. Alli, S. Kermasha. 1997. Characterization of the Pyrazines Formed during the Processing of Maple Syrup. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.45, p.3368-3373.
- ALLI, I., J. Bourque, R. Metusin, R. Liang et V. Yaylayan. 1990. Identification of Pyrazines in Maple Syrup. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.38, p.1242-1244.
- ANESE, M., L. Manzocco, M.C. Nicoli et C.R. Lerici. 1999. Antioxidant properties of tomato juices as affected by heating. Journal of the Science of Food and Agriculture, vol.79, p.750-754.
- ANESE, M., P. Pietta et M.C. Nicoli. 1993. Oxygen consuming properties of heated glucose-glycine aqueous solutions. Italian Journal of Food Science, vol.5, p.75-79.
- ANON. 1984. Maple Syrup, Maple Sugar. CCB Review of Chocolate Confectionery and Bakery, vol.9, p.26-27.
- ANTOLOVICH, M., P.D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald et K. Robards. 2002. Methods for testing antioxidant activity. Analyst, vol. 127, p.183-198.
- ANTOLOVICH, M., P.D. Prenzler, K. Robards et D. Ryan. 2000. Sample Preparation in the Determination of Phenolic Compounds in Fruits. Analyst, vol. 125, no. 5, p. 989-1009.
- ARORA, A., M.G. Nair et G.M. Strasburg. 1998. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. Free Radicals in Biology and Medicine, vol.24, p.1355-1363.
- BATZRI, S. et E.D. Korn. 1973. Single bilayer liposomes prepared without sonication. Biochimica et Biophysica Acta, vol.298, p.1015-1019.
- BELFORD, A.L., R.C. Lindsay et S.C. Ridley. 1991. Contributions of selected flavor compounds to the sensory properties of maple syrup. Journal of Sensorial Studies, vol.6, p.101-118.
- BENAVENTE-GARCIA, O., J. Castillo, F.R. Marin, A. Ortuno et J.A. Delrio. 1997. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 45, p. 4505-4515.

BENZIE I.F.F. et J.J. Strain. 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. Analytical Biochemistry, vol.239, p.70-76.

BLOCK, G. 1992. A role for antioxidants in reducing cancer risk. Nutrition Review, vol.50, p.207-213.

BOHM, Bruce A. 1998. Introduction to Flavonoids, Australia : Harwood Academic Publishers, 503 p.

BOHM, B.A. 1982. The Minor Flavonoids. In J.B. Harbone, T. Mabry et H. Mabry. (éd.), The Flavonoids : Advances in Research 1975, Londres, Chapman and Hall, p.313.

BORS, W., W. Heller et C. Michel. 1998. The chemistry of flavonoids. In C.A. Rice-Evans et L. Packer, (éd.). Flavonoids in Health and Disease. New-York, N.Y. Marce Dekker, Inc., p.111-136.

BOURZEIX, M., D. Weyland et N. Heredia. 1986. Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. Bulletin O.I.V. vol. 1117, p. 669-670.

BRESSA, F., N. Tesson, M. Della Rosa, A. Sensidoni et F. Tubaro. 1996. Antioxidant effect of Maillard reaction products : application to a butter cookie of a competition kinetics analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.44, p.692-695.

CABRERA, G. 2000. Effect of Five Dietary Antimutagens on the Genotoxicity of Six Mutagens in the Microscreen Prophage-Induction Assay. Environmental and Molecular Mutagenesis, vol. 36, p. 206-220.

CHEN, H-Y. et G.-C.Yen. 1997. Possible Mechanisms of Antimutagens by Various Teas as Judged by their Effects on Mutagenesis by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and benzo[a]pyrene. Mutation Research, vol. 393, p. 115-122.

CÔTÉ, J. 2003. Separation and Characterization of Glycosylated Phenolic Compounds and Flavonoids from Maple Products. M.Sc. Thesis, McGill University, Montréal, Canada.

DESLAURIERS, I. 2000. Recovery, Separation and Characterization of Phenolic Compounds and Flavonoids from Maple Products. M.Sc. Thesis, McGill University, Montréal, Canada.

DiRIENZO, D.B. 2000. Symposium : Probiotic Bacteria : Implications for Human Health, The Journal of Nutrition, vol.130, p.382S-383S.

DUMONT, J., L. Saucier, G.B. Allard et B. Aurouze. 1993. Microbiological, physiochemical and sensory quality of maple syrup aseptically packaged in paper-based laminate. International Journal of Food Science and Technology, vol.28, p.83-93.

ESCARPA, A. et M.C. Gonzalez. 2001. An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. Critical Reviews in Analytical Chemistry, vol. 31, no.2, p.57-139.

ESCARPA, A. et M.C. Gonzalez. 1999. Fast Separation of (poly)Phenolic Compounds from Apples and Pears by High-Performance Liquid Chromatography with Diode-array Detection. Journal of Chromatography, vol. 830, no. 2, p. 301-309.

ESCARPA, A. et M.C. Gonzalez. 1998. High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection for the Determination of Phenolic Compounds in Peel and Pulp from Different Apple Varieties. Journal of Chromatography, vol. 823, no.1-2, p.331-337.

ESTERBAUER, H., KH. Cheeseman, MU. Dianzani, G. Poli et TF. Slater. 1982. Separation and Characterisation of the Aldehydic Products of Lipid Peroxidation Stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in Rat Liver Microsomes. Biochemistry Journal, vol. 208, p.129.

GEE, J.M. et I.T. Johnson. 2001. Polyphenolic Compounds : Interactions with the Gut and Implications for Human Health. Current Medicinal Chemistry, vol.8, p.1245-1255.

GOUVERNEMENT DU QUÉBEC (1983). Les produits de l'érable et leurs succédanés. In Règlements sur les Aliments. Chapitre 8.

GUNATA, Y.Z., C.L.Bayonove, R.L. Baumes et R.E. Corconnier. 1985. The Aroma of Grapes I. Extraction and Determination of Free and Glycosidically Bound Fractions of some Grape Arome Components. Journal of Chromatography, vol.331, p. 83-90.

GUNATA, Y.Z., S. Bitteur, J-M. Brillouet, C.L. Bayonove et R.E. Corconnier. 1988. Sequential Enzymic Hydrolysis of Potentially Aromatic Glycosides from Grape. Carbohydrate Research, vol.184, p.139-149.

GUNATA, Y.Z., C.L. Bayonove, R.L. Baumes, R.E. Corconnier, A. Arnaud et P. Galzy. 1990. Hydrolysis of Grape Monoterpenyl Glucosides by *Candida milichiana* and *Candida wickerhamii*  $\beta$ -glucosidases. Journal of Science Food and Agriculture, vol. 50, p. 499-506.

GUTTERIDGE, J.M.C. 1994. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. Chemico-Biological Interactions, vol.91, p.133-140.

HAKKINEN, S.H., S.O. Karenlampi, I.M. Heinonen, H.M. Mykkanen et A.R. Torronen. 1998. HPLC Method for Screening of Flavoids and Phenolic Acids in Berries. Journal of Science Food and Agriculture, vol.77, no.4, p.543-551.

HAKKINEN, S. M. Heinonen, S. Karenlampi, H. Mykkanen, J. Ruuskanen, R. Torronen. 1999. Screening of Selected Flavonoids and Phenolic Acids in 19 Berries. Food Research International, vol.32, no.5, p.345-353.

HALLIWELL, B. et J.M.C. Gutteridge. 1985. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford : Clarendon Press, p.

HARBORNE, J.B. 1964. In Biochemistry of Phenolic Compounds, New York Academic Press (éd.), London, 618 p.

HARBORNE, J.B. et C.A. Williams. 1975. Flavone and flavonol glycosides. In The Flavonoids: Advances in Research, Harborne, J.B., T.J. Mabry et H. Mabry. (Eds), Chapman and Hall, London, p.376.

HEIM, K.E., A.R. Tagliaferro et D.J. Bobilya. 2002. Flavonoids antioxidants : chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry, vol.13, p.572-584.

HERMANN, K. 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 28, p.315-347.

HERTOG, M.G.L., P.C.H. Hoelman et D.P. Venema. 1992. Optimazation of a Quantitative HPLC Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.40, no.9, p. 1591-1598.

HOLLMAN, P.C.H., J.H.M. de Vries, S.D. van Leeuwen, M.J.B. Mengelers et M.B. Katan. 1995. Absorption of Dietary Quercetin glycosides and Quercetin in Healthy Ileostomy Volunteers. The American Journal of Clinical Nutrition, vol.62, p.1276-1282.

JONES, A.R.C. et I. Alli. 1987. Sap yields, sugar contents and soluble carbohydrates of sap and syrup of some canadian birch and maple species. Canadian Journal of Forest Research, vol. 17, p. 263-266.

KATAN, M. 1999. Functional foods. The Lancet, vol.354, p.794.

KAUR, C. et H.C. Kapoor. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. International Journal of Food Science and Technology, vol. 36, p.703-725.

KERMASHA, S., M. Goetghebeur, et J. Dumont. 1995. Determination of Phenolic Compound Profiles in Maple Products by High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.43, p.708-716.

KRUL, C., A. Luiten-Schuite, A. Tenfelde, B. van Ommen, H. Verhagen et R. Havenaar. 2001. Antimutagenic activity of green tea and black tea extracts studied in a dynamic in vitro gastrointestinal model. Mutation Research, vol. 474, p.71-85.

KUENTZ, A., R.E. Simard, J.A. Zee et M. Desmarais. 1976. Comparison of Two Methods of the Analysis of Minerals in Maple Syrup. Canadian Institute of Food Science and Technology Journal, vol. 9, p.147.

KÜHNNAU, J. 1976. The Flavonoids. A Class of Semi-Essential Food Components: their Role in Human Nutrition. World Review of Nutrition and Diet, vol. 24, p.117-191.

LESSARD, S. 1995. Thèse de maîtrise. Micronutriments alimentaires et leurs rôles dans le contrôle naturel de la cancérisation cellulaire. INRS-Institut Armand-Frappier.

LE TIEN, C., C. Vachon, M.-A. Mateescu et M. Lacroix. 2001. Milk Protein Coatings Prevent Oxidative Browning of Apples and Potatoes. Journal of Food Science, vol. 66, no.4, p.512-516.

LIEN, E.J., S. Ren, H.H. Bui et R. Wang. 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. Free Radicals in Biology and Medicine, vol.23, p.285-294.

LIMASSET, B., C. Le Doucen, J.C. Dore, T. Ojasso, M. Damon et A.C. De Paulet. 1993. Effects of flavonoids on the release of reactive oxygen species by stimulated human neutrophils. Biochemistry Pharmacology, vol.46, p.1257-1271.

MACHEIX, J., A. Fleuriet. 1998. Phenolic Acids in Fruits. In C.A. Rice-Evans et L. Packer, (éd.). Flavonoids in Health and Disease. New-York, N.Y. Marce Dekker, Inc., p.35-60.

MACHEIX, J., A. Fleuriet and J. Billot. 1990. The main phenolics of fruit. In : Fruit phenolics ; CRC Press : Boca Raton, Fl.

MARON, D.M. et B.N. Ames. 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research, vol. 113, p.173-215.

MATEO, J.J., M. Jimenez. 2000. Monoterpenes in Grape Juice and Wines. Journal of Chromatography, vol.881, no.1-2, p.557-567.

MATTILA, P., J. Astola et J. Kumpulainen. 2000. Determination of Flavonoids in Plant Material by HPLC with Diode-Array and Electro-Array Detections. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.48, p.5834-5841.

McCANN, J. et B.N. AMES, 1976. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test assay of 300 chemicals : discussion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, vol.73, p.950-954.

- McDANIELS, A .E., A.L. Reyes, L.J. Wymer, C.C. Rankin et G.N. Jr Stelma. 1990. Comparison of the Salmonella (Ames) test, Umu tests, and the SOS Chromotests for Detecting Genotoxins. Environmental and Molecular Mutagenesis, vol.16, p. 204-215.
- MILLER, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- MIYAZAWA, M., K. Sakano, S. Nakamura et H. Kosaka. 2001. Antimutagenic Activity of Isoflavone from *Pueraria lobata*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.49, p.336-341.
- MOLLICA, J.N. et M.F. Morselli. 1986. Sugars and sugar products : Gas-Chromatographic Determination of Non-Volatile Organic Acids in Sap of Sugar Maple (*Acer saccharum* Marsh). Journal of the Association of Official Analytical Chemistry, vol. 67, p.1125.
- MORIN, A., M. Heckert, E. Poitras, D. Leblanc, F. Brion et C. Moresoli. 1995. Exopolysaccharide Production on Low-Grade Maple Sap of Maple Sap by *Enterobacter agglomerans* Grown in Small Scale Bioreactors. Journal of Applied Bacteriology, vol.79, p.30-37.
- MORSELLI, M.F et M.L. Whalen. 1986. Amino acid increase in xylem sap of acer saccharum prior to bud break. American Journal of Botany, vol.73, p.722. Abstr. 329.
- MORSELLI, M.F. 1975. Nutritional Value of Pure Maple Syrup. Nature Maple Syrup Digest, vol.14, p.12.
- NICOLI, M.C., M. Anese, MT Parpinel, S. Franceschi et C.R. Lericci. 1997. Loss and/or formation of antioxidant during food processing and storage. Cancer Letter, vol.114, p.71-74.
- NIJVELDT, R.J., E. van Nood, D.E.C. van Hoorn, P.G. Boelens, K. van Norren et P.A.M. van Leewen. 2001. Flavonoids : a review of probable mechanisms of action and potential applications. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 74, p. 418-425.
- ODA, Y., S. Nakamura, I. Oki, T. Kato et H. Shinagawa. 1985. Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. Mutation Research, vol.147, p.219-229.
- PIETTA, P-G. 2000. Flavonoids as Antioxidants. Journal of Natural Products, vol.63, p.1035-1042.
- POTTER, T.L. et I.S. Fagerson. 1992. Phenolic Compounds in Maple Syrup. In M.T. Huang, C.T. Ho et C.Y. Lee, (éd.). Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I, American Chemical Society, Washington, D.C. 234 p.

- QUILLARDET, P., O. Huisman, R. D'Ari et M. Hofnung. 1982. SOS chromotest, a direct assay of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity, Proceedings of the National Academy of Sciences (USA), vol.79, p.5971-5975.
- RICE-EVANS, C. 2001. Flavonoids Antioxidants. Current Medicinal Chemistry, vol.8, p.797-807.
- RICE-EVANS, C. A., N.J. Miller et G. Paganga. 1996. Structure-antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids (Review). Free Radical in Biology and Medicine, vol. 20, p.933-956.
- ROBINSON, A.R., K.S. Maclean et H.M. Macconnel. 1989. Heavy Metal, pH, and Total Solid Content of Maple Sap and Syrup Produced in Eastern Canada. Journal of the Association of Official Analytical Chemistry, vol.72, p.674-676.
- ROSSMAN, T.G., M. Molina, L.W. Meyer. 1984. The genetic toxicology of metal compounds : I. Induction of  $\lambda$  prophage in *E. coli* WP2<sub>8</sub> ( $\lambda$ ). Environmental Mutagen, vol. 6, p.59-69.
- SCHMIDL, M.K. et T.P. Labuza. 2000. Essentials of Functional Foods. Gaithersburg : Aspen Publication, 396 p.
- SCHUSTER, J.M. et K. Herrmann. 1985. Hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid derivatives in soft fruits. Phytochemistry, vol.24, p.2761-2764.
- SPANOS, G.A. et R.E. Wrolstad. 1992. Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 40, p. 1478-1487.
- STUCKEL, J.G. et N.H. Low. 1996. The Chemical Composition of 80 Pure Maple Syrup Samples Produced in North America. Food Research International, vol.29, no.3-4, p.373-379.
- WANG, H., G. Cao et R.L. Prior. 1996. Total Antioxidant Capacity of Fruit. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol.44, p. 701-705.
- WAYNER, D.D.M., G.W. Burton, K.U. Ingold et S. Locke. 1985. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasme by controlled peroxidation : The important contribution made by plasma proteins. FEBS Letters, vol.187, p.33-37.
- WHALEN, LM. et M.F. Morselli. 1985. Mold Growth on Maple Syrup. Maple Syrup Journal, vol.5, p.11-12.

WHONG, W-Z., Y-F. Wen, J. Stewart et T-M. Ong. 1986. Validation of the SOS/Umu Test with Mutagenic Complex Mixtures. Mutation Research, vol.175, p.139-144.

WILLITS, C.O. et C.H. Hills. 1996. Maple Sap Production, Tapping, Collecting and Storage. In C.O. Willits et C.H. Hills, (éd.). Maple Syrup Producers Manual, Washington, D.C., 234 p.

WULF, L.W. et C.W. NAGEL. 1976. Analysis of phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography. Journal of Chromatography, vol.116, p.271-279.

ZEIGER, E. 2000. Death and Antimutagenicity. Mutation Research, vol.466, p.125-127.