

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement
et de l'Environnement

THÈSE

pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Lille 1
Ingénierie des Fonctions Biologiques

Contribution à la recherche des composés impliqués dans l'amertume de la racine de chicorée – Approches métabolomique et sensorielle de l'influence de la torréfaction

par Honorine WILLEMAN

Soutenue le 04 mai 2016 devant la commission d'examen :

Dominique Rolin, <i>Professeur, Université de Bordeaux</i>	Rapporteur
Thierry Thomas-Danguin, <i>Chargé de recherche, INRA de Dijon</i>	Rapporteur
Isabelle Mouly, <i>Lab manager R&D, Lesaffre international</i>	Examinatrice
Michèle Boitel-Conti, <i>Professeur, Université de Picardie Jules Verne</i>	Examinatrice
Jean-Louis Hilbert, <i>Professeur, Université de Lille</i>	Examineur
Anne Fertin, <i>Maître de conférences, Université de Lille</i>	Examinatrice
Philippe Hance, <i>Chargé de projet, Adrinord</i>	Invité



Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement
et de l'Environnement

THÈSE

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille 1

Ingénierie des Fonctions Biologiques

**Contribution à la recherche des composés impliqués
dans l'amertume de la racine de chicorée –
Approches métabolomique et sensorielle
de l'influence de la torréfaction**

par Honorine WILLEMAN

Soutenue le 04 mai devant la commission d'examen :

Dominique Rolin, <i>Professeur, Université de Bordeaux</i>	Rapporteur
Thierry Thomas-Danguin, <i>Chargé de recherche, INRA de Dijon</i>	Rapporteur
Isabelle Mouly, <i>Lab manager R&D, Lesaffre international</i>	Examinatrice
Michèle Boitel-Conti, <i>Professeur, Université de Picardie Jules Verne</i>	Examinatrice
Jean-Louis Hilbert, <i>Professeur, Université de Lille</i>	Examineur
Anne Fertin, <i>Maître de conférences, Université de Lille</i>	Examinatrice
Philippe Hance, <i>Chargé de projet, Adrinord</i>	Invité



RESUME

Contribution à la recherche des composés impliqués dans l'amertume de la racine de chicorée – Approches métabolomique et sensorielle de l'influence de la torréfaction

La chicorée industrielle est cultivée pour sa racine qui est transformée sous forme séchée ou torréfiée pour être consommée notamment comme boisson. La racine et ses dérivés alimentaires sont connus pour leur amertume, ce qui peut représenter un frein pour de nouveaux consommateurs. Si l'amertume native est attribuée à des composés terpéniques, nos résultats indiquent une diminution de leur teneur lors de la torréfaction ce qui tend à démontrer que d'autres composés non identifiés sont responsables de l'amertume des produits torréfiés. A ce jour, aucune étude n'a été menée permettant d'identifier les déterminants chimiques de la saveur amère des produits finis ni de préciser l'impact de la torréfaction sur la composition native de la chicorée. Mes travaux de thèse ont donc été menés dans cet objectif.

Par des approches de génotypage et de métabolomique, l'analyse de la diversité génétique de 48 génotypes de chicorée industrielle a permis de constituer une collection de référence qui a été exploitée pour étudier la composition chimique de la racine fraîche, des cossettes séchées et des produits torréfiés à différents degrés (faible, moyen et fort). En parallèle, le profilage organoleptique des différents produits torréfiés a été effectué par analyse sensorielle. Les observations faites révèlent une évolution de la composition chimique et de l'amertume à l'issue de la torréfaction. L'intégration des données à l'aide d'une démarche statistique de corrélation a permis de mettre en relation 3 composés néoformés ainsi que 6 signaux inconnus avec le degré d'amertume des produits torréfiés de la racine de chicorée.

Mots clés : amertume, torréfaction, chicorée, métabolomique, organoleptique, diversité génétique, 5-hydroxyméthylfurfural.

ABSTRACT

Contribution to the research of compounds involved in the bitterness of the chicory root – Metabolomic and sensory approaches of the influence of the roasting process

Industrial chicory is cultivated for its root which is processed as dried or roasted products and consumed especially as beverage. Fresh root and its derivative foodstuffs are known for their bitterness, which can be considered as an obstacle for new consumers. Native bitterness is linked to terpene compounds, but our results indicate that other compounds are involved in bitterness of the roasted products. Indeed, content in terpene compounds dramatically decreases during roasting process. So far, no study has been done to identify chemical determinants of bitter taste of the end products or to clarify the impact of roasting on the native composition of chicory. My PhD work was therefore carried out to in this end.

By genotyping and metabolomic approaches, genetic diversity analysis of 48 industrial chicory genotypes was assessed to establish a reference collection used to perform a metabolomic study of the fresh root, dried cossettes and roasted products at different levels (light, medium and dark). In parallel, an organoleptic profiling of different roasting products was achieved by sensory analysis. The observations reveal changes in the chemical composition and in the perception of bitterness at the end of the roasting process. We used a statistical correlation analysis to integrate data from metabolomic and sensory analysis and so, 3 neoformed compounds and 6 unknown signals were highlighted as involved in the bitterness of roasted chicory root products.

Keywords: bitterness, roasting, chicory, metabolomic, organoleptic, genetic diversity, 5-hydroxymethylfurfural.

REMERCIEMENTS

Merci à Jean-Louis Hilbert, mon directeur de thèse, pour son attention pendant ces années de thèse.

Merci à mon encadrant Philippe Hance, pour m'avoir encadrée, aiguillée, corrigée, conseillée, soutenue et surtout de m'avoir supportée tout au long de ces années de thèse...

Merci également à Anne Fertin, ma co-encadrante de thèse, pour m'avoir formée sur l'analyse sensorielle.

Je tiens à remercier les membres du jury, Dominique Rolin, Thierry Thomas-Danguin, Isabelle Mouly et Michèle Boitel-Conti, d'avoir accepté de juger mes travaux.

Merci aux membres du comité de thèse, Annick Moing, Jérôme Bony et Richard Stadler, d'avoir pris le temps de me conseiller lors de nos rencontres.

Un grand merci à la société Leroux SAS, dirigée par Olivier Hermand, d'avoir participé au financement de ma thèse. Merci à Myriam Janssens, responsable recherche et développement chez Leroux, pour nos réunions constructives, sa gentillesse et pour sa confiance.

Merci à Bruno Desprez, président de la société Florimond Desprez Veuve et Fils, pour son amour de la chicorée mais aussi pour l'apport de critiques scientifiques très constructives lors de nos réunions. Merci également à Nicolas Henry, directeur de recherche betteraves et chicorées chez Florimond Desprez Veuve et Fils.

Merci à l'ensemble des partenaires du projet QUALICHIC avec qui j'ai eu l'occasion, lors de réunions de projet, de discuter, de débattre et de critiquer les résultats obtenus au cours de la thèse. Ces réunions m'ont vraiment permis d'avancer dans ma réflexion.

Un grand merci aux personnes de la plateforme métabolomique de Bordeaux pour leur accueil, leur gentillesse et leur disponibilité. Merci Mickaël Maucourt et Catherine Deborde pour m'avoir présenté la RMN et toute la méthodologie qui va avec. Merci à Stéphane Bernillon pour m'avoir permis d'approcher et de comprendre le fonctionnement d'une LC-QTOF-MS et surtout de m'avoir aidée à apprivoiser la plateforme en ligne workflow4metabolomics ! Merci à Annick Moing, responsable scientifique de la plateforme, pour m'avoir transmis ses connaissances en analyse statistique. Et enfin merci aux personnes que j'ai côtoyées dans le bureau des « semi-permanents », Vanessa, Nadia, Sandrine, Camille, Marie, Florence et Julie pour nos discussions de mariage, bébé, vacances... des discussions de filles quoi !

Merci à Jean-François Goossens, directeur du laboratoire CUMA de Lille 2, et Nathalie Duhal, ingénieure d'étude au CUMA, pour leur gentillesse, leur disponibilité et le partage de leurs connaissances scientifiques.

Merci à Thierry Cadalen pour les analyses génotypiques qu'il a entreprises et qui ont complété mes recherches. Merci aussi pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience.

J'adresse un merci général aux membres de notre nouvelle unité ASQV du SN2 à savoir Caroline, David, Christophe, Nasser, Bruno, Najia, Françoise, Marie-Christine, Séverine et Damien mais aussi aux personnes de l'ex-SADV pour nos discussions le midi !

Un énorme merci à toutes les personnes passées par le bureau des diplomatifs pour ces moments de détente, de partage, de rigolade, de débats ...

Et tout particulièrement :

Merci à Guillaume, dit Guigui, pour m'avoir écoutée lorsque je me plaignais, pour ses conseils, pour son optimisme, pour nos nombreuses discussions de travail, ou pas, pour les moments de rires (nombreux aussi). Je tiens à prendre ma revanche sur tes remerciements de thèse, je ne suis pas plus bavarde que toi mais autant, c'est pour ça que l'on s'entend si bien !! :)

Merci à Marianne pour nos nombreux moments de papotages sur tous les sujets possibles, la création de l'univers en passant par la construction des pyramides à l'époque de Louis XIV mais aussi celle des dinosaures... de quoi s'y perdre ^^ . Nos discussions le midi sur les films à voir et les livres à lire... Mais attention il y a aussi eu des moments de discussion sur le boulot :). Par contre je suis désolé mais Guigui à raison tu es aussi bavarde que nous !

Merci à Pauline pour tes connaissances cinématographique et littéraire qui m'ont fait voyager mais surtout merci pour tous ces gâteaux que tu nous as cuisinés (kinder délice maison, sucette d'halloween, cookies, fondant chocolat...).

Merci à Matthieu pour sa gentillesse, sa disponibilité, son écoute et ses conseils.

Sans oublier de remercier Malika, Harmony, Sana, Nadim, Maxime C, Julien, Christophe, Maxime M, Rihem, Laure, Charlotte, Prisca... mais aussi les stagiaires que j'ai pu encadrer pendant ces 3 ans, Chloé, Justine, Maureen, Ophélie et Cédric.

Enfin merci à toutes les personnes extérieures :

Mes amis de longue date Nicolas, Lucile, Charlotte et Alice.

Mes parents, Nathalie et Stéphane, qui m'ont toujours soutenue dans mes choix et qui m'ont donné les outils pour réussir. Mon grand frère, Aurélien, toujours là pour me conseiller et me taquiner !

Et enfin mention spéciale à mon mari, Yoan, qui m'a épaulée, encouragée mais surtout qui m'a supportée pendant ces 3 années et demi lors de mes moments de doute. Enfin une énorme pensée pour mon fils, Simon, qui, je l'espère, est fière de sa maman !!

ABBREVIATIONS

1-FFT : Fructan:fructan 1-fructosyltransférase

1-SST : Sucrose:sucrose 1-fructosyltransférase

3-CQA : acide 3-mono-*O*-caféoylquinique

3,5-diCQA : acide 3,5-di-*O*-caféoylquinique

4CL : 4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase

5-CQA : acide 5-mono-*O*-caféoylquinique

5-HMF : 5-hydroxyméthylfurfural

Ac : Acétone

ACG : Acides chlorogéniques (CGA)

ACP : Analyse en composantes principales

ANOVA : Analyse de la variance

AFNOR : Association française de normalisation

C3'H : *p*-coumaroyl ester 3'-hydroxylase

C4H : Cinnamate 4-hydroxylase

CAS : Chemical abstracts service

CH₂Cl₂ : Dichlorométhane

CHCl₃ : Chloroforme

CP : Composante principale

CTN : Color Test Neuhaus

D : 'Dark'

D₂O : Deuterium oxide

DHdLc : 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine

DHLc : 11(S),13-dihydrolactucine

DHLp : 11(S),13-dihydrolactucopitrine

dLc : 8-déoxylactucine

DMAPP : Diméthylallyl pyrophosphate

DP : Degré de polymérisation

EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique

ERETIC : Electronic reference to access in vivo concentrations

EtOAc : Ethyl acétate

EtOH : Ethanol

F-6-P : Fructose 6-phosphate

FPP : Farnesyl pyrophosphate

G-1-P : Glucose 1-phosphate

G-6-P : Glucose 6-phosphate

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

GGPP : Géranylgéranil pyrophosphate

GPP : Géranyl pyrophosphate

HPLC-DAD : Chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV à barrette de diode

IPP : Isopentényl pyrophosphate

ISO : Organisation internationale de normalisation

L : 'Light'

Lc : Lactucine

LC-QTOF-MS : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse quadripôle à temps de vol

Lp : Lactucopicrine

LST : Lactones sesquiterpéniques (STL)

M : 'Medium'

MeOH : Méthanol

m/z : Rapport masse sur charge

n-hex : *n*-hexane

PAI : Produit alimentaire intermédiaire

PIC : Polymorphism index content

QC : Contrôle qualité

R : Racine fraîche

RMN-¹H : Résonance magnétique nucléaire
du proton

S : Cossettes séchées

SMILES : Simplified molecular-input line-
entry system

T : Produits torréfiés

TR : Temps de rétention (RT)

TSP : 3-triméthylsilyl [2,2,3,3-*d*₄] propionate
de sodium

UPLC-HRMS : Chromatographie liquide ultra
performante couplée à la spectrométrie de
masse haute résolution

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	1
LISTE DES TABLEAUX	9

INTRODUCTION GENERALE

CONTEXTE DE LA THESE	15
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	19
1. La chicorée.....	19
1.1. La plante et son cycle de développement.....	19
1.2. L'utilisation ancestrale de la chicorée	20
1.3. Son utilisation actuelle	22
1.4. La composition native majeure de la racine de chicorée.....	24
1.5. Les propriétés des composés naturellement présents dans la racine de chicorée	33
1.5.1. Les propriétés bénéfiques pour la santé	33
1.5.2. Les propriétés organoleptiques.....	34
2. Les produits transformés de la racine de chicorée industrielle	35
2.1. Le processus de transformation	35
2.2. La torréfaction	36
2.3. La composition de la racine de chicorée torréfiée.....	37
2.4. Les propriétés organoleptiques des produits torréfiés de la chicorée	38
3. Le marquage moléculaire	39
3.1. Définition	39
3.2. Les marqueurs moléculaires.....	40
3.3. Le marquage moléculaire en agro-alimentaire	42
4. La métabolomique	44
4.1. Définition	44
4.2. Les outils.....	46

4.2.1. La chromatographie liquide haute performance	46
4.2.2. La spectrométrie de masse	47
4.2.3. La résonance magnétique nucléaire	51
4.3. La métabolomique en agro-alimentaire.....	54
5. L'analyse sensorielle.....	56
5.1. Définition.....	56
5.2. Le panel	56
5.3. Conditions de dégustations.....	59
5.4. Les tests sensoriels	60
5.4.1. Tests discriminatifs.....	60
5.4.2. Tests de positionnement.....	60
5.4.3. Tests hédoniques.....	61
5.4.4. Tests descriptifs : le profil sensoriel	61
5.5. L'analyse sensorielle en agro-alimentaire.....	63
6. L'analyse des données par l'outil statistique	64
6.1. Définition.....	64
6.2. Exemples d'analyses statistiques	65
6.2.1. Analyse en composantes principales	65
6.2.2. Corrélation et régression linéaire.....	67
6.2.3. Analyse de la variance	67
6.2.4. Classification hiérarchique ascendante.....	68
6.3. L'utilisation de l'analyse statistique	68
DEMARCHES SCIENTIFIQUE & EXPERIMENTALE	70
CHAPITRE 1 : IMPLICATION DES ACIDES CHLOROGENIQUES ET DES LACTONES	
SESQUITERPENIQUES DANS L'AMERTUME DE LA RACINE DE CHICOREE	
ET DES PRODUITS TORREFIES	
INTRODUCTION.....	75
PUBLICATION	77

A method for the simultaneous determination of chlorogenic acid and sesquiterpene lactone content in industrial chicory foodstuffs

Willeman Honorine, Hance Philippe, Fertin Anne, Voedts Najia, Duhal Nathalie, Goossens Jean-François, Hilbert Jean-Louis

ETUDE PRELIMINAIRE DE L'AMERTUME DES PRODUITS TORREFIES.....	89
1. Matériels et méthodes	89
1.1. Matériels biologiques	89
1.2. Extraction et quantification par HPLC-DAD des acides chlorogéniques et des lactones sesquiterpéniques	89
1.3. Analyses sensorielles	89
1.4. Analyses statistiques	91
2. Résultats et discussion	92
2.1. Composition en acides chlorogéniques et en lactones sesquiterpéniques des variétés de chicorée industrielle et des produits transformés	92
2.2. Amertume de la racine et des produits torréfiés en fonction des variétés	96
2.3. Relation entre la composition et l'amertume de la racine et des produits torréfiés.	96
CONCLUSION.....	101

**CHAPITRE 2 : INFLUENCE DU SECHAGE ET DE LA TORREFACTION SUR LA COMPOSITION
NATIVE DE LA RACINE DE CHICOREE INDUSTRIELLE**

INTRODUCTION	105
MATERIELS ET METHODES	107
1. Matériels biologiques.....	107
1.1. Expérimentations au champ.....	107
1.2. Pilote de transformation	109
2. Profilage chimique ciblé des métabolites secondaires par HPLC-DAD.....	111
3. Profilage chimique non ciblé des composés polaires et semi-polaires par LC-QTOF-MS	114
4. Profilage chimique ciblé et non ciblé des composés polaires par RMN du proton	116
5. Marquage moléculaire par marqueurs microsatellites.....	119
6. Analyses statistiques	121

RESULTATS ET DISCUSSION	123
1. Evaluation de la diversité génétique de la collection de chicorées industrielles	123
2. Impact du processus de transformation sur la composition chimique native de la racine de chicorée	139
CONCLUSION.....	153

CHAPITRE 3 : INFLUENCE DU DEGRE DE TORREFACTION SUR LA COMPOSITION DE LA RACINE - CONSEQUENCE SUR L'AMERTUME DES PRODUITS TORREFIES

INTRODUCTION	159
MATERIELS ET METHODES	161
1. Matériels biologiques.....	161
2. Décoction alimentaire	163
3. Analyses métabolomiques.....	164
3.1. Profilage chimique ciblé des métabolites secondaires par HPLC-DAD	164
3.2. Profilage chimique non ciblé des composés polaires par LC-QTOF-MS.....	164
3.3. Profilages chimiques ciblé et non ciblé des composés polaires par RMN- ¹ H	164
4. Analyses sensorielles.....	166
4.1. Qualification du panel	166
4.2. Entrainement du panel.....	168
4.3. Génération de descripteurs et entraînement	168
4.4. Profil sensoriel	170
5. Analyses statistiques	172
RESULTATS ET DISCUSSION	173
1. Influence des différents niveaux de torréfaction sur la composition chimique des produits torréfiés	173
2. Influence de la torréfaction sur les propriétés sensorielles	186
3. Implication des molécules dans l'amertume du produit torréfié	193
CONCLUSION.....	199
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	203

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	211
ANNEXES	231
VALORISATION	237

LISTE DES FIGURES

Introduction générale

Figure i.1 : Le cycle de développement de *Cichorium intybus* var. *sativum*. (p 19)

Figure i.2 : Exemples de différentes variétés consommées pour les trois espèces de chicorée présentes en Europe. (p 23)

Figure i.3 : Structure de l'inuline. (p 25)

Figure i.4 : Modèle de biosynthèse d'inuline proposé par Van Laere & Van den Ende (2002). Les enzymes sont encadrés. 1-SST : sucrose:sucrose 1-fructosyltransférase, 1-FFT : fructane:fructane 1-fructosyltransférase, HK : hexokinase, SPS : sucrose phosphate synthétase, SPP : sucrose phosphate phosphatase, G-6-P : glucose 6-phosphate, G-1-P : glucose 1-phosphate, F-6-P : fructose 6-phosphate. (p 26)

Figure i.5 : Voie de biosynthèse des acides chlorogéniques issus de la voie des phénylpropanoïdes dans les plantes. Les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse sont : PAL : phénylalanine ammonia lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL : 4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase ; HCT : hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinatate hydroxycinnamoyl transférase ; HQT : hydroxycinnamoyl CoA quinate hydroxycinnamoyl transférase ; C3'H : *p*-coumaroyl ester 3'-hydroxylase ; CSE : caféoylshikimate estérase (Legrand *et al.*, soumis). (p 28)

Figure i.6 : Les acides chlorogéniques présents dans la racine de *C. intybus* : le 3-mono-*O*-caféoylquinique (1) et le 3,5-di-*O*-caféoylquinique (2). (p 30)

Figure i.7 : Voie de biosynthèse des terpènes dans les plantes (Heldt & Piechulla, 2004). (p 31)

Figure i.8 : Les lactones sesquiterpéniques majeures présentes dans la racine de *C. intybus* : lactucine (1), 8-déoxylactucine (2), lactucopicrine (3), 11(S),13-dihydrolactucine (4), 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine (5), 11(S), 13-dihydrolactucopicrine (6). (p 32)

Figure i.9 : Schéma des étapes de la transformation de la racine fraîche à la poudre soluble de chicorée (Macrae *et al.*, 1993). (p 35)

Figure i.10 : L'itinéraire de la plante cultivée à partir de sa forme récoltée aux produits alimentaires dérivés (leroux.fr). (p 36)

Figure i.11 : Exemple d'utilisation de marquage moléculaire (gnis.org). (p 39)

Figure i.12 : Technique de marquage par microsatellite. Un marqueur microsatellite est une paire d'amorces spécifiques bordant le microsatellite. L'individu B, possédant plus d'unité de répétition que A, a un produit d'amplification qui migre plus lentement que A. (PCR : Polymerase Chain Reaction) (gnis.org). (p 41)

Figure i.13 : Illustration du compromis entre l'étendue métabolique et la qualité de l'analyse métabolomique. (p 45)

Figure i.14 : Modules disponibles pour les analyses LC-MS (workflow4metabolomics.org). TP1 preprocessing permet de convertir les spectres en données numériques, TP2 statistics mets à disposition des outils statistique et TP3 l'identification de composés. (p 49)

Figure i.15 : Les étapes du pré-traitement des spectres aboutissant à une matrice de variables et une matrice de données. (p 50)

Figure i.16 : Le noyau possède un moment magnétique pouvant être assimilé à un petit aimant (Une introduction à la RMN, chapitre 1, Serge Akoka, Université de Nantes). (p 51)

Figure i.17 : Orientation des moments magnétiques nucléaires : (a) en absence, (b) en présence d'un champ magnétique externe B_0 . En présence d'un champ magnétique, la somme vectorielle des moments magnétiques, M , est nulle et dirigée dans la direction de ce champ (c) (Une introduction à la RMN, chapitre 1, Serge Akoka, Université de Nantes). (p 52)

Figure i.18 : Orientation de M , la somme vectorielle des moments magnétiques. (a) En présence de B_0 , M est non nulle et dirigée suivant z , (b) rotation de 90° de tous les moments magnétiques en présence d'un champ B_1 perpendiculaire à B_0 , (c) dès que B_1 n'est plus appliqué, les moments magnétiques reprennent une polarisation et une précession uniquement gouvernées par B_0 mais M est alors dans le plan transversal (Une introduction à la RMN, chapitre 1, Serge Akoka, Université de Nantes). (p 53)

Figure i.19 : Salle d'analyse sensorielle de l'IUT de Lille 1. (p 59)

Figure i.20 : Représentation des données sous forme de tableau. Les variables sont représentées en colonnes et les observations en lignes. (p 65)

Figure i.21 : Exemple d'analyse en composantes principales effectuée par le logiciel R *via* le package factominer (factominer.free.fr). A gauche le graphique des individus et à droite le graphique des variables. (p 66)

Figure i.22 : Exemple de corrélation ou de régression linéaire. (p 67)

Figure i.23 : Exemple de dendrogramme. (p 68)

Chapitre 1 : Implication des acides chlorogéniques et des lactones sesquiterpéniques dans l'amertume de la racine de chicorée et des produits torréfiés

Figure 1. Structure, logP values and surface polarity (SP) of the six sesquiterpene lactones: lactucin (1), 8-deoxylactucin (2), lactucopicrin (3), 11(S),13-dihydrolactucin (4), 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin (5), 11(S), 13-dihydrolactucopicrin (6) and two chlorogenic acids: 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (7), 5-mono-*O*-caffeoylquinic acid (8) identified in chicory roots products. (*publication*)

Figure 2. HPLC-DAD chromatograms of sesquiterpene lactones and chlorogenic acids in chicory root product (flour) obtained with H₂O/CHCl₃/MeOH 30/30/30 (v/v/v) extraction: (A) STL at 254 nm and (B) CGA at 320 nm. 1: 5-mono-*O*-caffeoylquinic acid, 2: 11(S),13-dihydrolactucin, 3: lactucin, 4: 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, 5: 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin, 6: 8-deoxylactucin, 7: 11(S), 13-dihydrolactucopicrin, 8: lactucopicrin. (*publication*)

Figure 1.1: Effet du processus de transformation sur les 6 lactones sesquiterpéniques : DHLc : 11(S),13-dihydrolactucine ; Lc : lactucine ; DHdLc : 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine ; dLc : 8-déoxylactucine ; DHLp : 11(S),13-dihydrolactucopirine ; Lp : lactucopirine et des 2 acides chlorogéniques : 5-CQA : acide 5-mono-*O*-caféoylquinique ; 3,5-diCQA : acide 3,5-di-*O*-caféoylquinique. (*p 95*)

Figure 1.2 : Effet variétal des racines de chicorée sur les teneurs en LST et en ACG, la valeur totale d'amertume (BV) et les résultats du test de classement (BD). Analyse en composantes principales (avec CP1 expliquant 74,02 % et CP2 22,85 %) des 8 métabolites quantifiés par analyse HPLC-DAD, de la BV et du test de classement obtenus par analyse sensorielle pour les 5 variétés de chicorée industrielle (n = 3). (*p 99*)

Figure 1.3 : Structure des 6 LST identifiés dans les produits de racine de chicorée. (1) : lactucine, (2) : 8-déoxylactucine, (3) : lactucopirine, (4) : 11(S),13-dihydrolactucine, (5) : 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine, (6) : 11(S),13-dihydrolactucopirine. (*p 100*)

Chapitre 2 : Influence du processus de transformation sur la composition native de la racine de chicorée industrielle

Figure 2.1 : Plan d'expérimentation. (p 107)

Figure 2.2 : Dispositif expérimental en alpha plan de 6 sous-blocs de 8 objets (génotypes) répété 3 fois (3 blocs). (p 109)

Figure 2.3 : Pilote de transformation de la société Leroux. (p 110)

Figure 2.4 : HPLC-DAD de l'équipe métabolite secondaire du laboratoire ASQV de l'institut Charles Viollette. (p 111)

Figure 2.5 : Gradient d'élution (en %) de la méthode HPLC-DAD. Solvant A : eau avec 0,1 % d'acide *ortho*-phosphorique, solvant B : méthanol avec 0,1 % d'acide *ortho*-phosphorique, solvant C : acétonitrile avec 0,1 % d'acide *ortho*-phosphorique. (p 112)

Figure 2.6 : Chromatogramme HPLC-DAD des lactones sesquiterpéniques et des acides chlorogéniques présents dans un extrait de racine de chicorée. La solution d'extraction est un mélange ternaire H₂O/CHCl₃/MeOH 30/30/30 (v/v/v) : (A) LST à 254 nm et (B) ACG à 320 nm. 1: 3-CQA, 2: DHLc, 3: Lc, 4: 3,5-diCQA, 5: DHdLc, 6: dLc, 7: DHLp, 8: Lp. (p 113)

Figure 2.7 : LC-QTOF-MS du Centre Génomique Fonctionnelle de Bordeaux (cgfb.fr). (p 114)

Figure 2.8 : Empreinte globale issue d'une analyse non ciblée par LC-QTOF-MS. TIC All MS (Total Ion Current chromatogram) de racine fraîche, séchée et torréfiée de chicorée industrielle. (p 115)

Figure 2.9 : RMN-¹H du Centre Génomique Fonctionnelle de Bordeaux (cgfb.fr). (p 116)

Figure 2.10 : Empreinte globale issue d'une analyse ciblée et non ciblée par RMN-¹H de la racine fraîche de chicorée (a) et du produit torréfié (b). L'empreinte globale des cossettes séchées est similaire à celle de la racine fraîche. (p 118)

Figure 2.11 : Exemple d'un couple d'amorces (surlignées en vert), couplé à un fluorochrome (étoile verte), bordant le marqueur microsatellite (en rouge). (p 120)

Figure 2.12 : Discrimination quantitative par classification hiérarchique des 48 génotypes de racine fraîche (n = 3) à partir des distances euclidiennes (logiciel MeV v4.9) obtenues par les 47 signaux sélectionnés par ANOVA (p-value < 0,05). (p 124)

Figure 2.13 : Histogramme représentant le nombre d'allèles totaux pour chacun des 48 génotypes. (p 127)

Figure 2.14 : Discrimination des géotypes par classification hiérarchique ascendante des 48 géotypes de racine fraîche à partir des distances euclidiennes (logiciel Darwin v5.0.158), obtenues après transformation des données de géotypages de 19 marqueurs microsatellites en fréquences alléliques. (p 129)

Figure 2.15 : Analyse en coordonnées principale des distances euclidiennes obtenues à partir des fréquences alléliques issues des données de géotypage (logiciel Darwin v5.0.158). A. PCoA représentant l'axe 1 (16 % de l'inertie totale) et l'axe 2 (14 %), B. PCoA représentant l'axe 2 (14 %) et l'axe 3 (9 %). Code couleur équivalent à la **figure 2.14**. (p 131)

Figure 2.16 : Visualisation, par une analyse en composantes principales (avec CP1 expliquant 27,88 % et CP2 23,93 %) (logiciel R v2.15.), de la répartition des 9 géotypes selon leur composition chimique pour les 32 métabolites identifiés lors des analyses métabolomiques de la racine fraîche de chicorée industrielle. (p 136)

Figure 2.17 : Diagramme de Venn représentant la répartition de l'ensemble des signaux détectés et quantifiés par HPLC-DAD, LC-QTOF-MS et RMN-¹H. Racine fraîches : vert, cossettes séchées : orange, produits torréfiés : marron. Les chevauchements des cercles représentent les signaux en commun. (p 139)

Figure 2.18 : Illustration des résultats obtenus par les tests ANOVA à un facteur ajusté par la méthode de Bonferroni (logiciel MeV v.4.9), à partir des 2 515 signaux communs aux 9 géotypes sélectionnés de racine (R), de cossette séchée (S) et de produit torréfié (T). (p 142)

Figure 2.19 : Analyse en composante principale (avec CP1 expliquant 58,15 % et CP2 31,25 %) (logiciel R v2.15.) des 16 signaux qui diminuent de façon significativement différents (p -value < 0,05) pour les 9 géotypes de racine fraîche (R), cossettes séchées (S) et produit torréfié (T) de chicorée industrielle. (p 143)

Figure 2.20 : Analyse en composante principale (avec CP1 expliquant 89,13 % et CP2 1,82 %) (logiciel R v2.15.) des 177 signaux qui augmentent de façon significativement différents (p -value < 0,05) pour les 9 géotypes de racine fraîche (R), cossettes séchées (S) et produit torréfié (T) de chicorée industrielle. (p 144)

Figure 2.21 : Evolution des teneurs, en mg/g de matière sèche de l'inuline (échelle de gauche) et du fructose, glucose et saccharose (échelle de droite) au cours du processus de transformation. Les différentes lettres d'une même couleur indiquent une différence significative (p -value < 0,05). (p 146)

Figure 2.22 : Transformation de Lobry de Bruyn – Alberda van Eckenstein (Hodge & Osman, 1976). (p 148)

Chapitre 3 : Influence de la torréfaction sur la composition de la racine – Conséquence sur l’amertume des produits torréfiés

Figure 3.1 : Filtration des extraits de décoction alimentaire qui seront utilisés pour les analyses métabolomiques et sensorielles. (p 163)

Figure 3.2 : Exemple de test de détection du daltonisme, il s’agit de visualiser les numéros dans les deux figures. Si aucun numéro n’est perçu par le candidat, il est probablement porteur d’une anomalie de la vision des couleurs. (p 166)

Figure 3.3 : Exemple de test de logique. Il consiste à estimer la proportion que représente la surface noircie par rapport à la surface totale du carré. (p 167)

Figure 3.4 : Questionnaire présenté aux membres du panel d’experts pour le profilage sensoriel des produits torréfiés de la chicorée. Chaque produit est noté de 0 (absence) à 10 (très intense) pour les 13 descripteurs. (p 171)

Figure 3.5 : Diagramme de Venn représentant la distribution de l’ensemble des signaux détecté et quantifié par HPLC-DAD, LC-QTOF-MS et RMN-¹H pour les trois degrés de torréfaction de la racine de chicorée. Les chevauchements des cercles représentent les signaux en commun. (p 173)

Figure 3.6 : Visualisation, par analyse en composantes principales (avec CP1 expliquant 35,33 % et CP2 7,00 %) (logiciel R v2.15.), de la répartition des génotypes pour chacun des trois degrés de torréfaction : faible (L, CTN ‘light’), moyenne (M, CTN ‘medium’) et forte (D, CTN ‘dark’) en utilisant les 3 006 signaux communs. (p 175)

Figure 3.7 : Illustration des résultats obtenus par les tests de Student (logiciel MeV v.4.9) à partir des 3 065 signaux communs aux 9 génotypes sélectionnés de CTN ‘light’ et CTN ‘medium’. Les signaux connus sont cités en **gras** et ceux identiques aux analyses effectuées en chapitre 2 (**figure 2.17 et 2.18**) sont soulignés. (p 176)

Figure 3.8 : Répartition des 9 génotypes de produit torréfié CTN ‘light’ (L), visualisée par analyse en composantes principales (avec CP1 expliquant 57,89 % et CP2 12,84 %) (logiciel R v2.15.), en fonction des 16 métabolites connus qui évoluent de façon significativement différents (p -value < 0,01) au cours de la torréfaction. En vert les métabolites qui diminuent et en orange ceux qui augmentent. (p 181)

Figure 3.9 : Répartition des 9 génotypes de produit torréfié CTN ‘medium’ (M), visualisée par analyse en composantes principales (avec CP1 expliquant 50,12 % et CP2 17,84 %) (logiciel R v2.15.), en fonction des 16 métabolites connus qui évoluent de façon significativement différents (p -value < 0,01)

au cours de la torréfaction. En vert les métabolites qui diminuent et en orange ceux qui augmentent. (p 184)

Figure 3.10 : Représentation en radar de l'intensité moyenne, note de 0 à 10, perçue par les juges pour chaque descripteur. Les résultats d'ANOVA (logiciel MeV v.4.9) indiquent une différence significative, entre les trois temps de torréfaction, pour 8 descripteurs, *** p -value < 0,001, ** p -value < 0,01, * p -value < 0,05. (p 187)

Figure 3.11 : Visualisation, par une analyse en composantes principales (avec CP1 expliquant 23,45 % et CP2 16,28 %) (logiciel R v2.15.), de la répartition des 9 génotypes de produit faiblement (L, CTN 'light') et moyennement (M, CTN 'medium') torréfiés et le génotype fortement torréfié (D, CTN 'dark') selon les 8 descripteurs significativement différents (p -value < 0,05) pour les 3 degrés de torréfaction. (p 191)

Figure 3.12 : Illustration des résultats obtenus par corrélation de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les 357 signaux évoluant au cours de la torréfaction de la racine de chicorée et la saveur amère. Le saccharose est également corrélé négativement à la saveur astringente et à l'arôme torréfié / grillé. Le fumarate, le citrate et le 5-HMF sont également corrélés positivement à la saveur astringente et à l'arôme torréfié / grillé. L'inuline est également corrélée négativement à l'arôme torréfié / grillé. (p 194)

Figure 3.13 : Structures chimiques du 5-HMF (a) et de l'alcool furfurylique (b) (PubChem.ncbi.nlm.nih.gov). La similarité des structures de ces deux composés, renseignée par le coefficient de Tanimoto, est de 0,89. (p 196)

Figure 3.14 : Structures chimiques du lactate (a) et du fumarate (b) (PubChem.ncbi.nlm.nih.gov), de l'acide benzylique (b) et du magnésium lactate trihydrate (c) (BitterDB.agri.huji.ac.il). (p 197)

LISTE DES TABLEAUX

Introduction générale

Tableau i.1 : Utilisations médicinales traditionnelles de *Cichorium intybus* (d'après Street *et al.*, 2013). (p 21)

Tableau i.2 : Comparaison de l'acide chlorogénique (3-CQA) et de l'acide néochlorogénique (5-CQA). Le numéro CAS d'une substance chimique est son numéro d'enregistrement unique auprès de la banque de données du Chemical Abstract Service (CAS). Le numéro EC correspond à l'identifiant unique assigné à une substance chimique par les autorités de l'Union Européenne. (p 29)

Tableau i.3 : Normes à respecter lors d'entraînement, de contrôle et de suivi d'un groupe de sujets. (d'après *Evaluation sensorielle - guide de bonnes pratiques*, 1999). (p 58)

Tableau i.4 : Tableau de synthèse des tests sensoriels précédemment présentés (d'après *Evaluation sensorielle - guide de bonnes pratiques*, 1999). (p 62)

Chapitre 1 : Implication des acides chlorogéniques et des lactones sesquiterpéniques dans l'amertume de la racine de chicorée et des produits torréfiés

Table 1: Contents of CGA (5-CQA, 3,5-diCQA) and STL (DHLc, Lc, DHdLc, dLc, DHLp, Lp) in the root, flour and roasted grains extracted by different solvents and solvent mixtures. (*publication*)

Table 2: Authentication of CGA and STL in chicory flour by negative-ion UPLC-HRMS analysis. (*publication*)

Table 3: Retention time (RT), limit of detection (LOD) and of quantitation (LOQ), linearity range, determination coefficient (R²) and regression equation of metabolites tested. (*publication*)

Table 4: Extractability rate of the extraction H₂O/CHCl₃/MeOH 30/30/40 (v/v/v), repeatability and reproducibility expressed in terms of the variation (RSD %) of contents. The repeatability and reproducibility of the HPLC-DAD method are expressed in terms of the variation (RSD %) of retention times (RT) and areas. (*publication*)

Table 5: Recovery (%) of the extraction of H₂O/CHCl₃/MeOH 30/30/40 (v/v/v) with different additions (5-CQA, 3,5-diCQA and DHLc) to flour. (*publication*)

Tableau 1.1: Teneurs en ACG (5-CQA, 3,5-diCQA) et en LST (DHLc, Lc, DHdLc, dLc, DHLp, Lp) dans les 5 variétés de chicorée industrielle : Calcite, Chrysolite, Malachite, Orchies et Silex, quantifiées au niveau de la racine et des produits torréfiés. (p 93)

Tableau 1.2 : Valeur d'amertume des LST dans les 5 variétés de chicorée industrielle au niveau de la racine et des produits torréfiés. (p 97)

Chapitre 2 : Influence du processus de transformation sur la composition native de la racine de chicorée industrielle

Tableau 2.1 : Tableau représentant les génotypes apparentés. Les génotypes du groupe A sont apparentés avec des génotypes du groupe B. Le génotype 1E est apparenté avec les génotypes du groupe D. Les génotypes du groupe C ne sont apparentés avec aucun groupe. (p 108)

Tableau 2.2 : Statistiques descriptives par marqueurs microsatellites (logiciel Power Marker v. 3.25). GL : groupe de liaison sur la carte ; Nb d'allèle : nombre d'allèles détectés par marqueur ; Nb d'observation : nombre d'individus génotypés sur les 572 ; Proba 1, Hétérozygotie, PIC : 3 caractéristiques des marqueurs. (p 126)

Tableau 2.3 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus par les données issus des analyses métabolomiques et des analyses génotypiques. Les neuf génotypes sélectionnés sont présentés en rouge. (p 133)

Tableau 2.4 : Présentation codée des croisements effectués pour l'obtention des génotypes ayant des parents communs. (p 132)

Tableau 2.5 : Teneurs moyennes en mg/g de matière sèche de monosaccharide (mono.), saccharose (sacch.), inuline (inul.), acides aminés (AA), citrate, fumarate, malate, LST, ACG, trigonelline (trigo.), choline et scyllitol pour les 9 génotypes de la racine fraîche de chicorée. (p 135)

Tableau 2.6: Résultats des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les teneurs en pyroglutamate et en acides aminés. (p 141)

Tableau 2.7 : Résultats des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les teneurs en di- et polysaccharides et en monosaccharides. (p 147)

Tableau 2.8 : Résultats des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les teneurs en sucres et les acides organiques. (p 148)

Tableau 2.9 : Résultats des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les teneurs en fructose et en mannose et glucose. (p 149)

Tableau 2.10 : Résultats des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les teneurs en 5-HMF et en fructose, glucose, mannose, saccharose et inuline. (p 149)

Chapitre 3 : Influence de la torréfaction sur la composition de la racine – Conséquence sur l’amertume des produits torréfiés

Tableau 3.1 : Récapitulatif des répétitions torréfiées selon les trois degrés de torréfaction. Les répétitions représentées en orange sont celles utilisées pour les analyses chimiques et sensorielles. (p 162)

Tableau 3.2 : Dispositif du test de reconnaissance des saveurs. (p 166)

Tableau 3.3 : Dispositif du test de classement des saveurs. (p 168)

Tableau 3.4 : Liste des 13 descripteurs et de leur référent. (p 169)

Tableau 3.5 : Organisation des sessions. (p 170)

Tableau 3.6 : Présentation des résultats significatifs des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les métabolites diminuant et ceux augmentant d’une torréfaction ‘light’ à ‘medium’. (p 177)

Tableau 3.7 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus sur l’évolution des métabolites au cours de processus de transformation (chapitre 2) et du processus de torréfaction (chapitre 3). (p 179)

Tableau 3.8 : Teneur moyenne en mg/g de matière sèche d’acides chlorogéniques, de lactones sesquiterpéniques, de di- et polysaccharides, de monosaccharides, d’acides organiques, de *myo*-inositol (inositol), de pyroglutamate (pyro.) et de 5-HMF pour les 9 géotypes faiblement (‘light’) et moyennement (‘medium’) torréfiés. (p 182)

Tableau 3.9 : Résultats des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les 13 descripteurs sensoriels. Seules les corrélations significatives, R^2 supérieur ou égale à 0,5 et une *p*-value ajustée inférieure à 0,05, sont représentées dans ce tableau. (p 188)

Tableau 3.10 : Fractionnement des arômes volatils de la racine de chicorée torréfiée (Sannai, Fujimori, & Kato, 1982). (p 189)

Tableau 3.11 : Molécules inconnus corrélés positivement à l’amertume. (p 198)

INTRODUCTION

GENERALE

CONTEXTE DE LA THESE

La chicorée sauvage (*Cichorium intybus*) est une plante de la famille des Astéracées, certainement originaire du bassin méditerranéen, qui s'est largement répandue en Europe en tant qu'adventice. Dès l'antiquité, elle était utilisée en Egypte, en Grèce ou encore en Italie aussi bien comme aliment qu'à des fins médicinales. C'est pourquoi, elle s'est sans doute développée sous une forme semi-cultivée pendant des siècles. Sa culture, à proprement parler, est mentionnée pour la première fois en Allemagne en 1616, puis s'est développée dans le Nord de l'Europe. Au 17^{ème} siècle a été mis au point le processus industriel de torréfaction de la racine de chicorée à des fins alimentaires. Cet usage s'est renforcé lors du blocus continental imposé en 1806 par Napoléon qui provoqua une pénurie de café. Ainsi la chicorée à boisson, dite industrielle, acquiert une place de choix dans la vie quotidienne des français et les surfaces cultivées ont été multipliées par 15 entre 1872 et 1940. C'est dans les années 80 que la sélection moderne de la racine de chicorée débuta et que de nombreuses améliorations variétales furent entreprises. La chicorée étant allogame, les variétés sont dites de population. Ces variétés sont nettement moins homogènes que les variétés fixées et par conséquent moins stables. En 1981, la variété population « Tilda » (Bataille, France) a été sélectionnée pour sa racine courte et sa forme cylindro-conique afin de faciliter l'arrachage mécanique. En 1984, la variété population « Pévèle » (Florimond Desprez, France) est la première variété à combiner une forme de racine propice à l'arrachage et une résistance à la montée à graines permettant d'augmenter le rendement et les teneurs en matière sèche. Ce caractère est primordial pour les zones du nord de l'Europe à cause du risque de vernalisation par le froid après semis. En 1986, « Cassel » (Florimond Desprez, France) est la première variété synthétique, population artificielle résultant de multiplication, à forte capacité de rendement. En 1987, « Orchies » (Florimond Desprez, France) est la première variété synthétique cumulant un bon rendement et une bonne résistance à la montée à graines. En 1988, « Bergues » (Florimond Desprez, France) est la première variété hybride, population obtenue à partir d'un croisement entre deux individus, basée sur la stérilité mâle nucléo-cytoplasmique de chicorée/tournesol « Desprez », permettant d'augmenter le rendement. Cette stérilité a pu être obtenue par fusion de protoplaste de mésophylle de chicorée industrielle fertile et d'hypocotyle de tournesol mâle stérile (Rambaud *et al.*, 1993). Ce caractère induit la perte de production de pollen par les étamines, et oblige l'allopollinisation. Enfin les variétés synthétiques « Maurane » (2000) et « Nausicaa » (2002) (Chicoline, Belgique) ont été sélectionnées pour leur teneur en inuline à haut degré de polymérisation et pour leur faible taux de fructose libre. Par ces nombreuses améliorations, la chicorée industrielle tient une place emblématique et historique au sein de la région Nord-Pas-de-Calais. Elle est aujourd'hui principalement cultivée en Flandres dans le triangle Dunkerque – Calais – St-Omer par l'intermédiaire de 200 planteurs. La société Florimond Desprez, basée à Capelle-en-Pévèle (Nord), est une société de production de semences, spécialisée dans le domaine de la création

variétale grâce à la sélection et à l'amélioration génétique de variétés cultivées. Premier obtenteur au monde de semences de chicorée, la société propose 5 variétés de chicorée : Orchies, Chrysolite, Malachite, Selenite et Obsidienne. La société Leroux, basée à Orchies (Nord), est le spécialiste dans le traitement de la chicorée à boisson et le leader en France avec 96 % de part de marché. Chaque année, elle transforme 80 000 tonnes de racines en 17 000 tonnes de produits finis. Avec 1 500 à 2 000 hectares cultivés selon les années, la chicorée industrielle demeure une culture de niche qui est en perte de vitesse. D'après Philippe Butez, président de la Confédération nationale des planteurs de chicorée, « il a été demandé de réduire les surfaces d'emblavements de 35 à 40 % pour la récolte 2015 ». L'avenir de la filière chicorée à boisson est en jeu. Il est donc grand temps de remettre la chicorée au goût du jour. Toutefois, en ce qui concerne l'amélioration de la chicorée industrielle pour favoriser le produit fini, aucune étude n'est en cours.

La chicorée industrielle et les produits alimentaires dérivés, finis ou produits alimentaires intermédiaires (PAI), sont connus pour leur amertume ce qui peut représenter un frein pour de nouveaux consommateurs. Le goût demeure une composante essentielle de l'acceptabilité et de l'attrait pour un aliment, quel que soit sa finalité ou ses revendications. L'offre alimentaire doit être adaptée aux attentes gustatives des consommateurs. Une valorisation des produits passant par le positionnement organoleptique, notamment vis-à-vis de l'amertume, tant pour les aliments que pour les PAI, doit être développée. Différentes stratégies peuvent être mises en place :

- diminuer ou moduler le niveau de l'amertume selon les usages,
- créer de nouveaux produits, sur la base de nouvelles formulations aromatiques.

La composition chimique de la racine fraîche de chicorée, dépendante du mode de production agricole, de l'environnement et de sa génétique, conditionne les qualités organoleptiques des produits dérivés. Les composants de la plante participent ainsi étroitement à la modulation de l'attrait que les consommateurs peuvent avoir envers les produits alimentaires. Les qualités gustatives dépendent néanmoins des traitements liés à la transformation industrielle et notamment à la torréfaction. En effet, si l'amertume naturelle ressentie lors de la consommation de la racine peut-être en partie attribuée aux composés terpéniques (Rees & Harborne, 1985 ; Van Beek *et al.*, 1990), il semble que d'autres composés non identifiés soient impliqués dès lors que les produits sont transformés. De nos jours, aucune étude n'a été menée permettant d'éclaircir l'impact de la torréfaction sur la composition native de la chicorée et sur l'apparition de nouvelles molécules impliquées dans l'amertume des produits torréfiés. Ainsi, l'étude des conséquences de la torréfaction sur la modification des attributs organoleptiques constitue un axe majeur de recherche.

La racine de chicorée industrielle et les différents produits issus de sa transformation n'ont jamais été caractérisés de façon exhaustive aux niveaux chimique et organoleptique. Les connaissances quant à l'origine métabolique et à la variabilité des contributeurs présents initialement

dans la racine (précurseurs), mais aussi celles relatives à la dynamique des molécules au cours de la torréfaction restent à acquérir. Jusqu'à présent, seules quelques approches ciblées (endive ou racine en mélange avec d'autres produits) ont été réalisées et mises en relation avec un nombre restreint de métabolites, parce que quantitativement prédominants. Aucune approche globale et intégrative de l'ensemble des composés solubles et des qualités organoleptiques de la racine fraîche au produit torréfié, n'a été entreprise.

L'objectif de la thèse était de rechercher les déterminants chimiques contribuant à l'amertume des produits torréfiés de la chicorée dans le but de relier l'amertume du produit fini avec la composition initiale de la racine. Pour cela l'examen des changements subis par la composition chimique de la racine au cours du processus de torréfaction est primordial.

Les travaux de thèse ont ainsi combiné une approche métabolomique permettant une caractérisation large des composés de la racine fraîche de chicorée et de ses produits dérivés avec une approche sensorielle déterminant le profil organoleptique de la chicorée torréfiée, notamment pour l'amertume. L'intégration de l'ensemble de ces données a été menée à l'aide d'une démarche statistique afin d'identifier des composés solubles clés responsables de l'amertume de la racine de chicorée torréfiée.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. La chicorée

1.1. La plante et son cycle de développement

La chicorée est une plante herbacée, eudicotylédone, de la famille des Astéracées comme la laitue, l'artichaut ou encore le tournesol. Le genre *Cichorium*, dont elle fait partie, regroupe six espèces réparties autour du globe (Kiers, 2000).

En Europe, trois d'entre elles sont présentes : *Cichorium spinosum* L., *Cichorium endivia* L. et *Cichorium intybus* L. Cette dernière est de type vivace lorsqu'elle pousse dans les prés, les champs incultes ou encore au bord des chemins. Pour la production de graines, les variétés de *C. intybus* sont généralement cultivées de façon bisannuelle (**figure i.1**). Une fois semée, aux alentours des mois de mars-avril, une rosette de feuilles se forme puis une racine tubérisée accumule des réserves azotées et carbonées vers le mois de juillet (Limami *et al.*, 1993). Après une période de vernalisation (Hartman, 1956 ; Demeulemeester & De Proft, 1999), ses réserves sont remobilisées au printemps suivant, lors de la montaison, pour la formation d'une hampe florale. La floraison a lieu entre juillet et septembre. Quinze à vingt fleurs ligulées sont regroupées en une inflorescence bleue appelée capitule qui ne s'épanouit que quelques heures lors d'un seul jour. *C. endivia*, *C. spinosum* et *C. intybus* présentent un mode de pollinisation entomophile, dissémination du pollen par les insectes. *C. endivia* est préférentiellement autogame alors que les deux suivantes sont allogames, l'allofécondation étant favorisée par la présence d'un système d'auto-incompatibilité sporophytique (Eenink, 1981), par des phénomènes de compétition pollinique (Eenink, 1982) et par la morphologie florale défavorable à l'autofécondation (Desprez *et al.*, 1994).

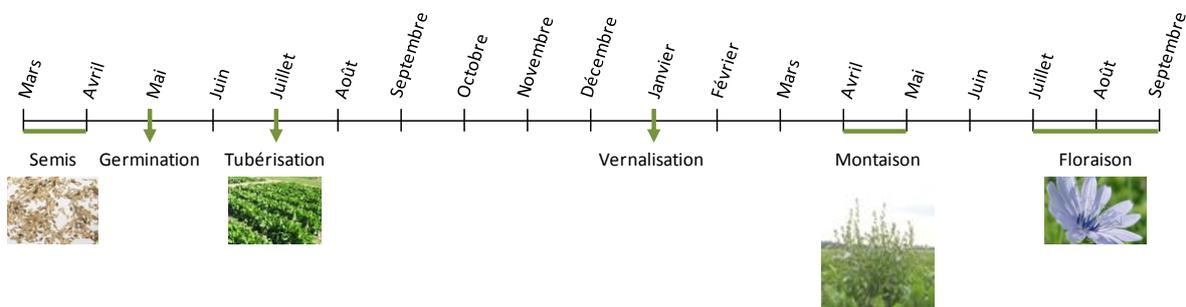


Figure i.1 : Le cycle de développement de *Cichorium intybus* var. *sativum*.

1.2. L'utilisation ancestrale de la chicorée

La chicorée est depuis longtemps utilisée comme plante alimentaire et médicinale. Le document le plus ancien la mentionnant est le papyrus Ebers, vieux de 4 000 ans. Il nous apprend que la chicorée était très appréciée des égyptiens au titre de plante digestive mais aussi dépurative. Plus tard, les grecs et les romains la préconisent pour guérir les maladies du foie ou de l'intestin. Pline l'Ancien (23-79 ap. J.C), écrivain naturaliste romain, indique dans son livre XX *Naturalis historia* que la chicorée, en mélange avec de l'huile de géranium rosat et du vinaigre, calme les douleurs de tête, et mêlée au vin, celles du foie et de la vessie. Dans un grand nombre de pays, elle devint rapidement partie intégrante de la pharmacopée. Charlemagne rendit la culture de la chicorée obligatoire dans les jardins médicaux au travers du Capitulaire *De Villis*. La littérature médicale décrit la racine comme anti-hépatique, apéritive, diurétique, laxative ou encore fébrifuge. Au cours des siècles qui suivirent, la chicorée fut préconisée dans de nombreux cas, comme par exemple la jaunisse, la constipation, la fièvre et diverses affections cutanées (**tableau i.1**).

Tableau i.1 : Utilisations médicinales traditionnelles de *Cichorium intybus* (d'après Street *et al.*, 2013).

Pays	Utilisations traditionnelles	Partie de la plante	Préparation	Référence
Afghanistan	Paludisme	Racine	Extraction aqueuse	[1]
Bosnie-Herzégovine	Diarrhée, renforcement de la prostate et d'autres organes reproducteur, cancer pulmonaire, veisalgie, et purification des voies biliaires	Parties aériennes, fleurs, racine	Non renseigné	[2]
	Troubles du foie, spasmodique, cholestérol, antiseptique	Partie aérienne	Décoction	[3]
Bulgarie	Stimulant de la cholagogue pour la sécrétion gastrique, hypoglycémique	Racine, parties aériennes	Décoction	[4]
	Troubles du foie	Graines		[5]
Inde	Diabète	Plante entière	Non renseigné	[6]
	Jaunisse, hypertrophie du foie, goutte, et rhumatismes	Racine	Décoction	[6]
	Soulagement de la toux	Non renseigné		
Iran	Digestive, stomachique, dépuratif, cholérétique, laxatif, hypotension, tonique et antipyrétique	Plante entière	Non renseigné	[7]
	Purification du sang	Feuilles	Non renseigné	[8]
	Hypertension	Feuilles	Décoction	[9]
Italie	Purification du sang, artériosclérose, anti arthrite, antispasmodique, digestive	Feuilles / racine	Décoction	[10]
	Dépurative	Verticilles	Décoction	[11]
	Cholérétique, hépatoprotecteur contre la jaunisse, laxatif doux, hypoglycémique	Feuilles	Décoction, feuilles fraîches écrasées	[4]
Jordanie	Hémorragie interne, sédatif pour la typhoïde	Plante entière	Cuisiné	[5]
Maroc	Maladie rénale	Parties aériennes / racine	Non renseigné	[12]
	Troubles rénaux, diabète	Plante entière	Décoction	[13]
Pakistan	Diabète	Racine	Décoction	[14]
Pologne	Troubles digestifs et manque d'appétit	Racine	Thé	[15]
Serbie	Diarrhée	Fleurs	Infusion	[16]
	Diurétique, digestive, laxative, anti-inflammatoires, problèmes de foie, réduction de la glycémie	Racine	Décoction / Thé	[17]
	Cholagogue, digestif, hypoglycémique	Parties aériennes / racine	Non renseigné	[18]
Afrique du Sud	Jaunisse, tonique	Feuilles, tige, racine		[19]
	Cancers, calculs rénaux	Racine	Décoction	[20]
Turquie	Cicatrisation des plaies	Feuilles	Pommade	[21]
	Hémorroïdes, troubles urinaires	Partie aérienne	Thé	[22]

[1] Bischoff *et al.*, 2004 ; [2] Sarić-Kundalić *et al.*, 2011 ; [3] Hanlidou *et al.*, 2004 ; [4] Leporatti & Ivancheva, 2003 ; [5] Ahmed *et al.*, 2003 ; [6] Pushparaj *et al.*, 2007 ; [7] Miraldi *et al.*, 2001 ; [8] Pieroni, 2000 ; [9] Guarrera *et al.*, 2005 ; [10] Loi *et al.*, 2005 ; [11] Pieroni *et al.*, 2002 ; [12] Jouad *et al.*, 2001 ; [13] El-Hilaly *et al.*, 2003 ; [14] Ahmad *et al.*, 2009 ; [15] European Medicines Agency, 2013 ; [16] Savikin *et al.*, 2013 ; [17] Jarić *et al.*, 2007 ; [18] Kokoska *et al.*, 2002 ; [19] Van Wyk *et al.* 1997 ; [20] Süntar *et al.*, 2012 ; [21] Sezik *et al.*, 2001 ; [22] Tetik *et al.*, 2013.

1.3. Son utilisation actuelle

De nos jours, la chicorée est cultivée pour ses feuilles qui sont consommées en salades crues ou cuites et pour sa racine qui est exploitée comme ingrédients, produits alimentaires et également comme source d'inuline (**figure i.2**).

Parmi les trois espèces présentes en Europe, *Cichorium spinosum*, aussi appelée chicorée épineuse à cause de ses rameaux épineux, est une plante maritime que l'on retrouve en Grèce et en Crète où elle est principalement consommée sous le nom de « stamnagathi ». Cette espèce est très peu cultivée de par son faible intérêt agronomique.

Cichorium endivia est la variété endive au sens strict. Elle est cultivée de façon annuelle. Nous consommons principalement les feuilles de la variété *crispum* ou chicorée frisée et de la variété *latifolium* ou chicorée scarole.

Cichorium intybus est l'espèce la plus largement cultivée de par ses nombreuses utilisations dans l'agroalimentaire. Elle est composée de trois variétés : *sylvestre*, *foliosum* et *sativum*.

La variété *sylvestre* comprend une large gamme de chicorée salade aux pigmentations diverses (rouge, verte, blanche, panachée). « Chioggia » et « Grumolo » sont disponibles en feuilles rouges ou vertes. « Castelfranco » et « Treviso » présentent des feuilles panachées vertes et rouges pour la première, blanches et rouges pour la seconde.

La variété *foliosum* est cultivée pour ses feuilles et réunit la chicorée « Spadona », la « Catalogna » ou encore la chicorée « Witloof ». Cette dernière est cultivée sur deux ans. Les graines sont semées en mars-avril et les plantes récoltées en septembre. Les feuilles sont alors coupées au niveau du collet et les racines sont soumises au forçage. Dans l'obscurité et avec une température avoisinant les 16-18°C sous humidité saturante, l'activité végétative reprend et génère des bourgeons étiolés au bout de trois semaines. Ces chicorées aux feuilles blanches sont à l'origine des chicons, appelées ainsi dans le Nord de la France, mais appelées abusivement endives dans les autres régions.

La variété *sativum*, appelée chicorée industrielle, est principalement cultivée en Inde, Afrique du sud, Chili, Etats-Unis, Chine et surtout dans le Nord de l'Europe : France, Belgique et Pays-Bas. Sélectionnée pour la grosseur de sa racine, son cycle de développement est arrêté au bout d'une année. Cette variété est cultivée pour sa richesse en inuline, polymère de fructose (Meyer & Stasse-Wolthuis, 2009). Avec l'artichaut, la chicorée est la seule plante à contenir assez d'inuline pour que son extraction soit rentable du point de vue économique. En France, 180 000 tonnes d'inuline sont extraites des racines de chicorée par an. L'hydrolyse chimique de l'inuline permet la libération de fructose. Ces composés sont tout les deux employés comme constituants alimentaires. Le fructose est un édulcorant naturel utilisé dans les boissons rafraichissantes, les crèmes glacés et autres pâtisseries. Il contient autant de calories que le glucose, mais son pouvoir édulcorant plus élevé permet d'en

réduire l'apport. L'inuline montre des caractéristiques gélifiantes intéressantes. L'intérêt de son utilisation comme constituant est qu'elle n'affecte pas le goût du produit et n'engendre pas d'enrichissement en matières grasses (Kim *et al.*, 2001 ; Franck, 2007).

La variété *sativum* peut aussi être cultivée pour la production d'ingrédients et de denrées alimentaires torréfiées. Les hollandais semblent être les premiers à mettre au point le processus industriel de torréfaction de la racine de chicorée (XVII^{ème} siècle). Ensuite, le procédé gagna l'Allemagne, la Belgique et, par l'Alsace, la France. La chicorée devient un produit alimentaire dont la consommation en Europe est comparable à celle du café à l'aube de la Révolution française. Son usage alimentaire se renforce du 18^{ème} au milieu du 19^{ème} siècle au cours des périodes de récessions ou de conflits notamment lors du blocus continental décrété par Napoléon en 1806, qui provoqua une pénurie de café (Kandeler & Ullrich, 2009).

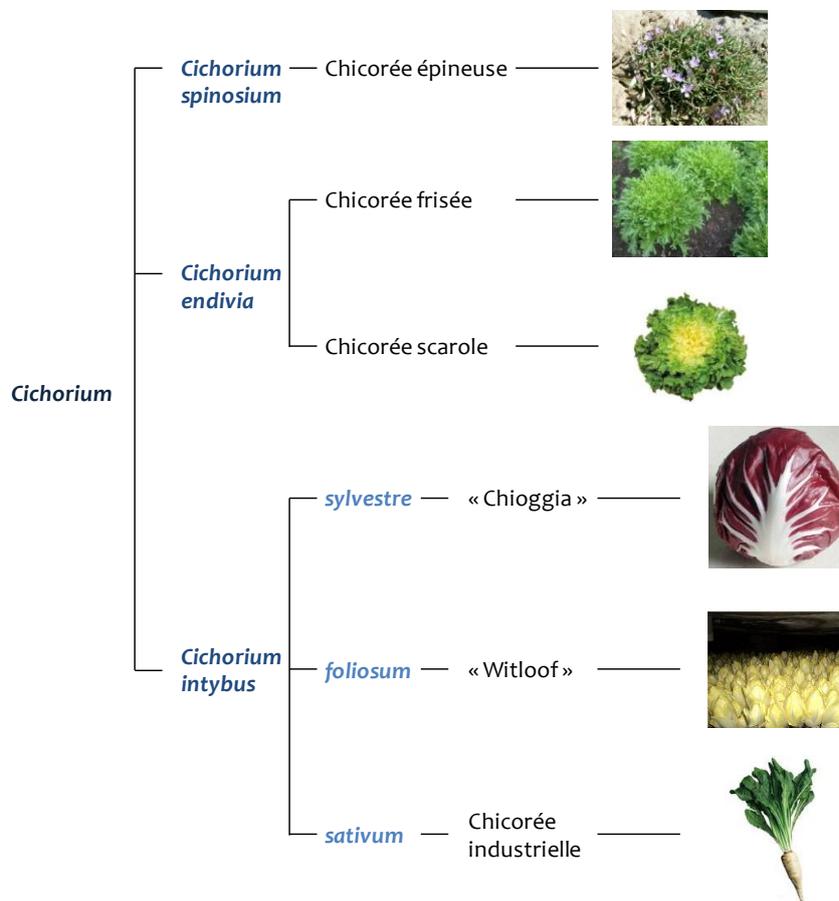


Figure i.2 : Exemples de différentes variétés consommées pour les trois espèces de chicorée présentes en Europe.

1.4. La composition native majeure de la racine de chicorée

A l'instar des autres plantes, pour se développer et assurer sa survie, *C. intybus* produit de nombreux composés issus du métabolisme primaire et du métabolisme secondaire. Dans ce travail, l'ensemble des molécules présentes à l'état naturel dans la racine fraîche est qualifié de molécule native.

Les métabolites primaires, également appelés métabolites centraux, sont présents dans de nombreux organismes taxonomiquement éloignés. Ce métabolisme réunit les éléments essentiels à la vie de la plante. Ils interviennent directement dans la croissance, le développement et la reproduction d'un organisme. Ce sont les sucres, les acides organiques, etc.

Les métabolites secondaires, également appelés métabolites spécialisés, permettent à la plante de s'adapter et de se reproduire dans son environnement. Ces métabolites interviennent dans la répulsion des herbivores, la protection contre les pathogènes, l'attraction des pollinisateurs ou encore l'allélopathie qui est la compétition entre les plantes pour la germination et la croissance. Les trois principales familles de métabolites secondaires sont : les composés azotés dont les alcaloïdes, les composés phénoliques et les terpènes.

Dans la racine fraîche de *C. intybus*, la composition en molécules solubles (non-volatils) est peu connue. De par leur abondance et leur rôle avéré dans la racine, trois groupes de composés ont été largement étudiés. Ainsi, *C. intybus* produit principalement des sucres de type inuline (Van Laere & Van den Ende, 2002), des composés phénoliques tels que les acides chlorogéniques et des composés sesquiterpéniques (Rees & Harborne, 1985).

- **Les sucres**

L'inuline, polymère de réserve, est le sucre principal de la racine de *C. intybus*. Sa teneur représente 15 à 20 % de la matière fraîche (Gupta & Kaur, 1997). Ce polymère est constitué d'une répétition d'unité de fructose (2 à 70), liés en β -(2-1) et se terminant par une unité de saccharose (**figure i.3**). D'après De Leenheer & Hoebregs (1994), le degré de polymérisation (DP) moyen de l'inuline dans la racine de chicorée est de 70 DP.

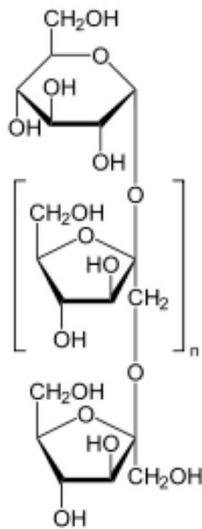


Figure i.3 : Structure de l'inuline.

Van Laere & Van den Ende (2002) proposent un modèle de biosynthèse de l'inuline à partir de la racine de chicorée (**figure i.4**). Dans un premier temps, le saccharose est importé et/ou synthétisé dans le cytosol. Puis l'inuline est synthétisée dans la vacuole à partir de deux enzymes : sucrose:sucrose 1-fructosyltransférase (1-SST) et fructane:fructane 1-fructosyltransférase (1-FFT). Cette biosynthèse est initiée par le transfert d'un fructose entre deux molécules de saccharose par l'intermédiaire de la 1-SST pour produire un trisaccharide, le 1-kestotriose. Puis, la 1-FFT transfère un fructose à partir du 1-kestotriose ou d'un fructane conduisant à la formation d'oligofructose et d'inuline.

Chez la chicorée, il a été démontré que le froid induisait la dégradation de l'inuline. Ce phénomène semble être courant chez les espèces d'eudicotylédones qui accumulent l'inuline dans les organes végétatifs de stockage tels que les racines pivotantes (Van den Ende *et al.*, 1996 ; Demeulemeester *et al.*, 1998 ; Gupta & Kaur, 2000). A l'inverse, Kusch *et al.* (2009) ont démontré que l'inuline est synthétisée *via* l'induction des enzymes 1-SST et 1-FFT lors de faible teneur en azote combinée à de forte teneur en carbone.

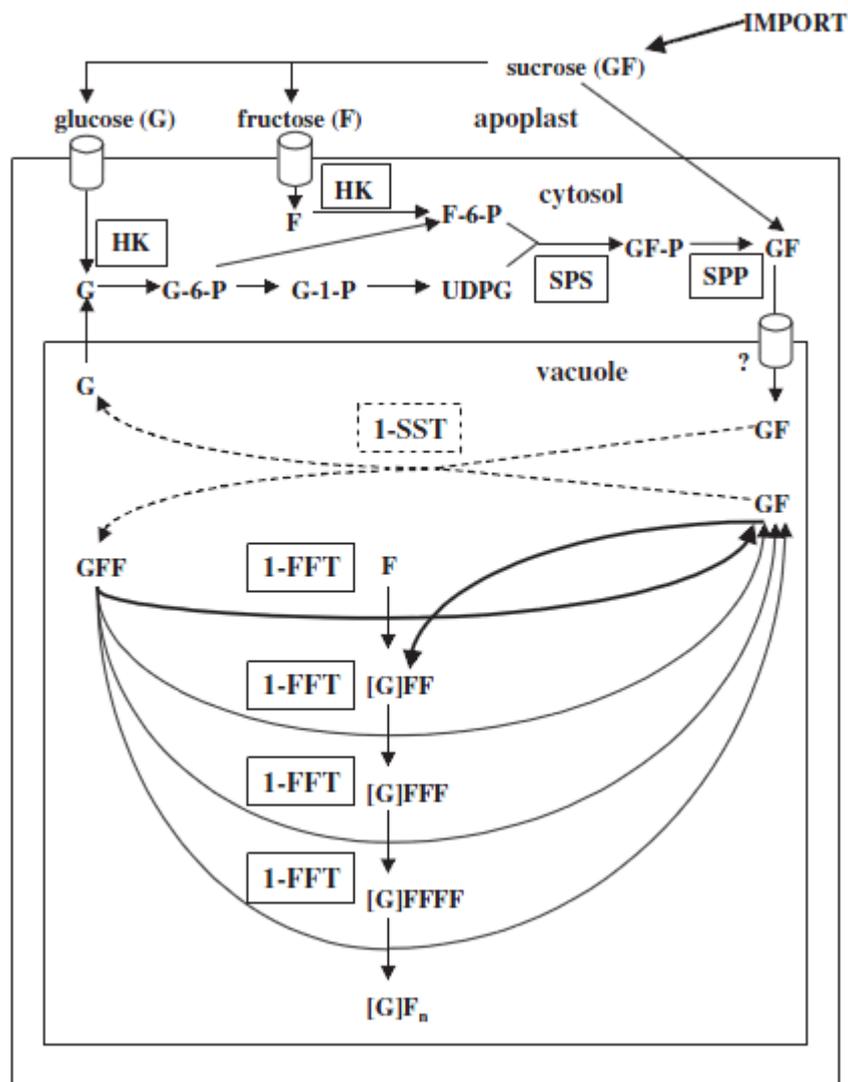


Figure i.4 : Modèle de biosynthèse d'inuline proposé par Van Laere & Van den Ende (2002). Les enzymes sont encadrés. 1-SST : sucrose:sucrose 1-fructosyltransférase, 1-FFT : fructane:fructane 1-fructosyltransférase, HK : hexokinase, SPS : sucrose phosphate synthétase, SPP : sucrose phosphate phosphatase, G-6-P : glucose 6-phosphate, G-1-P : glucose 1-phosphate, F-6-P : fructose 6-phosphate.

En ce qui concerne les sucres libres, la teneur en glucose représente 2,8 %, en fructose 5,9 % et en saccharose 16,3 % de la matière sèche (Milala *et al.*, 2009). Bien que mineurs, les polysaccharides tels que la cellulose, l'hémicellulose et les pectines, sont présents dans la racine de chicorée. Toutefois, ces fibres (cellulose) représentent seulement 5 % de la matière sèche de la racine de chicorée (Pazola, 1987).

- **Les acides chlorogéniques**

Les polyphénols constituent un groupe de plusieurs milliers de molécules caractérisées par des groupements hydroxyles (OH) associés à un ou plusieurs cycles aromatiques. En fonction du nombre et de l'agencement des cycles aromatiques, on peut distinguer quatre grands groupes : les acides hydroxybenzoïques, les stilbènes, les flavonoïdes et les acides hydroxycinnamiques. Les acides chlorogéniques (ACG), de la famille des acides hydroxycinnamiques, sont des esters d'acide quinique issus de la voie des phénylpropanoïdes (**figure i.5**). Cette voie mène à la formation du coumaroyl-CoA (coenzyme A). Elle est initiée par la PAL (phénylalanine ammonialyase) qui catalyse la formation d'acide trans-cinnamique à partir de la phénylalanine. L'acide trans-cinnamique est ensuite hydroxylé par la C4H (cinnamate 4-hydroxylase) pour former l'acide para-coumarique. Enfin, une dernière étape, catalysée par la 4CL (4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase) permet la formation d'esters de CoA. Le coumaroyl-CoA est alors le composé de base pour la formation des dérivés de l'acide caféique. Ainsi, la position et le nombre d'insertion de l'acide caféique à l'acide quinique (issu de la voie du shikimate) déterminera l'ester.

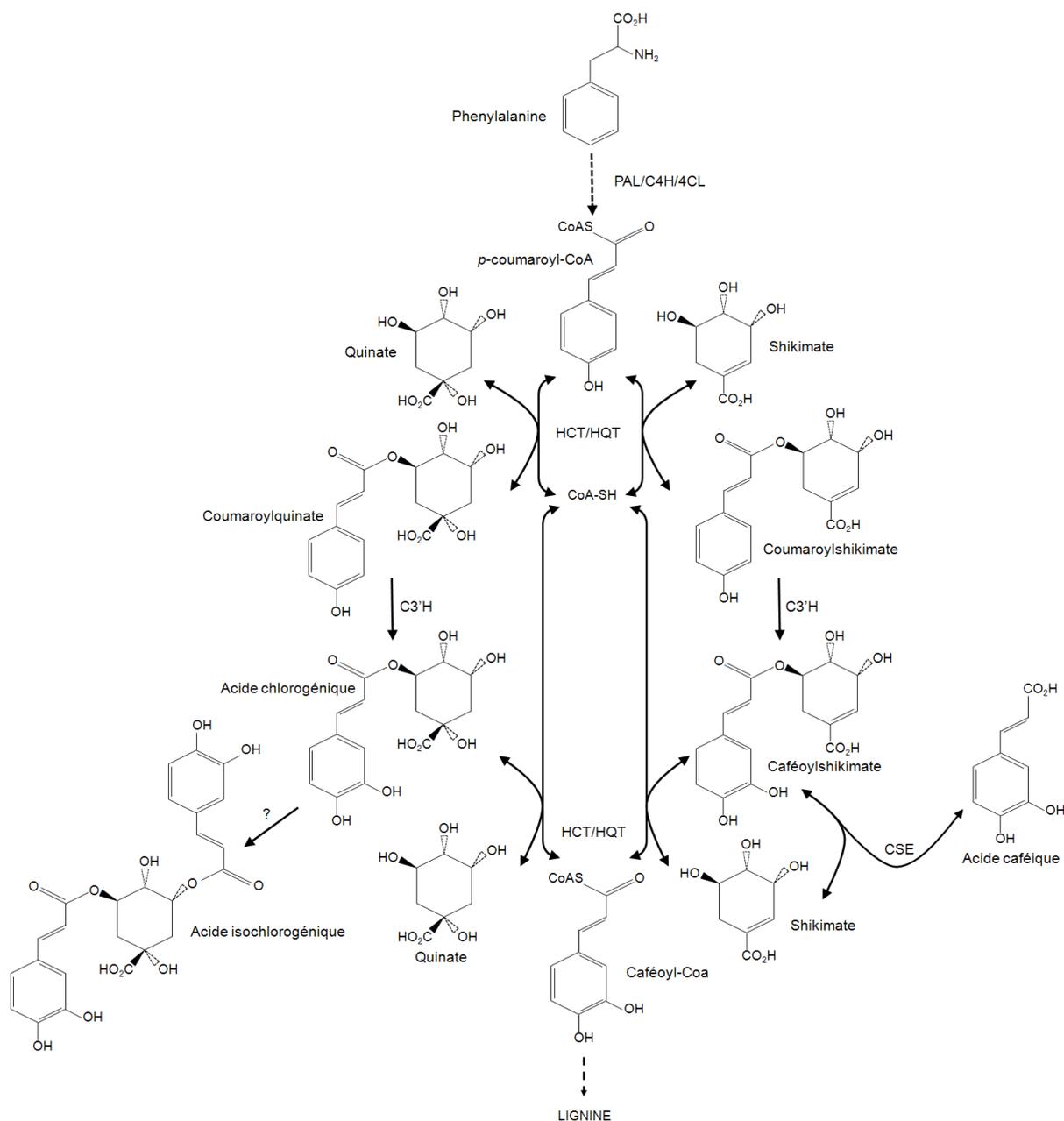
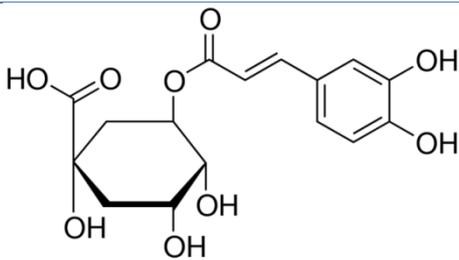
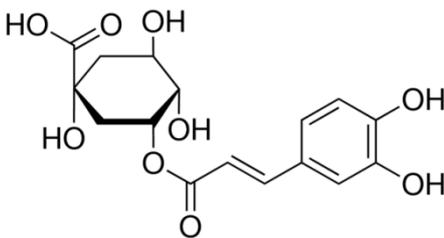


Figure i.5 : Voie de biosynthèse des acides chlorogéniques issus de la voie des phénylpropanoïdes dans les plantes. Les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse sont : PAL : phénylalanine ammonia lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL : 4-hydroxycinnamoyl-CoA ligase ; HCT : hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quinate hydroxycinnamoyl transférase ; HQT : hydroxycinnamoyl CoA quinate hydroxycinnamoyl transférase ; C3'H : *p*-coumaroyl ester 3'-hydroxylase ; CSE : caféoylshikimate estérase (Legrand *et al.*, soumis).

Dans la racine de chicorée, deux acides chlorogéniques majeurs ont été identifiés : l'acide 5-mono-*O*-caféoylquinique aussi dénommé acide chlorogénique ou encore 5-CQA et l'acide 3,5-di-*O*-caféoylquinique aussi appelé acide isochlorogénique ou encore 3,5-diCQA (Zawirska-Wojtasiak *et al.*, 2014). Les analyses chimiques récentes réalisées au laboratoire ne corroborent pas ces résultats et

indiquent que l'acide 3-mono-*O*-caféoylquinique aussi appelé 3-CQA est l'acide chlorogénique majoritaire de la racine fraîche de chicorée. Il semble que ces discordances entre nos analyses et les données de la littérature soit en lien avec le changement de nomenclature des acides chlorogéniques. Ainsi le 3-CQA est maintenant désigné « acide chlorogénique » et le 5-CQA est désigné « l'acide néochlorogénique » (**tableau i.2**). Ce dernier est absent dans la racine de chicorée industrielle.

Tableau i.2 : Comparaison de l'acide chlorogénique (3-CQA) et de l'acide néochlorogénique (5-CQA). Le numéro CAS d'une substance chimique est son numéro d'enregistrement unique auprès de la banque de données du Chemical Abstract Service (CAS). Le numéro EC correspond à l'identifiant unique assigné à une substance chimique par les autorités de l'Union Européenne.

	acide chlorogénique	acide néochlorogénique
synonyme	acide 1,3,4,5-tetrahydroxycyclohexanecarboxylique, acide 3-(3,4-dihydroxycinnamoyl)quinique, acide 3- <i>O</i> -caféoylquinique	acide 5- <i>O</i> -(trans-3,4-dihydroxycinnamoyl)-D-quinique, acide trans-5- <i>O</i> -caféoylquinique
numéro CAS	327-97-9	906-33-2
numéro EC	206-325-6	212-997-1
formule		

La formation des acides chlorogéniques est catalysée par deux enzymes : HCT (hydroxycinnamoyl-CoA shikimate/quininate hydroxycinnamoyl transférase) et HQT (hydroxycinnamoyl-CoA quinate hydroxycinnamoyl transférase). Ces enzymes utilisent le *p*-coumaroyl-CoA issu de la voie des phénylpropanoïdes pour produire à la fois l'acide *p*-coumaroylshikimique et l'acide *p*-coumaroylquinique. Ce dernier est hydroxylé par la C3'H (*p*-coumaroyl ester 3'-hydroxylase) pour produire l'acide caféoylquinique, c'est-à-dire l'acide chlorogénique. Enfin, ce dernier peut être converti en acide isochlorogénique (**figure i.6**). L'enzyme responsable de cette conversion a été mis en évidence chez la patate douce, il s'agit d'une chlorogenic acid:chlorogenate caffeoyl transferase (Villegas *et al.*, 1987) qui permet le transfert d'un groupement caféyle d'un acide caféoylquinique vers un autre pour former un acide dicaféoylquinique. Cette dernière étape est en cours d'étude chez la chicorée au sein de notre laboratoire (thèse de Guillaume Legrand, 2015 ; thèse de Marianne Delporte).

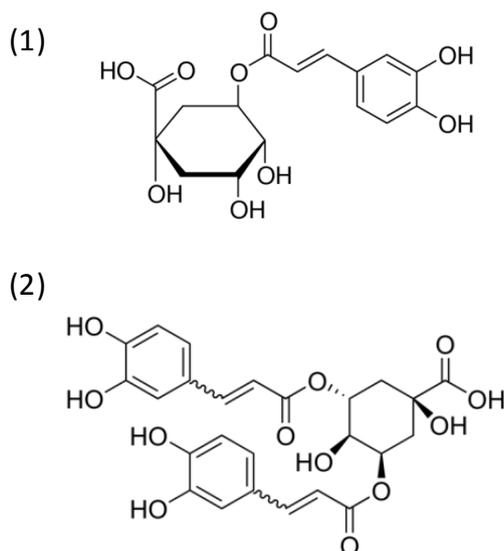


Figure i.6 : Les acides chlorogéniques présents dans la racine de *C. intybus* : le 3-mono-*O*-caféoylquinique (1) et le 3,5-di-*O*-caféoylquinique (2).

Les acides chlorogéniques de la racine de chicorée sont principalement connus pour leur pouvoir antioxydant. En effet, comme toutes les plantes, la chicorée est soumise à des stress oxydatifs, induits par des facteurs extérieurs (pathogène, UV, etc.), qui génèrent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dérivant de l'oxygène et présentant une forte toxicité pour la plante. Ainsi, en neutralisant les radicaux libres formés à la suite d'un stress ou de ceux issus du métabolisme normal (Niggeweg *et al.*, 2004), les acides chlorogéniques permettent de maintenir l'équilibre redox de la cellule.

- **Les lactones sesquiterpéniques**

Les lactones sesquiterpéniques (LST) font partie de la famille des terpènes issus de la voie du mévalonate. La production d'isopentényl pyrophosphate (IPP) et du diméthylallyl pyrophosphate (DMAPP, IPP isomérase) est dépendante de la voie du mévalonate (**figure i.7**). L'IPP et le DMAPP, unités monomériques (C5), sont les précurseurs intermédiaires de la voie des isoprénoïdes, soit des sesquiterpènes. La condensation d'un IPP et d'un DMAPP forme le géranyl pyrophosphate (GPP), précurseur des monoterpènes (C10). L'ajout d'un DMAPP au GPP forme le farnésyl pyrophosphate (FPP), précurseur des sesquiterpènes (C15) et des triterpènes (C30). Enfin, l'ajout d'un IPP au FPP forme le géranylgéranyl pyrophosphate (GGPP), précurseur des diterpènes (C20) et des tetraterpènes (C40). Chaque réaction est catalysée par une enzyme spécifique. La géranyl diphosphate synthase catalyse la réaction du GPP, la farnésyl diphosphate synthase celle du FPP et la géranylgéranyl diphosphate synthase celle du GGPP. La synthèse des sesquiterpènes (C15) s'effectue dans le cytosol. Toutefois la compartimentation du métabolisme des terpènes n'est pas totalement éclairci (Vranová *et al.*, 2013).

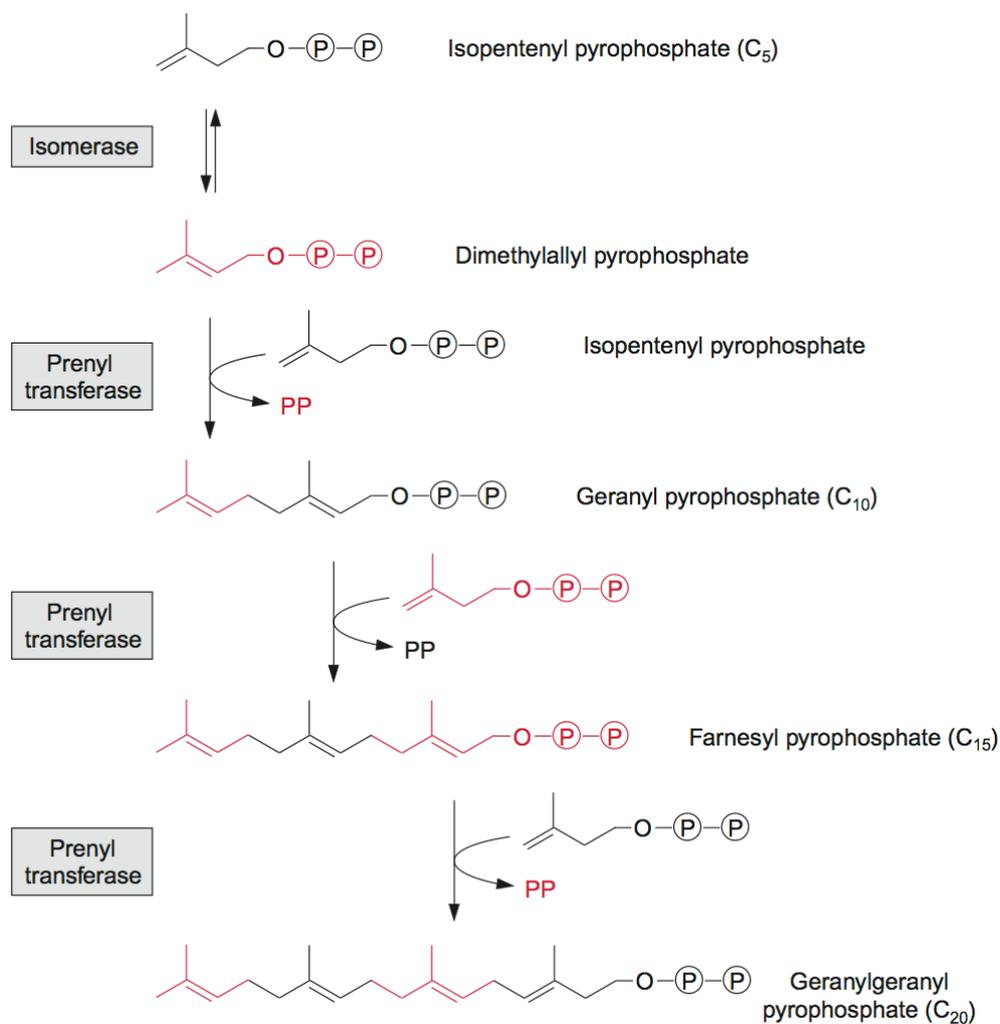


Figure i.7 : Voie de biosynthèse des terpènes dans les plantes (Heldt & Piechulla, 2004).

Dans la racine de chicorée, six lactones sesquiterpéniques sont présentes : la 11(S),13-dihydrolactucine (DHLc), la lactucine (Lc), la 11(S),13-dihydrolactucopicine (DHLp), la lactucopicine (Lp), la 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine (DHdLc) et la 8-déoxylactucine (dLc) (**figure i.8**).

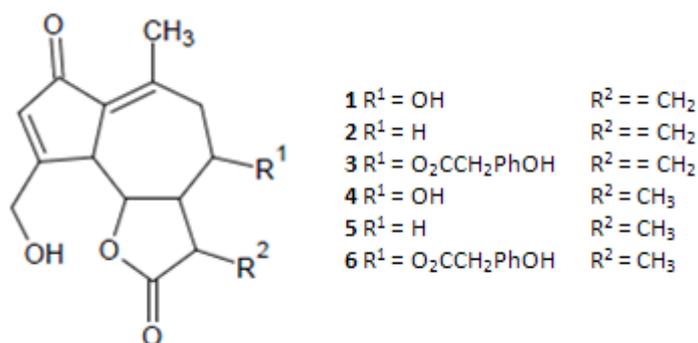


Figure i.8 : Les lactones sesquiterpéniques majeures présentes dans la racine de *C. intybus* : lactucine (1), 8-déoxylactucine (2), lactucopicrine (3), 11(S),13-dihydrolactucine (4), 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine (5), 11(S), 13-dihydrolactucopicrine (6).

Il existe aussi chez *Cichorium intybus* des lactones glycosylées : Crepidiaside B (DHdLc glycosylée), Cichorioside B (DHLc glycosylée), Sonchuside A, Cichoriosode, Sonchuside C, Cichopumilide et Crepidiaside A (dLc glycosylée) (Kisiel & Zielinska, 2001).

De nombreux travaux ont montré le rôle des lactones sesquiterpéniques dans la protection de la plante contre les agressions extérieures de type biotique. En effet, Rees & Harborne (1985) ont démontré l'implication de la lactucine, la 8-déoxylactucine et la lactucopicrine dans la protection de la plante contre les herbivores. D'autres travaux ont également mis en évidence les activités antifongiques et antibactériennes des lactones sesquiterpéniques (Picman, 1986). Les recherches de Mares *et al.* (2005) sur la racine de chicorée ont notamment confirmé l'activité antifongique de la 8-déoxylactucine et de la 11(S),13-dihydrolactucine.

Outre leur rôle avéré dans la protection de la chicorée contre des stress biotique et abiotique, l'inuline, les acides chlorogéniques et les composés sesquiterpéniques sont également connus à travers leurs effets bénéfiques pour la santé et pour leurs propriétés organoleptiques.

1.5. Les propriétés des composés naturellement présents dans la racine de chicorée

1.5.1. Les propriétés bénéfiques pour la santé

Comme décrit précédemment, la racine fraîche de chicorée industrielle accumule des métabolites primaires et secondaires qui présentent vis-à-vis de l'Homme des propriétés biologiques originales.

Tout d'abord, l'inuline représentait 40 % du marché des prébiotiques en 2011 (Site internet : PRWeb, 2013). Cet effet prébiotique, favorisant la croissance et/ou l'activité des bactéries intestinales bénéfiques à notre santé, a été démontré à de nombreuses reprises chez la racine de chicorée (Roberfroid *et al.*, 1998 ; Van de Wiele *et al.*, 2004 ; Kleessen *et al.*, 2007). D'autres études ont démontrées que l'inuline favorise un meilleur transit intestinal (Kleessen *et al.*, 1997), ainsi que l'absorption des minéraux avec en particulier le calcium (Coudray *et al.*, 1997 ; Van Den Heuvel *et al.*, 1999) et d'éléments comme le fer (Laparra *et al.*, 2009). De plus, elle intervient de façon positive sur la réponse immunitaire de l'organisme (Bodera, 2008 ; Nagahara *et al.*, 2012), elle a un rôle potentiel dans la prévention du cancer du côlon (Kaur & Gupta, 2002 ; Roberfroid, 2005) et dans la lutte contre l'ostéoporose (Coxam, 2005). Des expériences chez l'animal (Respondek *et al.*, 2008 ; Verbrugge *et al.*, 2009) et un essai clinique récent chez des patients atteints d'obésité (Antal *et al.*, 2010) semblent confirmer le rôle préventif de l'inuline contre cette maladie. Enfin, l'inuline module le niveau hormonal de l'insuline et du glucagon, régulant ainsi le métabolisme des glucides et des lipides en abaissant les niveaux de glucose dans le sang (Rumessen *et al.*, 1990 ; Kaur & Gupta, 2002).

Les acides chlorogéniques, quant à eux, sont connus pour leur pouvoir antioxydant. En effet, le 3,5-di-*O*-caféoylquinique, un des acides chlorogéniques identifiés dans les chicorées, est responsable de près de 70% de l'activité antioxydante de la chicorée potagère (Fraisie *et al.*, 2011). Ces acides chlorogéniques présentent d'autres actions telles que hypocholestérolémiantes (Cho *et al.*, 2010), hypoglycémiques (Hemmerle *et al.*, 1997), anti-inflammatoires (Cavin *et al.*, 2005), analgésiques (Dos Santos *et al.*, 2005) ou encore neuroprotectrices (Kim *et al.*, 2005).

Enfin, une bibliographie abondante fait état de l'activité anti tumorale des lactones sesquiterpéniques (Kupchan *et al.*, 1969 ; Lee *et al.*, 1973). En effet, Seto *et al.*, (1988) ont démontré que les LST de *Cichorium endivia* et *Cichorium intybus* possèdent une activité cytotoxique envers les cellules de lymphomes en culture. Rüngeler *et al.* (1999) proposent un mécanisme moléculaire de l'action anti-inflammatoire des LST par l'inhibition du facteur de transcription NF- κ B. Ces travaux sont confirmés par ceux de Cavin *et al.* (2005). A ce titre, elles agiraient également sur la réponse à la douleur au travers d'une activité analgésique en limitant l'effet des médiateurs de l'inflammation (Wesołowska *et al.*, 2006).

1.5.2. Les propriétés organoleptiques

Parmi les molécules natives de la racine fraîche de chicorée, seules les LST semblent impliquées dans les propriétés sensorielles. Elles sont décrites dans la littérature comme des composés amers (Rees & Harborne, 1985). Le seuil d'amertume de nombreuses LST a été caractérisé avec les travaux de Ungnade & Hendley (1948) chez *Helenium tenuifolium*, une plante de la famille des Astéracées. Van Beek *et al.* (1990) ont évalué le seuil de perception des LST de *C. intybus*, la lactucine, la lactucopicrine, la 8-déoxylactucine et leurs dérivés. Ils en concluent que le seuil de sensibilité varie considérablement d'une molécule à l'autre. La 11(S), 13-dihydrolactucopicrine se révèle être la plus amère avec un seuil de perception de 0,2 ppm (parties par million), soit 8 fois plus que le seuil de la quinine. A l'inverse, la lactucine semble être perçue comme la moins amère avec un seuil de 1,7 ppm. Toutefois, cette étude n'a pas pris en considération les niveaux quantitatifs respectifs de chaque composé dans la racine fraîche. D'autres études sur les LST de la laitue et celles de la chicorée ont démontré une forte corrélation entre l'amertume et la lactucine glycoside (Price *et al.*, 1990 ; Peters *et al.*, 1996).

La racine de chicorée n'est pas consommée à l'état frais et subit plusieurs transformations avant d'être commercialisée sous forme de farine, de grain torréfié, de liquide concentré ou encore de poudres solubles. Ce processus peut entraîner des changements dans la composition native mais peut également engendrer des modifications sur les propriétés organoleptiques.

2. Les produits transformés de la racine de chicorée industrielle

2.1. Le processus de transformation

Chaque année dans le monde, 1 000 000 tonnes de racines de chicorée industrielle sont produites (Union Française des Semenciers). La France est le premier producteur mondial avec 90 000 tonnes par an dont le Nord-Pas-de-Calais est la principale région de culture. Une fois récoltée, la racine de chicorée est stockée (**figure i.9, a**), lavée (**figure i.9, b**), débarrassée de ses feuilles et débitée en lamelles d'environ 6 mm d'épaisseur appelées cossettes (**figure i.9, c**). Ces dernières sont séchées dans des fours cylindriques avec un flux d'air atteignant des températures de l'ordre de 110 °C à 130 °C (**figure i.9, d**). Le séchage réduit la teneur en eau de 75 à 12 %. Après refroidissement (**figure i.9, e**) les cossettes séchées sont entreposées (**figure i.9, f**) avant d'être broyées finement pour obtenir une mouture commercialisable ou avant d'être directement torréfiées (**figure i.9, g**). La torréfaction consiste à exposer un aliment à une forte chaleur. Cette étape va faciliter certaines voies chimiques ce qui favorisera le développement de la coloration brune et des arômes. La torréfaction s'effectue dans des tambours cylindriques chauffés entre 130 et 150 °C pour un délai compris entre 15 et 25 minutes. Une fois torréfiées, les cossettes sont concassées en grains qui seront alors extraits à l'eau chaude (**figure i.9, h**) afin d'obtenir des produits commercialisables sous forme liquide concentrée ou enfin, après atomisation (**figure i.9, i**), sous forme de poudres solubles.

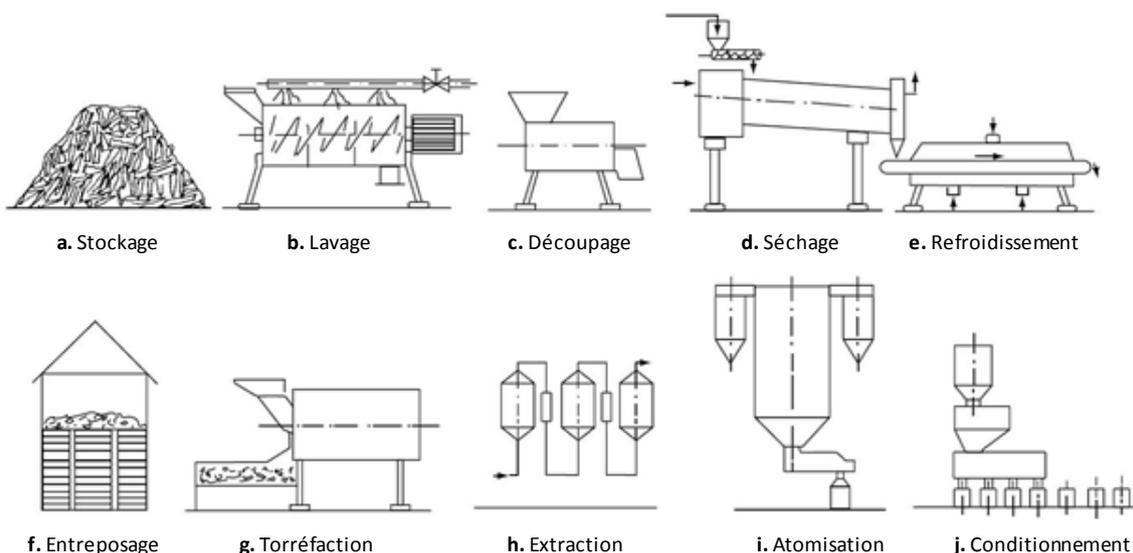


Figure i.9 : Schéma des étapes de la transformation de la racine fraîche à la poudre soluble de chicorée (Macrae *et al.*, 1993).

Ces différents produits se retrouvent dans notre alimentation sous différentes formes, telle que la farine de chicorée utilisée dans la conception de différents biscuits, comme améliorant de

panification ou encore comme exhausteur naturel de goût. Les formes torréfiées sont, quant à elles, des colorants naturels, dont les différentes teintes peuvent être obtenues par le seul changement de la température de torréfaction (**figure i.10**).



Figure i.10 : L'itinéraire de la plante cultivée à partir de sa forme récoltée aux produits alimentaires dérivés (leroux.fr).

2.2. La torréfaction

La torréfaction est l'action de torréfier. D'après le comité français du café, ce verbe serait apparu en 1520, issu du latin *torrefacere*, assemblage de *torre* qui signifie sécher et de *facere* qui signifie faire (comitefrancaisducafe.fr). La torréfaction est donc l'action de cuire, de chauffer, de griller de façon à transformer la matière première en produit torréfié. Ce processus est à l'origine du développement de la coloration brune et des arômes typiques des produits torréfiés. Elle est utilisée dans la fabrication de la chicorée torréfiée mais aussi de la bière (Sakamura, Furukawa, & Kasal, 1978), du café (Czerny *et al.*, 1999) ou encore du cacao (Krysiak, 2006). Le processus de torréfaction est complexe et s'accompagne de transformations à la fois physique et chimique. De nombreuses études effectuées sur le café ont démontré l'impact de la torréfaction sur la composition native *via* la caramélisation et la réaction de Maillard (Moreira *et al.*, 2012 ; Wei *et al.*, 2012). Des études sur la bière (Coghe *et al.*, 2006) mais aussi sur des produits de boulangerie ont également démontré l'implication de ces réactions lors du processus de cuisson (Ait Ameer *et al.*, 2006), notamment sur les

biscuits (Ait Ameer *et al.*, 2007 ; Gökmen *et al.*, 2007 ; Gökmen *et al.*, 2008) et le pain (Ramirez-Jiménez *et al.*, 2000 ; Capuano *et al.*, 2008). Ces réactions sont à l'origine de la dégradation des molécules natives et de la formation de nouvelles molécules définies comme néoformées puisqu'elles ne sont pas naturellement présentes dans les produits frais.

La caramélisation, favorisée à forte température, consiste en la déshydratation des sucres, suivie par des étapes d'isomérisation et de polymérisation aboutissant à la synthèse de composés de coloration brune (Clarke *et al.*, 1997). Cette réaction a lieu lorsque des sucres sont chauffés au-delà de leur point de fusion, à des températures comprises entre 150 et 180°C. Elle donne lieu à la formation de nouvelles molécules telles que le 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF) (Mathlouthi & Rogè, 2005).

La réaction de Maillard est une réaction complexe ayant pour réactifs les acides aminés et les sucres réducteurs. De nombreuses combinaisons sont possibles (Machiels & Istasse, 2002). Elle peut se produire à des températures plus basses que pour la caramélisation et est initiée rapidement lors de la transformation de produit. Après de nombreuses étapes, la réaction conduit à la formation de polymères colorés appelés mélanoidines. Selon l'avancement de la réaction dans la matrice alimentaire, différents produits de Maillard, intermédiaires plus ou moins stables, seront retrouvés (Martins *et al.*, 2001).

2.3. La composition de la racine de chicorée torréfiée

Les étapes de transformations, et plus précisément la torréfaction, modifie la composition naturelle de la racine fraîche de chicorée par dégradation, conversion, association, etc.

Les études de Sannai *et al.* (1982) sur les composés aromatiques formés lors du processus de torréfaction de la racine de chicorée ont permis d'identifier 32 composés volatils dont principalement la vanilline, le 5-HMF et le furfural. Les études complémentaires de Baek & Cadwallader (1998) ont identifié 95 composés volatils de la racine de chicorée torréfiée. Ils ont mis en évidence que la torréfaction génère beaucoup de composés hétérocycliques tels que les furanes, les pyrazines ou encore les N-furfurylpyrroles.

Barlianto & Maier ont beaucoup travaillé sur les acides de la racine fraîche et torréfiée de chicorée. Par le développement d'une méthode pour identifier les acides non-volatils des produits torréfiés (Barlianto & Maier, 1994), ils ont déterminé les acides naturellement présents dans la racine, tels que les acides citrique, malique, phosphorique et pyroglutamique (Barlianto & Maier, 1995b). Ils ont également déterminé les acides dérivés des sucres, par dégradation de l'inuline et l'augmentation de la teneur en fructose, lors du processus de torréfaction (Barlianto & Maier, 1995a), comme par exemple les acides acétique, formique, lactique ou encore oxalique. D'autres études sur les composés solubles (non-volatils) de la racine indiquent la dégradation des acides chlorogéniques lors de la torréfaction.

Les acides isochlorogéniques (3,5-diCQA et 4,5-diCQA) sont totalement dégradés et l'acide chlorogénique voit sa teneur chuter de 65 % dans les produits torréfiés. Les travaux de Loaëc *et al.* (2014), sur l'étude des composés indésirables formés lors de la torréfaction, ont permis de quantifier l'acrylamide, le N^ε-carboxyméthyl-lysine, le 5-HMF et leurs potentiels précurseurs, la lysine, les protéines, le saccharose, le fructose et le glucose dans le café et la racine de chicorée. Ils ont pu corrélérer l'acrylamide aux sucres et notamment le saccharose, le N^ε-carboxyméthyl-lysine aux protéines et le 5-HMF au glucose.

Des informations éparses et peu nombreuses sont disponibles concernant l'effet de la torréfaction sur la composition native de la racine de chicorée. Toutefois, aucune étude n'analyse l'évolution de la composition chimique de la racine de chicorée au cours du processus de transformation et surtout au cours de la torréfaction.

2.4. Les propriétés organoleptiques des produits torréfiés de la chicorée

D'après Machiels & Istasse (2002) la réaction de Maillard, se produisant lors du traitement thermique des aliments, est la principale responsable de la production des odeurs, des arômes et des pigments caractéristiques des aliments cuits. De nombreux composés de faibles poids moléculaires souvent volatils et aromatiques sont formés au cours de la torréfaction telles que les pyrazines, les pyrroles ou encore les oxazoles (Yeretzian *et al.*, 2003 ; Van Boekel, 2006). Ils sont perçus comme prépondérant dans la formation de saveurs au cours de la cuisson des aliments. En effet, les pyrazines sont associées à la saveur et l'arôme torréfié alors que les alkylpyrazines sont plutôt associés à celle de la noisette. Les alkylpyridines confèrent aux aliments les saveurs et les arômes végétal, amère, astringente et brûlée alors que les furanes, les furanones et les pyranones confèrent plutôt des saveurs et des arômes sucrée, brûlée, piquante ou encore similaire au caramel (Markowicz *et al.*, 2012).

Les travaux de Sannai *et al.* (1982), sur l'étude des composés impliqués dans les arômes de la chicorée torréfiée, définissent les molécules avec des arômes « cireux », « huileux », sucré, floral, noisette, vanille et brûlé. Les études de Baek & Cadwallader (1998) ont pu mettre en évidence un certain nombre d'arômes décrivant la racine de chicorée torréfiée : arômes chocolaté, sucré, végétal, noisette, floral, brûlé, chicorée, etc. Nous sommes confrontés au manque d'information de l'effet des traitements thermiques, en particulier, celui de la torréfaction sur les propriétés organoleptiques de la racine de chicorée.

Ainsi, pour enrichir les connaissances sur la compréhension de l'impact du processus de torréfaction sur la composition chimique et les propriétés sensorielles de la racine de chicorée, différentes approches ont été utilisées lors de ma thèse : le marquage moléculaire, la métabolomique, l'analyse sensorielle et l'analyse statistique.

3. Le marquage moléculaire

3.1. Définition

Jusqu'au début des années 70, la diversité génétique était abordée en ne tenant compte que des caractères observables. A partir des années 70, les marqueurs isoenzymatiques ont commencé à être utilisés pour analyser la diversité génétique des espèces végétales. Cependant le nombre limité de marqueurs et l'absence de neutralité vis-à-vis de l'environnement constituaient deux inconvénients majeurs à leur utilisation. Ce n'est que 15 ans plus tard que les marqueurs moléculaires ont commencé à être développés de façon importante chez les plantes et utilisés pour des études de diversité (**figure i.11**). Les marqueurs moléculaires font appel à des séquences d'ADN codantes ou non, présentant un polymorphisme selon les individus. Le nombre de ces marqueurs est en théorie illimité, grâce à eux, il est possible :

- d'établir l'empreinte génétique d'une plante, c'est-à-dire de caractériser des individus et des variétés en vue de leur protection et de leur classification,
- de mettre en évidence et de suivre les gènes impliqués dans l'expression de caractères d'intérêt agronomique ou technologique,

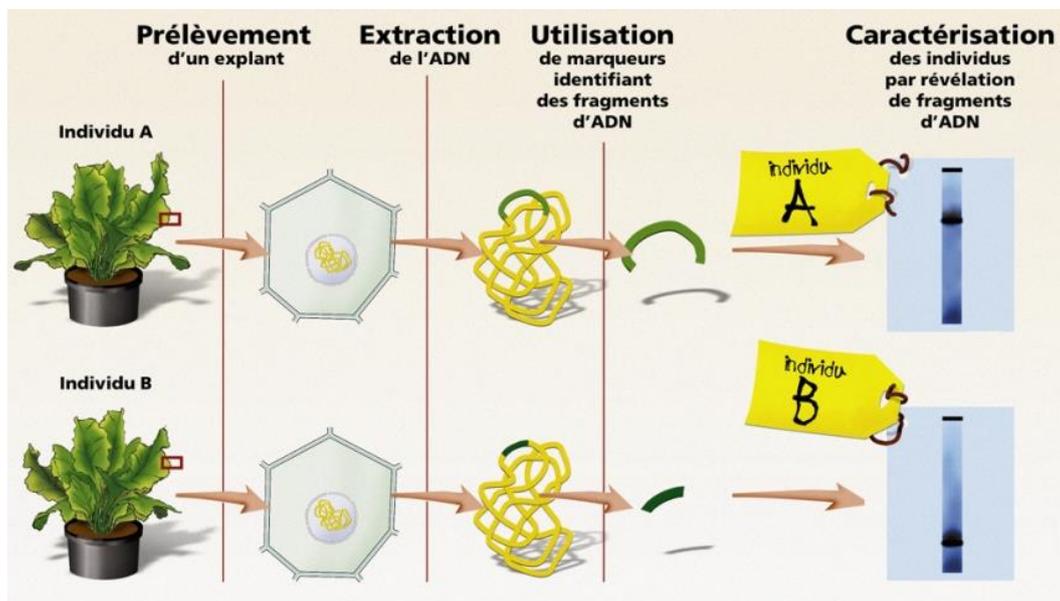


Figure i.11 : Exemple d'utilisation de marquage moléculaire (gnis.org).

Un bon marqueur doit être :

- neutre : ses différents allèles n'ont pas d'effet sur le phénotype de l'individu,
- polymorphe : possède de nombreux allèles (multiallélique) permettant de caractériser les différents individus,
- codominant : l'individu hétérozygote peut être distingué car il présente simultanément les caractères des ses parents homozygotes,
- monolocus : être situé sur une seule partie du génome
- distribué régulièrement le long du génome : plus la couverture du génome en marqueurs est dense et bien répartie, meilleure sera l'évaluation de la région à approfondir.

3.2. Les marqueurs moléculaires

Dans la décennie des années 1980 à 1990, les marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) sont historiquement les premiers à avoir été utilisés. Un marqueur RFLP est développé après coupure de l'ADN génomique par une enzyme de restriction et hybridation par une sonde nucléotidique. Cette technique fournit des profils peu complexes pour les espèces diploïdes à condition que la sonde ne cible pas une séquence répétée. Toutefois, elle est lourde à mettre en œuvre : l'étape de transfert et d'hybridation empêche une automatisation du travail. C'est pourquoi, depuis les années 2000, elle n'est quasiment plus utilisée. Les marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) sont obtenus par amplification par PCR de fragments d'ADN en utilisant des amorces de séquences arbitraires. Cette méthode ne nécessite pas de digestion par une enzyme de restriction, pas de transfert sur une membrane. Elle est donc rapide et d'une faible technicité. Toutefois, sa reproductibilité est difficile à obtenir. Depuis 1993, les marqueurs AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism) sont développés par digestion de l'ADN génomique et fixation d'adaptateurs de séquences connues aux extrémités des produits de digestion en vue de leur amplification par PCR. Cette technique génère de très nombreux fragments et permet de récupérer un grand nombre de marqueurs avec un nombre limité de combinaisons. Par contre que ce soit pour les marqueurs RAPD ou AFLP, ils ne mettent en évidence que des marqueurs dominants.

Lors de nos analyses génotypiques, les marqueurs microsatellites sont utilisés. Ce sont des séquences constituées d'unités répétées de 1 à 5 nucléotides disposées sur le génome. Les plus abondants sont (A)_n, (TC)_n, (TAT)_n et (GATA)_n et plus particulièrement chez les plantes le motif le plus courant est (AT)_n. Les valeurs de n peuvent aller de quelques unités à plusieurs dizaines. On parle de séquences répétées en tandem ou microsatellites (Simple Sequence Repeats). L'intérêt de ces microsatellites réside dans leur polymorphisme. Celui-ci repose sur la variation du nombre d'unités de répétition, constituant le microsatellite (**figure i.12**).

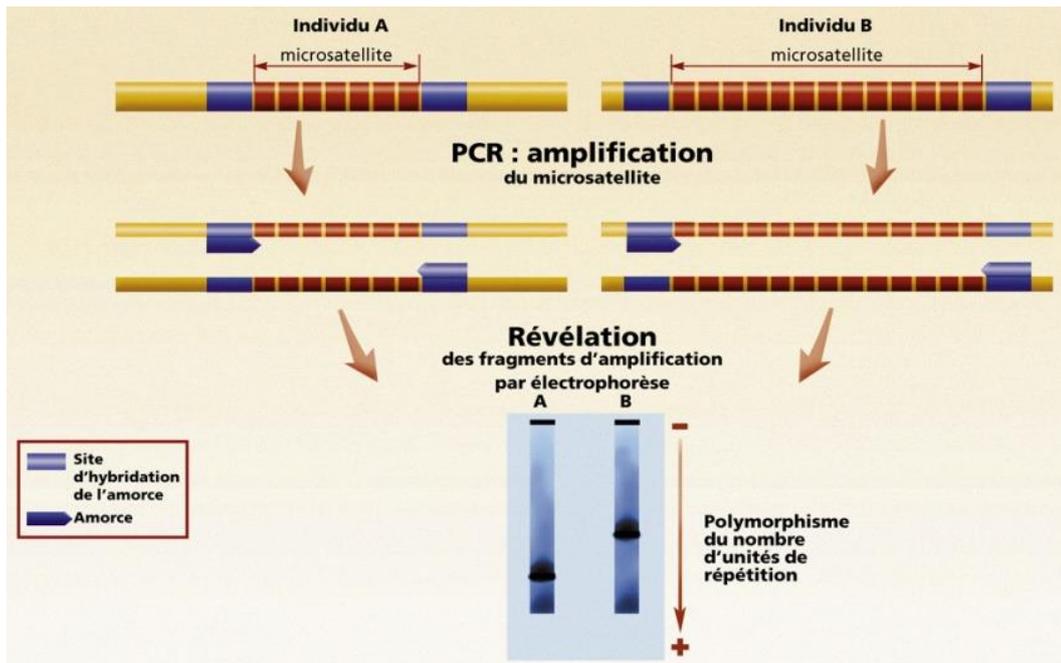


Figure i.12 : Technique de marquage par microsatellite. Un marqueur microsatellite est une paire d'amorces spécifiques bordant le microsatellite. L'individu B, possédant plus d'unité de répétition que A, a un produit d'amplification qui migre plus lentement que A. (PCR : Polymerase Chain Reaction) (gnis.org).

C'est une technique qui nécessite une préparation préalable assez lourde. Il faut d'abord isoler et synthétiser des séquences d'ADN contenant des motifs microsatellites (construire des banques génomiques enrichies en motifs microsatellites) ou utiliser des données de séquences. Ensuite, il faut tester les amorces bordant le microsatellite. En revanche, elle est simple d'utilisation car reposant simplement sur une PCR (Polymerase Chain Reaction), technique permettant l'amplification *in vitro* d'une séquence d'ADN donnée par la répétition de cycles de réplication d'ADN. Le marquage par microsatellites permet de développer de nombreux marqueurs.

Actuellement, la technique de marquage la plus utilisée est celle utilisant les marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Elle peut être développée par différentes approches dont la PCR, les micro-arrays ou encore le séquençage et visent à mettre en évidence un polymorphisme au niveau d'un nucléotide. Cette technologie qui permet d'éliminer entièrement les étapes de séparation de taille par électrophorèse présente un potentiel d'automatisation très supérieur aux technologies précédentes. Elle peut donc être réalisée à très haut débit. Le marquage SNP permet d'obtenir des résultats précis pour différencier des allèles entre individus. Cette technique n'est pas utilisée lors de nos analyses car elle nécessite des outils qui lui sont adaptés.

3.3. Le marquage moléculaire en agro-alimentaire

Le marquage moléculaire est utilisé par les sélectionneurs pour l'amélioration des plantes. L'amélioration a pour but de créer de nouvelles variétés à partir de la diversité existante. Elle consiste à croiser des plantes choisies pour leurs caractères intéressants et complémentaires afin de les réunir dans une seule. Pour cela il faut connaître le génome et maîtriser l'apport de nouveaux caractères afin d'éviter d'introduire des caractères indésirables. C'est à ce niveau que le marquage moléculaire intervient afin de réaliser une carte génétique permettant de cibler et d'introduire un ou des gène(s) d'intérêt(s) dans un fond génétique.

Leroy *et al.* (2011) sont les premiers à combiner l'identification de QTL (Quantitative Trait Loci) avec la composition chimique, les qualités sensorielles et les caractères agronomiques. Pour cela, ils ont utilisé 236 marqueurs pour couvrir l'ensemble du génome de *Coffea canephora*. Cette étude a permis d'identifier 7 QTL en lien avec le rendement, 27 QTL en lien avec la composition chimique et 6 QTL en lien avec les qualités sensorielles. D'autres études sur *Coffea canephora* ont suivi telle que celle de Mérot-L'Anthoëne *et al.* (2014) qui, à partir de 249 marqueurs microsatellites, a construit une carte génétique permettant de mettre en évidence des QTL en lien avec le rendement, des caractères chimiques et sensoriels. Ces études sont développées afin de créer de nouvelles variétés en fonction des attentes des agriculteurs, des industriels et des consommateurs. Des études similaires ont été menées sur la chicorée (*C. intybus*) sur la variété *foliosum*, autrement désignée chicon. A l'aide de marqueurs moléculaires, des QTL ont pu être déterminés en lien avec la morphologie du chicon, notamment les caractéristiques du bourgeon (Van Stallen *et al.*, 2005a) ou en lien avec les caractéristiques du goût comme l'amertume et le sucré (Van Stallen *et al.*, 2005b).

Le marquage moléculaire est également utilisé pour étudier la diversité génétique, notamment en utilisant les marqueurs microsatellites. Dirlwanger *et al.* (2002) ont développé 41 marqueurs microsatellites à partir du pêcher dans le but d'analyser sa diversité génétique et celle du cerisier. A partir de ces marqueurs microsatellites, tous donnent des produits d'amplification par PCR chez le pêcher et 33 chez le cerisier. A partir de ces 33 marqueurs communs, 13 révèlent un polymorphisme pour les 2 espèces : 19 sont uniquement polymorphiques chez le pêcher et 1 l'est uniquement chez le cerisier. Le nombre d'allèles par locus varie de 1 à 9 pour le pêcher, avec une moyenne de 4,2, et varie de 1 à 6 pour le cerisier, avec une moyenne de 2,8. Ces mêmes marqueurs ont été testés chez 6 autres espèces du genre *Prunus*, chez deux autres genres de *Rosaceae*, le pommier et le fraisier, et dans 3 autres familles : *Fagaceae* (châtaignier), *Juglandaceae* (noyer) et *Vitaceae* (vigne). Trente et un marqueurs donnent des produits d'amplification par PCR pour les 6 espèces du genre *Prunus*, 20 pour le pommier et le fraisier, 27 pour le châtaignier, 18 pour la vigne et 13 pour le noyer. Ces résultats démontrent la possibilité de transposer les microsatellites entre les espèces du genre *Prunus* mais aussi pour des espèces n'appartenant pas à la famille des *Rosaceae*. Les études de Krishna *et al.* (2004)

utilisent 18 marqueurs microsatellites pour déterminer la diversité génétique de 48 cultivars de cacahuète. Ainsi, 120 allèles ont été détectés, le nombre varie de 3 à 19 allèles par locus avec une moyenne de 6,9. Ces travaux ont pu mettre en évidence la variation génétique qui sera utilisée pour choisir des parents lors de programmes de croisements mais aussi pour la construction d'une carte de liaison. La diversité génétique a également été étudiée à partir de microsatellites chez le riz (Thomson *et al.*, 2007), le blé (Plaschke *et al.*, 1995), la canne à sucre (Cordeiro *et al.*, 2003) ou encore le caféier (Silvestrini *et al.*, 2007).

Les travaux de Raulier *et al.* (2016) étudient également la diversité génétique de la chicorée à partir de 19 cultivars de *C. endivia*, 27 de *C. intybus* sauvages et 155 de *C. intybus* dont 83 chicorées industrielles, 42 Witloof et 30 chicorées salades (Radicchio, pain de sucre et Catalogne). A partir de 15 marqueurs microsatellites, ils ont clairement séparé les cultivars *C. endivia* de *C. intybus*. Toutefois, 7 *C. intybus* sauvages sont plus proches de *C. endivia* que de *C. intybus* ce qui démontre les interrelations génétiques complexes entre ces deux espèces. Au niveau des *C. intybus*, les résultats confirment une différenciation entre les trois groupes de cultivar (chicorée industrielle, Witloof et chicorée salade). Les individus de chicorée salade sont divisés en trois sous-groupes génétiques, correspondant aux cultivars Radicchio, pain de sucre et Catalogne, ce qui atteste la validité de la classification basée sur les facteurs morphologiques. De façon générale, ces observations indiquent une forte variabilité phénotypique et génotypique des cultivars de la chicorée industrielle qui constitue un matériel génétique utile pour l'amélioration et la sélection de cultivar.

D'autres études réalisées dans le laboratoire chez la chicorée industrielle, variété *sativum*, ont permis de développer des marqueurs microsatellites permettant de construire une carte génétique de référence dérivée à partir de la chicorée witloof et de la chicorée industrielle (Cadalen *et al.*, 2010). Cette carte contient 472 marqueurs couvrant 80 à 83 % du génome. Les études de Muys *et al.* (2014) ont intégré 237 marqueurs moléculaires, 170 AFLP, 28 microsatellites, 12 EST-SSR et 27 EST-SNP, dans une nouvelle carte génétique de la chicorée industrielle qui recouvre 84 % du génome.

4. La métabolomique

4.1. Définition

Un métabolome représente l'ensemble des métabolites contenus dans un échantillon biologique. C'est le résultat final de l'expression du génome dans un environnement particulier. Le métabolome comprend une large gamme de molécules (par exemple : des métabolites primaires tels que les sucres, les acides organiques, les acides aminés et des métabolites secondaires comme les terpènes, les phénols) avec des propriétés physico-chimiques variées et des concentrations différentes. Ces métabolites, chimiquement définis comme de petites molécules de masse moléculaire inférieure à 1500 Da, sont les produits finaux des processus cellulaires, en aval de l'expression des gènes et des activités enzymatiques. Ils présentent un éventail très large de formules chimiques. Ainsi, la base de données « The Human Metabolome » (HMDB, version 3.6) contient 41 993 entrées correspondant à des métabolites différents et incluant aussi bien des métabolites hydro-solubles que lipo-solubles avec des métabolites qui pourraient être considérés comme abondants ($> 1 \mu\text{M}$) ou relativement rares ($< 1 \text{nM}$). Dans le règne végétal, il a été estimé qu'au moins 200 000 métabolites différents existent, et qu'entre 7 000 et 15 000 se retrouveraient dans une espèce individuelle (D'Auria & Gershenzon, 2005 ; Fernie, 2007).

La Métabolomique définit la science qui a pour objectif de donner l'éclairage le plus large sur ces empreintes chimiques en identifiant et en quantifiant ces molécules, c'est-à-dire en établissant un profil des métabolites d'un échantillon étudié (**figure i.13**). Le profil métabolique d'un échantillon biologique résulte d'une part du patrimoine génétique de l'individu et d'autre part de l'influence de facteurs environnementaux. En identifiant et en quantifiant les métabolites, la métabolomique donne une photographie globale de l'état de l'extrait étudié (définitions issues de l'infrastructure METABOHUB (metabohub.fr)).

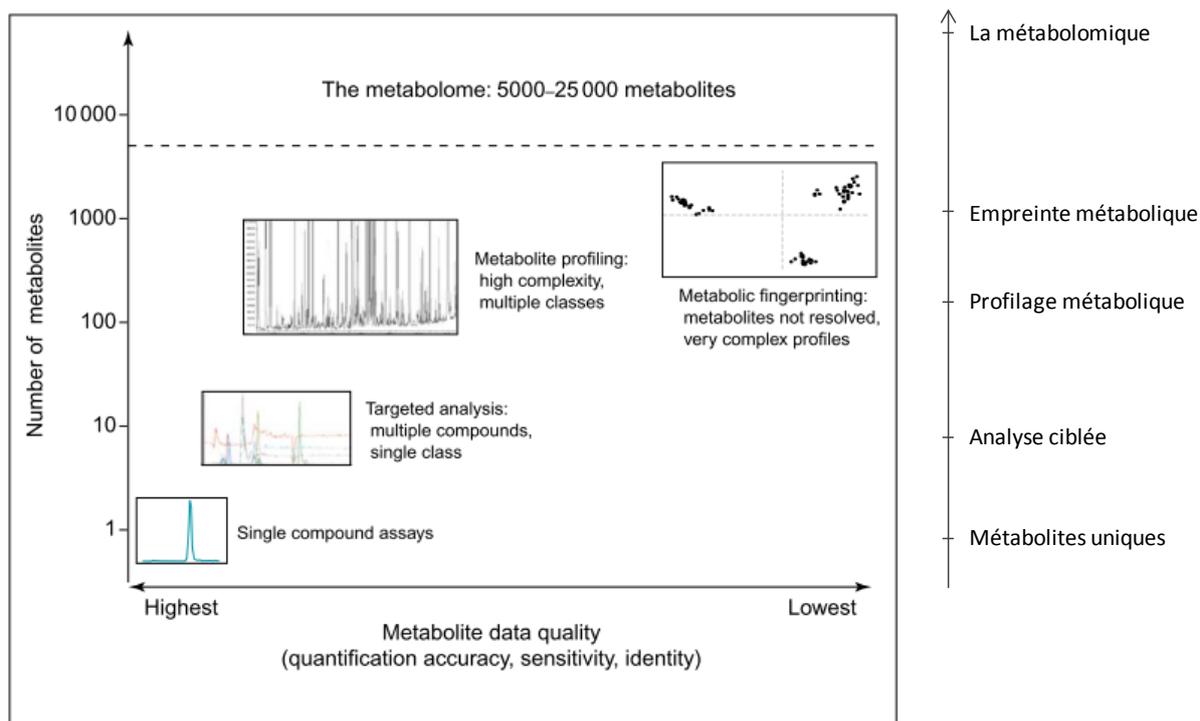


Figure i.13 : Illustration du compromis entre l'étendue métabolique et la qualité de l'analyse métabolomique.

Les analyses les plus sensibles et les plus précises sont typiquement celles pour les métabolites uniques. Ces analyses ciblées fournissent des données de bonne qualité sur une seule catégorie de composés en utilisant des méthodes dédiées et optimisées. Le profilage métabolique fournit des données pour une ou plusieurs classes chimiques, et peut notamment couvrir l'ensemble des métabolites connus d'une voie de biosynthèse. Toutefois, ces méthodes présentent un compromis et n'offrent pas la même qualité de données pour tous les métabolites détectés. Enfin, si les empreintes métaboliques offrent l'étendue la plus large, il faut préciser que ce sont les profils et non les teneurs en métabolites qui sont comparés par ces approches et que les méthodologies peuvent être soumises à des artefacts qui portent atteinte à l'évaluation quantitative des données. Aucune des méthodes seules n'est suffisante pour couvrir le métabolome complet d'une plante (Trethewey, 2004).

Si la métabolomique est une discipline à part entière, elle fait appel à une démarche analytique nécessitant différentes technologies. Pour cela, différents outils sont disponibles, telles que la chromatographie liquide haute performance couplée à un détecteur UV à barrette de diode (HPLC-DAD : High-Performance Liquid Chromatography – Diode Array Detector), la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-HRMS : Ultra Performance Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry, HPLC-MS/MS : High-Performance Liquid Chromatography – Multiple Mass Spectrometry, LC-QTOF-MS : Liquid Chromatography –

Quadrupole-Time Of Flight – Mass Spectrometry) ou encore la spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire du proton (RMN-¹H).

4.2. Les outils

4.2.1. La chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) permet de qualifier et de quantifier les métabolites solubles présents dans les extraits par un processus de séparation entre deux phases, l'une stationnaire, l'autre mobile, au sein d'une colonne dite chromatographique. La séparation des molécules s'effectue en fonction de leur affinité pour les deux phases caractérisées par leur coefficient de partage, leur nature plus ou moins hydrophobe et leur polarité. La colonne remplie de la phase stationnaire est composée d'un matériel solide (silice) et actif, alors que la phase mobile est liquide (solvant) et soumise à une forte pression afin de lui permettre de traverser la colonne. La chimie de la silice utilisée est choisie en fonction de la nature des composés : acides, neutres ou basiques.

L'HPLC comporte :

- **un dégazeur**, il permet de retirer le gaz (oxygène, azote, etc.) présent dans le(s) solvant(s) afin d'éviter d'endommager les échantillons ou la phase stationnaire,
- **une pompe**, elle permet l'injection d'éluant sous pression dans la colonne ; une pompe est utilisée pour une élution isocratique ou plusieurs pour une élution par gradient,
- **un injecteur**, il injecte les échantillons dans la phase mobile,
- **un détecteur**, il existe plusieurs types de détecteurs, spectroscopique, réfractométrie, électrochimiques, conductimétrie, évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) et, celui utilisé lors de nos analyses, le détecteur UV à barrette de diode (DAD) qui permet de détecter et de quantifier les analytes à leur maximum d'absorption.

Il existe plusieurs types de chromatographie en phase liquide, la nature de la phase stationnaire dépend de la nature et du nombre de composés à séparer. Celle utilisée lors de nos analyses est la chromatographie en phase inverse. Cette chromatographie est basée sur les interactions hydrophiles et les affinités d'une molécule envers la phase mobile et stationnaire dans le but de les séparer en fonction de leur polarité. Les phases stationnaires sont hydrophobes et la phase mobile, composée de solvants, est plutôt polaire. Ainsi, les molécules les moins polaires sont plus tardivement éluées que les molécules polaires.

4.2.2. La spectrométrie de masse

Couplée à la chromatographie liquide, la spectrométrie de masse (MS) est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur masse, voire de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le spectromètre de masse est composé d'une source d'ionisation, d'un analyseur, d'un détecteur et d'un système de traitement.

La source d'ionisation consiste à vaporiser les molécules et à les ioniser. Elle peut être utilisée soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Plusieurs types de sources existent et sont utilisés en fonction du résultat recherché et des molécules analysées : l'ionisation électronique (EI), l'ionisation chimique (CI), l'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB), la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et, celle utilisée lors de nos analyses, l'ionisation par électronébulisation (électrospray, ESI). Cette dernière permet, sous l'effet d'un champ électrique et grâce éventuellement à un courant d'air coaxial, de transformer le liquide en nuage de fines gouttelettes (spray) chargées suivant le mode d'ionisation. Sous l'effet d'un second courant d'air chauffé, les gouttelettes s'évaporent progressivement. Leur densité de charge devenant trop importante, les gouttelettes explosent en libérant des microgouttelettes constituées de molécules protonées ou déprotonées. Les ions ainsi formés sont ensuite guidés en appliquant une forte différence de potentiel électrique entre l'extrémité de l'émetteur et un orifice situé à proximité. En faisant varier ces potentiels électriques il est possible de provoquer des fragmentations plus ou moins importantes.

L'analyseur sépare les ions en fonction de leur rapport m/z . il existe des analyseurs basse résolution comme par exemple le quadripôle (Q), et des analyseurs haute résolution permettant de mesurer la masse exacte des analytes comme par exemple le temps de vol (TOF) ou encore l'Orbitrap. Ceux utilisés lors de nos analyses sont :

- l'orbitrap, il se compose d'une électrode creuse à l'intérieur de laquelle est placée parallèlement une électrode en forme de fuseau ; les ions sont injectés au niveau de l'électrode centrale et piégés autour d'elle par la force électrostatique qui compense les forces centrifuges ; le mouvement des ions se décompose alors ainsi : un mouvement circulaire autour de l'électrode centrale dans le plan (xy) et un mouvement oscillatoire de va-et-vient selon l'axe z ; en particulier, les ions d'un m/z donné seront sur la même trajectoire circulaire qui oscille axialement ; le courant induit par ces oscillations permet par une transformée de Fourier, convertissant une représentation temporelle en représentation fréquentielle (et inversement), d'accéder aux m/z ,
- l'analyseur quadripolaire (Q), il est formé de quatre barres métalliques parallèles entre lesquelles les ions sont injectés avec une énergie cinétique de quelques électrons volts ; les

ions empruntent une trajectoire « rectiligne » déterminée par leur oscillation entre le quadripôle selon le changement de polarité des barres,

- la mesure d'un temps de vol (Time Of Flight : TOF), il consiste à mesurer le temps que met un ion, accéléré préalablement par une tension, à parcourir une distance donnée. Le rapport masse sur charge est directement mesurable à partir du temps de vol. Les ions de rapport m/z le plus petit parviendront au détecteur les premiers.

Le détecteur transforme les ions en signal électrique, plus les ions sont nombreux, plus le courant est important. Le détecteur amplifie le signal obtenu pour qu'il puisse être **traité informatiquement**. Le résultat obtenu est un spectre de masse représentant les rapports m/z .

Les analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des analyses de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Ces analyses permettent d'étudier les filiations ioniques par l'étude de leur fragmentation et de séparer des composés de masses moléculaires différentes au sein d'un mélange. Le triple quadripôle combine deux analyseurs quadripolaires en série, séparés par une cellule de collision. Cette combinaison de quadripôles permet de travailler en MS simple ou en tandem. Ainsi, l'ion parent à étudier est sélectionné par le premier analyseur, selon son rapport m/z , et fragmenté dans la cellule de collision. Le second analyseur est focalisé sur l'ion produit, aussi appelé l'ion fils. Ce mode de fonctionnement présente une double sélectivité, au niveau des sélections de l'ion parent et de l'ion fils. En outre, les deux analyseurs étant fixées à des tensions constantes la sensibilité de détection est améliorée par rapport à d'autres modes de balayage. Le Q-TOF est un hybride qui associe plusieurs types d'analyseur dans un spectromètre de masse en tandem afin de combiner leurs points forts. Ainsi le Q-TOF est constitué d'un double quadripôle et d'un analyseur à temps de vol. Le HRMS (High Resolution Mass Spectrometry) est un spectromètre de masse à haute résolution hybride combinant les performances d'un quadripôle pour la sélection de précurseur avec une grande précision et un Orbitrap pour une détection à haute résolution et grande précision.

Quel que soit le ou les analyseur(s) utilisé(s), la spectrométrie de masse engendre une multitude de données stockées sous forme brute (spectrale par exemple) qui nécessitent un niveau expert pour être traitées, c'est-à-dire traduites en des informations qui identifient et qui quantifient. C'est pourquoi Giacomoni *et al.* (2015) ont développé, à travers une plateforme collaborative, un protocole sous forme de flux utilisant différents algorithmes permettant de traiter les données en ligne pour la métabolomique : workflow4metabolomics (W4M). Cette plateforme permet d'effectuer le pré-traitement des spectres, transformant les spectres en données numériques, mais aussi de réaliser des analyses statistiques voire l'identification de composés *via* l'interrogation en ligne de bases de données (**figure i.14**).

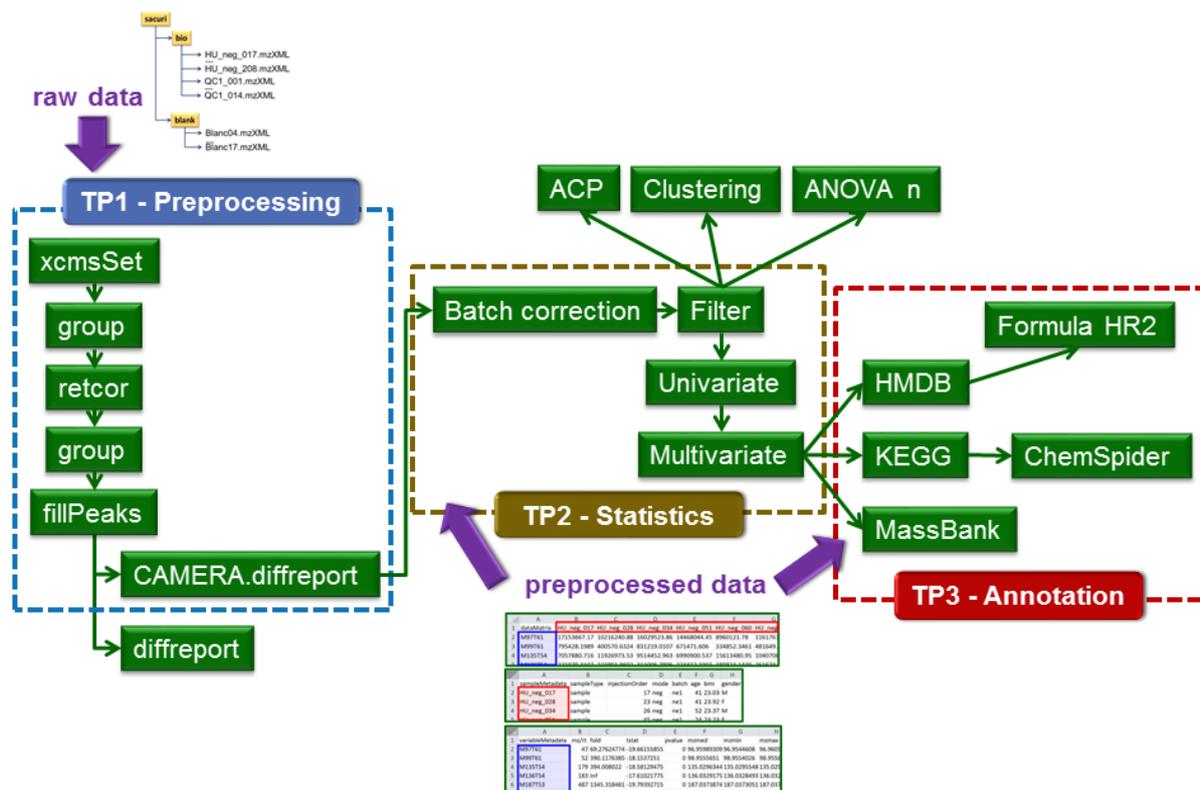


Figure i.14 : Modules disponibles pour les analyses LC-MS (workflow4metabolomics.org). TP1 preprocessing permet de convertir les spectres en données numériques, TP2 statistics mets à disposition des outils statistique et TP3 l'identification de composés.

Le pré-traitement comporte différentes étapes (**figure i.15**). Le module `XcmsSet` regroupe des algorithmes permettant d'extraire les signaux relatifs à des ions à partir de chaque échantillon, les pics sont filtrés selon les paramètres choisis et intégrés. Après l'extraction des pics, le module `group` est un outil qui associe les pics qui correspondent au même analyte dans les échantillons en utilisant le chevauchement m/z . Il permet aussi de rejeter les signaux qui ne sont que partiellement détectés dans les répétitions d'une classe d'échantillon. Après l'appariement des pics en groupes, le module `retcor` utilise ces groupes pour identifier et corriger les dérives du temps de rétention au cours des analyses. Le module `fillPeaks` permet de remplacer des valeurs manquantes par l'intensité de la ligne de base. Le module `CAMERA` (Collection of Algorithms for METabolite pRoFile Annotation) a pour but principal l'annotation et l'évaluation des données LC-MS. Il inclut des algorithmes pour l'annotation des isotopes, des adduits et des fragments mais aussi des méthodes regroupant des signaux qui proviennent d'un seul métabolite. A l'issue de ce traitement, deux matrices sont créées, la matrice des variables et la matrice des données. La matrice des variables indique leur nom et les décrit par le m/z moyen, minimum, maximum ; le temps de rétention moyen, minimum, maximum ; les adduits et les

isotopes identifiés et le nombre de pics détectés pour chaque groupe d'échantillon. La matrice des données présente l'intensité des signaux pour chacun des échantillons.

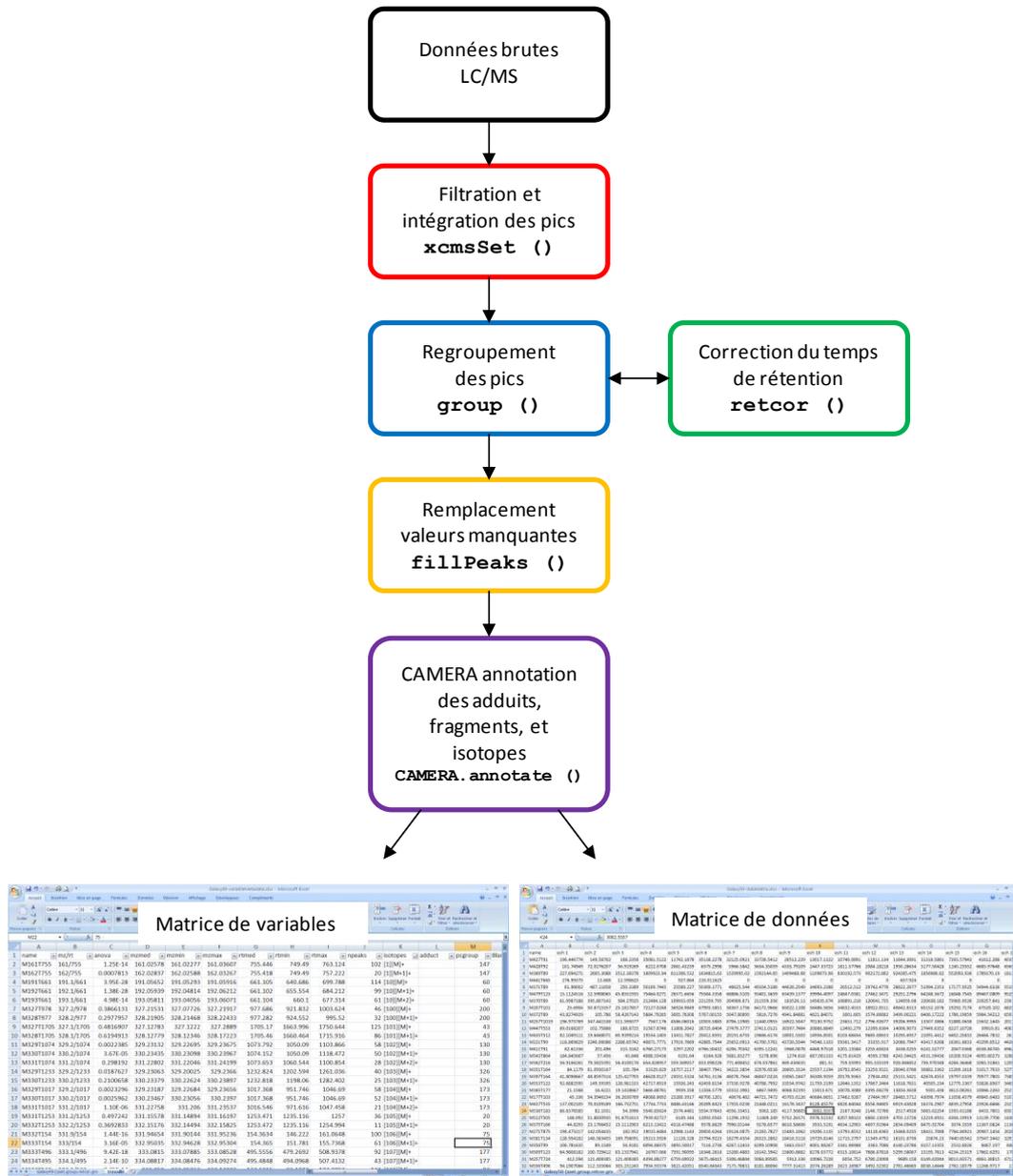


Figure i.15 : Les étapes du pré-traitement des spectres aboutissant à une matrice de variables et une matrice de données.

4.2.3. La résonance magnétique nucléaire

La spectrométrie par résonance magnétique nucléaire (RMN) est une technique de caractérisation des molécules pour une étude qualitative et quantitative d'échantillons. Elle est basée sur l'utilisation d'un champ magnétique intense. Ce champ magnétique est créé par une bobine supraconductrice qui permet d'exciter les noyaux atomiques et d'enregistrer le signal de retour à l'équilibre sous forme d'ondes de radiofréquence. Celles-ci se mesurent en MHz (Mégahertz). Les propriétés RMN dépendent de l'isotope étudié. Ainsi chaque isotope a une fréquence d'observation différente. Mais certains noyaux dont le nombre de masse et le numéro atomique sont pairs comme par exemple le carbone-12 ou l'oxygène-16, très abondants à l'état naturel, ne donnent aucun signal RMN. Le noyau utilisé lors de nos études est l'hydrogène (RMN du proton), il donne un signal RMN et il est très abondant à l'état naturel. L'analyse peut s'appliquer sur des échantillons (fluides, liquides) bruts (non préparés) et représente à ce titre une technique dite non destructive. La spectrométrie RMN fait intervenir différents principes de bases.

- **Le moment magnétique**

Le noyau d'un atome peut être considéré comme une sphère chargée positivement et tournant sur elle-même. La rotation de ces charges induit un champ magnétique appelé moment magnétique nucléaire (**figure i.16**).

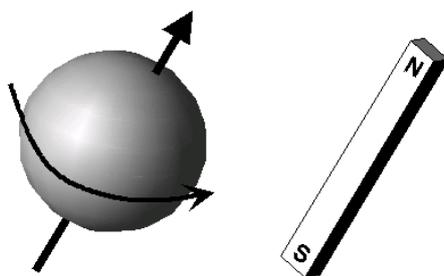


Figure i.16 : Le noyau possède un moment magnétique pouvant être assimilé à un petit aimant (Une introduction à la RMN, chapitre 1, Serge Akoka, Université de Nantes).

- **L'aimantation**

Dans un échantillon macroscopique, un grand nombre de noyaux coexiste. On peut considérer qu'ils sont orientés de manière totalement statistique (**figure i.17 a**) et sont animés d'un mouvement aléatoire par agitation thermique. Lorsque l'échantillon est plongé dans un champ magnétique externe intense B_0 , les moments magnétiques nucléaires s'orientent dans la direction de ce champ. Toutefois, l'agitation thermique contrarie cette orientation. Les moments magnétiques ne peuvent adopter que deux orientations possibles, l'une sensiblement parallèle à B_0 (α) et l'autre sensiblement antiparallèle (β) (**figure i.17 b**). Le nombre de noyaux parallèles est légèrement supérieur à celui des noyaux

antiparallèles, la somme vectorielle de tous les moments magnétiques nucléaires est alors non-nulle et dirigée dans la direction du champ B_0 . Cette somme est appelée l'aimantation nucléaire et notée M (**figure i.17 c**).

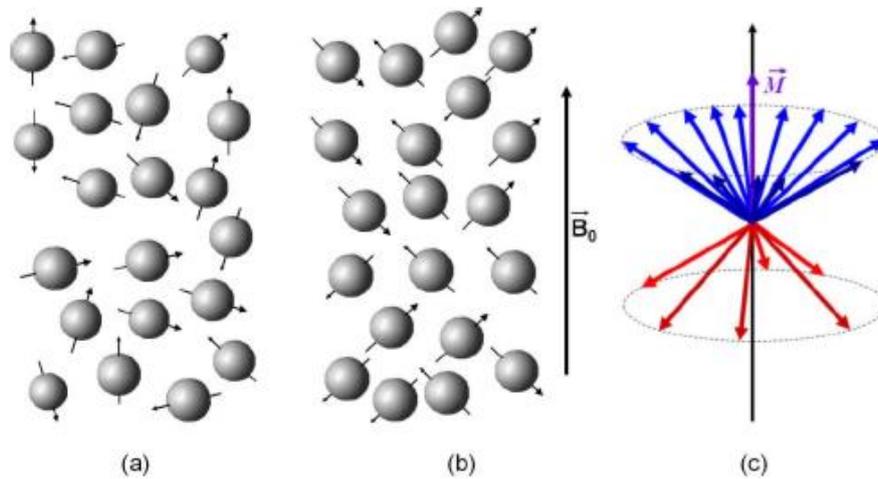


Figure i.17 : Orientation des moments magnétiques nucléaires : (a) en absence, (b) en présence d'un champ magnétique externe B_0 . En présence d'un champ magnétique, la somme vectorielle des moments magnétiques, M , est nulle et dirigée dans la direction de ce champ (c) (Une introduction à la RMN, chapitre 1, Serge Akoka, Université de Nantes).

- **La résonance**

L'aimantation est proportionnelle au nombre de noyaux et c'est elle qui est mesurée en RMN. Toutefois, M n'est pas observable lorsqu'elle est parallèle à B_0 (**figure i.18 a**), il faut donc la basculer de 90° . Pour faire tourner M , il suffit d'appliquer transitoirement un autre champ magnétique B_1 dirigé à 90° de B_0 . Les moments magnétiques sont alors animés d'un mouvement de précession autour de B_1 . Dès qu'une rotation de 90° a été obtenue, le champ B_1 est coupé (**figure i.18 b**). L'aimantation M étant la somme de tous les moments magnétiques nucléaires, elle est alors orientée à 90° de B_0 et peut être mesurée (**figure i.18 c**).

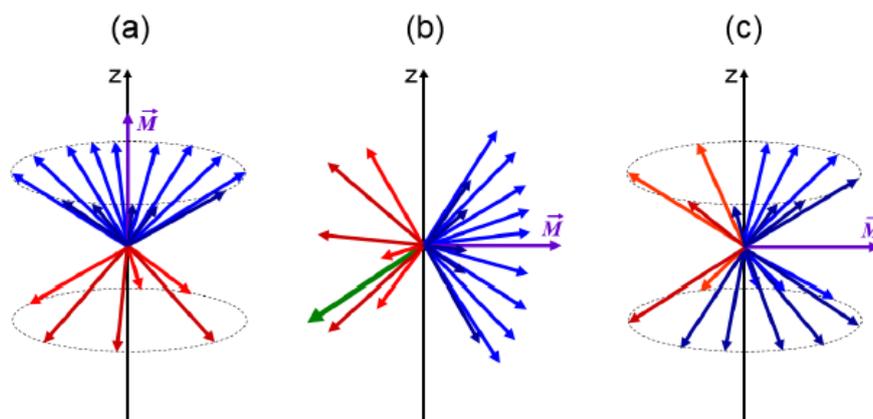


Figure i.18 : Orientation de M , la somme vectorielle des moments magnétiques. (a) En présence de B_0 , M est non nulle et dirigée suivant z , (b) rotation de 90° de tous les moments magnétiques en présence d'un champ B_1 perpendiculaire à B_0 , (c) dès que B_1 n'est plus appliqué, les moments magnétiques reprennent une polarisation et une précession uniquement gouvernées par B_0 mais M est alors dans le plan transversal (Une introduction à la RMN, chapitre 1, Serge Akoka, Université de Nantes).

Le champ B_1 , généré par une console électronique, doit avoir une fréquence comprise dans la gamme des ondes radio (quelques centaines de Mégahertz). La **figure i.18 c** montre qu'après l'application du champ B_1 , les populations des états α et β sont identiques. Ce qui explique la disparition d'une aimantation suivant l'axe z .

- **La relaxation**

Après avoir basculé dans le plan transversal, l'aimantation va progressivement retourner à sa position d'équilibre, parallèle à B_0 . Dans les liquides, les temps de relaxation longitudinale des protons sont typiquement de l'ordre de quelques secondes.

- **Le signal**

Le signal RMN est transformé par la transformation de Fourier, opération mathématique permettant de passer d'une représentation temporelle à une représentation fréquentielle. Ainsi, un spectre RMN représente l'intensité des signaux en fonction du déplacement chimique exprimé en ppm (parties par million). Après réintégration des ppm d'intérêts, une quantification absolue est possible pour les ppm connus et une quantification relative pour les inconnus grâce à des gammes étalons comme par exemple le glucose, le fructose, l'acide glutamique ou encore la glutamine.

4.3. La métabolomique en agro-alimentaire

De récentes recherches dans le domaine des maladies humaines (Kaddurah-Daouk & Krishnan, 2009), de la pharmaceutique (Wishart, 2008a), de la physiologie des plantes (Hall *et al.*, 2008), de la nutrition humaine (Wishart, 2008b) et d'autres, ont montré l'impact global et la croissance rapide de la métabolomique. Son application est plus récente en sciences des aliments où elle est utilisée comme un outil pour la qualité, le traitement et la sécurité des matières premières et des produits finis (Cevallos-Cevallos *et al.*, 2009).

La métabolomique dite informative correspond à l'identification et la quantification des métabolites ciblées ou non ciblées pour obtenir des informations intrinsèques des échantillons. Ainsi, elle permet la découverte de nouveaux composés bioactifs et de biomarqueurs. Dans ce contexte, des modèles de prédiction ont été développés pour estimer les caractéristiques sensorielles du thé vert (Ikeda *et al.*, 2007 ; Tarachiwin *et al.*, 2007 ; Pongsuwan *et al.*, 2008), de la pastèque (Tarachiwin *et al.*, 2008) et des champignons (Cho *et al.*, 2007). Ces études confortent l'intérêt de la métabolomique pour développer des produits alimentaires en considérant les préférences gustatives des consommateurs. La métabolomique peut également être utilisée pour comprendre l'impact des procédés sur la qualité des variétés de plantes cultivées. Par exemple, les variétés de pomme de terre se distinguent pour leur utilisation dans la friture et d'autres pour la cuisson. Pour évaluer les différences chimiques, des variétés de pommes de terre ont été analysées en spectrométrie de masse par ionisation électrospray (FI-ESI-MS) et l'identification des composés a été facilitée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) (Beckmann *et al.*, 2007). Il a ainsi pu être constaté que les variétés Salara et Agria ont de faibles teneurs en tyrosine ce qui les rend apte à être découpées et frites. Quant aux variétés avec une forte teneur en tyrosine (telles que Désirée et Granola), elles sont plus adaptées à la cuisson. De par sa globalité, l'analyse métabolomique cible plus rapidement et de façon intégrative la chimie responsable de la qualité à favoriser.

Différents outils métabolomiques sont utilisés dans le profilage de la chicorée. Les travaux de Baek & Cadwallader (1998) ont contribué à développer une méthode par GC/MS couplée à l'olfactométrie pour fractionner et identifier les composés volatils responsables des arômes de la racine de chicorée torréfiée. Ainsi, 95 composés volatils ont pu être détectés dont des pyrazines, des pyrroles, des furanes ou encore des aldéhydes. Certains composés volatils ont pu être associés à des arômes, c'est le cas du 3-méthylbutanal avec l'arôme chocolaté, du 2,3-butanedione avec l'arôme de beurre ou encore le phénylacétaldéhyde avec une note florale ou encore de chèvrefeuille. Les études de Carazzone *et al.* (2013) utilisent l'HPLC-PDA-ESI-MSⁿ pour identifier les composés phénoliques des chicorées salade (*C. intybus* var. *sylvestre*). L'utilisation des spectres UV et des fragmentations MSⁿ a permis l'identification de 64 composés dont plusieurs dérivés d'acide hydroxycinnamique, incluant 8 acides mono et dicaféoylquinique, 3 dérivés d'acides tartariques, 31 flavonols, 2 flavones glycosides et

10 anthocyanidines. Enfin, les travaux de Ritota *et al.* (2013) ont consisté à suivre la traçabilité analytique de l'IGP (indicateur géographique protégée) des chicorées salades italiennes, *Radicchio Rosso di Treviso* et *Radicchio Variegato di Castelfranco*, par combinaison de la HRMAS-NMR (RMN haute résolution avec rotation de l'angle magique), et des analyses statistiques multivariées. Cette étude a permis de construire un modèle statistique permettant de classer les échantillons selon leur cultivar, *Treviso* ou *Castelfranco*, et selon le label protégé, IGP ou non. Ils mettent en évidence de potentiels marqueurs moléculaires géographiques et variétaux qui pourrait être le point de départ pour la création d'une méthode fiable pour prévenir la fraude et évaluer le contrôle de la qualité.

5. L'analyse sensorielle

5.1. Définition

L'analyse sensorielle est définie comme une méthode scientifique utilisée pour évoquer, mesurer, analyser et interpréter les réponses à des produits perçus par les sens tels que la vue, l'odorat, le toucher, le goût et l'ouïe (Stone & Sidel, 2004). A ce jour, il n'existe pas d'outils de mesure suffisamment performants pour remplacer la perception humaine dans l'optique de caractériser et de contrôler la qualité des produits alimentaires. Comme dans toute démarche scientifique, cette discipline demande beaucoup de rigueur pour garantir des résultats fiables et de qualité (Lefebvre & Bassereau, 2003). La pratique de l'évaluation sensorielle est encadrée par diverses normes de l'association française de normalisation (AFNOR) et de l'organisation internationale de normalisation (ISO), ces deux institutions s'étant accordées sur les mêmes commissions de normalisation.

5.2. Le panel

La constitution d'un panel de testeurs, sa formation et son entraînement (Labbe *et al.*, 2004), requièrent la prise en compte de paramètres aussi différents tels que les désirs des consommateurs, la définition de groupes particuliers (Geel, Kinnear, & De Kock, 2005), ainsi que les modèles d'analyse des données où interviennent les notions d'âge, de langage et de culture (Piccolo & D'Elia, 2008 ; Seo *et al.*, 2009).

- **Qualification des sujets**

La sélection des sujets porte sur leur disponibilité et leurs motivations, puis sur leurs capacités d'expression sensorielle. D'une façon générale, la formation requise pour les sujets dépend de l'objectif de l'étude, du type d'essai ainsi que du produit. On distingue ainsi plusieurs niveaux de compétences :

- **sujet initié** : personne qui a déjà participé à au moins un essai sensoriel discriminatif de même nature que celui auquel il participe ; les sujets initiés participent aux essais de discrimination,
- **sujet qualifié** : personne choisie en fonction de sa capacité à effectuer un essai sensoriel et dont les performances ont été contrôlées ; les sujets qualifiés ont des aptitudes sensorielles relatives à l'espace produit considéré ; elles sont validées lors de la sélection, développées par un entraînement, puis contrôlées ; les sujets qualifiés participent à tous les types d'essais analytiques,
- **sujet expert** : sujet qualifié qui a une excellente acuité sensorielle ; il est entraîné à l'utilisation des méthodes d'évaluation sensorielle ; les sujets experts ont des aptitudes sensorielles relatives à un produit déterminé ; elles sont validées lors de la sélection,

développées par un entraînement spécifique, puis contrôlées pour s'assurer de leur répétabilité ; les sujets experts participent à tous les types d'essais analytiques, ils sont spécifiquement adaptés lorsqu'une grande précision ou une grande constance des performances dans le temps sont recherchées.

- **Sélection du panel**

L'animateur sensoriel a besoin de détecter les éventuelles incapacités (vision des couleurs, agueusie ou encore anosmies) mais aussi de déterminer l'acuité sensorielle des sujets. Cependant, il doit permettre une certaine marge de manœuvre dans les déficiences sensorielles des panélistes car de nombreux sujets moyens s'amélioreront nettement avec la formation. Il n'est donc pas nécessaire d'avoir uniquement les panélistes les plus discriminants au début de la formation.

Pour évaluer les sujets, l'animateur dispose d'une batterie de tests appropriés aux produits destinés. Par exemple, si les panélistes sont voués à faire des tests de discrimination, les tests d'évaluations n'impliqueront que des tâches associées à ces tests. Cependant, la clé pour l'évaluation n'est pas l'abondance de tests. En effet, cela pourrait diminuer l'enthousiasme et la motivation des panélistes quand vient le temps d'évaluer de "vrais" produits.

- **Entraînement, contrôle et suivi du panel**

La formation d'un groupe de sujets suit des normes AFNOR (**tableau i.3**). La fréquence d'entraînement requise dépend des tests et du niveau d'acuité sensorielle souhaitée.

Pendant la phase d'entraînement, en particulier pour les panels descriptifs, l'animateur doit expliquer aux panélistes que le travail sensoriel est difficile et nécessite de l'attention et de la concentration.

Tableau i.3 : Normes à respecter lors d'entraînement, de contrôle et de suivi d'un groupe de sujets.
(d'après *Evaluation sensorielle - guide de bonnes pratiques*, 1999).

Entraînement, formation d'un groupe de sujets homogène	
<i>Normes</i>	NF ISO 8586-1 : 1993 NF ISO 8586-2 : 1994
<i>Sujets</i>	Nombre : à partir de 10 à 20 « sujets initiés » pour obtenir un groupe de 10 à 12 sujets entraînés
<i>Séances d'entraînement</i>	<p>Nombre : 10 au minimum, proches dans le temps</p> <p>Mise en œuvre de différents essais réalisés sur des produits spécifiques : déttection et reconnaissance des odeurs et saveurs : - produits de référence - échantillons complexes (boissons, aliments) entraînement à la quantification d'un stimulus entraînement à la description de produits spécifiques à l'espace produit concerné</p>
<i>Contrôle des performances des sujets</i>	<p>Evaluation des performances de chaque sujet (<i>variance intra-individuelle</i>) : répétabilité des réponses quantitatives capacité de discrimination</p> <p>Evaluation des performances du groupe (<i>répétabilité, discrimination, cohérence au sein du groupe</i>)</p>
<i>Suivi du jury</i>	<p>Motivation : relation de confiance entre l'animateur et les sujets indications sur les résultats des travaux gratifications ou rétributions</p> <p>Contrôles périodiques des performances : baisse des performances → nouvel entraînement</p> <p>Maintien de l'effectif du groupe : entraînement de nouveaux sujets (2 ou 3), intégration progressive</p>

5.3. Conditions de dégustations

Les exigences relatives aux conditions d'évaluation des produits visent à minimiser les biais et les perturbations que peuvent subir les dégustateurs pendant l'évaluation des produits :

- les essais se déroulent dans un laboratoire conforme à la norme NF 8589:2007 (**figure i.19**),
- une réunion préalable informe les sujets des consignes à respecter avant et pendant la dégustation :
 - ne pas consommer avant l'essai de produits fortement aromatiques (café, chewing-gum, cigarette, etc.),
 - ne pas porter de produits fortement aromatiques (parfums, etc.),
 - être ponctuel et prévenir en cas d'absence ou de perturbation physiologique (rhume, soins dentaires, etc.),
- les sujets évaluent les produits sans communiquer entre eux,
- les sujets respectent un temps d'attente minimum entre deux échantillons de produits ; ils ont à leur disposition un aliment capable d'atténuer les caractéristiques sensorielles du produit précédent (l'eau est la plus couramment utilisée ; la mie de pain ou la biscotte pour les produits fortement rémanents).



Figure i.19 : Salle d'analyse sensorielle de l'IUT de Lille 1.

Une limite du nombre d'échantillons présentés par sujet et par séance est difficile à fixer. Elle dépend du type d'essai, de la nature des produits et de leur rémanence. Le nombre de 12 produits (6 dans le cas d'un profil) constitue une bonne indication. Les variations d'une séance à l'autre, concernant les conditions expérimentales (sujets, produits ou contexte) sont à consigner.

5.4. Les tests sensoriels

5.4.1. Tests discriminatifs

Les tests discriminatifs portent sur la différence entre deux échantillons. Les sujets ont au minimum la formation de sujets initiés.

Ces essais se déroulent selon un plan d'expérience équilibré pour annuler les effets d'ordre de présentation et, si nécessaire, les effets de report de premier ordre.

La présentation des produits est simultanée et l'ordre de dégustation est imposé. Les sujets sont libres de goûter à nouveau les échantillons de produits comme ils le souhaitent. Ils doivent impérativement fournir une réponse (situation de choix forcé).

Pour l'ensemble des essais présentés, la démarche conduit d'abord à définir le nombre de sujets nécessaire en fonction des risques statistiques acceptables fixés et, ensuite, à interpréter les données par application de la loi binomiale ou éventuellement du χ^2 .

Différents tests discriminatifs existent (**tableau i.4**) :

- Essai triangulaire : « Examinez les 3 échantillons de gauche à droite. Désignez le numéro de celui que vous trouvez différent. » (NF ISO 4120 : 2004),
- Essai duo-trio : « Examinez les 3 échantillons de gauche à droite : le premier est le témoin, l'un des 2 autres est différent du témoin. Désignez le numéro de celui que vous trouvez différent. » (NF ISO 10399 : 2004),
- Essai 2 sur 5 : « Examinez les 5 échantillons de gauche à droite. Reconstituez les deux groupes d'échantillons en entourant les 3 produits du même type. » (NF V 09-001 : 1983).

5.4.2. Tests de positionnement

Les tests de positionnement sont des essais dont la finalité est soit d'évaluer un écart de perception, soit de classer des produits suivant l'intensité perçue d'une caractéristique. Les sujets ont au minimum la formation de sujets qualifiés. Ils ont reçu une formation homogène relative aux produits et à l'essai. Leurs performances sont contrôlées (répétabilité, sensibilité).

Ces essais se déroulent selon un plan d'expérience équilibré pour annuler les effets d'ordre de présentation et les effets de report de premier ordre. La présentation des produits est simultanée et l'ordre de dégustation est imposé. Les sujets sont libres de goûter à nouveau les échantillons comme ils le souhaitent. Ils ne peuvent pas répondre en classant les produits *ex aequo*.

Différents tests de positionnement existent (**tableau i.4**) :

- Essai de comparaison par paire : « Examinez les 2 échantillons de gauche à droite. De ces 2 échantillons lequel est le plus « ... » ? (sucré, salé...) » (NF ISO 5495 : 2006),

- Essai de classement : « Examinez les échantillons de gauche à droite. Ecrivez les numéros de code par ordre croissant d'intensité pour l'attribut « ... » (sucré, salé...) » (NF ISO 8587 : 2007),
- Essai de notation : cet essai consiste à demander aux sujets d'évaluer des échantillons, en définissant l'intensité d'une caractéristique sur l'échelle proposée (NF ISO 4121 : 2004).

5.4.3. Tests hédoniques

Dans le cas de l'approche hédonique, les consommateurs évaluent le degré de plaisir que leur procure l'aliment. Le plaisir des sujets dépend de plusieurs facteurs et, en particulier, de la perception de l'ensemble des caractéristiques sensorielles des produits. L'évaluation conduit à des résultats de type monodimensionnel (classement des produits selon une propriété sensorielle donnée) sur une échelle de réponse mesurant l'acceptabilité. Il s'agit d'essai de notation hédonique.

Les consommateurs peuvent également exprimer leur(s) préférence(s) entre produits lors d'essais de comparaison de préférence. Elles sont évaluées lors d'essais de comparaison par paire(s) ou lors d'essais de classement (**tableau i.4**). Les préférences intègrent des notions sensorielles complexes. Il est donc rare que les consommateurs s'accordent sur leurs préférences.

5.4.4. Tests descriptifs : le profil sensoriel

Le profilage sensoriel est utilisé afin de décrire et d'évaluer en intensité et en qualité un ensemble de caractéristiques sensorielles perçues sur un ou plusieurs produits. Les sujets ont au minimum la formation de sujets qualifiés. Le recrutement du groupe conduit à la formation d'un minimum de 12 personnes pour garantir l'intégrité d'un groupe final de 10 sujets participant à l'évaluation des produits. Du fait de la complexité des méthodes, le recrutement initial accorde une grande importance à la disponibilité et à la motivation des sujets, ainsi qu'à leurs compétences *a priori* pour ce type d'essai.

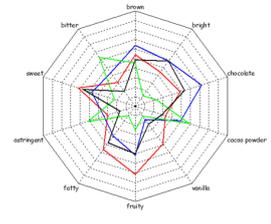
- **Génération des descripteurs**

Le terme descripteur est utilisé pour nommer une saveur qui décrit sensoriellement un produit. Il existe différents modes opératoires pour les générer. La liste des descripteurs peut être proposée aux sujets par l'animateur, elle peut être issue d'études précédentes, de la littérature scientifique, de normes, etc. Cette liste peut aussi être basée sur une liste personnelle générée par chaque sujet. Cependant, la plupart du temps il s'agit d'obtenir une liste de descripteurs générée et définie par l'ensemble des sujets. Pour cela, plusieurs séances de génération de termes sont nécessaires. L'animateur procède ensuite, avec l'accord du groupe, à une réduction de la liste de termes en une liste de descripteurs communs, composée d'environ de 10 à 15 termes. Les termes redondants, à connotation hédonique ou à vocation quantitative sont éliminés lors des discussions.

- **Réalisation du profil sensoriel**

Ces essais se déroulent selon un plan d'expérience équilibré pour annuler les effets d'ordre de présentation et les effets de report de premier ordre. Il sera construit de manière à obtenir au minimum 10 réponses indépendantes par produits. Des produits témoins peuvent être introduits lors de l'évaluation, si l'étude a pour objectifs un positionnement des produits par rapport à un produit de référence ou pour contrôler la stabilité des réponses du groupe de sujets.

Tableau i.4 : Tableau de synthèse des tests sensoriels précédemment présentés (d'après *Evaluation sensorielle - guide de bonnes pratiques*, 1999).

	Question	Type d'essai	Type de réponse
<i>Essais discriminatifs</i> • <i>différence</i> • <i>similitude</i>	Existe-t-il des différences ?	Triangulaire	Les produits sont différents :
	Suivi de production	Duo-trio	OUI NON
<i>Essais de positionnement (sur une seule caractéristique)</i>	Temps de stockage	2 sur 5	Les produits sont identiques :
	Changement de : - matière première, - technologie, - fournisseur...		OUI NON
	Intensité d'une caractéristique ?	Comparaison par paires Classement	Z F T B 
	Concentration d'arôme Intensité d'amertume	Notation	Goût sucré
<i>Essais descriptifs (un ensemble de caractéristiques)</i>	Carte d'identité du produit ?	Profil sensoriel	
<i>Essais hédonique</i> <i>Mesure de plaisir</i>	Quel est le produit préféré ?	Comparaison par paires Classement Notation	

5.5. L'analyse sensorielle en agro-alimentaire

L'analyse sensorielle est utilisée pour évaluer un produit alimentaire tout au long de son itinéraire de production notamment lors de la transformation de la matière première, *via* le stockage ou encore *via* le processus de transformation industrielle. Les travaux de Masi *et al.* (2013) ont concerné la réduction de la présence de composés indésirables dans le café par modification du degré de torréfaction. Cette étude indique qu'une température égale ou supérieure à 160 °C est nécessaire pour obtenir un mélange dans lequel les descripteurs «café» prévalent sur ceux « non-café ». Les résultats suggèrent que l'optimisation de la torréfaction des grains de café pour réduire la formation de composés potentiellement nocifs doit envisager le risque de décevoir les attentes sensorielles des consommateurs. Des travaux sur la truffe noire ont utilisé l'analyse sensorielle pour étudier l'effet de la congélation sur le profil organoleptique (Culleré *et al.*, 2013). Ils ont mis en évidence que l'arôme de truffes congelées diffère sensiblement de l'arôme de truffes fraîches. Le méthional et certains phénols ont été proposés comme des marqueurs de temps de congélation et une 1-octen-3-one comme un marqueur général du processus de congélation. Une étude sur le vin décrit l'effet de l'espèce de chêne et du processus de chauffe pour la fabrication de tonneaux sur le profil sensoriel du vin mûri en fût (Chira & Teissedre, 2014). A partir d'un même vin, le type de bois de chêne et le processus de tonnellerie génèrent des vins avec des caractéristiques différentes. Les vins élevés en fûts de chauffe légère sont perçus moins sucrés, plus amers et plus astringents que les autres. Les vins aux notes épicées et boisées sont caractéristiques des chênes de Slovaquie, à l'inverse des chênes américains qui apportent une note sucrée. Les chênes français de Colbert et de l'Allier caractérisent des vins plus épicés et les chênes provenant du centre de la France plutôt des vins boisés.

L'analyse sensorielle est aussi utilisée pour comprendre les préférences des consommateurs. Une étude menée par Geel *et al.* (2005) a déterminé les caractéristiques d'appréciation des consommateurs sur le marché du café. Ils ont mis en avant que les amateurs de café purs préfèrent les saveurs astringente et amère avec des arômes de torréfié, de noisette et une note corsée alors que les amateurs de mélange de café sont moins attirés par l'intensité de l'arôme café mais plutôt par la douceur, le goût « racine », typique de la chicorée mélangée au café instantané.

Les travaux de Peters & Van Amerongen (1998) utilisent l'analyse sensoriel pour mettre en lien les composés sesquiterpéniques et l'amertume de la chicorée salade. Un test de positionnement, essai de notation, est utilisé pour déterminer l'intensité amère des échantillons de salades, crus et cuits, sur une échelle de 0 à 100. Les teneurs en lactucopicine et en lactucine sont mesurées par un test ELISA. La comparaison des données par régression linéaire démontre que la lactucine et la lactucopicine sont significativement liées à l'amertume des chicorées salades avant et après la cuisson.

6. L'analyse des données par l'outil statistique

6.1. Définition

L'analyse statistique est un ensemble de méthodes permettant de décrire et d'analyser des observations (ou données). Ces observations consistent généralement en la mesure d'une ou plusieurs caractéristiques communes sur un ensemble d'objets équivalents, appelé population. Chaque objet d'une population s'appelle un individu, les caractéristiques que l'on mesure s'appellent des variables et les mesures s'appellent des observations. Il existe différents types de variables :

- des variables quantitatives, ce sont des caractéristiques numériques (taille, âge, etc.) qui s'expriment par des nombres réels sur lesquels les opérations arithmétiques de base (somme, moyenne etc.) ont un sens ; ces nombres peuvent être discrets (nombre fini tel que l'âge) ou continus (toutes les valeurs réelles sont susceptibles d'être prises tel que la taille),
- des variables qualitatives, ce sont des caractéristiques non numériques dans le sens où les opérations de base n'ont pas de sens ; elles peuvent être nominales (sexe, couleur des cheveux, etc.) ou ordinales lorsque l'ensemble des catégories est muni d'un ordre total (très résistant, assez résistant, peu résistant) ; les différents niveaux d'une variable qualitative s'appellent des modalités (ou catégories).

Nous distinguons, les analyses univariées des analyses multivariées. Une technique univariée s'attache à une seule série d'une variable ou à une seule mesure (même s'il y a plusieurs échantillons). Une technique multivariée montre les relations entre plusieurs variables. Pour ces deux types d'analyses, les données sont représentées en tableau où les individus sont représentés en ligne et sont chacun décrits par des variables (**figure i.20**). Cette représentation peut faciliter la lecture de petits tableaux, lorsqu'il y a peu de données. Cependant, dès lors que la taille du tableau est grande, ou lorsque les relations entre plus de deux individus ou plus de deux variables (analyses multivariées) sont recherchées, cette représentation et les techniques simples de la statistique descriptive ne suffisent plus.

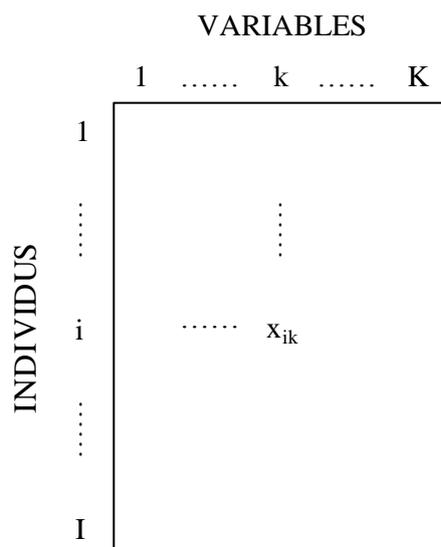


Figure i.20 : Représentation des données sous forme de tableau. Les variables sont représentées en colonnes et les observations en lignes.

Des méthodes permettant la visualisation des données dans le meilleur espace réduit ont été développées pour répondre aux problèmes posés par des tableaux de grandes dimensions. Ces méthodes d'analyse permettent de représenter synthétiquement de vastes ensembles numériques pour faciliter les interprétations. Les représentations font plus souvent appel à des représentations graphiques. Etant donné la difficulté de visualiser des points dans des espaces de dimensions supérieures à deux, les points sont représentés dans des plans. Ces méthodes ne se limitent pas à la représentation des données, elles cherchent les ressemblances entre les individus et les interactions entre les variables. Ces proximités entre individus et variables permettront d'interpréter ces données et de fournir une synthèse des résultats des analyses.

6.2. Exemples d'analyses statistiques

6.2.1. Analyse en composantes principales

L'analyse en composantes principales, nommée ACP, est l'une des analyses factorielles les plus employées. Les données pour l'ACP sont constituées d'observations et de variables qui doivent être quantitatives, continues. Les principales variantes de l'ACP viennent des différences de transformation du tableau de données. Ainsi, le nuage de points peut être centré ou non, réduit ou non. Le cas le plus étudié est lorsque le nuage de points est centré et réduit ; dans ce cas nous parlons d'ACP normée. L'ACP cherche à représenter graphiquement les relations entre individus par l'évaluation de leurs ressemblances, ainsi que les relations entre variables par l'évaluation de leurs liaisons. Deux individus se ressemblent, ou sont proches, s'ils possèdent des valeurs proches pour l'ensemble des

variables. Deux variables sont liées si elles partagent un fort coefficient de corrélation linéaire. L'objectif est donc d'extraire et de synthétiser le maximum d'information illustré sous une représentation graphique selon deux nouvelles variables appelées composantes principales (CP), obtenues par combinaison linéaire des variables d'origine (Abdi & Williams, 2010) (**figure i.21**)

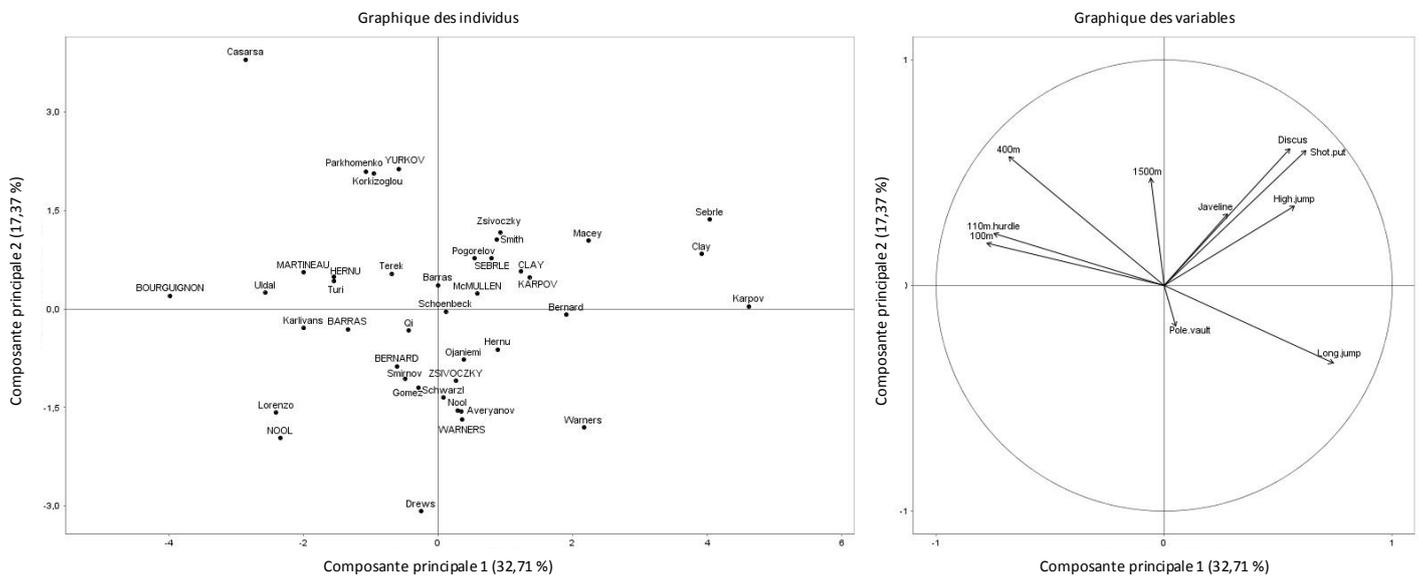


Figure i.21 : Exemple d'analyse en composantes principales effectuée par le logiciel R *via* le package factominer (factominer.free.fr). A gauche le graphique des individus et à droite le graphique des variables.

A partir des relations données, quelques règles peuvent être définies pour l'interprétation :

- un individu sera du côté des variables pour lesquelles il a de fortes valeurs, inversement il sera du côté opposé des variables pour lesquelles il a de faibles valeurs,
- plus la valeur d'une variable est élevée pour un individu, plus cet individu sera éloigné de l'origine suivant l'axe factoriel décrivant le mieux cette variable,
- deux individus à une même extrémité d'un axe (éloignés de l'origine) sont proches (se ressemblent),
- deux variables très corrélées positivement sont du même côté sur un axe,
- il n'est pas possible d'interpréter la position d'un individu par rapport à une seule variable, et réciproquement, il n'est pas possible d'interpréter la position d'une variable par rapport à un seul individu ; les interprétations doivent se faire de manière globale.

L'ACP est une méthode puissante pour synthétiser de vastes populations décrites par plusieurs variables quantitatives. Elle permet entre autre de dégager de grandes catégories d'individus et de réaliser un bilan des corrélations entre les variables. Par cette analyse, nous pouvons mettre en évidence de grandes tendances dans les données telles que des regroupements d'individus ou des

oppositions entre individus ou entre variables. Les représentations graphiques fournies par l'ACP sont simples et riches d'informations. L'ACP peut être une première analyse pour l'étude d'une population dont les résultats seront enrichis par exemple par une classification automatique des données.

L'analyse en coordonnées principales (PCoA) et l'ACP sont assez proches puisque la PCoA permet aussi de représenter des individus dans un espace de faible dimension avec des axes optimaux en termes de variabilité. La PCoA est une méthode dont le but est de représenter les individus pour lesquels on dispose d'une matrice de proximité. C'est pourquoi, la PCoA applique à la matrice des distances euclidiennes entre les individus. Cette distance peut se définir comme la distance en vol d'oiseau entre 2 points.

6.2.2. *Corrélation et régression linéaire*

Le terme de corrélation est utilisé dans le langage courant pour désigner une liaison (association / relation) entre deux variables quelconques. En statistique, les termes corrélation et régression sont réservés pour désigner la liaison entre deux variables quantitatives (le plus souvent continues) (**figure i.22**). A la différence d'une régression, une corrélation peut être symétrique, les deux variables peuvent permuter, elles ne dépendent pas forcément l'une de l'autre. En ce qui concerne la régression, si on prend l'exemple où X est l'âge et Y la taille, quand l'âge augmente la taille augmente et inversement. Ainsi la liaison est asymétrique puisque la taille dépend de l'âge mais pas l'inverse, on ne peut donc pas permuter X et Y.

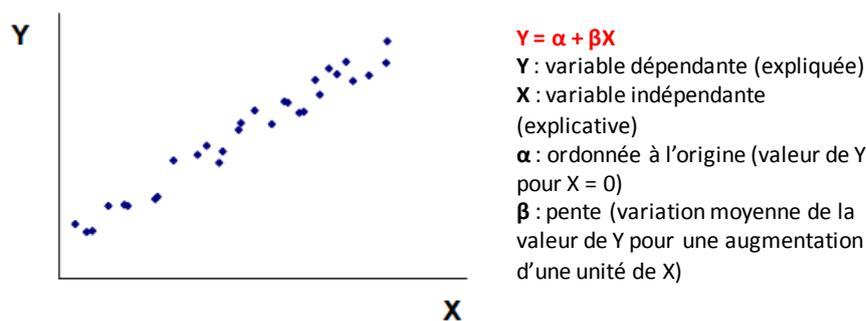


Figure i.22 : Exemple de corrélation ou de régression linéaire.

6.2.3. *Analyse de la variance*

Une comparaison de moyenne sur deux échantillons est possible grâce au test de Student. En revanche, une analyse sur trois échantillons indépendants ou plus nécessite une analyse de la variance nommée ANOVA. L'hypothèse à vérifier (H_0), est que tous les groupes d'échantillon ont la même

moyenne. L'hypothèse alternative est qu'au moins l'un des groupes a une moyenne différente des autres. Le but est en principe d'identifier un facteur de variabilité entre les groupes d'échantillon. L'ANOVA peut être à un facteur, par exemple l'effet du génotype sur les variables (analyse univariée), ou à deux facteurs, par exemple l'effet du génotype et de l'environnement sur les variables (analyse multivariée).

6.2.4. Classification hiérarchique ascendante

La classification hiérarchique ascendante organise les individus, définis par un certain nombre de variables, en les regroupant de façon hiérarchique. Elle commence par agréger les variables représentatives des individus qui sont les plus semblables entre elles, puis les individus ou groupes d'individus un peu moins semblables et ainsi de suite jusqu'au regroupement de l'ensemble des échantillons. Ces agrégations se font deux par deux et les liens hiérarchiques apparaissent sur un dendrogramme (**figure i.23**).

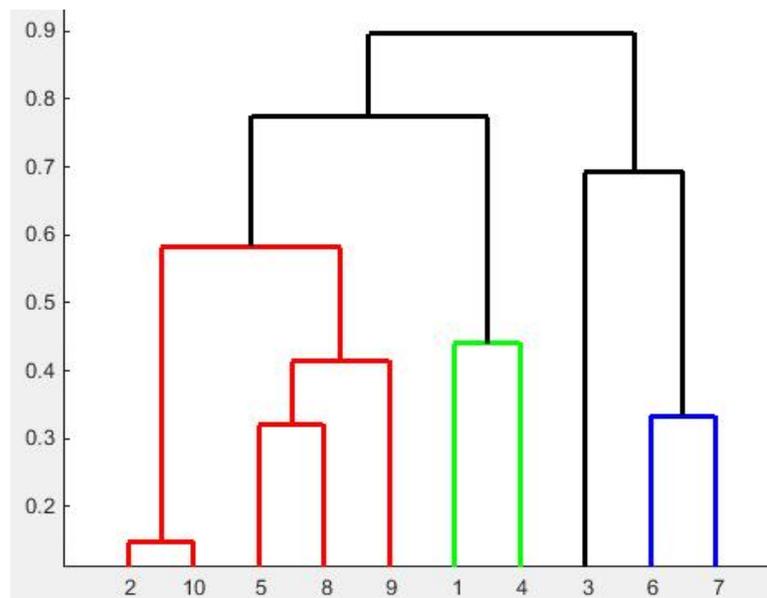


Figure i.23 : Exemple de dendrogramme.

6.3. L'utilisation de l'analyse statistique

Les statistiques peuvent être vues en fonction de l'objectif fixé ; classiquement les méthodes statistiques sont employées soit pour explorer les données, soit pour prédire un comportement. La statistique exploratoire s'appuie sur des techniques descriptives et graphiques. Elle est généralement décrite par la statistique descriptive qui regroupe des méthodes exploratoires simples, uni- ou bidimensionnelle (moyenne, variance etc.) et la statistique exploratoire multidimensionnelle. L'analyse de données s'inscrit dans ce cadre de la statistique exploratoire multidimensionnelle. Elle

fait toujours l'objet de recherche pour s'adapter à tout type de données et faire face à des considérations de traitements en temps réel en dépit de la quantité de données toujours plus importante.

Aujourd'hui, les méthodes d'analyse de données sont employées dans un grand nombre de domaines qu'il est impossible d'énumérer. Actuellement, ces méthodes sont beaucoup utilisées en marketing par exemple pour la gestion de la clientèle (pour proposer de nouvelles offres ciblées par exemple). Elles permettent également l'interprétation de sondages d'opinion. Ces approches ont également été mises à profit en traitement du signal et des images, où elles sont souvent employées comme prétraitement, qui peuvent être vus comme des filtres. C'est le cas de la plateforme workflow4metabolomics pour le traitement de signaux en spectrométrie de masse et en RMN (Giacomoni *et al.*, 2015). Tout domaine scientifique qui doit gérer de grande quantité de données de type variées ont recours à ces approches. Son *et al.* (2009) utilisent les analyses statistiques multivariées pour étudier les différences chimiques de la pulpe, la peau et les semences de raisin ainsi que les vins de différentes régions. Grâce à l'analyse de données issues de la RMN du proton, ils ont pu mettre en évidence un effet environnemental sur les teneurs en sucres, minéraux, acides aminés et acides organiques du cépage mais aussi des vins, qui diffèrent selon le niveau d'ensoleillement des régions de production. Cavaliere *et al.* (2007) utilisent les analyses statistiques afin de détecter l'origine des huiles d'olives. Ainsi l'analyse des données issues de la spectrométrie de masse ont permis de suivre 5 biomarqueurs pour des huiles provenant des régions tunisienne et italienne. Des teneurs différentes permettent de discriminer les origines. Ce profilage est reconnu comme un paramètre fondamental pour l'évaluation de la qualité et comme outil unique pour le contrôle de l'authenticité.

Les analyses statistiques sont également utilisées pour associer des molécules à des propriétés sensorielles. Les travaux de Pattee *et al.* (2000) ont mis en relation les saveurs sucré, amère et l'arôme torréfié avec la composition en sucre de 52 génotypes de cacahuètes grillées. Des corrélations positives ont été mises en évidence entre la composition totale en sucre et la saveur sucrée mais aussi avec l'arôme torréfié. A l'inverse des corrélations négatives ont été établies avec les saveurs amère et astringente. D'autres travaux utilisent les analyses statistiques pour corrélérer la composition chimique aux propriétés sensorielles. C'est le cas des études de Preys *et al.* (2006) sur le vin rouge. Ils ont mis en relation la composition phénolique et les données sensorielles d'un très grand nombre de vins différents, 61 vins français et 60 vins allemands, en utilisant les analyses multivariées. Ainsi, ils soulèvent une potentielle relation entre les flavonols aglycones et l'amertume des vins. Puis, à l'aide d'une régression partielle des moindres carrés ils mettent en évidence une forte corrélation entre la composition phénolique et l'astringence.

DEMARCHES SCIENTIFIQUE & EXPERIMENTALE

Des informations éparses et peu nombreuses sont disponibles sur la composition chimique et sur les propriétés organoleptiques des produits torréfiés de la chicorée. Nous sommes également confrontés au manque de renseignements sur l'évolution de la composition chimique native et des propriétés sensorielles de la racine au cours du processus de transformation et en particulier au cours de la torréfaction. Dans l'optique de mieux comprendre l'effet du procédé de transformation sur le contenu chimique et le lien avec les qualités organoleptiques de la racine, mon travail de thèse a eu pour objectif de caractériser la variabilité des caractères chimiques et sensoriels au sein de génotypes de chicorée industrielle, en portant un éclairage sur les déterminants de l'amertume. La variabilité nécessaire à cette démarche repose initialement sur la diversité génétique du matériel biologique évalué *a priori* en sélection et disponible parmi les semences de bases des constituants des variétés commerciales du moment. Sur cette base, 48 génotypes de chicorée industrielle sont venus constituer la collection qui a été cultivée en champ pour produire le matériel biologique et les produits transformés dérivés. Deux produits dérivés de la racine fraîche de chicorée ont été étudiés : les cossettes séchées et les produits torréfiés à différents degrés. Ainsi, mon travail a consisté à étudier l'évolution de la composition chimique native et des propriétés sensorielles au cours de la torréfaction dans le but de déterminer un ou des métabolites impliqués dans l'amertume de la racine de chicorée torréfiée.

Dans un premier temps, la variabilité de la collection de chicorée a été évaluée à travers des analyses métabolomique et de génotypage. Cette dernière approche a été menée en parallèle de ma thèse par Thierry Cadalen, ingénieur de recherche au sein du laboratoire. A l'aide de méthodes statistiques de la variance et d'analyses multivariées non supervisées, les génotypes ont été groupés et hiérarchisés selon la variabilité existante au niveau alléliques et au niveau de leur métabolome soluble (non-volatils). Les résultats de la classification des données chimique et de génotypage ont conduit à sélectionner un ensemble plus restreint de génotypes constituant notre collection de référence. A partir de cette sélection, le profilage chimique ciblé et non ciblé a été mené sur les équivalents séchés et torréfiés, obtenus en pilote de transformation, afin de mettre en évidence un effet du processus de torréfaction. Cette première étape passe par la mise au point de protocoles d'extraction et l'utilisation de méthodes d'analyse faisant appel à la chromatographie liquide haute performance couplée à la détection dans l'UV, à la spectrométrie de masse et à la spectrométrie par résonance magnétique nucléaire du proton.

Dans un second temps, à partir de la collection de référence, le profilage chimique ciblé et non ciblé a, cette fois, été mené sur les équivalents torréfiés à différents degrés de torréfaction et dont le profil sensoriel a été déterminé par un panel entraîné de testeurs. A l'aide d'une démarche statistique,

des associations significatives entre signaux spécifiques issus des empreintes chimiques et le degré d'amertume ont été recherchées dans le but d'identifier des marqueurs responsables de la saveur amère des produits torréfiés de la chicorée.

CHAPITRE 1 :

**Implication des acides chlorogéniques et des lactones
sesquiterpéniques dans l'amertume de la racine de
chicorée et des produits torréfiés**

INTRODUCTION

Les lactones sesquiterpéniques et les acides chlorogéniques sont des métabolites secondaires solubles majoritairement accumulés chez les Astéracées, notamment chez la chicorée (Rees & Harborne, 1985). La diversité de leur structure chimique permet à ces molécules d'intervenir dans différents processus physiologiques mis en œuvre par les plantes, comme l'attraction des pollinisateurs (Hagler & Buchmann, 1993), la répulsion des herbivores (Arimura et al., 2008) ou encore la protection contre les pathogènes (Niggeweg et al., 2004).

En plus de leurs rôles avérés dans la plante, les métabolites secondaires présents dans la racine de chicorée peuvent conférer de par leurs propriétés biologiques une valeur ajoutée aux produits alimentaires qui en sont dérivés. Les LST et les ACG sont en effet connus pour leurs actions anti-inflammatoires (Cavin et al., 2005), analgésiques (Wesołowska et al., 2006) ou encore neuroprotectrices (M.-Y. Kim, Iwai, & Matsue, 2005). Le 3,5-di-*O*-caféoylquinique, un des acides chlorogéniques de la plante, est en l'occurrence responsable de près de 70% de l'activité antioxydante de la chicorée (Fraise et al., 2011). Outre des effets bénéfiques potentiels pour la santé humaine, ces métabolites secondaires entrent en jeu dans les propriétés organoleptiques de la chicorée. En effet, celle-ci est connue pour son goût amer plus ou moins apprécié, essentiellement dû aux LST plus principalement à la lactucine et la lactucopicrine (Price et al., 1990; Van Beek et al., 1990).

Jusqu'à présent, aucune méthode permettant le phénotypage des métabolites secondaires majeurs impliqués dans les qualités alimentaires de la racine de chicorée et de l'ensemble des produits issus de cette plante n'a été entreprise. Le but de l'étude énoncée dans la publication (Willeman *et al.*, 2014) est de développer et de valider d'une méthode, incluant l'extraction et l'analyse, pour la détermination simultanée des LST et des ACG libres de la racine de *Cichorium intybus* var. *sativum* et de ses dérivés alimentaires. Dans nos travaux, différents solvants ou combinaisons de solvants sont testés pour extraire des nombreuses matrices ces métabolites secondaires majeurs. Une méthode analytique quantitative est également mis au point par HPLC conventionnelle couplée à un détecteur à barrette de diodes et basée sur l'emploi d'une colonne polaire en phase inverse Kinetex PFP™ permettant une séparation rapide et résolutive des composés ciblés. Par ailleurs, l'authentification des LST de la racine de chicorée a été réalisée, pour la première fois, par UPLC-HRMS en établissant les paramètres de détection et en validant une méthode de quantification par l'intermédiaire des transitions de masses.

Prises ensemble, les propriétés nutritionnelles et organoleptiques sont des facteurs importants d'appréciation et de consommation du produit. Jusqu'à présent, aucune étude complète de l'amertume dans les produits alimentaires torréfiés de la racine de chicorée n'a été effectuée. Dans la deuxième

partie du chapitre, l'amertume et la composition en LST et en ACG de la racine de 5 variétés de chicorée industrielle et des produits torréfiés correspondants ont été évaluées. Les données de l'analyse sensorielle couplées à celles du profilage chimique font l'objet d'une démarche statistique afin de révéler l'existence d'une relation entre l'amertume et les composés ciblés. Ces résultats feront l'objet d'une prochaine publication.

Note : dans ce chapitre, l'acide chlorogénique est noté 5-CQA selon la nomenclature du système IUPAC (IUPAC, 1976 ; Jaiswal *et al.*, 2011).

Research Article

A Method for the Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Sesquiterpene Lactone Content in Industrial Chicory Root Foodstuffs

Honorine Willeman,¹ Philippe Hance,¹ Anne Fertin,² Najia Voedts,¹ Nathalie Duhal,³ Jean-François Goossens,³ and Jean-Louis Hilbert¹

¹UMR 1281, Stress Abiotiques et Différenciation des Végétaux Cultivés, GIS GENOCHIC, INRA, IFRI47, Université Lille 1 Sciences et Technologies, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

²IUT A, Département Génie Biologique, Université Lille 1 Sciences et Technologies, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

³Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Centre Universitaire de Mesures et d'Analyses (CUMA), Université Lille 2, BP 83, 3 rue du Pr. Laguesse, 59006 Lille Cedex, France

Correspondence should be addressed to Jean-Louis Hilbert; jean-louis.hilbert@univ-lille1.fr

Received 16 July 2014; Accepted 3 October 2014; Published 4 December 2014

Academic Editor: Thomas Efferth

Copyright © 2014 Honorine Willeman et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

A method for the simultaneous determination of free chlorogenic acids (CGA) and sesquiterpene lactones (STL) in chicory root and its dried (flour) and roasted (grain) forms is described. The method uses one extraction and one analysis for all chicory root products. Various solvents with low to high polarity, such as methanol, chloroform, or *n*-hexane, were tested alone, in combination in different proportions or with acidified or neutral aqueous solvent. The water/chloroform/methanol (30/30/40, v/v/v) mixture generated the best extraction yield, 21% higher than alcohol mixtures. The profiling of CGA and STL content was performed through a conventional HPLC-DAD method using a PFP core shell column in a fast single run. Good retention time and area repeatability (RDD mean % 0.46 and 5.6, resp.) and linearity ($R^2 \geq 0.96$) were obtained. The STL and chlorogenic acids levels determined were 254.7 and 100.2 $\mu\text{g/g}$ of dry matter in the root, 792.5 and 1,547 $\mu\text{g/g}$ in flour, and 160.4 and 822.5 $\mu\text{g/g}$ in the roasted grains, respectively. With an average recovery of 106% and precision of 90%, this method is rapid, reproducible, and straightforward way to quantify the chlorogenic acids and STL in chicory raw material and end products.

1. Introduction

Sesquiterpene lactones (STL) and chlorogenic acids (CGA) are soluble secondary main metabolites that accumulate in *Asteraceae*, especially in chicory [1]. The diversity of the chemical structure of these compounds allows these molecules to be involved in various physiological processes used by plants, such as the attraction of pollinators [2], the repulsion of herbivores [3], and protection against pathogens [4].

Many cultivated types of chicory (*Cichorium intybus* L.) exist, such as those used in salads, forage, and, in particular, industrial chicory utilized for the production of roots as raw material. Industrial chicory (*Cichorium intybus* var. *sativum*)

has economic importance in many agricultural regions in the world as a source of inulin or food [5]. In northern France, chicory root is grown especially for use as dried or roasted products and beverage. Once harvested, the root is sliced and dried to produce an intermediate raw material called green slices. The slices are either ground to obtain flour or roasted and then crushed into grains. The grains can be marketed directly or extracted with hot water to obtain a concentrated liquid or, after spray-drying, soluble powders. Chicory flour can be used as bread-improving ingredient, and when roasted, chicory is used to enhance the aroma, color, or flavor of food. Thus, chicory root is consumed in different forms of derivative products in the human diet.

In addition to their known roles in plants, secondary metabolites present in chicory root may add value to food products via their biological properties. STL and CGA are known for their anti-inflammatory [6], analgesic [7], and neuroprotective actions [8]. 3,5-Di-*O*-caffeoylquinic acid, a chlorogenic acid, is responsible for nearly 70% of the antioxidant activity of chicory [9]. In addition to their potential beneficial effects on human health, these secondary metabolites play a role in the organoleptic properties of chicory. Indeed, chicory root is known for its bitter taste, which is essentially due to STL, mainly lactucin (Lc) and lactucopicrin (Lp) [10, 11].

Taken together, these nutritional and organoleptic properties are important factors for the appreciation and consumption of chicory products. The contents of STL and CGA represent a quality parameter of the raw material. Characterizing these compounds is part of a broader framework of varietal improvement and process optimization programs designed to improve the end product quality. However, these approaches are constrained by the requirement for the often tedious extraction of several thousand samples, routine analysis, and multiple assays to ensure the detection of these molecular families in various matrices.

The composition and distribution of STL and CGA have been extensively studied in leaf products of chicory crops such as salads, chicon, and forage [12–14]. However, despite studies of these compounds in fresh or roasted roots [11, 15, 16], the contents of both free STL and CGA in industrial chicory root and its derivative foods have not been determined.

Extraction modalities differ from one group of molecules to another and depend on the plant material from which the molecules are extracted. From the leaf of *Cichorium intybus* L. var. *sylvestre*, Mulinacci et al. [17] extracted CGA using water and fractionation by many solvents (ethanol, *n*-hexane, chloroform, and ethyl acetate). Price et al. [10] used methanol and chloroform to extract STL from the leaf of *Cichorium intybus* L. var. *foliosum* and var. *sylvestre*. Van Beek et al. [11] used ethyl acetate, methanol, chloroform, ethanol, and acetone sequentially to extract STL from the root of *Cichorium intybus*. More recently, the extraction of STL and CGA from “Catalogna and Head Radicchio” chicory leaves using a unique mixture of solvents was proposed [18] with separate analyses for the STL and CGA by high-performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD).

Until now, no method for determining the major secondary metabolites involved in the qualities of the chicory root and processed products from this plant has been described. The purpose of this study was the development and validation of a method for the simultaneous determination of free STL and CGA from the root of *Cichorium intybus* var. *sativum* and its food products, including extraction and analysis. In our work, we tested different solvents and combinations of solvents to extract these major secondary metabolites from several matrices. We also developed a quantitative analytic method on conventional HPLC-DAD and a polar reverse-phase column Kinetex PFP for the rapid and self-limiting separation of target compounds. Compounds were

authenticated by ultraperformance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometer (UPLC-HRMS).

2. Methods

2.1. Biological Materials. Three major transformation products of industrial chicory were analyzed. The root was obtained from an agronomic trial, located in Coutiches, France, conducted in 2011 by the company Florimond-Desprez Veuve et Fils SAS (Capelle-en-Pévèle, France). Flour and roasted grains were obtained from the company Leroux SAS (Orchies, France).

The samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . For the experiments, the samples were freeze-dried (48 h) and ground (ball mill, Retsch, Eragny sur Oise, France) using 50 mL wells and 25 mm balls to obtain a fine powder. These samples were stored at -80°C .

2.2. Analytical Reagents and Chemicals. The solvents (methanol (MeOH), ethanol (EtOH), chloroform (CHCl_3), dichloromethane (CH_2Cl_2), acetonitrile (ACN), acetone (Ac), ethyl acetate (EtOAc), and *n*-hexane (*n*-hex)), acetic acid (AAC), formic acid (FA), and *ortho*-phosphoric acid used for the extraction and chemical analysis were all HPLC grade and were obtained from the Dislab company (Lens, France). All of these solvents and acids were stored at 4°C . The standards used for the HPLC analysis were 5-mono-*O*-caffeoylquinic acid (5-CQA) and 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid (3,5-diCQA) and were provided by Biopurify (Chengdu, China). 11(S),13-Dihydrolactucin (DHLc), lactucin (Lc), 11(S),13-dihydrolactucopicrin (DHLp), and lactucopicrin (Lp) were provided by Extrasynthèse (Genay, France); 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin (DHdLc) and 8-deoxylactucin (dLc) were extracted, purified in the laboratory from industrial chicory root, and authenticated by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) and ^{13}C NMR [19] (Figure 1).

2.3. Extraction of CGA and STL. Several extraction methods have been tested using different solvents and combinations to extract CGA and STL simultaneously, including methanol 100% (MeOH); ethanol 100% (EtOH); acetone 100% (Ac); ethyl acetate 100% (EtOAc); *n*-hexane 100% (*n*-hex); chloroform 100% (CHCl_3); dichloromethane 100% (CH_2Cl_2); 25/75, 50/50, and 75/25 mixtures (v/v) of water/methanol ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$), water/chloroform ($\text{H}_2\text{O}/\text{CHCl}_3$), and water/ethanol ($\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$); 75/24/1, 75/23/2, 75/22/3, and 75/21/4 mixtures (v/v/v) of methanol/water/acetic acid ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{AAC}$) and methanol/water/formic acid ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{FA}$); and 40/40/20, 30/30/40, 25/25/50, and 20/20/60 mixtures (v/v/v) of water/chloroform/methanol ($\text{H}_2\text{O}/\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$). These extractions were carried out by maceration; 100 mg powder was extracted with 1.5 mL of solvent (1/15 ratio, w/v). For the extraction modalities with water/chloroform and water/chloroform/methanol, the solvents were added one at a time. The tubes were agitated for 17 h (o/n) in the dark at room temperature. The tubes were then centrifuged (12,000 r.p.m. at 4°C for 8 min), and the supernatants were filtered in 96-well

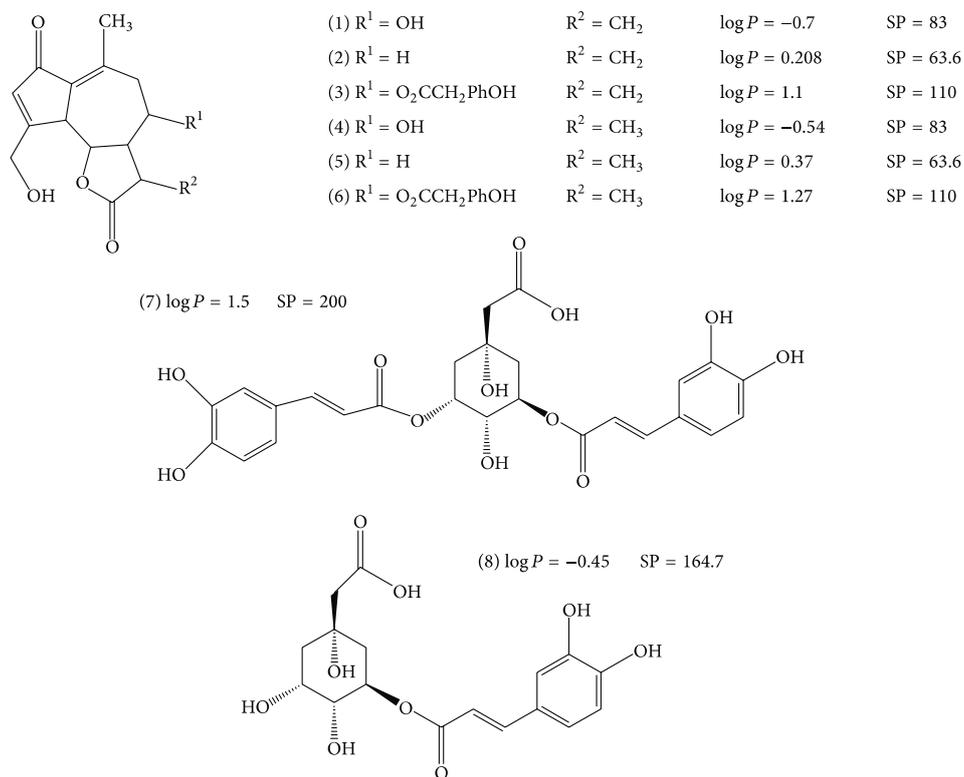


FIGURE 1: Structure, $\log P$ values, and surface polarity (SP) of the six sesquiterpene lactones: lactucin (1), 8-deoxylactucin (2), lactucopicrin (3), 11(S),13-dihydrolactucin (4), 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin (5), 11(S), 13-dihydrolactucopicrin (6), and two chlorogenic acids: 3,5-di-O-caffeoylquinic acid (7) and 5-mono-O-caffeoylquinic acid (8) identified in chicory roots products.

microplates (Pall GHP 0.45 μm , VWR, Fontenay-sous-Bois, France) and then analyzed by HPLC-DAD. Each extraction method was repeated three times. The $\text{H}_2\text{O}/\text{CHCl}_3$ and $\text{H}_2\text{O}/\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ systems were immiscible, but adding 500 μL of MeOH allowed for the phases mixing.

2.4. HPLC-DAD Quantification. A Prominence HPLC system (Shimadzu, Marne la Vallée, France) consisting of a quaternary pump (LC-20AD) and a UV-visible diode array detector (SPD-20A) was used to detect CGA and STL at 320 and 254 nm, respectively. A Kinetex PFP column (100 \times 4.6 mm, 2.6 μm) (Phenomenex, Le Pecq, France) was used for compound separation. The separation method lasted 16.5 min. The elution was performed in gradient mode using three different solvents—water (solvent A), MeOH (solvent B), and ACN (solvent C)—all acidified with 0.1% *ortho*-phosphoric acid. Solvent B gradient rose from an initial 7.5–17.5% at 1 min, 32.5% at 5 min, and 80% at 8 min, returning to 7.5% at 9 min until the end of the run; solvent C was kept at 12% throughout. The oven temperature was 45°C, and the flow rate was 1.1 mL/min. The amount of sample injected was 5 μL .

The quantification was performed by external calibration using standards (5-CQA, 3,5-diCQA, DHLc, Lc, DHdLc, dLc DHLp, Lp.), each repeated five times. The respective

calibration curves were constructed by linear regression plotting signal area versus compound concentration. The analytic precision was measured within and between days. Each extract was analyzed three times consecutively and three times on three different days.

2.5. UPLC-High Resolution MS Analysis/Authentication. Chromatographic separation was performed on an Accela UPLC system (Thermo Scientific) equipped with a Kinetex PFP column (100 \times 4.6 mm, particle size 2.6 μm ; Phenomenex). The elution was performed with the same HPLC-DAD gradient mode as described previously using water (solvent A), MeOH (solvent B), and ACN (solvent C), all acidified with 0.1% formic acid. The LC flow rate was 1 mL/min; the injection volume was 5 μL . The column oven temperature was 45°C and the sample tray temperature 4°C.

Eluted compounds were detected in negative mode in full mass scan (m/z 120 to 900) using a Thermo Scientific Orbitrap Mass Spectrometer Q Exactive equipped with a heated electrospray ionization source (HESI-II). Instrument parameters were as follows: sheath gas 60, auxiliary gas 20 (both arbitrary units), spray voltage 4 kV, capillary temperature 275°C, capillary voltage –60 V, tube lens voltage –135 V, skimmer voltage –20 V, and source temperature 300°C.

Mass spectra were recorded at a resolution of 50,000 with an automatic gain control (AGC) target of 500,000 and a maximum injection time of 500 ms.

2.6. Validation Method

2.6.1. Linearity, Limit of Detection (LOD), and Limit of Quantification (LOQ). Linearity was studied for each molecule. Using a series of seven dilutions, the standard concentrations ranged from 3.3 to 70,000 ng/mL, and each was repeated five times.

The LOD and LOQ were determined for each molecule. All dilutions were analyzed by HPLC-DAD to determine the average concentration (μ) corresponding to the loss of signal detection and quantification (blank sample) for each of the three products. The LOD was defined by $\mu + 3\sigma$ and LOQ by $\mu + 10\sigma$, where σ represents the standard deviation of the blank.

2.6.2. Precision and Specificity. Repeatability was evaluated for each product by six successive repetitions of the extraction method. Reproducibility was calculated for each product by three successive repetitions performed on different days. The coefficient of variation (% respective standard deviations (RSD)) served as a measure of precision.

The specificity of the extraction method was evaluated by varying the proportions of solvents $H_2O/CHCl_3/MeOH$ plus and minus 4% compared to the optimal method.

2.6.3. Extractability and Recovery Rate Matrix Effect. The root, flour, and roasted grains were extracted using the optimum conditions according to the extraction method (see Section 2.3). Once all the supernatant was recovered, the pellet was reextracted under the conditions described above. Three repetitions were performed on each product. The extraction efficiency was the rate of extractable compounds (without reextraction) under the optimal modality and was measured as the ratio between the contents obtained during the first extraction ($E1$) and all contents (first extraction ($E1$) + reextraction 17 h ($E2$)). The extraction rate (ER) is expressed as

$$ER = \left(\frac{E1}{E1 + E2} \right) \times 100. \quad (1)$$

The recovery rate was calculated by adding 0.075, 0.15, or 0.3 mM of 5-CQA; 0.0075, 0.03, or 0.075 mM of 3,5-diCQA; or 0.007, 0.014, or 0.045 mM of DHLc to the flour. Three replicates are performed by employing the optimum extraction modality. The recovery rate (RR) is the ratio between the measured content (MC) and the theoretical content (TC):

$$RR = \left(\frac{MC}{TC} \right) \times 100. \quad (2)$$

The effect of the extraction mixture on possible conversions of the chemical structures of the target compounds was evaluated by observing the variation in their content by HPLC-DAD analysis. Three representative target compounds

(5-CQA, 3,5-diCQA, and DHLc) were directly added individually in three different concentrations to the solvent mixture, in a chicory or "no-chicory matrix" (flour wheat). The extraction procedure was completed as described. The overlapping of chromatographic signals corresponding to the addition of the molecules was evaluated. No matrix effect was obtained when no interfering peak was present and when the linearity of the response was observed.

2.7. Statistics and Calculation. All extractions and analyses were performed in triplicate, except for linearity, which was repeated five times. Data are expressed as the means of individual repeats with the RSD of each extraction condition. Statistical analysis was performed using R 2.15.1 for Windows [20] and used to examine between-extract variation. When the Bartlett test was significant for homogeneity of variance, the extraction effect on metabolite levels was estimated by a one-way ANOVA, and mean separations were evaluated by pairwise comparison using Student's t -test. Log P values (predicted lipophilicity) were calculated from online cheminformatics services provided by the Molinspiration Property Calculation Service (2013) [21].

3. Results and Discussion

3.1. Method Development. Several methods for extracting STL or CGA from the leaves of *Cichorium intybus* L. var. Catalogna and var. Rosso di Chioggia [18], var. *sylvestre* [17], and *Cichorium endivia* var. *crispa* [22] have been described. However, no method for the determination of STL and CGA exists for industrial chicory root and its derivatives. In our work, these compounds were determined in different products of chicory from a single extraction and analysis. The relative contents obtained from the extraction were evaluated by HPLC-DAD.

The first screen was performed using pure solvents that cover a wide range of polarity, including MeOH, EtOH, Ac, EtOAc, n -hex, $CHCl_3$, or CH_2Cl_2 . Only the contents obtained from a selection of solvents (maximum extraction without excluding any metabolites) are shown in Table 1. Thus, the extraction efficiency of MeOH compared to EtOH or $CHCl_3$ was, on average, 4.5 times higher for all products. In general, in terms of the quantity of STL and CGA extracted, methanol is more effective (P value < 0.05) than the less polar solvents such as chloroform [23] and ethanol [24]. The other tested solvents, including acetone, ethyl acetate, n -hexane, and dichloromethane, delivered extraction yields up to 7 times lower than MeOH. These data are confirmed by the work of Ferioli and D'Antuono [18], which demonstrated that the extraction of chicory salad with MeOH yields at least twice the STL of extraction with EtOH, acetone, or ethyl acetate. Although molecules are mainly extracted with chloroform, ethanol, and methanol, the content increases with solvent polarity. The solubility of STL and CGA, such as Lc or 5-CQA, in the alcoholic solvents may be due to the high surface polarity notably induced by hydroxyl, carbonyl, and γ -lactone moieties. However, the presence of methyl, methylene, and phenyl groups provides a lipophilic character

TABLE I: Contents of CGA (5-CQA, 3,5-diCQA) and STL (DHLC, Lc, DHdLc, dLc, DHLp, Lp) in the root, flour, and roasted grains extracted by different solvents and solvent mixtures.

Solvents/solvent mixtures ^a	Metabolites ^b -µg/g of dry matter ± SD						TOTAL	P value	
	5-CQA	3,5-diCQA	DHLC	Lc	DHdLc	dLc			
Root									
MeOH	52.5 ± 15.8 ^{bc}	41.3 ± 12.9 ^{ab}	26.7 ± 8.5 ^b	52.8 ± 15.7 ^{bc}	37.9 ± 3.7 ^{ab}	3.6 ± 0.2 ^c	3.8 ± 1 ^{cd}	255 ± 56.1	2.30E - 02
EtOH	4.3 ± 0.7 ^d	9.7 ± 2.2 ^c	3.8 ± 0.5 ^c	8.9 ± 1 ^d	8.4 ± 1.3 ^d	0.9 ± 0.05 ^d	2.2 ± 0.1 ^c	51.3 ± 6.8	—
CHCl ₃	3.6 ± 0.3 ^d	1.9 ± 0.4 ^d	4.8 ± 0.4 ^c	8.6 ± 0.5 ^d	4.7 ± 0.2 ^c	1 ± 0.07 ^c	1.4 ± 0.2 ^d	35.8 ± 0.8	5.83E - 02
H ₂ O/MeOH	66.2 ± 0.9 ^c	37.4 ± 0.7 ^b	48.7 ± 2.4 ^a	88.6 ± 3.2 ^{ab}	39.4 ± 0.3 ^b	5.6 ± 0.06 ^a	20.9 ± 0.6 ^a	345.1 ± 6.5	7.14E - 07
MeOH/H ₂ O/AAC	73.5 ± 1 ^b	50.4 ± 0.8 ^a	42.5 ± 1.5 ^b	77.7 ± 2.8 ^c	42.4 ± 1.2 ^a	4.5 ± 0.4 ^b	6.1 ± 0.4 ^b	341.8 ± 7.8	1.29E - 06
H ₂ O/CHCl ₃ /MeOH	91.9 ± 5.7 ^a	8.3 ± 0.7 ^c	53.3 ± 3.3 ^a	97.4 ± 5.5 ^a	24.3 ± 0.3 ^c	6.8 ± 1.3 ^{ab}	18.9 ± 1.2 ^a	354.9 ± 15.3	1.30E - 04
Flour									
MeOH	239.7 ± 29.3 ^c	131.9 ± 19.2 ^c	56.1 ± 5.3 ^d	58.7 ± 10.9 ^d	115.8 ± 17.4 ^c	5 ± 0.7 ^c	10.8 ± 0.9 ^b	666 ± 91.2	1.13E - 02
EtOH	35.8 ± 3.2 ^e	46.8 ± 3.9 ^d	15 ± 2.1 ^f	46.3 ± 6.4 ^d	59.4 ± 6.9 ^d	3.6 ± 1 ^c	7.8 ± 1.4 ^c	273.2 ± 30.7	—
CHCl ₃	107.7 ± 11.6 ^d	58 ± 2.5 ^d	30.3 ± 1.5 ^e	39.5 ± 1.5 ^d	64.4 ± 2.9 ^d	3.7 ± 0.1 ^c	7.5 ± 0.08 ^c	349.9 ± 18.1	2.63E - 02
H ₂ O/MeOH	590.9 ± 21.3 ^b	281.4 ± 16.3 ^b	117.7 ± 3.5 ^b	125.1 ± 4 ^b	240.5 ± 8.6 ^b	19.4 ± 1.4 ^b	22.8 ± 2.2 ^a	1,485.2 ± 64.5	7.44E - 05
MeOH/H ₂ O/AAC	557.6 ± 17.9 ^b	300.2 ± 11.9 ^b	104.3 ± 1.1 ^c	103.8 ± 5.3 ^c	235.8 ± 11.6 ^b	29.3 ± 1.5 ^a	19 ± 1.1 ^a	1,433.6 ± 54.4	2.86E - 05
H ₂ O/CHCl ₃ /MeOH	810.7 ± 24.8 ^a	410.6 ± 38.3 ^a	147.8 ± 7.3 ^a	150 ± 1 ^a	318.8 ± 29.7 ^a	38.3 ± 6.5 ^a	27.2 ± 3.8 ^a	2,013.8 ± 123.2	7.57E - 04
Roasted grain									
MeOH	345.4 ± 38.7 ^c	79.4 ± 8.4 ^c	3.1 ± 1.1 ^a	32.3 ± 3.4 ^a	43.9 ± 4.3 ^c	5.2 ± 3.3 ^b	4.4 ± 0.9 ^a	535.7 ± 61.5	3.51E - 03
EtOH	56.5 ± 4.5 ^d	20.2 ± 3.4 ^d	0.3 ± 0.1 ^b	14.4 ± 1.7 ^d	16.1 ± 3.3 ^d	nd	0.5 ± 0.7 ^{cd}	120.5 ± 14.6	—
CHCl ₃	37.5 ± 14.7 ^d	16.9 ± 1.3 ^d	0.3 ± 0.3 ^b	13.1 ± 1.8 ^d	12.9 ± 0.8 ^d	nd	2.3 ± 0.2 ^b	94.6 ± 20.4	9.73E - 02
H ₂ O/MeOH	564 ± 28.3 ^a	143.4 ± 9.1 ^a	nd	22.1 ± 3.6 ^{bc}	64.2 ± 3.5 ^{ab}	nd	nd	820.4 ± 48.7	2.44E - 04
MeOH/H ₂ O/AAC	375.4 ± 8.1 ^c	92.6 ± 9.1 ^c	nd	16.5 ± 1.6 ^{cd}	61.7 ± 8.4 ^b	nd	1 ± 0.07 ^d	565.4 ± 28.1	1.87E - 05
H ₂ O/CHCl ₃ /MeOH	499.6 ± 22.8 ^b	119.2 ± 10.4 ^b	1.3 ± 2.3 ^{ab}	22.9 ± 0.1 ^b	92.8 ± 7.9 ^a	16.4 ± 5.4 ^a	1.3 ± 0.09 ^c	779.2 ± 51.9	6.96E - 06

Different letters in the same column within the same product indicate significant differences ($P < 0.05$).

P value: calculated by comparison to the results obtained with ethanol extraction.

^aMeOH: methanol 100%; EtOH: ethanol 100%; CHCl₃: chloroform 100%; H₂O/MeOH: water/methanol 25/75 (v/v); MeOH/H₂O/AAC: methanol/water/ acetic acid 75/24/1 (v/v/v); H₂O/CHCl₃/MeOH: water/chloroform/methanol 30/30/40 (v/v/v/v).

^b5-CQA: 5-mono-O-caffeoylquinic acid; 3,5-diCQA: 3,5-di-O-caffeoylquinic acid; DHLC: II(S),13-dihydro-8-deoxy-lactucin; Lc: lactucin; DHdLc: II(S),13-dihydro-8-deoxy-lactucin; dLc: 8-deoxylactucin; DHLp: II(S),13-dihydro-8-deoxy-lactucin; Lp: lactucopicrin.

SD: standard deviations obtained by three repetitions.

nd: not detected.

to the compounds that can explain their extractability in less polar solvents, such as chloroform. As observed with DHLp and Lp, their greater solubility in chloroform and in nonaqueous solvents, such as hexane or dichloromethane (data not shown), might be related to their higher lipophilicity shown by the calculated $\log P$ values of 1.27 and 1.1, respectively (Figure 1).

Extractability was increased by expanding the polarity range with the addition of water (25, 50, or 75%) to three selected solvents. The aqueous alcohol system $H_2O/MeOH$ (25/75, v/v) was more effective in extracting compounds with a low affinity for alcohol. Indeed, the addition of water increased the extraction efficiency of MeOH by 1.4, 1.5, and 2.2 times for the root, roasted grains, and flour, respectively (Table 1). The water simultaneously reduced the dehydrating effect of MeOH and promoted its diffusion in the matrix, allowing a better penetration of the solvent mixture and an increased extraction of STL. These actions help to solubilize all target compounds more extensively. However, the effect was limited and resulted in a loss of performance when the percentages of water reached 50 and 75%. Indeed, according to Elliott et al. [25], the swelling of the membranes favors the penetration of alcohol and is optimal when the proportion of water in the aqueous alcohol mixture is 25%. These results are confirmed by Song et al. [24], who found that a porous membrane is favored by a high concentration of alcohol. Under the same conditions, the water was tested in combination with $CHCl_3$ or EtOH. As in the case of MeOH, the best extraction rates were achieved with 25% water. Whereas a mixture of water and ethanol did not improve the extraction efficiency of the $H_2O/MeOH$ system (25/75, v/v), adding water to $CHCl_3$ increased the extraction rate of the roasted product and root by 2- and 3-fold, respectively. Chloroform, which is less polar than water, carries more amphiphilic-like and fewer polar compounds. According to Burianek and Yousef [26], the interface between these two solvents, which results from their immiscibility, forms a suitable environment to concentrate these molecules. Moreover, during maceration, agitation optimizes not only the transfer of matrix molecules to water but also water to this interface. Therefore, the molecules' affinity for less polar phases promotes their extraction in chloroform. To increase the extraction polarity, optimization was conducted using an $H_2O/MeOH$ combination (25/75, v/v), which we denote as $H_2O/MeOH$.

Organic acids are known to penetrate and destabilize agent membranes [27]. As such, acetic acid (AAC) and formic acid (FA) were tested in addition to the methanol mixture to maximize extraction. The $MeOH/H_2O/AAC$ system (75/24/1, v/v/v) conferred the same extraction yields for the root and flour but up to 1.5 times lower than the $H_2O/MeOH$ system for the roasted grains (Table 1). The final proportion of acid in the mixture (2, 3, or 4%) or the use of formic acid instead of acetic acid did not cause a significant difference in the extraction yields of flour (P value = 0.06) and roasted grains (P value = 0.14). Furthermore, the superposition and similarity of the absorption spectra of target signals indicated no difference between an acidified extraction and a nonacidified extraction (data not shown).

The extraction method was optimized by combining water with chloroform and methanol in different proportions. The presence of chloroform in the mixture increased the extraction yield of the flour by 35% compared to $H_2O/MeOH$ (Table 1). Chloroform, a solvent of intermediate polarity, leads to the generation of twice as many amphiphilic-like molecules as $H_2O/MeOH$, similarly to dLc and 3,5-diCQA. The presence of methanol in the water and the interface between chloroform and the aqueous phase would extend the polarity of the mixture, facilitating the extraction of polar and less polar compounds. These compounds were then recovered together by removing the interface through the addition of methanol, allowing their simultaneous analysis.

3.2. Authentication. Main secondary metabolites of the chicory are authenticated in chicory products by UPLC-HRMS. Table 2 shows authentication characteristics of STL and CGA in flour. Theoretical exact mass (M) was calculated from the formula at which one proton is subtracted ($M-H^+$) for negative mode analysis. Each molecular ion ($M-H^+$) was extracted from the MS-TIC (Total Ionic Current).

Exact mass (M_c), elementary formula, ring double bond (RDB), and precision (ppm) are calculated for each analyte. All elementary formula propositions with precision more than 7 ppm are rejected. For flour, the lowest ppm is 4.156 ± 0.260 for 3,5-diCQA and the highest is 6.658 ± 0.160 for DHLp, with an average of 5.866. When exact mass with exactly elementary formula and low ppm have the same RDB theoretical, we can authenticate the molecule. Each exact mass (M_c) is associated with a retention time (RT) and elution order is the same as for the HPLC-DAD analysis.

All metabolites are authenticated in flour (Table 2) but also in root and roasting grains (data not shown).

3.3. Validation

3.3.1. LOD, LOQ, and Linearity. In this study, the following STL and CGA commonly found in chicory were studied: DHLc, Lc, DHdLc, dLc, DHLp, Lp, 5-CQA, and 3,5-diCQA. The quantification of target compounds was undertaken by an HPLC-DAD analysis of standards. For the efficient separation of all metabolites of interest while providing a meaningful flow analysis, we used chromatographic columns based on core-shell particles of $2.6 \mu m$ [28]. A Kinetex PFP column (Phenomenex) was chosen because of its ability to separate positional isomers [29]. The samples analyzed showed separation with a very good resolution of the target compounds in 16.5 min. This method allows for the analysis of approximately 90 samples per day operating in a conventional chromatographic system.

Table 3 shows the RT, the LOD and LOQ, the linearity range, the coefficient of determination (R^2), and the equation of the slope of the standard range for each metabolite tested. The STL absorbed in UV range between 190 and 260 nm (max. 254 nm) and the CGA between 210 and 320 nm (max. 320 nm). The RTs of each molecule for all wavelengths were different, indicating the lack of coelution of molecules, as evidenced by the resolution factor R_s value above 8.5

TABLE 2: Authentication of CGA and STL in chicory flour by negative-ion UPLC-HRMS analysis.

Metabolites ^a	Formula	M – H+ theoretical	RDB	RT min	M – H+ average ± SD	Precision (ppm) average ± SD
5-CQA	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353.08726	8.5	1.85	353.08856 ± 8.83E – 05	5.244 ± 0.250
DHLc	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	277.10760	7.5	2.07	277.10884 ± 3.74E – 05	6.460 ± 0.135
Lc	C ₁₅ H ₁₆ O ₅	275.09970	8.5	2.30	275.09316 ± 5.10E – 05	6.397 ± 0.186
3,5-diCQA	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	515.11895	14.5	3.65	515.12061 ± 1.02E – 04	4.156 ± 0.260
DHdLc	C ₁₅ H ₁₈ O ₄	261.11260	7.5	4.04	261.11376 ± 4.19E – 05	6.209 ± 0.160
dLc	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	259.09700	8.5	4.04	259.09803 ± 5.44E – 05	6.000 ± 0.197
DHLp	C ₂₃ H ₂₄ O ₇	411.14430	12.5	6.82	411.14657 ± 6.60E – 05	6.658 ± 0.160
Lp	C ₂₃ H ₂₂ O ₇	409.12870	13.5	6.91	409.13055 ± 2.46E – 04	5.802 ± 0.601

^a5-CQA: 5-mono-*O*-caffeoylquinic acid; DHLc: 11(S),13-dihydro-lactucin; Lc: lactucin; 3,5-diCQA: 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid; DHdLc: 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin; dLc: 8-deoxylactucin; DHLp: 11(S),13-dihydro-lactucopiricin; Lp: lactucopiricin.

M – H+: molecular weight without one hydrogen.

RDB: ring double bond.

RT: retention times.

SD: standard deviations obtained by three repetitions.

TABLE 3: Retention time (RT), limit of detection (LOD) and of quantitation (LOQ), linearity range, determination coefficient (R^2), and regression equation of metabolites tested.

Metabolites ^a	RT avg ± SD	LOD ng/mL	LOQ ng/mL	Linearity range ng/mL	R^2	Regression equation
5-CQA	1.62 ± 0.010	8.1	8.5	8.5–42,000	0.9993	$y = 1E + 07x$
DHLc	2.01 ± 0.009	2	5.7	5.7–35,000	0.9930	$y = 4E + 07x$
Lc	2.29 ± 0.007	6.4	13.7	13.7–70,000	0.9954	$y = 3E + 07x$
3,5-diCQA	5.11 ± 0.033	9.3	66.5	66.5–62,000	0.9986	$y = 2E + 07x$
DHdLc	5.41 ± 0.023	9.5	18.1	18.1–50,000	0.9954	$y = 3E + 07x$
dLc	5.59 ± 0.023	4.1	11.4	11.4–10,000	0.9903	$y = 6E + 07x$
DHLp	8.74 ± 0.037	2.5	3.3	3.3–2,000	0.9645	$y = 4E + 07x$
Lp	8.88 ± 0.041	5.9	20.5	20.5–12,000	0.9910	$y = 3E + 07x$

^a5-CQA: 5-mono-*O*-caffeoylquinic acid; DHLc: 11(S),13-dihydro-lactucin; Lc: lactucin; 3,5-diCQA: 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid; DHdLc: 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin; dLc: 8-deoxylactucin; DHLp: 11(S),13-dihydro-lactucopiricin; Lp: lactucopiricin.

(i.e., DHLp and Lp), promoting better quantization. This separation is even more effective using the Kinetex column, whose chemistry (based on PFP groups, aromatic interaction π - π , and H-F) allows for the resolution of positional isomers, which include the targeted CGA and STL. The analytic precision (repeatability and reproducibility) was measured by the intra- and interday (three different days) repetition method and is expressed in terms of the variation (RSD %) of RT and areas obtained (Table 4). A small variation of RT (here, a maximum of 0.9%) is very important to avoid the misidentification of peaks in samples. The area variation was, in general, small but higher for the reproducibility tests, with means of 6.8% for CGA and 6.4% for STL, as summarized in Table 4.

The LODs defined for all compounds were between 2 and 9.5 ng/mL (Table 3). The LOQs ranged from 3.3 to 89.5 ng/mL. Linearity ranges varied from 1 to 6,140 times the LOQ (Table 3). Thus, the concentration range, for all compounds, extended from 3.3 to 70,000 ng/mL. Linearity was perfectly preserved for each range, as illustrated by R^2 above

0.96. For each molecule, the H₂O/CHCl₃/MeOH system (30/30/40, v/v/v) enables the extraction of a content greater than the limit of quantification without surpassing the limit of linearity. Under these extraction conditions, no additional preparation, such as dilution or enrichment, is necessary for these samples.

3.3.2. Precision and Specificity. The precision of the H₂O/CHCl₃/MeOH (30/30/40, v/v/v) extraction method was evaluated by six successive intraday repetitions and three successive interday repetitions. This variable is expressed in terms of variation (RSD %) by the repeatability and reproducibility of the obtained contents of each target metabolite (Table 4). A maximum of 10 and 12% variation was observed for repeatability and reproducibility, respectively. These results indicate good accuracy of the extraction for all target metabolites.

A variation of $\pm 4\%$ in the ratio of the H₂O/CHCl₃/MeOH solvents relative to the optimal modality (30/30/40, v/v/v) introduces a variability of $\pm 20\%$ from the average (data not shown). These results demonstrate the selectivity of

TABLE 4: Extractability rate of the extraction H₂O/CHCl₃/MeOH 30/30/40 (v/v/v), repeatability, and reproducibility expressed in terms of the variation (RSD %) of contents. The repeatability and reproducibility of the HPLC-DAD method are expressed in terms of the variation (RSD %) of retention times (RT) and areas.

	Metabolites ^a							
	5-CQA	3,5-diCQA	DHLc	Lc	DHdLc	dLc	DHLp	Lp
Extraction								
Extractability rate %								
Root	94	76	79	82	85	86	84	85
Flour	82	82	85	84	85	84	85	85
Roasted grains	86	85	88	89	89	87	89	89
Repeatability RSD %								
Root	±4	±6	±2	±2	±7	±9	±6	±8
Flour	±6	±5	±9	±7	±6	±7	±5	±7
Roasted grains	±4	±4	±2	±10	±7	±5	±10	±4
Reproducibility RSD %								
Root	±6	±6	±5	±4	±9	±11	±8	±8
Flour	±5	±6	±7	±10	±7	±9	±7	±11
Roasted grains	±6	±6	±9	±8	±11	±5	±12	±6
HPLC-DAD analysis								
Repeatability								
RT RSD %								
Root	±0	±0.6	±0	±0	±0.3	±0.9	±0.6	±0.6
Flour	±0.4	±0.6	±0.4	±0.4	±0.5	±0.9	±0.4	±0.3
Roasted grains	±0.3	±0.6	±0.3	±0.3	±0.6	±0.8	±0.6	±0.7
Areas RSD %								
Root	±5.1	±7.2	±5.7	±3.5	±9.7	±14.3	±11.3	±4.1
Flour	±1.3	±1.6	±3.2	±2.9	±6.6	±12	±13.2	±6.6
Roasted grains	±2.5	±4.1	±7.7	±1.1	±6.1	±3.3	±1.3	±1.1
Reproducibility								
RT RSD %								
Root	±0.6	±1.5	±1.0	±1.0	±1.0	±0.6	±1.5	±1.0
Flour	±0.6	±0.6	±0	±0.6	±0.6	±1	±1.2	±0.6
Roasted grains	±0.6	±1.0	±0	±1.0	±1.2	±0.6	±1.2	±1.5
Areas RSD %								
Root	±11.5	±7.7	±2.7	±11.9	±8.3	±6.4	±10.5	±10.2
Flour	±5.4	±3.6	±5.5	±3.6	±3.8	±9.5	±6.2	±4.9
Roasted grains	±4.4	±5.8	±8.8	±3.3	±6.7	±8.4	±5.1	±1.8

^a5-CQA: 5-mono-*O*-caffeoylquinic acid; 3,5-diCQA: 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid; DHLc: 11(S),13-dihydro-lactucin; Lc: lactucin; DHdLc: 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin; dLc: 8-deoxylactucin; DHLp: 11(S),13-dihydro-lactucopiricin; Lp: lactucopiricin. RSD: respective standard deviations.

the method and the importance of respecting the parameters set forth above.

3.3.3. Extractability, Recovery Rate, and Matrix Effect. The extraction efficiency of the ternary mixture H₂O/CHCl₃/MeOH (30/30/40, v/v/v) was evaluated for each metabolite in the three products (Table 4). Residual contents measured from the reextraction of the pellet were used to define the extractability rate of the first method. The minimum extractability was observed for 3,5-diCQA in root (76%), and the maximum extractability was observed for the 5-CQA in the root (94%). For all metabolites, only one extraction of 17 h yielded 84% total efficiency for the roots and flour

and 88% for the roasted grains. Extractability is favorable for STL present in roasted matrix, as shown by a yield close to 89%. However, the measured levels indicate a low initial concentration of STL in the roasted grains.

5-CQA, 3,5-diCQA, and DHLc were added to the flour at different concentrations to determine the recovery rate of the H₂O/CHCl₃/MeOH (30/30/40, v/v/v) extraction method. The flour was used because of its richness in STL and CGA. The concentrations tested were 0.075, 0.15, and 0.3 mM 5-CQA; 0.0075, 0.03, and 0.075 mM 3,5-diCQA; and 0.007, 0.014, and 0.045 mM DHLc. Recovery rates were between 94 and 122% (Table 5), with an average rate of 106%, indicating the effectiveness of the method.

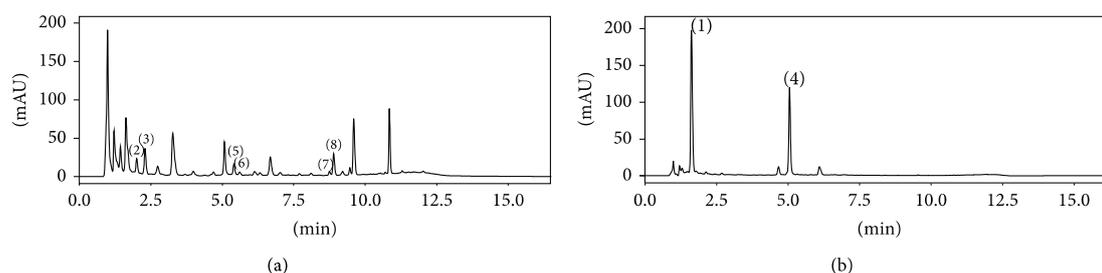


FIGURE 2: HPLC-DAD chromatograms of sesquiterpene lactones and chlorogenic acids in chicory root product (flour) obtained with $H_2O/CHCl_3/MeOH$ 30/30/30 (v/v/v) extraction: (a) STL at 254 nm and (b) CGA at 320 nm. (1) 5-Mono-*O*-caffeoylquinic acid, (2) 11(S),13-dihydro-lactucin, (3) lactucin, (4) 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid, (5) 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucin, (6) 8-deoxylactucin, (7) 11(S), 13-dihydro-lactucopicrin, and (8) lactucopicrin.

TABLE 5: Recovery (%) of the extraction of $H_2O/CHCl_3/MeOH$ 30/30/40 (v/v/v) with different additions (5-CQA, 3,5-diCQA, and DHLc) to flour.

	Metabolites ^a		
	5-CQA	3,5-diCQA	DHLc
Add 5-CQA			
0.075 mM	96%	—	—
0.15 mM	97%	—	—
0.3 mM	94%	—	—
Add 3,5-diCQA			
0.0075 mM	—	106%	—
0.03 mM	—	111%	—
0.075 mM	—	116%	—
Add DHLc			
0.007 mM	—	—	106%
0.014 mM	—	—	103%
0.045 mM	—	—	122%

^a5-CQA: 5-mono-*O*-caffeoylquinic acid; 3,5-diCQA: 3,5-di-*O*-caffeoylquinic acid; DHLc: 11(S),13-dihydro-lactucin.

The addition of different concentrations of 5-CQA, 3,5-diCQA, and DHLc in a chicory (flour) and “no-chicory” (wheat flour) matrix was used to evaluate the effect of the $H_2O/CHCl_3/MeOH$ (30/30/40, v/v/v) extraction mixture on the conversion of the chemical structure of the target compounds. The choice of “no-chicory” material focused on wheat flour because the targeted metabolites are absent. In the chicory matrix, the variation in the levels of metabolites, with or without addition, was between 2 and 9% and was included within the repeatability values. In the “no-chicory” matrix, no conversion was observed for the other molecules (contents), and the solvent alone did not change the structure of the compounds (data not shown).

3.4. STL and CGA in Products Derived from Chicory. The flour and the roasted product were derived from the same batch of roots and were analyzed with the evaluated determination method (Figure 2). For the first time, the CGA

and STL composition was demonstrated in chicory flour and the presence of STL in the roasted grains was identified. The sesquiterpene lactones and chlorogenic acids levels were 254.7 and 100.2 $\mu\text{g/g}$ of dry matter in the root, 792.5 and 1,547 $\mu\text{g/g}$ in flour, and 160.4 and 822.5 $\mu\text{g/g}$ in the roasted grains, respectively (Table 1). The ratio of secondary metabolites between the root and the flour was 5.7 (P value = 0.0014), between the root and the roasted grains 2.2 (P value = 0.0002), and between the flour and the roasted grains 2.6 (P value = 0.0021). The drying of roots increases the levels of metabolites, most likely due to the release of the bound forms, while roasting tends to degrade all molecules. Supplementary work is being conducted on the presence of the conjugated and free forms of the metabolites of interest. The study of the process effects on the content of secondary metabolites related to the organoleptic characteristics of the various products is also in progress.

4. Conclusion

Our work has shown that the ternary mixture $H_2O/CHCl_3/MeOH$ (30/30/40, v/v/v) can be used to extract the content of chlorogenic acids and sesquiterpene lactones of chicory root and its main food derivatives, flour, and roasted grains, simultaneously, with a higher efficiency than aqueous alcohol systems and a strong representation of the molecules. Direct extraction of the material, without an intermediate fractionation step (liquid-liquid extraction, SPE), evaporation, or resolubilization, followed by a short and simple chromatographic analysis, is a flexible, fast, and effective method. The chromatographic method profiled eight molecules belonging to families of major soluble secondary metabolites of chicory plant and is conducted with one extraction and one analysis. This method of simultaneous determination allows for comparative studies (physiological, genetic, or influencing the process) among the many products derived from chicory.

This targeted approach is currently being evaluated with a more comprehensive approach in which different mixtures tested to achieve this optimal system, including water/chloroform/methanol solutions at 20/20/60 or 30/30/40 (v/v/v), are combined with methodologies developed for the analysis of plant metabolomics [30]. These studies suggest

the possibility of extending the metabolomics approach we have developed for chicory.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Authors' Contribution

Honorine Willeman designed and performed experiments, analyzed data, and wrote the paper. Philippe Hance conceived and conducted the study, designed experiments, and wrote the paper. Anne Fertin gave technical support and conceptual advice. Najia Voedts performed experiments. Nathalie Duhal performed experiments, analyzed data, and wrote the paper. Jean-François Goossens and Jean-Louis Hilbert revised critically the paper. Honorine Willeman and Philippe Hance contributed equally to this work.

Acknowledgments

The present work was financed by a public-private partnership, "Groupement d'intérêt Scientifique" GENOCHIC, involving UMR 1281 SADV, Université Lille 1, Florimond-Desprez Veuve et Fils SAS, and Leroux SAS. Funding was also provided by BPI France and the Région Nord Pas-de-Calais to QUALICHIC and GLYCACHIC projects. This work is supported by a doctoral fellowship from Leroux-Finaler SAS and the Doctoral School 104 SMRE to Honorine Willeman. The authors would like to thank Myriam Janssens, Grégoire Volpoet (Leroux-Finaler), and Nicolas Henry (Florimond-Desprez) for providing chicory root materials. The authors also acknowledge the team of the pole "Nutrition, Santé et Longévité" and especially Guillaume Orgeval for their helpful support in the realization of this project and the IRENI Institute for funds dedicated to the UPLC-High Resolution MS apparatus.

References

- [1] S. B. Rees and J. B. Harborne, "The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant," *Phytochemistry*, vol. 24, no. 10, pp. 2225–2231, 1985.
- [2] J. R. Hagler and S. L. Buchmann, "Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) foraging responses to phenolic-rich nectars," *Journal of the Kansas Entomological Society*, vol. 66, no. 2, pp. 223–230, 1993.
- [3] G.-I. Arimura, S. Garms, M. Maffei et al., "Herbivore-induced terpenoid emission in *Medicago truncatula*: concerted action of jasmonate, ethylene and calcium signaling," *Planta*, vol. 227, no. 2, pp. 453–464, 2008.
- [4] R. Niggeweg, A. J. Michael, and C. Martin, "Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid," *Nature Biotechnology*, vol. 22, no. 6, pp. 746–754, 2004.
- [5] Q. Wang and J. Cui, "Perspectives and utilization technologies of chicory (*Cichorium intybus* L.): a review," *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 11, pp. 1966–1977, 2011.
- [6] C. Cavin, M. Delannoy, A. Malnoe et al., "Inhibition of the expression and activity of cyclooxygenase-2 by chicory extract," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 327, no. 3, pp. 742–749, 2005.
- [7] A. Wesołowska, A. Nikiforuk, K. Michalska, W. Kisiel, and E. Chojnacka-Wójcik, "Analgesic and sedative activities of lactucin and some lactucin-like guaianolides in mice," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 107, no. 2, pp. 254–258, 2006.
- [8] M.-Y. Kim, K. Iwai, and H. Matsue, "Phenolic compositions of *Viburnum dilatatum* Thunb. fruits and their antiradical properties," *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 18, no. 8, pp. 789–802, 2005.
- [9] D. Fraisse, C. Felgines, O. Texier, and J. L. Lamaison, "Caffeoyl derivatives: major antioxidant compounds of some wild herbs of the *Asteraceae* family," *Food and Nutrition Sciences*, vol. 2, pp. 181–192, 2011.
- [10] K. R. Price, M. S. DuPont, R. Shepherd, H. W.-S. Chan, and G. R. Fenwick, "Relationship between the chemical and sensory properties of exotic salad crops—Coloured lettuce (*Lactuca sativa*) and chicory (*Cichorium intybus*)," *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 53, pp. 185–192, 1990.
- [11] T. A. van Beek, P. Maas, B. M. King, E. Leclercq, A. G. J. Voragen, and A. de Groot, "Bitter sesquiterpene lactones from chicory roots," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 38, no. 4, pp. 1035–1038, 1990.
- [12] C. Carazzone, D. Mascherpa, G. Gazzani, and A. Papetti, "Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry," *Food Chemistry*, vol. 138, no. 2–3, pp. 1062–1071, 2013.
- [13] J. G. Foster, K. A. Cassida, and M. A. Sanderson, "Seasonal variation in sesquiterpene lactone concentration and composition of forage chicory (*Cichorium intybus* L.) cultivars," *Grass and Forage Science*, vol. 66, no. 3, pp. 424–433, 2011.
- [14] A. M. Peters and A. van Amerongen, "Sesquiterpene lactones in chicory (*Cichorium intybus* L.): distribution in chicons and effect of storage," *Food Research International*, vol. 29, no. 5–6, pp. 439–444, 1996.
- [15] M. N. Clifford, S. Shutler, G. A. Thomas, and O. Ohiokpehai, "The chlorogenic acids content of coffee substitutes," *Food Chemistry*, vol. 24, no. 2, pp. 99–107, 1987.
- [16] H. Haffke and U. H. Engelhardt, "Chlorogensäuren in Kaffee-Ersatzstoffen," *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, vol. 183, no. 1, pp. 45–46, 1986.
- [17] N. Mulinacci, M. Innocenti, S. Gallori, A. Romani, G. La Marca, and F. F. Vincieri, "Optimization of the chromatographic determination of polyphenols in the aerial parts of *Cichorium intybus* L.," *Chromatographia*, vol. 54, no. 7–8, pp. 455–461, 2001.
- [18] F. Ferioli and L. F. D'Antuono, "An update procedure for an effective and simultaneous extraction of sesquiterpene lactones and phenolics from chicory," *Food Chemistry*, vol. 135, no. 1, pp. 243–250, 2012.
- [19] P. Hance, Y. Martin, J. Vasseur, J.-L. Hilbert, and F. Trotin, "Quantification of chicory root bitterness by an ELISA for 11 β ,13-dihydroxylactucin," *Food Chemistry*, vol. 105, no. 2, pp. 742–748, 2007.
- [20] R. Ihaka and R. Gentleman, "R: a language for data analysis and graphics," *Journal of Computational and Graphical Statistics*, vol. 5, no. 3, pp. 299–314, 1996.

- [21] Molinspiration, Calculation of molecular properties and bio-activity score, 2013, <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>.
- [22] R. Llorach, A. Martínez-Sánchez, F. A. Tomás-Barberán, M. I. Gil, and F. Ferreres, "Characterisation of polyphenols and antioxidant properties of five lettuce varieties and escarole," *Food Chemistry*, vol. 108, no. 3, pp. 1028–1038, 2008.
- [23] Burdick and Jackson Laboratories, *Solvent Guide*, Burdick and Jackson Laboratories, Muskegon, Mich, USA, 2nd edition, 1980.
- [24] S. Song, W. Zhou, Z. Liang et al., "The effect of methanol and ethanol cross-over on the performance of PtRu/C-based anode DAFCs," *Applied Catalysis B: Environmental*, vol. 55, no. 1, pp. 65–72, 2005.
- [25] J. A. Elliott, S. Hanna, A. M. S. Elliott, and G. E. Cooley, "The swelling behaviour of perfluorinated ionomer membranes in ethanol/water mixtures," *Polymer*, vol. 42, no. 5, pp. 2251–2253, 2001.
- [26] L. L. Burianek and A. E. Yousef, "Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 31, no. 3, pp. 193–197, 2000.
- [27] M. Bahri, P. Hance, S. Grec et al., "A "novel" protocol for the analysis of hydroxycinnamic acids in leaf tissue of chicory (*Cichorium intybus*, L., Asteraceae)," *The Scientific World Journal*, vol. 2012, Article ID 142983, 8 pages, 2012.
- [28] G. Guiochon and F. Gritti, "Shell particles, trials, tribulations and triumphs," *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 15, pp. 1915–1938, 2011.
- [29] S. Fekete, K. Ganzler, and J. Fekete, "Efficiency of the new sub-2 μ m core-shell (Kinetex) column in practice, applied for small and large molecule separation," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 54, no. 3, pp. 482–490, 2011.
- [30] M. Gromova and C. Roby, "Toward Arabidopsis thaliana hydrophilic metabolome: assessment of extraction methods and quantitative ^1H NMR," *Physiologia Plantarum*, vol. 140, no. 2, pp. 111–127, 2010.

ETUDE PRELIMINAIRE DE L'AMERTUME DES PRODUITS TORREFIES

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels biologiques

L'essai agronomique et le matériel produit ont été décrits lors d'une précédente étude (Loaëc *et al.*, 2014). Brièvement, la culture de 5 variétés de chicorée industrielle (Calcite, Orchies, Chrysolite, Malachite, Silex) a été conduite en 2011 par la société Florimond Desprez (Cappelle-en-Pévèle, France) près de Coutiches en France selon un dispositif en blocs randomisés. Chacune des variétés a été implantée en parcelle et répétée 3 fois. Les racines de chaque variété ont été séchées puis torréfiées pour produire respectivement des cossettes séchées et torréfiées. Ce processus a été effectué par la société Leroux SAS (Orchies, France).

1.2. Extraction et quantification par HPLC-DAD des acides chlorogéniques et des lactones sesquiterpéniques

Les métabolites secondaires majeures sont extraits, de la racine fraîche, des cossettes séchées et du produit torréfié, en utilisant un mélange H₂O/CHCl₃/MeOH (30/30/40, v/v/v) (Willeman *et al.*, 2014). Ces extraits sont ensuite analysés par HPLC-DAD Prominence (Shimadzu, Marne la Vallée, France) afin d'identifier et de quantifier les 2 ACG (5-CQA, 3,5-diCQA) et les 6 LST (DHLC, Lc, DHdLc, dLc, DHLp, Lp) de la racine de chicorée industrielle. Les paramètres décrits dans la publication de Willeman *et al.* (2014) sont utilisés.

1.3. Analyses sensorielles

1.3.1. Entraînement du panel

Les dégustateurs sont entraînés dans un laboratoire d'analyse sensorielle, à la reconnaissance des saveurs fondamentales : sucrée (saccharose : 16 g/l), salée : (NaCl : 5 g/l), amère (caféine : 0,5 g/l) et acide (acide citrique 1 g/l). Ils sont également entraînés à la discrimination de la saveur amère sur la caféine, à différentes concentrations (0,1 à 0,5 g/l). Ces entraînements suivent la norme NF ISO 8586-1 – AFNOR V09-003.1.

A l'issue de ces séances d'entraînement, 25 sujets (18 femmes, 7 hommes), âgés entre 18 et 47 ans ont été retenus pour constituer le panel de dégustateurs.

1.3.2. Test de classement de l'intensité amère sur la racine

Un test de classement suivant l'amertume est effectué sur les 5 variétés de racine fraîche de chicorée (Calcite, Orchies, Chrysolite, Malachite, Silex) selon la Norme AFNOR NF ISO 8587:2007. L'épreuve consiste à demander aux sujets de classer les 5 échantillons de racines en leur attribuant un rang selon l'intensité perçue de la saveur amère. Chaque produit est testé directement sur la langue. Le rang 1 est attribué à l'échantillon le moins amer et le rang 5 à l'échantillon le plus amer. A l'issue du test, la somme des classements attribués par chaque sujet, pour chaque produit est effectuée. L'analyse de cette épreuve utilise un test non paramétrique : le test de Friedman sur les rangs. La probabilité associée au test de Friedman peut être vue comme la probabilité d'obtenir une variabilité entre les rangs moyens au moins aussi grande que celle effectivement observée. L'hypothèse nulle suppose l'égalité des barycentres (rangs moyens), la répartition est uniforme car tous les classements possibles sont observés le même nombre de fois ; l'hypothèse alternative, à l'inverse, suppose que les écarts entre les barycentres ne peuvent pas être imputés seulement au hasard.

1.3.3. Discrimination des produits torréfiés par test triangulaire

Le test triangulaire est effectué sur 2 variétés, Calcite et Chrysolite, au niveau des produits torréfiés, selon la Norme AFNOR NF ISO 4120:2007. Ce test est réalisé afin de mettre en évidence une différence significative entre ces deux variétés. Des décoctions des grains torréfiés sont préparées pour être dans les mêmes conditions que le consommateur. Pour cela, 1,5 g de chicorée torréfiée sont ajoutés à une tasse de 100 ml d'eau à 90°C. La décoction est maintenue à 90°C pendant 20 minutes puis l'ensemble est filtré à l'aide d'un filtre à café.

Le test triangulaire s'effectue sur les décoctions en utilisant ou non un pince-nez. Ce système empêche que les arômes ne perturbent la recherche de différences notamment sur les saveurs. Les décoctions sont présentées simultanément aux dégustateurs, deux échantillons sur les trois correspondent au même produit torréfié. Chaque dégustateur doit indiquer l'échantillon perçu comme différent. L'analyse du test triangulaire repose sur la loi binomiale. L'évènement observé peut prendre deux formes « réponse correcte », l'individu a regroupé correctement les échantillons, ou « réponse fausse », l'individu n'a pas regroupé correctement les échantillons. Il suffit de connaître le nombre de réponses correctes obtenues et de les comparer aux réponses correctes attendues. Le test est significatif pour une probabilité égale ou inférieure à 0,05.

1.4. Analyses statistiques

Toutes les extractions et les analyses HPLC-DAD ont été répétées 3 fois. Les données sont exprimées selon la moyenne des répétitions individuelles de chaque échantillon, à laquelle est affecté leur écart type. L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel R version 2.15.1 (Ihaka & Gentleman, 1996) afin de déterminer les variations entre les variétés. Lorsque le test de Bartlett est significatif (test de l'homogénéité de la variance) les différences relatives en teneurs de métabolites, entre les variétés ou entre les stades de traitement, ont été estimées par une ANOVA univariée. La hiérarchisation des moyennes a été effectuée en les comparants par paires à l'aide du test de Student.

2. Résultats et discussion

2.1. Composition en acides chlorogéniques et en lactones sesquiterpéniques des variétés de chicorée industrielle et des produits transformés

La racine de chicorée renferme deux principales familles de métabolites secondaires : les acides chlorogéniques (ACG), avec le 5-CQA et le 3,5-diCQA, et les lactones sesquiterpéniques (LST), avec la 11(S),13-dihydrolactucine (DHLc), la lactucine (Lc), la 11(S),13-dihydrolactucopirine (DHLp), la lactucopirine (Lp), la 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine (DHdLc) et la 8-déoxylactucine (dLc). Leur quantification est effectuée après une extraction avec un mélange ternaire eau/chloroforme/méthanol (30/30/40, v/v/v) par HPLC-DAD (Willeman *et al.*, 2014). Le **tableau 1.1** indique la concentration en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche (MS) de ces 8 métabolites dans la racine et dans les produits torréfiés de 5 variétés de chicorée industrielle : Calcite, Orchies, Chrysolite, Malachite, Silex.

Dans la racine, les LST sont majoritaires avec une moyenne de 61 % des métabolites secondaires quantifiés. Quatre vingt quatre pour cent du contenu en LST sont uniquement constitués de DHLc, Lc et Lp. En ce qui concerne les ACG, le 3,5-diCQA est en quantité supérieure au 5-CQA puisqu'il couvre en moyenne 58 % du contenu en ACG. Dans le grain torréfié, les ACG sont prédominants avec une moyenne de 87 % des métabolites secondaires quantifiés. Contrairement à la racine fraîche, le grain torréfié contient davantage de 5-CQA que de 3,5-diCQA. Parmi les LST, les DHdLc, Lc et Lp sont les plus représentées à hauteur de 92 % du contenu (**tableau 1.1**).

D'un point de vue quantitatif, les variétés Calcite et Chrysolite présentent des teneurs extrêmes en métabolites secondaires au niveau de la racine, Calcite étant la plus enrichie (673,6 $\mu\text{g/g}$ de MS) et Chrysolite étant la moins enrichie (435,3 $\mu\text{g/g}$ de MS). En effet, Chrysolite contient, respectivement, 28,6 % et 44,7 % moins de LST et d'ACG que la variété Calcite, notamment pour 6 métabolites sur 8 : la DHLp, la DHdLc, la Lc, la Lp, le 5-CQA et le 3,5-diCQA. Concernant les 3 autres variétés : Malachite, Orchies et Silex, ils contiennent des valeurs intermédiaires à la fois en LST et en ACG (**tableau 1.1**). Sur l'ensemble des métabolites, seules les proportions de DHdLc, de DHLp et de dLc, respectivement de 11, 3 et 1 % (calculées sur le contenu des LST), restent identiques quelle que soit la variété. Pour les 5 autres métabolites, les proportions varient en moyenne de 6 % entre les 5 variétés, avec au maximum 10 % pour la DHLc et au minimum 4 % pour le 5-CQA et le 3,5-diCQA. Dans le grain torréfié, la teneur totale en LST ne diffère pas significativement entre les 5 variétés (**tableau 1.1**). Toutefois, des différences ponctuelles sont relevées puisque Silex présente des teneurs plus élevées pour la DHLc et pour la Lc. Concernant les ACG, Calcite et Orchies contiennent, respectivement, près de 3 fois plus de 3,5-diCQA et 1,5 fois plus de 5-CQA que les autres variétés.

Tableau 1.1: Teneurs en ACG (5-CQA, 3,5-diCQA) et en LST (DHLc, Lc, DHdLc, dlC, DHLp, Lp) dans les 5 variétés de chicorée industrielle : Calcite, Chrysolite, Malachite, Orchies et Silex, quantifiées au niveau de la racine et des produits torréfiés.

Variétés	Métabolites ^a - µg/g de matière sèche ± ET											
	5-CQA	3,5-diCQA	ACG	DHLc	Lc	DHDlc	dlc	DHLp	Lp	LST	Total	
Calcite	Racine	121,1 ± 6,4 _a	162,9 ± 6,9 _a	284 ± 13,3 _a	57,7 ± 0,8 _b	170,3 ± 8 _a	45,5 ± 1,5 _a	3,4 ± 0,1 _{cd}	11,8 ± 0,6 _a	101,2 ± 1,4 _a	389,6 ± 12,1 _a	673,6 ± 25,4 _a
	Torréfié	423,6 ± 31,7 _b	130,6 ± 1,4 _a	554,2 ± 32,4 _{ab}	0 _b	22,2 ± 0,8 _b	31,1 ± 10,3 _a	1,9 ± 0,2 _a	4,3 ± 1,4 _a	19,8 ± 1,4 _a	79,2 ± 11,8 _a	633,4 ± 41,2 _{ab}
	Orchies											
Racine	66,7 ± 1,9 _d	103,5 ± 5,4 _b	170,2 ± 6,2 _{cd}	70,7 ± 2,5 _a	140,9 ± 8,1 _b	38,1 ± 2,8 _b	5,3 ± 0,2 _a	9,9 ± 0,5 _b	73,2 ± 2,7 _b	338,1 ± 16,7 _b	508,3 ± 20,1 _b	
Torréfié	641,8 ± 120 _a	50,5 ± 1,4 _b	692,3 ± 121,4 _a	0 _b	27 ± 2,7 _{ab}	28,2 ± 12,2 _a	1,5 ± 0,6 _a	2 ± 0,8 _a	25,1 ± 8,3 _a	83,7 ± 23,7 _a	776 ± 102,1 _a	
Chrysolite	Racine	67,6 ± 2,9 _{cd}	89,5 ± 3,4 _d	157,1 ± 6,3 _d	68,1 ± 1,9 _a	107,4 ± 1,6 _c	29,9 ± 0,5 _c	4,3 ± 0,08 _b	8,7 ± 0 _c	59,8 ± 1,8 _d	278,2 ± 5,5 _c	435,3 ± 11,7 _d
	Torréfié	518,2 ± 34,3 _{ab}	49,4 ± 6 _b	567,6 ± 39,9 _{ab}	0 _b	20,2 ± 0,5 _b	25,7 ± 5 _a	1,3 ± 0,3 _a	2,9 ± 0,3 _a	21,1 ± 1,4 _a	71 ± 6,5 _a	638,6 ± 46,2 _{ab}
	Malachite											
Racine	87,9 ± 2 _b	116,1 ± 3,6 _c	204 ± 5,6 _b	53,7 ± 0,8 _b	114,7 ± 0,7 _c	c30,7 ± 0,3 _{ab}	3,1 ± 0,1 _d	9,1 ± 0,3 _{bc}	68,9 ± 0,3 _{bc}	280,2 ± 1,8 _c	484,2 ± 34,8 _{bc}	
Torréfié	440,6 ± 26,5 _b	42,3 ± 1 _b	482,9 ± 26,7 _b	0 _b	20,9 ± 1,8 _b	a23,8 ± 1,4 _b	1,3 ± 0,2 _a	2,3 ± 0,1 _a	21,1 ± 1,2 _a	69,3 ± 1,4 _a	552,2 ± 27,3 _b	
Silex	Racine	76,5 ± 1,9 _c	101,7 ± 0,1 _b	c178,2 ± 24,6 _c	54,2 ± 0,7 _b	113,6 ± 0,3 _c	31,2 ± 0,4 _c	3,5 ± 0,08 _c	9,4 ± 0,06 _{bc}	67,2 ± 1 _c	279,4 ± 1,4 _c	457,6 ± 2,3 _{cd}
	Torréfié	439,1 ± 52,6 _b	54,1 ± 12,3 _b	493,2 ± 44 _b	4 ± 1,8 _a	32,7 ± 4,7 _a	35,6 ± 6,8 _a	2,1 ± 0,5 _a	3,7 ± 1,1 _a	27,2 ± 5,2 _a	105,2 ± 17,1 _a	598,3 ± 36,6 _b

Les différentes lettres d'une même couleur au sein d'une même colonne indiquent une différence significative (*p*-value < 0,05)

^a 5-CQA : acide 5-mono-*O*-caféoylquinique ; 3,5-diCQA : acide 3,5-di-*O*-caféoylquinique ; ACG : acides chlorogéniques ; DHLc : 11(S),13-dihydrodrolactucine ; Lc : lactucine ; Dhdlc : 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine ; dlc : 8-déoxylactucine ; DHLp : 11 (S),13-dihydrodrolactucopirine ; lp : lactucopirine ; LST : lactones sesquiterpéniques.

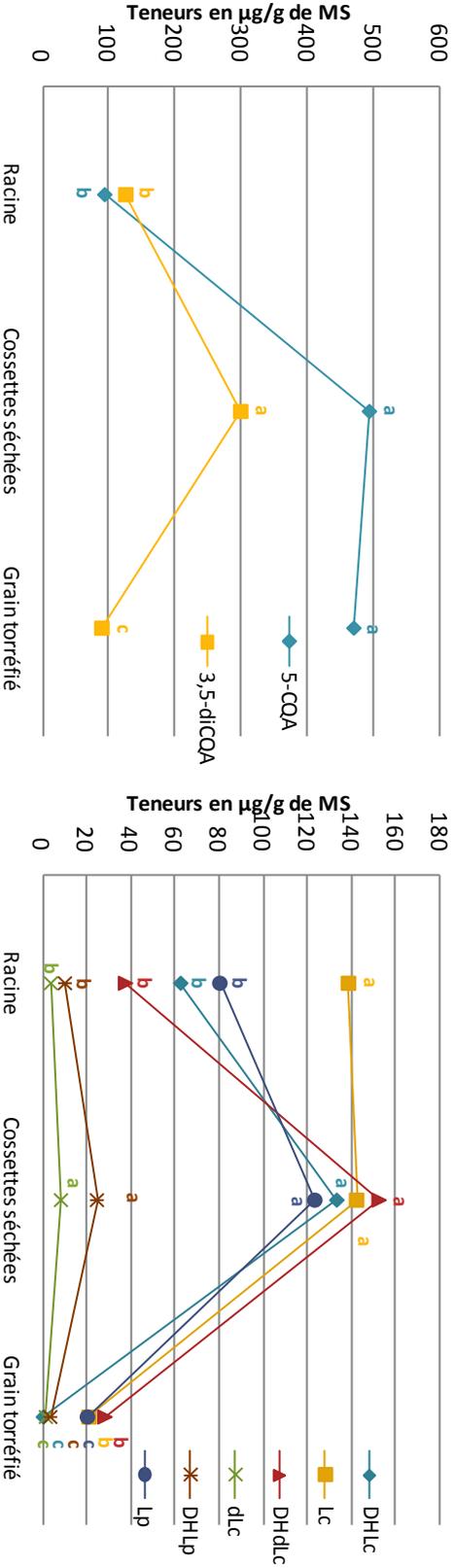
ET : écart type obtenu par trois répétitions techniques.

La **figure 1.1** montre l'évolution des teneurs des métabolites secondaires ciblés au cours du processus de transformation. Le séchage provoque la plus forte augmentation des ACG avec 5 fois plus de 5-CQA et 2,4 fois plus de 3,5-diCQA comparativement aux valeurs relevées dans la racine fraîche. Au cours de la torréfaction du grain de café, Trugo & Macrae (1984) ont mis en évidence l'isomérisation des ACG notamment dès le début du procédé. Dans notre étude, la torréfaction des cossettes séchées correspond à une perte de 4 fois la teneur en 3,5-diCQA, alors qu'elle n'affecte pas la teneur en 5-CQA. En effet, la concentration en 5-CQA, étant de 470,9 µg/g de MS dans les cossettes séchées, se maintient à 494,4 µg/g de MS dans les produits torréfiés. Selon Leloup *et al.* (1995), la diminution des dimères d'acide caféoylquinique s'expliquerait par leur hydrolyse partielle, libérant au passage des monomères d'acides chlorogéniques notamment le 5-CQA. Leur tendance à s'hydrolyser est confortée par les travaux de Bicho *et al.* (2011) qui démontrent que les dimères d'acide caféoylquinique sont plus sensibles que les monomères lors d'une torréfaction intense du grain de café. La conservation du niveau de 5-CQA trouve une origine à la fois dans les réactions d'isomérisation, dans la résistance de la structure monomérique et dans les formes libérées issues des dimères hydrolysés.

Comme cela a pu être constaté dans le cas des concentrations en ACG, à l'exception de la lactucine (Lc) dont la teneur ne varie pas, le séchage conduit également à une augmentation du contenu en LST de l'ordre de 46 % en moyenne (**figure 1.1**). En revanche, la torréfaction entraîne une diminution moyenne de 86 % du contenu, impactant en particulier la DHLc, la dLc et la DHLp qui ne sont quasiment plus détectées. Pris dans sa continuité, le procédé de transformation conduit d'abord à la libération des LST, augmentant de 1,7 fois leur contenu, puis à la disparition de ces composés, réduisant de 8 fois leur teneur. Seule la DHdLc ne présente pas de variations significatives entre le stade racine brute et le stade torréfié. Concernant les LST, ces étapes de modification ne sont pas encore décrites dans la littérature. Grafe (1915) et Pazola (1987) supposent également que lors du processus de torréfaction les LST sont dégradés dans la racine de chicorée.

Comparativement à la composition native en ACG et en LST de la racine de chicorée, le procédé impacte principalement les teneurs de 7 métabolites : la DHLc, la Lc, la dLc, la DHLp, la Lp, le 5-CQA et le 3,5-diCQA. A l'inverse, la somme des effets de chaque étape de traitement résulte en une variation non significative de la concentration en DHdLc. Toutefois, le procédé induit globalement lors du séchage une augmentation des composés chlorogéniques et sesquiterpéniques dont le contenu se trouve par la suite réduit d'un niveau plus important au cours de la torréfaction. Le jeu combiné des réactions d'hydrolyse et de dégradation thermique, accompagnant respectivement le séchage et la torréfaction, participe à la modification de la composition tantôt en libérant les formes conjuguées des composés tantôt en provoquant leur consommation. L'augmentation constatée lors du séchage peut résulter de la modification de la texture de la matrice racinaire, favorisant l'extractabilité des

composés. Toutefois, la granulométrie et le taux d'humidité ont été normalisés afin de s'assurer de conditions identiques lors de l'extraction et de l'analyse.



2.2. Amertume de la racine et des produits torréfiés en fonction des variétés

L'amertume de la chicorée est étudiée à partir de l'analyse sensorielle des échantillons. Ainsi, un test de classement par rang de l'intensité amère est effectué sur les racines à partir des 5 variétés de chicorée industrielle dans le but de les discriminer. Les variétés sont classées par les dégustateurs de la variété la moins amère (rang 1), à la variété la plus amère (rang 5). L'analyse des résultats par le test de Friedman met en évidence des différences significatives (p -values < 0,05) au niveau de l'amertume entre les 5 variétés (F: 10,65 > 9,46). Pour déterminer quelles variétés sont significativement différentes, un test de comparaison multiple par paire est effectué pour calculer la plus petite différence significative (LSD) entre deux échantillons (rang LSD = 21,46). Ainsi, 2 variétés, dont la différence des sommes des rangs est supérieure à 21,46, sont significativement différentes au niveau de leur intensité d'amertume. Il s'agit des variétés Calcite et Chrysolite. Les 3 autres variétés : Orchies, Malachite et Silex ne présentent aucune différence significative. Elles se situent entre la variété Calcite, la plus amère, et la variété Chrysolite, la moins amère. Ces résultats corroborent ceux précédemment obtenus par l'analyse chimique. La variété Calcite, la plus riche en LST et en ACG, est classée comme la plus amère contrairement à la variété Chrysolite, la moins riche en métabolites ciblés.

Au niveau des produits torréfiés, les variétés Calcite et Chrysolite sont présentées à l'analyse sensorielle. Ainsi, un test triangulaire est mis en place. Il permet de discriminer les variétés sans spécifier aux membres du panel des caractéristiques sensorielles. Le test est effectué sur les décoctions afin de se placer dans les mêmes conditions de dégustation que le consommateur. Les panélistes testent ces décoctions avec et sans pince-nez, afin d'éviter les interférences possibles entre les arômes et les saveurs. Dans les deux cas, le test triangulaire donne un nombre suffisant de réponses correctes pour permettre de confirmer l'existence d'une différence significative (p -value < 0,05) entre les deux variétés de chicorée industrielle après torréfaction. Les dégustateurs associent cette différence principalement à l'amertume, mais ils soulignent également une différence de couleur et d'arômes. La variété Calcite est identifiée par les dégustateurs comme étant la plus amère, la plus colorée et la plus riche en arôme comparativement à la variété Chrysolite.

2.3. Relation entre la composition et l'amertume de la racine et des produits torréfiés.

Les valeurs de seuil de détection de l'amertume des 6 lactones sesquiterpéniques ont été étudiées individuellement par un test triangulaire (Van Beek *et al.*, 1990). La DHLp et la Lp sont les LST les plus intenses en amertume avec, respectivement, des valeurs de seuil de détection de 0,2 ppm et de 0,5 ppm. Ces valeurs sont 8 fois supérieures à celle de l'amertume de la référence : l'hydrochlorure de quinine (1,6 ppm). Comparativement, la DHLc et la Lc sont les LST les moins

amères avec des valeurs seuils de 1,4 ppm et 1,7 ppm. Enfin, la DHdLc et la dLc, ont une valeur seuil intermédiaire de 1,1 ppm.

Le **tableau 1.2** montre les valeurs d'amertume (BV) des 6 LST, pour les 5 variétés de chicorée industrielle au niveau de la racine et des produits torréfiés. Les valeurs d'amertume (BV) sont exprimées selon les valeurs seuil de détection (ppm ; w/w) déterminées par la méthode de Van Beek *et al.* (1990).

Dans la racine fraîche, la valeur seuil de l'amertume pour les variétés Chrysolite et Malachite sont plus faibles que pour la variété Calcite (**tableau 1.2**). Cette différence s'explique par une quantité importante de DHLp (0,2 ppm), de Lp (0,5 ppm) et de DHdLc (1,1 ppm) pour la variété Calcite comparativement aux quatre autres variétés. Ces observations confortent les résultats obtenus précédemment en analyse sensorielle, où la variété Calcite est trouvée plus amère que la variété Chrysolite.

Tableau 1.2 : Valeur d'amertume des LST dans les 5 variétés de chicorée industrielle au niveau de la racine et des produits torréfiés.

Variétés	Métabolites ^a – valeur d'amertume ± ET						
	DHLc	Lc	DHdLc	dLc	DHLp	Lp	Total BV
Racine							
Calcite	41 ± 0,6b	100,2 ± 4,7a	41,4 ± 1,4a	3,1 ± 0,1cd	59,1 ± 3,1a	202,4 ± 2,7a	447,1 ± 11,8a
Orchies	50,5 ± 1,8a	82,9 ± 4,8b	34,6 ± 2,6b	4,8 ± 0,2a	49,5 ± 2,5b	146,3 ± 5,4b	368,5 ± 6b
Chrysolite	48,7 ± 1,4a	63,1 ± 0,9c	27,2 ± 0,4c	3,9 ± 0,07b	43,3 ± 0c	119,5 ± 3,6d	305,7 ± 2,7c
Malachite	38,4 ± 0,6b	67,5 ± 0,4c	27,9 ± 0,3c	2,8 ± 0,1d	45,4 ± 1,4bc	137,8 ± 0,7bc	319,7 ± 16,9c
Silex	38,7 ± 0,5b	66,8 ± 0,2c	28,4 ± 0,4c	3,2 ± 0,07c	47,1 ± 0,3bc	134,3 ± 2c	318,5 ± 2,1c
Torréfié							
Calcite	0b	13 ± 0,37b	28,3 ± 7,63a	1,7 ± 0,17a	21,6 ± 5,82a	39,6 ± 2,34a	104,1 ± 14,08a
Orchies	0b	15,9 ± 1,29ab	25,6 ± 9,08a	1,4 ± 0,45a	10,1 ± 3,21a	50,1 ± 13,59a	103 ± 26,9a
Chrysolite	0b	11,9 ± 0,22b	23,3 ± 3,68a	1,2 ± 0,21a	14,4 ± 1,06a	42,1 ± 2,28a	92,9 ± 6,59a
Malachite	0b	12,3 ± 0,87b	21,6 ± 1,05a	1,2 ± 0,12a	11,6 ± 0,27a	42,1 ± 1,9a	88,8 ± 2,35a
Silex	2,8 ± 1,07a	19,2 ± 2,27a	32,3 ± 5,07a	1,9 ± 0,40a	18,4 ± 4,6a	54,3 ± 8,5a	129 ± 19,14a

^a DHLc : 11(S),13-dihydro-lactucine ; Lc: lactucine ; DHdLc : 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine ; dLc : 8-déoxylactucine ; DHLp : 11(S),13-dihydro-lactucopirine ; Lp: lactucopirine ; BV : valeur d'amertume

^b Valeur d'amertume calculée selon Van Beek *et al.* (1990)

SD: Ecart type obtenu par les trois répétitions techniques

L'analyse en composantes principales des teneurs des 6 LST et des 2 ACG, de la valeur totale d'amertume (BV) et des résultats du test de classement (BD : degré d'amertume) obtenus pour les racines des 5 variétés, va permettre d'établir une corrélation entre ces différentes variables et l'amertume (**figure 1.2**). La composante principale 1 (CP1 expliquant 74,02 % de l'inertie totale) est expliquée par des teneurs élevées en Lp, DHLp, Lc, 3,5-diCQA mais aussi par une forte valeur d'amertume (BV). Plus largement, CP1 est également expliquée par de forte teneur en DHdLc et 5-

CQA. CP2 (22,85 %) est, quant à elle, expliquée par des teneurs élevées en dLc et en DHLc. La valeur (BV) et le degré d'amertume (BD) ne sont pas corrélés à la dLc, la DHLc et au 5-CQA (Spearman, p -value < 0,05). Toutefois, BV et BD sont corrélés à des teneurs élevées en Lp, Lc et DHdLc (Spearman, p -value < 0,001) mais aussi en DHLp et 3,5-diCQA (Spearman, p -value < 0,05). Selon CPI, les 5 variétés sont scindées en trois groupes:

- la variété Calcite avec de fortes teneurs en DHLp, Lp et 3,5-diCQA ainsi qu'une forte valeur (BV) et un fort degré d'amertume (BD),
- les trois variétés intermédiaires : Orchies, Silex et Malachite,
- et la variété Chrysolite avec des teneurs faibles en DHdLc, Lc, DHLp, Lp, 3,5-diCQA et 5-CQA ainsi qu'une faible valeur (BV) et un faible degré d'amertume (BD).

D'après les observations de l'ACP et les corrélations de Spearman, deux groupes de lactones sesquiterpéniques sont détectés dans la racine.

Ceux qui influencent fortement l'amertume, il s'agit de :

- la DHLp en faible proportion (3 % des LST) mais avec un faible seuil de détection (0,2 ppm),
- la Lp en forte proportion (24 % des LST) et un faible seuil de détection (0,5 ppm),
- la Lc avec un seuil de détection élevé (1,7 ppm) mais en forte proportion (41 % des LST)
- et enfin la DHdLc en proportion moyenne (11 % des LST) et un seuil de détection moyen (1,1 ppm),

et ceux qui n'affectent pas l'amertume, il s'agit de :

- la dLc avec un seuil moyen de détection (1,1 ppm) et en faible proportion (1 % des LST)
- et la DHLc avec un seuil élevé de détection (1,4 ppm) et en proportion moyenne (20 % des LST).

Des études ont montré que les LST sont responsables de l'amertume dans la racine fraîche de chicorée et plus spécifiquement la DHLp et la Lp (Peters & Van Amerongen, 1998). La différence d'intensité d'amertume entre les LST pourrait s'expliquer par la différence de substitut sur le carbone 8 (C-8) (Leclercq, PhD, 1992). La Lc possède un groupement hydroxyle, la dLc un atome d'hydrogène et la Lp a un substitut plus important, un groupement acide acétique *p*-hydroxyphényl (**figure 1.3**). La Lc est donc le plus polaire et possède la plus faible intensité en amertume à l'inverse de la Lp. Des notes d'amertume similaires sont observées pour les analogues dihydro-. Comme pour les LST, le moins polaire des ACG, le 3,5-diCQA, semble être positivement relié au degré d'amertume.

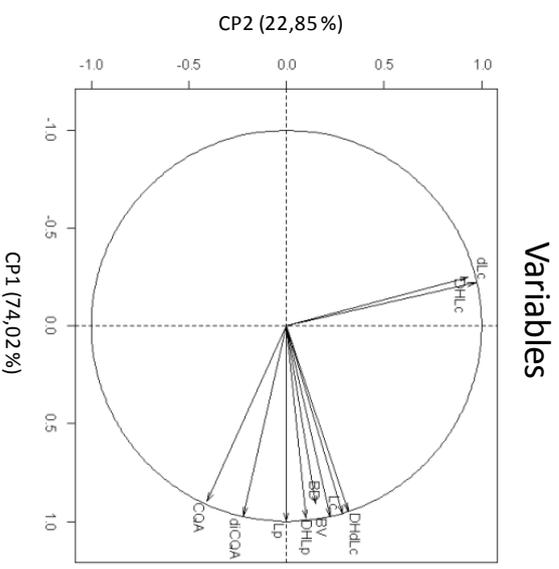
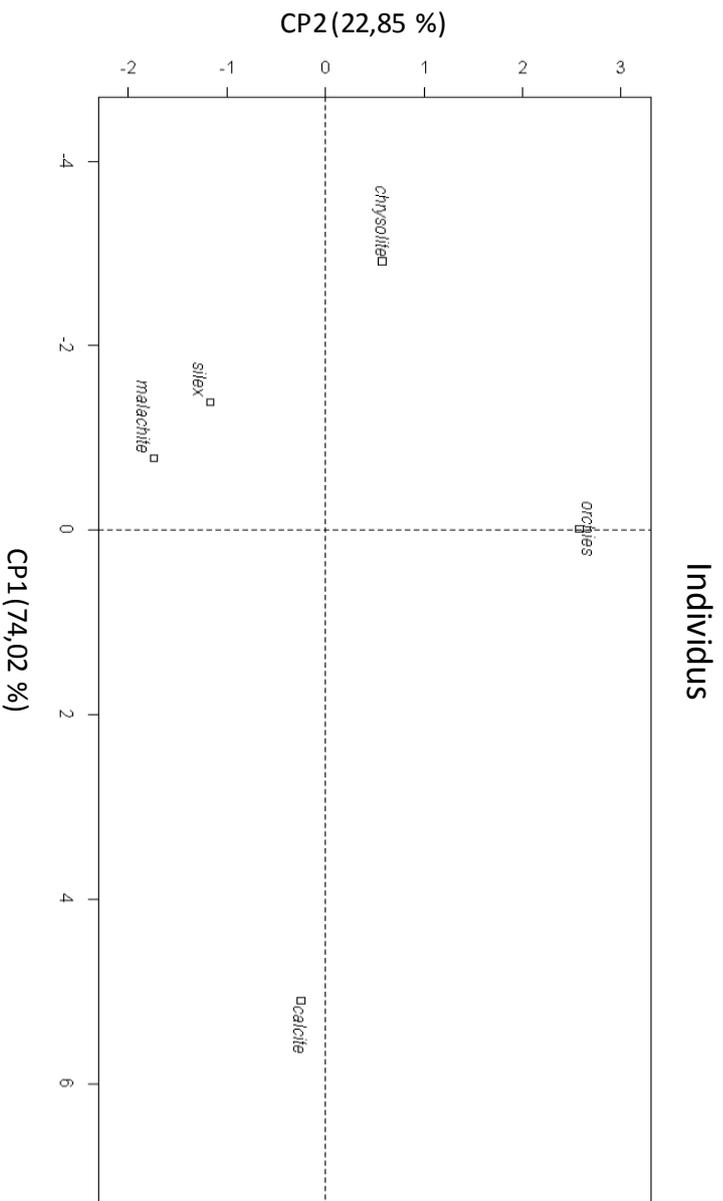


Figure 1.2 : Effet variétal des racines de chicorée sur les teneurs en LST et en ACG, la valeur totale d'amertume (BV) et les résultats du test de classement (BD). Analyse en composantes principales (avec CP1 expliquant 74,02 % et CP2 22,85 %) des 8 métabolites quantifiés par analyse HPLC-DAD, de la BV et du test de classement obtenus par analyse sensorielle pour les 5 variétés de chicorée industrielle (n = 3).

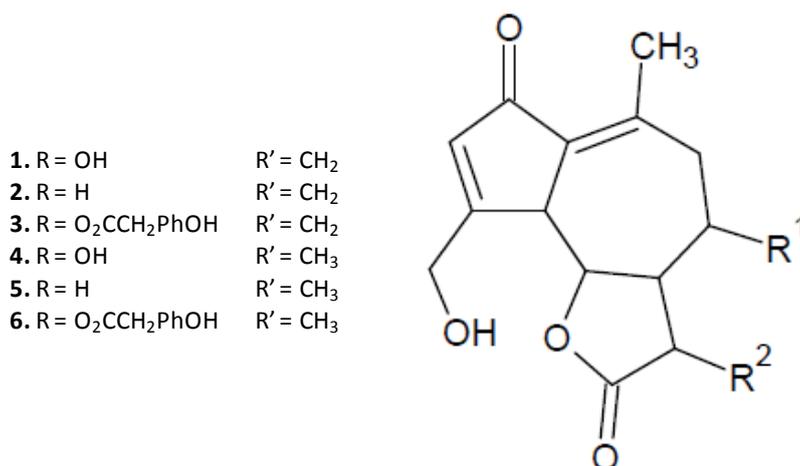


Figure 1.3 : Structure des 6 LST identifiés dans les produits de racine de chicorée. (1) : lactucine, (2) : 8-déoxylactucine, (3) : lactucopirine, (4) : 11(S),13-dihydrolactucine, (5) : 11(S),13-dihydro-8-déoxylactucine, (6) : 11(S),13-dihydrolactucopirine.

En ce qui concerne le produit torréfié, aucune différence significative dans le contenu en LST n'est observée entre les variétés Calcite ($79,2 \pm 11,8 \mu\text{g/g}$ de MS) et Chrysolite ($71 \pm 6,5 \mu\text{g/g}$ de MS) (**tableau 1.1**). De plus, aucune différence significative n'est relevée entre les sommes des indices BV des 5 variétés (**tableau 1.3**). Ces observations ne corroborent pas les résultats de l'analyse sensorielle obtenus précédemment qui distinguait nettement le niveau d'amertume entre les 2 variétés. Ainsi la variété Calcite était perçue plus amère que la variété Chrysolite. Au contraire, ces observations indiquent que les LST ne semblent plus ou pas être les seules molécules impliquées dans l'amertume des produits torréfiés.

Pendant le processus de torréfaction de nombreuses molécules sont modifiées, en particulier les ACG. Selon Trugo & Macrae (1984) et Montavon *et al.* (2003) les ACG participent à la génération de la couleur, de la saveur et des arômes pendant la torréfaction du grain de café. Farah *et al.* (2006) montrent qu'au cours de la torréfaction, une partie des ACG est transformée en quinolactones par la formation d'une liaison intramoléculaire suite à la perte d'une molécule d'eau. Ginz & Engelhardt (1995), Variyar *et al.* (2003) et Frank *et al.* (2008) ont démontré que le développement de l'amertume du grain de café au cours de la torréfaction est causé par la libération de l'acide caféique et par la formation de lactones chlorogéniques responsables de saveurs et d'arômes.

CONCLUSION

Nos premiers travaux ont démontré que le mélange ternaire $H_2O/CHCl_3/MeOH$ (30/30/40, v/v/v) permet d'extraire simultanément, avec une meilleure efficacité que les systèmes hydroalcooliques et une forte représentativité des molécules, le contenu en acides chlorogéniques et en lactones sesquiterpéniques de la racine de chicorée et de ses principaux dérivés alimentaires, la farine et le produit torréfié. L'extraction directe du matériel, sans étape intermédiaire de fractionnement (extraction liquide-liquide, SPE), d'évaporation ou de resolubilisation, suivie d'une analyse chromatographique simple et courte, offre une méthode souple, rapide et efficace. Ainsi, cette méthode de détermination simultanée permet des études comparatives (physiologique, génétique ou encore d'influence du processus) entre les nombreux produits issus de la chicorée.

Dans un second temps, par le biais de cette méthodologie comparative, une différence de teneurs en LST et en ACG a été déterminée au niveau de la racine fraîche entre les 5 variétés de chicorée industrielle. La variété Calcite est plus riche en LST et en ACG à l'inverse de la variété Chrysolite. Après torréfaction, la teneur en ACG augmente en moyenne de 64 % et celle en LST diminue en moyenne de 74 % dans les produits torréfiés. Toutefois, aucune différence significative n'a été observée pour les teneurs en LST entre les 5 variétés. Concernant les analyses sensorielles, les racines fraîches des 5 variétés sont discriminées au niveau de l'amertume. Calcite apparaît plus amère que la variété Chrysolite. Après torréfaction, la différence d'amertume des produits torréfiés de ces 2 variétés persiste. Si dans la racine fraîche les LST ont été corrélées positivement à l'amertume, c'est moins évident pour les produits torréfiés. Ces observations soulèvent l'hypothèse que les LST ne seraient plus ou pas les seules molécules impliquées dans l'amertume de la racine de chicorée torréfiée. L'implication des ACG peut être suggérée mais reste à démontrer.

CHAPITRE 2 :

**Influence du séchage et de la torréfaction sur
la composition native de la racine de
chicorée industrielle**

INTRODUCTION

Les études décrites dans le chapitre 1 confirment l'implication des LST dans l'amertume de la racine fraîche de chicorée. Cependant, leur teneur diminue fortement lors du processus de torréfaction. L'hypothèse alors posée est que les LST ne sont pas les seuls composés à contribuer à l'amertume du produit torréfié.

L'amertume des produits torréfiés dépend de sa composition chimique. Cette composition résulte de l'impact de la torréfaction sur la composition chimique native de la racine. Actuellement, aucun profilage métabolomique de la racine ni des produits torréfiés n'a été référencé dans la bibliographie. L'évolution de la composition native lors du processus de transformation reste encore à acquérir.

Dans cette étude, il s'agit de caractériser la diversité génétique d'une collection de 48 génotypes de chicorée industrielle, provenant de la société semencière Florimond Desprez, dans le but :

- de hiérarchiser la diversité génétique
- et de choisir des génotypes représentant l'ensemble de la diversité génétique de la collection.

Cette caractérisation est basée sur l'analyse métabolomique et génotypique. Le choix d'une approche métabolomique se base sur sa capacité à couvrir des structures chimiques variées et des gammes étendues de concentrations. Une analyse ciblée et non ciblée des métabolites solubles est menée par RMN-¹H d'extraits polaires et par HPLC-DAD et LC-QTOF-MS d'extraits semi-polaires. L'approche génotypique, quant à elle, se base sur la puissance des marqueurs microsatellites pour déterminer la diversité au niveau du génome. Il est essentiel d'évaluer et d'obtenir de la diversité génétique et chimique pour associer, dans la suite de nos travaux, des changements phénotypiques avec l'amertume des produits torréfiés de la chicorée.

Dans un second temps, le profilage des produits dérivés de la racine de chicorée issus des génotypes représentant la collection est effectué dans le but d'établir des évolutions de la composition initiale lors de la torréfaction. Des analyses ciblées et non ciblées des métabolites solubles sont menées par RMN-¹H, HPLC-DAD et LC-QTOF-MS pour la racine fraîche, les cossettes séchées et les produits torréfiés. L'utilisation conjointe des technologies analytiques combinée aux analyses statistiques nous aidera à mettre en évidence un effet du processus de transformation sur la composition native de la racine de chicorée.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels biologiques

1.1. Expérimentations au champ

Le matériel est issu d'une expérimentation qui prend en compte l'itinéraire de production de la plante, du champ aux produits finis (**figure 2.1**).

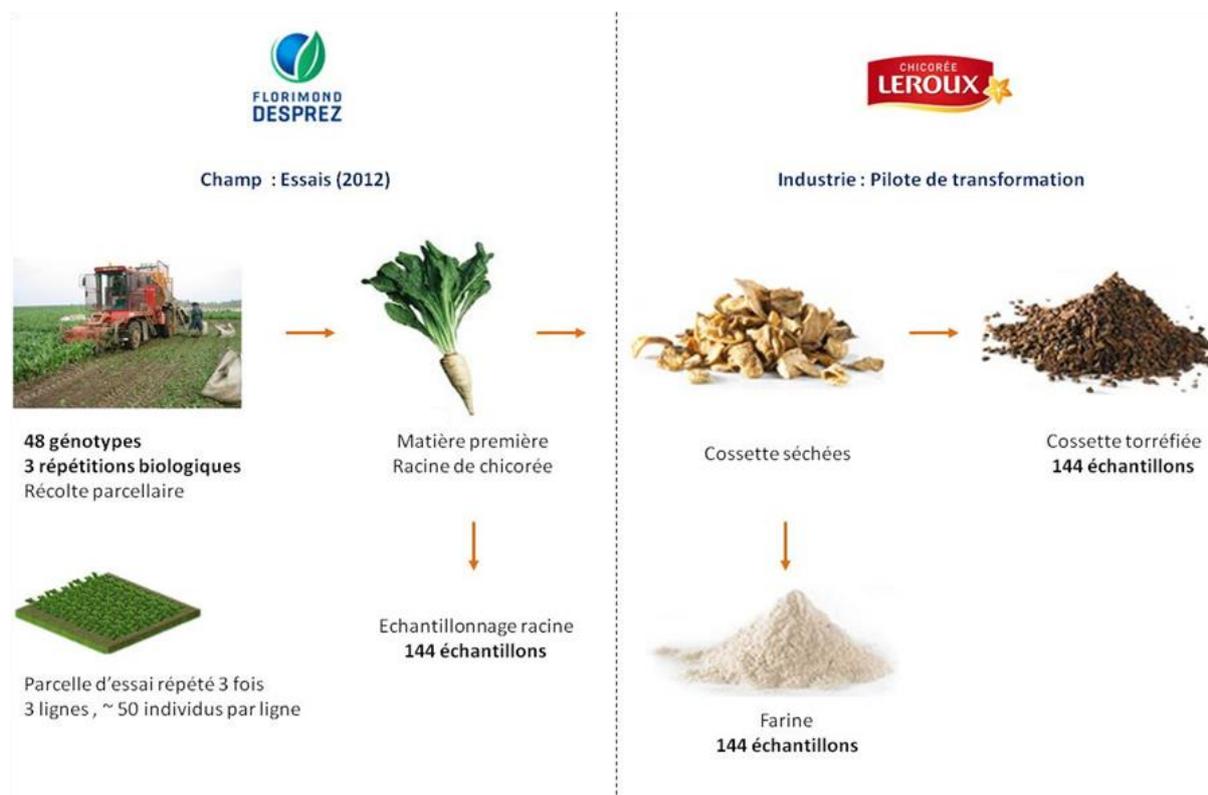


Figure 2.1 : Plan d'expérimentation.

Une collection de quarante-huit géotypes (cultivars) de chicorée industrielles, codés pour des raisons de confidentialité, a été choisie sur la base de la connaissance *a priori* de leur diversité génétique. Ces géotypes correspondent à des semences de base des constituants des variétés commerciales du moment dont quelques uns sont apparentés (**tableau 2.1**). Le matériel est divisé en cinq groupes, A, B, C, D et E. Ces groupes se distinguent selon leur utilisation par les sélectionneurs.

Tableau 2.1 : Tableau représentant les génotypes apparentés. Les génotypes du groupe A sont apparentés avec des génotypes du groupe B. Le génotype 1E est apparenté avec les génotypes du groupe D. Les génotypes du groupe C ne sont apparentés avec aucun groupe.

Génotypes apparentés		Génotypes non apparentés	
QualiE1	QualiD41	QualiC31	-
	QualiD44	QualiC32	-
	QualiD38	QualiC33	-
	QualiD42	QualiC34	-
	QualiD45	QualiC35	-
QualiA2	QualiB12	QualiC36	-
QualiA3	QualiB13	QualiC37	-
QualiA4	QualiB28	QualiC39	-
QualiA5	QualiB14	QualiC40	-
QualiA6	QualiB16	QualiC43	-
	QualiB17	QualiC46	-
	QualiB18	QualiC47	-
	QualiB19	QualiC48	-
	QualiB20		
	QualiB21		
QualiA7	QualiB22		
QualiA8	QualiB23		
	QualiB24		
	QualiB25		
	QualiB26		
	QualiB27		
QualiA9	QualiB29		
QualiA10	QualiB15		
QualiA11	QualiB30		

Les génotypes ont été implantés dans un champ unique localisé à Coutiches (France) selon un dispositif en alpha-plan de 6 sous-blocs de 8 objets répété 3 fois (**figure 2.2**), lors d'un essai agronomique réalisé en 2012 par la société Florimond Desprez Veuve et Fils (Capelle-en-Pévèle, France). Chaque génotype a été répété 3 fois ($n = 3$) et à chacune des répétitions correspond une parcelle composée de plusieurs plantes (150 environ). Les parcelles sont agencées selon deux axes, x (numéroté de 1 à 24) et y (numéroté de 1 à 6) de manière à ce que les objets ne se retrouvent jamais présents plus d'une fois dans un même bloc ni sur la même ligne. Ce plan d'expérimentation a pour but de contrôler l'hétérogénéité du terrain. La totalité des racines de chaque parcelle a été récoltée sur

la même journée et chaque lot parcellaire de racine a été transformé individuellement par le procédé industriel à l'échelle pilote.

	1	2	3	4	5	6
	BORDURE NUE					
1	QualiA4	QualiC46	QualiB25	QualiA10	QualiC32	QualiC48
2	QualiC47	QualiB19	QualiB28	QualiB23	QualiB17	QualiA7
3	QualiB21	QualiA2	QualiA9	QualiC43	QualiB12	QualiC36
4	QualiC33	QualiA6	QualiD44	QualiB26	QualiB26	QualiC40
5	QualiC43	QualiA5	QualiD41	QualiC33	QualiA5	QualiC31
6	QualiB27	QualiA11	QualiC37	QualiD38	QualiA2	QualiC34
7	QualiB13	QualiC39	QualiC46	QualiA4	QualiD45	QualiB14
8	QualiB22	QualiC37	QualiA6	QualiB17	QualiB23	QualiB15
9	QualiB16	QualiA9	QualiB20	QualiB30	QualiC35	QualiB24
10	QualiD42	QualiB18	QualiA7	QualiB29	QualiA8	QualiB28
11	QualiC40	QualiD45	QualiC31	QualiB13	QualiA11	QualiC47
12	QualiB15	QualiA3	QualiB14	QualiB12	QualiD1	QualiD42
13	QualiB14	QualiA8	QualiC32	QualiD42	QualiB21	QualiA4
14	QualiC48	QualiC36	QualiD45	QualiB15	QualiC39	QualiB29
15	QualiB29	QualiB25	QualiB24	QualiB21	QualiB13	QualiB20
16	QualiC34	QualiC32	QualiC36	QualiA2	QualiA9	QualiC43
17	QualiC35	QualiB24	QualiB16	QualiC34	QualiC33	QualiC37
18	QualiB12	QualiD38	QualiC47	QualiC39	QualiD44	QualiA10
19	QualiD1	QualiD44	QualiB22	QualiC48	QualiB30	QualiB19
20	QualiB17	QualiB23	QualiA8	QualiA3	QualiB27	QualiB22
21	QualiB20	QualiC31	QualiC40	QualiC35	QualiB25	QualiB16
22	QualiA7	QualiB28	QualiB18	QualiA11	QualiA3	QualiD41
23	QualiA10	QualiB30	QualiA5	QualiD1	QualiD38	QualiB18
24	QualiD41	QualiB26	QualiB19	QualiB27	QualiA6	QualiC46
	BORDURE NUE					

Figure 2.2 : Dispositif expérimental en alpha plan de 6 sous-blocs de 8 objets (génotypes) répété 3 fois (3 blocs).

1.2. Pilote de transformation

Les racines de chaque génotype ont été séchées puis torréfiées pour produire respectivement des cossettes séchées et torréfiées, à l'aide d'un séchoir à circulation d'air chaud (CPM Wolverine Proctor LLC, Glasgow, Grande Bretagne) de la société Leroux SAS (Orchies, France) (**figure 2.3**).



Figure 2.3 : Pilote de transformation de la société Leroux.

Le séchage se divise en sept étapes, cinq paliers de température décroissante et deux paliers de refroidissement. Pour chacune des 144 parcelles, six kilogrammes de lamelles fraîches sont disposés dans des plateaux séparés. A la suite du séchage, et pour chaque parcelle, une partie des cossettes séchées est prélevée et broyée tandis que l'autre partie suit le processus de torréfaction (**figure 2.1**).

La torréfaction s'effectue sur les cossettes séchées. Pour cela, 750 grammes de chacune des 144 parcelles sont disposés dans des plateaux séparés. La torréfaction est suivie par colorimétrie à l'aide du Color Test Neuhaus (CTN) qui est utilisé comme unité de degré de torréfaction. Celui-ci est inversement proportionnel à la valeur du CTN, plus le produit est coloré plus le CTN est petit. Les cossettes sont torréfiées jusqu'à une valeur de CTN moyenne. Pour des raisons de confidentialités, l'indice de CTN ainsi que le temps et la température de torréfaction ne sont pas renseignés.

Les échantillons de racines fraîches sont lyophilisés. Puis, les racines lyophilisées, les cossettes séchées et les produits torréfiés sont broyés puis tamisés à 355 μm afin d'obtenir une poudre homogène débarrassée des agrégats et des grosses particules. L'ensemble est ensuite stocké à -80°C .

2. Profilage chimique ciblé des métabolites secondaires par HPLC-DAD

Pour les analyses HPLC-DAD, les métabolites secondaires majeures sont extraits, de la racine fraîche et du produit torréfié, en utilisant un mélange H₂O/CHCl₃/MeOH (30/30/40, v/v/v) (Willeman *et al.*, 2014). Ils sont analysés, identifiés et quantifiés par le système HPLC Prominence (Shimadzu, Marne la Vallée, France) (**figure 2.4**) qui est composé d'une pompe quaternaire (LC-20AD) et d'un détecteur UV à barrette de diode (SPD-20A). Les acides chlorogéniques et les lactones sesquiterpéniques sont détectés et quantifiés à leur maximum d'absorption situé respectivement à 320 et 254 nm.



Figure 2.4 : HPLC-DAD de l'équipe métabolite secondaire du laboratoire ASQV de l'institut Charles Viollette.

Une colonne Kinetex PFP™ de dimension 100 × 4,6 mm (2,6 μm) (Phenomenex, Le Pecq, France) est utilisée pour la séparation des composés. La méthode de séparation dure 16,5 minutes. L'élution se fait en mode gradient en utilisant trois solvants différents qui sont l'eau (solvant A), le méthanol (solvant B) et l'acétonitrile (solvant C) tous acidifiés avec 0,1 % d'acide *ortho*-phosphorique (**figure 2.5**).

La température du four est de 45°C et le débit est de 1,1 ml/min. La quantité d'échantillon injectée est de 5 μl.

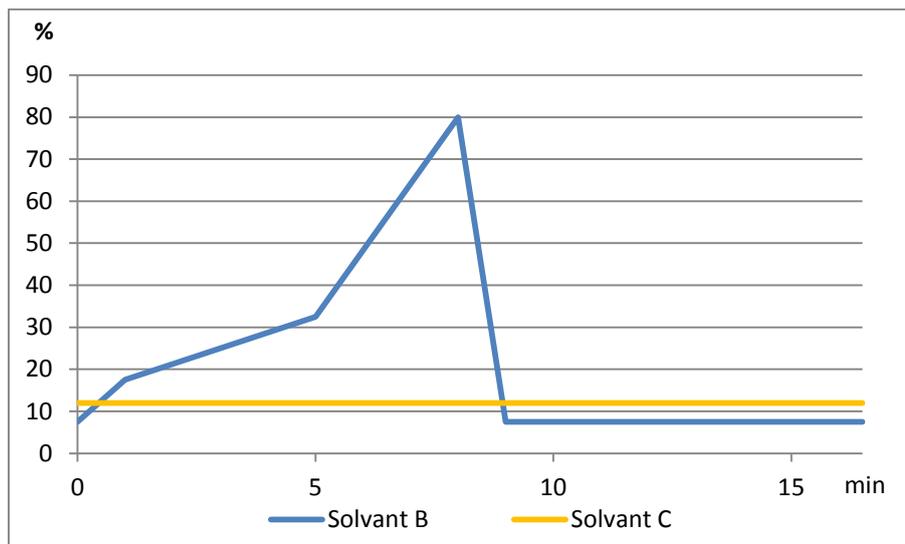


Figure 2.5 : Gradient d'élution (en %) de la méthode HPLC-DAD. Solvant A : eau avec 0,1 % d'acide *ortho*-phosphorique, solvant B : méthanol avec 0,1 % d'acide *ortho*-phosphorique, solvant C : acétonitrile avec 0,1 % d'acide *ortho*-phosphorique.

Ainsi cette méthode permet la séparation des deux acides chlorogéniques : acide 3-mono-*O*-caféoylquinique (3-CQA) et acide 3,5-di-*O*-caféoylquinique (3,5-diCQA) mais aussi des six lactones sesquiterpéniques : 11(S),13-dihydrolactucine (DHLc), lactucine (Lc), 11(S),13-dihydro-8-deoxylactucine (DHdLc), 8-deoxylactucine (dLc), 11(S), 13-dihydrolactucopicrine (DHLp) et lactucopicrine (Lp) (**figure 2.6**).

Chaque molécule possède son propre temps de rétention (TR) et l'aire de chaque signal est proportionnelle à sa quantité. La quantification absolue est réalisée par étalonnage externe grâce aux huit standards purs. A l'aide du logiciel LC Solution, les courbes d'étalonnage sont construites par régression linéaire traçant l'aire du signal en fonction de la concentration de composé. Ces 8 métabolites sont détectés et quantifiés dans la racine fraîche alors que seuls 6 le sont dans le produit torréfié (3-CQA, 3,5-diCQA, DHdLc, dLc, DHLp, Lp). Les teneurs en métabolites sont exprimées en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche (MS).

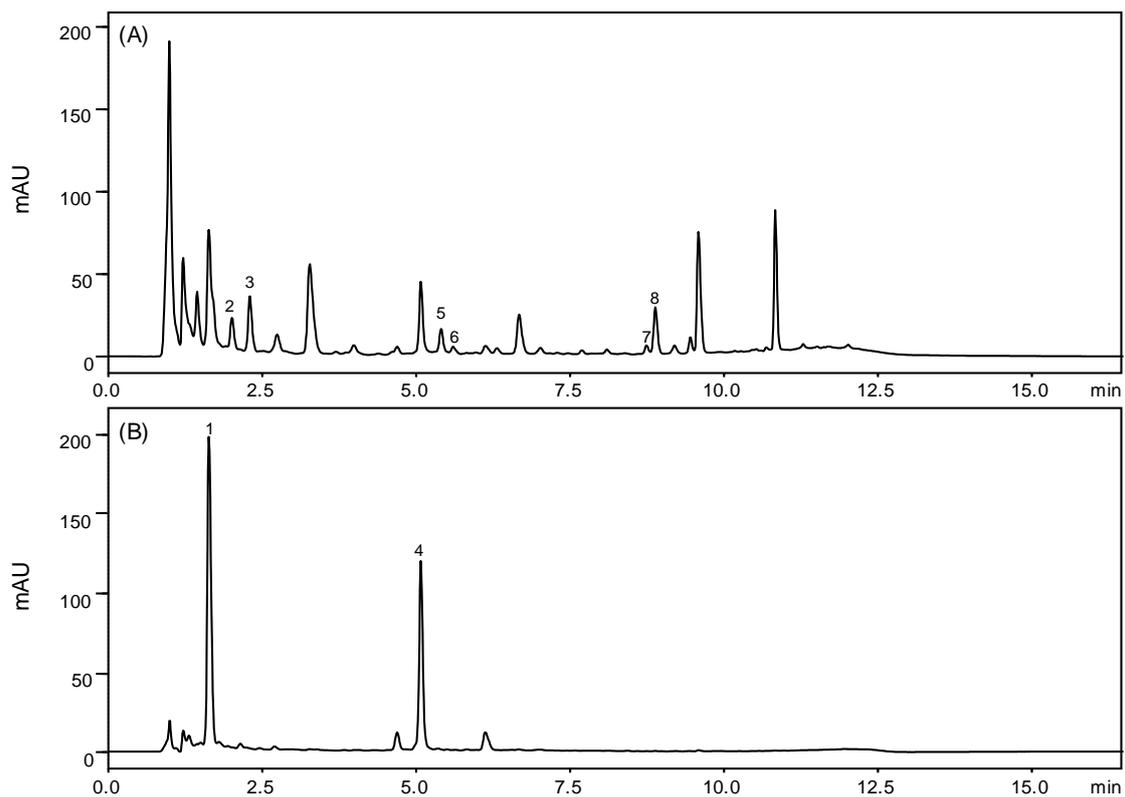


Figure 2.6 : Chromatogramme HPLC-DAD des lactones sesquiterpéniques et des acides chlorogéniques présents dans un extrait de racine de chicorée. La solution d'extraction est un mélange ternaire $\text{H}_2\text{O}/\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 30/30/30 (v/v/v) : (A) LST à 254 nm et (B) ACG à 320 nm. 1: 3-CQA, 2: DHLc, 3: Lc, 4: 3,5-diCQA, 5: DHdLc, 6: dLc, 7: DHLp, 8: Lp.

3. Profilage chimique non ciblé des composés polaires et semi-polaires par LC-QTOF-MS

Pour les analyses LC-QTOF-MS, les composés sont extraits de la racine fraîche, de la cosette séchée et du produit torréfié, en utilisant le mélange H₂O/CHCl₃/MeOH (30/30/40, v/v/v) (Willeman *et al.*, 2014). Les échantillons sont analysés sur un système LC-MS microTOF-Q (Dionex et Bruker) (figure 2.7).



Figure 2.7 : LC-QTOF-MS du Centre Génomique Fonctionnelle de Bordeaux (cgfb.fr).

La séparation se fait à l'aide d'une colonne Gemini C18 de dimension 2 × 150 mm (3 μm, 110 Å) (Phenomenex, Le Pecq, France) pendant 51 minutes selon un gradient de deux solvants qui sont l'eau acidifiée avec 0,1 % d'acide formique (solvant A) et l'acétonitrile 100 % (solvant B). La température du four est de 30°C et le débit est de 350 μl/min. La quantité d'échantillon injectée est de 5 μl. Une solution de formiate de lithium (10 mM) est injectée comme calibrant interne au niveau du spectromètre de masse, au début et à la fin de chaque analyse. Elle permet d'étalonner l'ensemble des chromatogrammes à l'aide du logiciel Data Analysis (Bruker). Un mélange des trois produits, racine fraîche, cosettes séchées et torréfiées, injecté tous les 10 échantillons, est utilisé comme contrôle qualité (QC). Le traitement XCMS peak picking / alignement (Smith *et al.*, 2006) est effectué sur les données en mode négatif, ce qui a permis de détecter 5862 signaux. Une série de nettoyage est effectuée sur l'ensemble des acquisitions. Les signaux présents dans les blancs (691), les signaux dont la fréquence d'apparition est inférieure à 50 % (1 295) et les adduits (22) sont éliminés. Ainsi il reste 3854 signaux pour l'ensemble des échantillons. Un dernier filtre par produit est appliqué. Il s'agit d'éliminer les signaux pour lesquels au moins un tiers, soit une répétition biologique sur trois, des

échantillons présente une valeur égale à 0. Ainsi, 2 718, 3 177 et 3 548 signaux sont retenus respectivement pour les échantillons de racines, de cossettes séchées et de produits torréfiés (**figure 2.8**). Les signaux sont ensuite normalisés par les QC qui les entourent pour obtenir leur quantification relative.

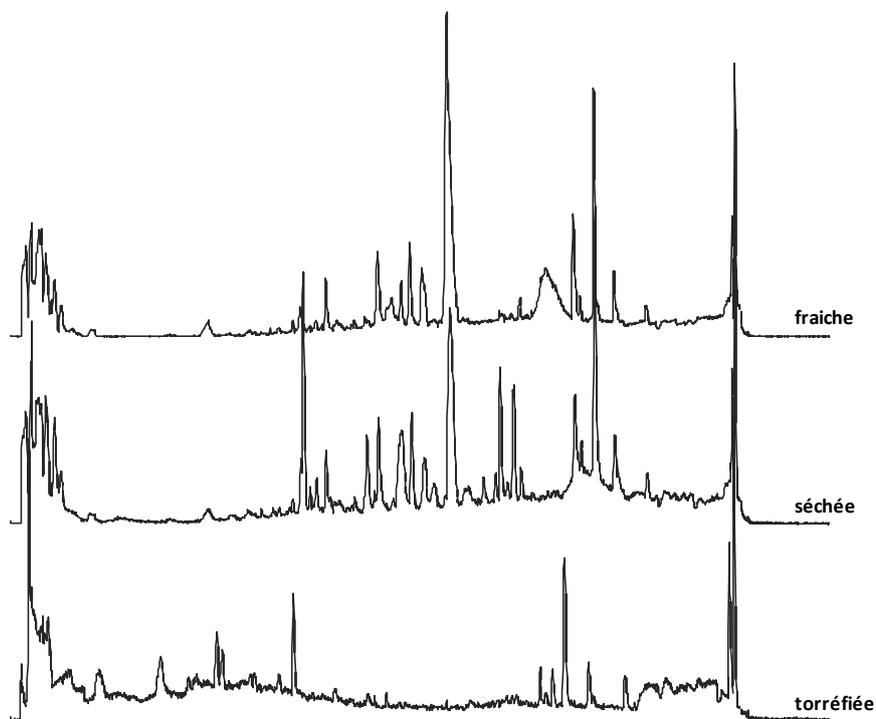


Figure 2.8 : Empreinte globale issue d'une analyse non ciblée par LC-QTOF-MS. TIC All MS (Total Ion Current chromatogram) de racine fraîche, séchée et torréfié de chicorée industrielle.

4. Profilage chimique ciblé et non ciblé des composés polaires par RMN du proton

Pour les analyses RMN-¹H, les métabolites polaires sont extraits à partir de 50 mg de matériel, de racine fraîche, de cosette séchée et de produit torréfié, par une série de mélanges hydroalcooliques éthanol/eau décrits par Moing *et al.* (2004). Ces extraits sont lyophilisés et les résidus secs sont resolubilisés dans 500 µl de tampon phosphate 100 mM contenant 3 mM d'EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) dans D₂O (oxyde de deutérium) puis titrés à pH 6 avant une seconde lyophilisation. Cette seconde lyophilisation est nécessaire pour réduire le signal résiduel de l'eau (H₂O). Les extraits secs sont conservés en atmosphère sèche avant les analyses RMN-¹H.

Pour les acquisitions de spectres RMN, les extraits sont solubilisés dans 500 µl de D₂O. Dix microlitres de TSP (3-triméthylsilyl [2,2,3,3-*d*₄] propionate de sodium) sont transférés directement dans les tubes RMN pour l'étalonnage des déplacements chimiques. Les spectres RMN-¹H sont enregistrés à 500,162 MHz et 300 K sur un spectromètre Bruker Avance (Wissembourg, France) (**figure 2.9**).



Figure 2.9 : RMN-¹H du Centre Génomique Fonctionnelle de Bordeaux (cgfb.fr).

Les spectres obtenus sont alignés en déplaçant le signal TSP à zéro. La méthode de l'ERETIC (Electronic REference To access In vivo Concentrations) est utilisée pour la quantification absolue des concentrations en métabolites (Akoka *et al.*, 1999) en utilisant des courbes de calibration du glucose. Les métabolites inconnus, nommés en utilisant la valeur médiane du déplacement chimique et la

multiplicité du groupe de résonance correspondant, sont quantifiés, quant à eux, en unités arbitraires. Les concentrations en métabolites dans les tubes RMN sont calculées dans le mode métabolite du logiciel AMIX (Bruker) qui calcule les zones de résonance. Les données sont ensuite exportées vers Excel et les métabolites sont quantifiés en utilisant la courbe d'étalonnage du glucose et la quantité de protons correspondant à chaque résonance. Pour les échantillons de racine, 29 métabolites sont quantifiés (24 connus, 5 inconnus), pour les cossettes séchées 31 métabolites sont quantifiés (24 connus, 7 inconnus) et pour les produits torréfiés 40 métabolites sont quantifiés (17 connus, 23 inconnus) (**figure 2.10**). Les teneurs sont exprimées en $\mu\text{g/g}$ de MS pour les connus et en unité arbitraire pour les inconnus.

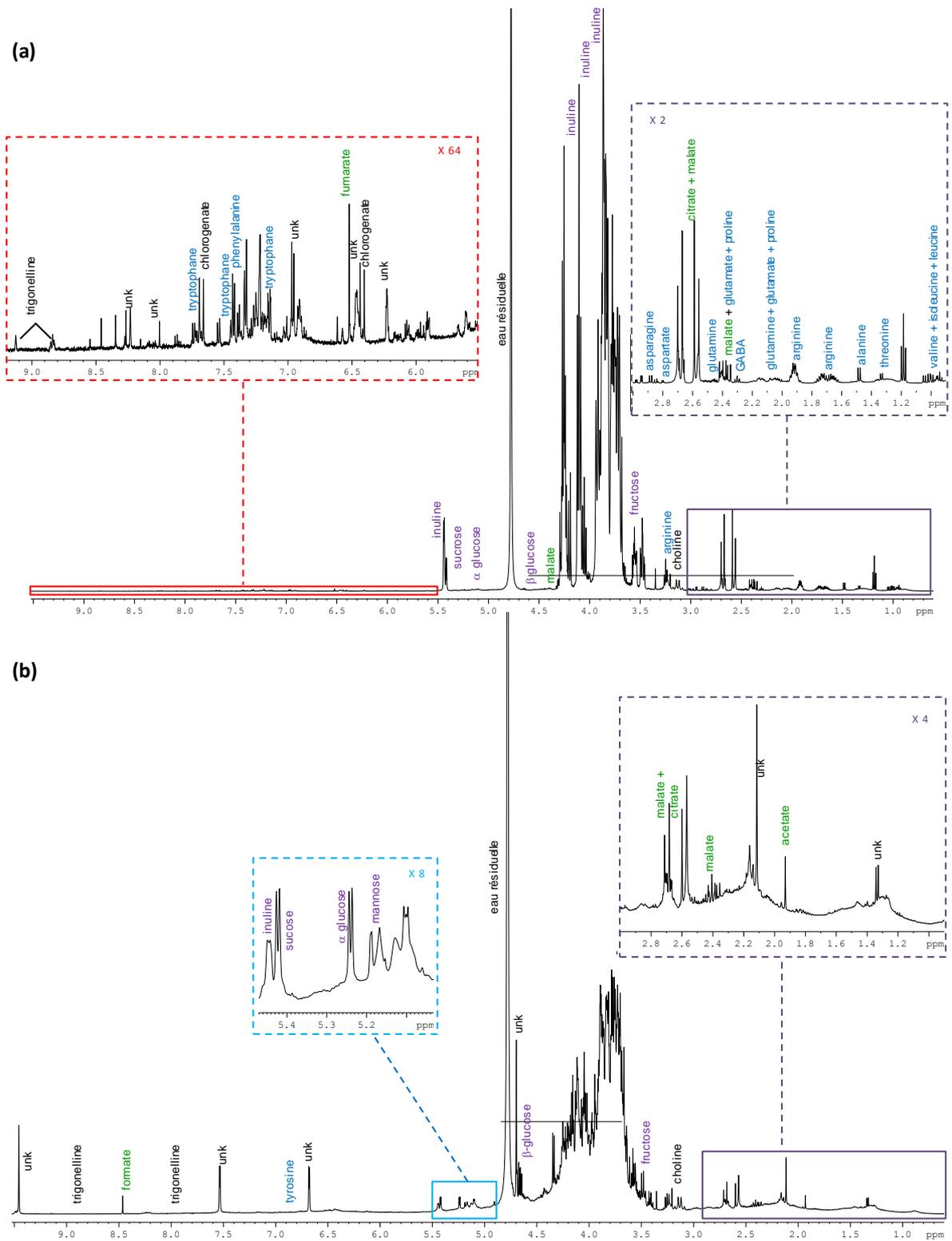


Figure 2.10 : Empreinte globale issue d'une analyse ciblée et non ciblée par RMN- ^1H de la racine fraîche de chicorée (a) et du produit torréfié (b). L'empreinte globale des cossettes séchées est similaire à celle de la racine fraîche.

5. Marquage moléculaire par marqueurs microsatellites

Des analyses de génotypage sur les 48 génotypes ont été réalisées par Thierry Cadalen, ingénieur de recherche au sein du laboratoire. Des prélèvements de feuilles au stade adulte ont été réalisés directement sur les 48 génotypes (Coutiches, 16 septembre 2012). Pour chaque génotype, le prélèvement a été réalisé sur une des 3 parcelles, à raison d'un prélèvement sur 12 plantes prises au hasard (1 feuille par plante). Ainsi, 576 feuilles au total ont été génotypées à l'aide d'une sélection de 19 marqueurs microsatellites. Ce sont des marqueurs présentant des séquences répétées en tandem (SSR) qui ont été choisis pour quatre critères :

- monocus : les marqueurs se situent sur une seule partie du génome,
- codominant : l'ensemble des allèles se distinguent,
- distribution sur chacun des 9 chromosomes pour avoir une bonne couverture du génome,
- bon index de diversité, très informatif : beaucoup d'allèles connus pour chaque marqueur.

Pour chacun des marqueurs, une paire d'amorces bordant les microsatellites et permettant de les amplifier par PCR est définie par le logiciel Primer3 version 0.3.0 (**figure 2.11**). Les produits d'amplification sont révélés par migration dans un séquenceur capillaire.

L'ADN génomique a été extrait des feuilles de chicorée en utilisant le kit d'extraction « Nucleospin 96 Plant II » (Macherey-Nagel). Un dépôt de 5 μ l d'ADN extrait est quantifié par migration sur gel d'agarose à 1% en présence d'un marqueur de taille (1 μ L de Smart Ladder, Eurogentech, France). Les quantités estimées sur gel sont utilisées pour diluer les ADN à une concentration de travail de 1 ng/ μ L. Une PCR (réaction en chaîne par polymérase) a été entreprise permettant, après dénaturation, d'hybrider les amorces couplées à un fluorochrome aux brins d'ADN, et donc d'amplifier par élongation les marqueurs microsatellites. Quatre fluorochromes différents, vert, bleu, rouge et jaune, sont utilisés pour combiner les marqueurs microsatellites sur une même plaque séquenceur. Les variations de séquence (variations de taille liées à des différences dans le nombre de répétitions) correspondent aux différents allèles microsatellites. Ils sont révélés après migration sur le séquenceur capillaire (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystem) sous la forme de pics. La révélation repose sur une migration différentielle qui se fait en fonction de la taille de chaque fragment d'ADN. Le laser du séquenceur permet de détecter les amplicons ou pics grâce aux fluorochromes associés à l'une des amorces (**figure 2.11**). Les tailles des pics en paire de bases sont standardisées et transformées en allèles en utilisant le programme GeneMapper.

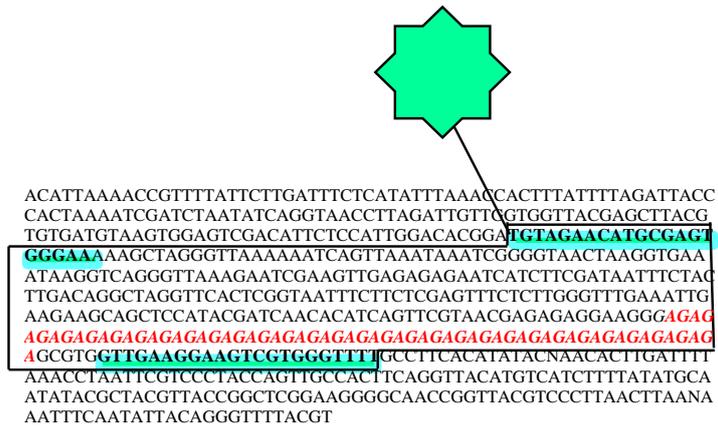


Figure 2.11 : Exemple d'un couple d'amorces (surlignées en bleu), couplé à un fluorochrome (étoile verte), bordant le marqueur microsatellite (en rouge).

6. Analyses statistiques

Afin de révéler une éventuelle variabilité chimique entre les 48 variétés de racine fraîche et un éventuel effet du processus de transformation sur la composition native, différents outils statistiques univariés et multivariés sont utilisés pour analyser l'ensemble des signaux quantifiés par HPLC-DAD, LC-QTOF-MS et RMN-¹H. La multitude d'information engendrée par la métabolomique nécessite la mise en place d'une démarche statistique rigoureuse.

Les analyses de la variance (ANOVA) à un facteur ont été réalisées en utilisant le logiciel Multi Experiment Viewer (MeV) version 4.9 ce qui a permis de trier les signaux modifiés significativement par les facteurs de l'étude (génotype et processus) pour un ensemble d'échantillons. Ces ANOVA ont été ajustées par la méthode de Bonferroni qui permet de corriger le seuil de significativité lors de comparaisons multiples.

Les classifications hiérarchiques ascendantes des données chimiques ont également été effectuées, après une normalisation automatique, en utilisant le logiciel MeV version 4.9. Ces classifications utilisent la distance euclidienne qui permet de rechercher des profils similaires et de les structurer les uns par rapport aux autres. En ce qui concerne les données de génotypage, le logiciel Power Marker version 3.25 est utilisé de façon à ce que, pour chaque marqueur, les configurations alléliques des 12 individus d'un génotype soient converties en fréquences alléliques spécifiques de ce génotype. La matrice de fréquence allélique ainsi générée est utilisée pour calculer une matrice de distances euclidiennes pour les 48 génotypes. A partir de ces distances, une classification hiérarchique ascendante est réalisée (logiciel Darwin v5.0.158) en utilisant comme critère d'agrégation la méthode de Ward qui consiste à réunir les groupes 2 à 2 ce qui permet de minimiser l'inertie inter-classe. Les classifications hiérarchiques, que ce soit pour les données chimiques ou de génotypage, permettent de visualiser si les données se structurent en groupes homogènes pour les individus.

Le logiciel R version 2.15 (Ihaka & Gentleman, 1996) a permis d'effectuer des corrélations de Pearson et de réaliser les analyses en composantes principales (ACP) des données chimiques. Quant aux données de génotypage, une analyse en coordonnées principales (PCoA) a été réalisée à partir des distances euclidiennes en utilisant le logiciel Darwin version 5.0.158. Ces analyses factorielles permettent de simplifier l'observation des données en visualisant graphiquement sans aucun *a priori* l'appartenance d'un individu ou d'une variable à un groupe donné.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Evaluation de la diversité génétique de la collection de chicorées industrielles

La diversité génotypique et phénotypique des 48 génotypes a tout d'abord été évaluée. Par une démarche statistique, un nombre de génotypes le plus représentatif possible de la diversité globale de la collection sera sélectionné selon les critères suivants :

- faible variabilité chimique entre les répétitions biologiques d'un même génotype (variabilité intra-génotypique)
- et forte diversité chimique des génotypes sélectionnés (diversité inter-génotypique).

Cette sélection permettra de respecter les exigences de l'analyse sensorielle puisqu'il n'est pas envisageable de discriminer sensoriellement plus de 10 génotypes différents, tant au niveau des compétences (effet de saturation, de lassitude etc.) du panel formé pour les propriétés organoleptiques, qu'au niveau du délai imparti voire du budget établi.

A partir du profilage chimique ciblé mené par HPLC-DAD et RMN-¹H et non ciblé par LC-QTOF-MS et RMN-¹H, la quantification absolue et relative de 2 755 signaux a pu être établie pour la racine fraîche de chicorée. Parmi ces signaux, 32 métabolites sont identifiés : 14 acides aminés, 6 lactones sesquiterpéniques, 4 sucres, 3 acides organiques, 2 acides chlorogéniques, 1 alcaloïde (trigonelline), un nutriment essentiel (choline) et le scyllitol. La multitude d'information apportée par ces 2 755 signaux ne permet pas de discriminer les variétés les unes par rapport aux autres. Dans un premier temps, nous devons écarter les signaux pour lesquelles les teneurs n'ont aucune différence significative entre les 48 génotypes. Pour cela, une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur est réalisée. L'analyse statistique, ajustée par la méthode de Bonferroni, met en évidence une différence significative (p -value < 0,05) pour 47 signaux, dont 15 sont connus : le saccharose, le scyllitol, le citrate, le malate, l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'aspartate, la glutamine, le glutamate, l'isoleucine, la leucine, la phénylalanine, la thréonine et la valine. Ce très faible nombre de signaux retenus, 1,7 % des signaux quantifiés dans la racine fraîche, indique soit une faible diversité chimique entre les 48 génotypes soit une forte variabilité chimique entre les répétitions biologiques. Pour répondre à cette interrogation, une classification hiérarchique ascendante des distances euclidiennes est effectuée à partir de la normalisation des 47 signaux sélectionnés pour les 48 génotypes (x 3 répétitions) de racine fraîche (**figure 2.12**). Cette analyse permet de visualiser la formation de 13 groupes de génotypes similaires d'un point de vue quantitatif.

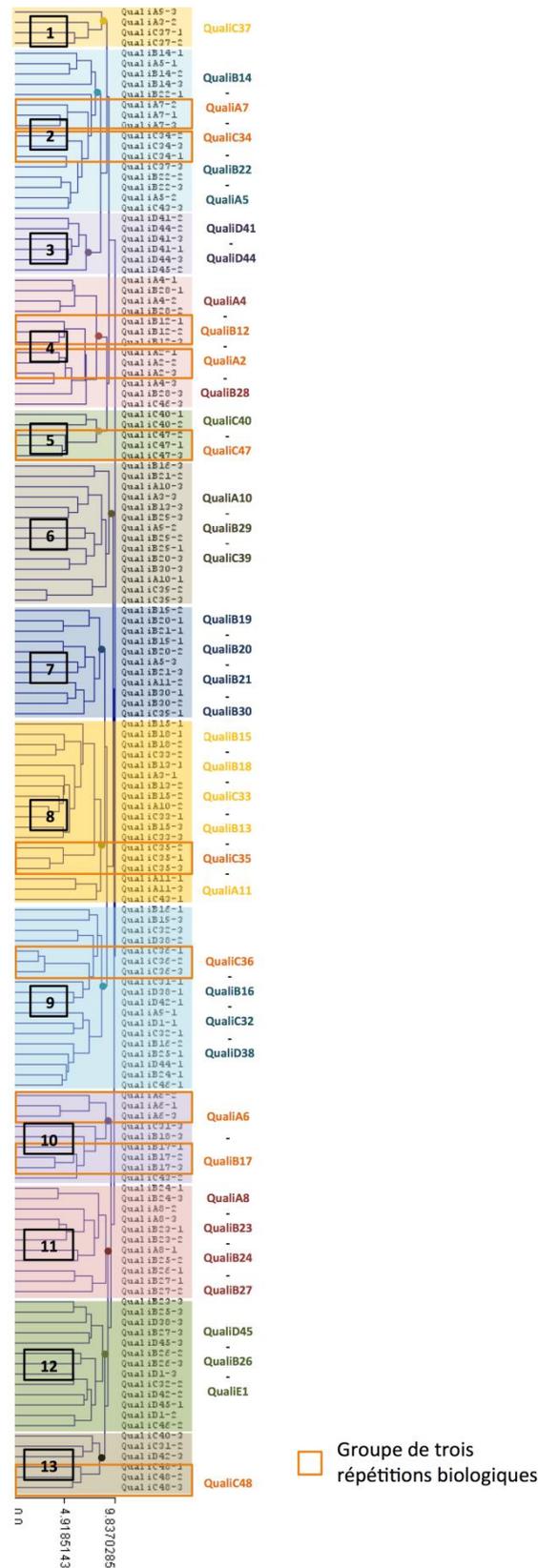


Figure 2.12 : Discrimination quantitative par classification hiérarchique des 48 génotypes de racine fraîche ($n = 3$) à partir des distances euclidiennes (logiciel MeV v4.9) obtenues par les 47 signaux sélectionnés par ANOVA (p -value $< 0,05$).

Ainsi, 15 % des génotypes ont leurs répétitions biologiques disséminées dans 3 clusters différents, il s'agit de QualiD42, QualiA3, QualiA9, QualiB25, QualiC31, QualiC43 et QualiC46. Au contraire, 85 % des génotypes regroupent au moins 2 répétitions biologiques dans le même cluster. Plus particulièrement, 46 % d'entre eux rassemblent les 3 répétitions biologiques : QualiB14, QualiB22, QualiD41, QualiA4, QualiB28, QualiB29, QualiB15, QualiC33, QualiA8 et notamment ceux encadrés en orange sur la **figure 2.12** : QualiA7, QualiC34, QualiB12, QualiA2, QualiC47, QualiC35, QualiC36, QualiA6, QualiB17 et QualiC48 pour lesquels les 3 répétitions sont regroupés sous un même nœud. Ces derniers présentent en effet une faible variation intra-génotypique pour les 47 signaux retenus. La variabilité intra-génotypique élevée ou faible ne dépend pas des groupes de génotypes.

Cette classification permet également d'observer que 40 % des génotypes du groupe A sont associés dans le même cluster que leur génotype apparenté du groupe B : QualiA4 avec QualiB28, QualiA2 avec QualiB12, QualiA5 avec QualiB14 et QualiA7 avec QualiB22. A l'inverse, QualiE1, QualiA6, QualiA8, QualiA10 et QualiA11 sont dissociés de leur génotype apparenté, puisqu'ils sont classés dans des clusters différents.

La diversité des 48 génotypes a également été étudiée au niveau génotypique. Pour cela, 12 plantes sur les 48 variétés ont été génotypées à l'aide d'une sélection de 19 marqueurs microsatellites cartographiés sur la carte de référence de la chicorée (voir la position des marqueurs sur la carte en **annexe 1**). Le **tableau 2.2** représente les statistiques descriptives pour les 19 marqueurs. L'hétérozygotie ou la proportion d'individus hétérozygotes par marqueur est voisine de 0,5 (moyenne de 0,54), à l'exception des rares marqueurs EU09C11(GL1), sw4A06(GL7), A94(GL8) et A124 (GL9) qui s'éloignent de cette valeur moyenne. Cette homogénéité, assez générale des marqueurs, pourrait être indicatrice d'une situation que partagent les génotypes de la collection. En effet, ils ont tous subi une pression due au travail de la sélection contribuant probablement à sélectionner des régions du génome tout en diminuant pour partie l'hétérozygotie naturelle des populations. Comme indiqué dans la bibliographie, les 2 coefficients notés dans le tableau Proba 1 et PIC donnent des valeurs proches et convergentes, et sont fonction à la fois du nombre d'allèles et de la distribution des fréquences alléliques. Ils quantifient la quantité de polymorphisme ou de diversité allélique révélée par un marqueur, à travers un indice variant de 0 à 1. Plus cet indice est proche de 1 et plus le marqueur met en évidence de l'information de diversité. D'après Liu (1997) rapportant une étude de Ott (1992), un locus ayant une valeur d'indice Proba 1 (Gene diversity) supérieure à 0,70 est considéré comme hautement polymorphe ou informatif chez des populations ayant des caractéristiques de populations naturelles. Même si les conclusions de Ott pourraient ne pas s'appliquer intégralement à notre collection de génotypes (facteur de biais pouvant être constitué par la sélection), il est probable que la plupart des marqueurs microsatellites choisis dans l'étude soient très informatifs ou hautement

informatifs. A l'exception de 3 marqueurs ayant un indice proche de 0,5, 84% des marqueurs ont des valeurs comprises entre 0,63 et 0,81.

A partir de l'ensemble de la collection et des 19 marqueurs, 170 allèles différents sont détectés avec en moyenne 9 allèles par marqueur, le maximum est de 13 allèles pour les marqueurs B131 (GL2), EU04F09 (GL5) et A94 (GL8) et le minimum est de 4 allèles pour le marqueur A124 (GL9). Chaque marqueur présente 1 à 3 allèles majeurs dont les fréquences alléliques varient entre 20 et 65 %, excepté pour sw5A06 (GL7) qui en présente 4 dont les fréquences alléliques sont autour de 20 %.

Tableau 2.2 : Statistiques descriptives par marqueurs microsatellites (logiciel Power Marker v. 3.25). GL : groupe de liaison sur la carte ; Nb d'allèle : nombre d'allèles détectés par marqueur ; Nb d'observation : nombre d'individus génotypés sur les 572 ; Proba 1, Hétérozygotie, PIC : 3 caractéristiques des marqueurs.

GL	Nom des marqueurs	Nb d'allèle	Nb d'observation	Proba 1 ^a	Hétérozygotie ^b	PIC ^c
1	EU09C11	11	565	0,78	0,34	0,75
1	EU0022	6	572	0,64	0,53	0,58
2	EU06G07	10	570	0,71	0,59	0,68
2	B131	13	566	0,68	0,55	0,66
2	B42	8	568	0,73	0,55	0,69
3	EU01H08	6	570	0,67	0,63	0,62
3	A149	6	563	0,75	0,57	0,71
4	EU01H12	11	572	0,72	0,56	0,69
4	sw1E08.2	10	569	0,73	0,58	0,7
5	EU04F09	13	572	0,75	0,63	0,72
5	EU0030	7	571	0,63	0,52	0,57
5	EU02A11	7	572	0,67	0,58	0,62
6	EU08C07	7	572	0,76	0,59	0,72
6	A67	10	568	0,57	0,48	0,5
7	EU05D03	9	570	0,51	0,44	0,47
7	Sw5A06	10	568	0,81	0,63	0,78
8	A94	13	572	0,79	0,65	0,76
8	EU04F07	9	569	0,53	0,42	0,48
9	A124	4	570	0,63	0,33	0,57
	moyenne	8,95	569,42	0,69	0,54	0,65

^a : probabilité que 2 allèles soient différents dans notre collection (terminologie utilisé par Power Marker est « Gene Diversity »)

^b : proportion d'individus hétérozygote,

^c : Polymorphisme Information Content : diversité allélique

L'étude du polymorphisme révèle 3 génotypes particuliers : QualiC36, QualiC35 et QualiC40. Leur profil allélique est différent des autres génotypes au regard de leur très faible nombre d'allèles, la moyenne de la collection étant de 68 allèles par génotypes (**figure 2.13**). QualiC36 possède 31 allèles sur les 170 possibles, il est homozygote pour le même allèle chez 7 marqueurs (37 % des marqueurs),

alors que les 12 autres marqueurs sont caractérisés par des structures génotypiques homozygotes et/ou hétérozygotes avec seulement 2 allèles par marqueur.

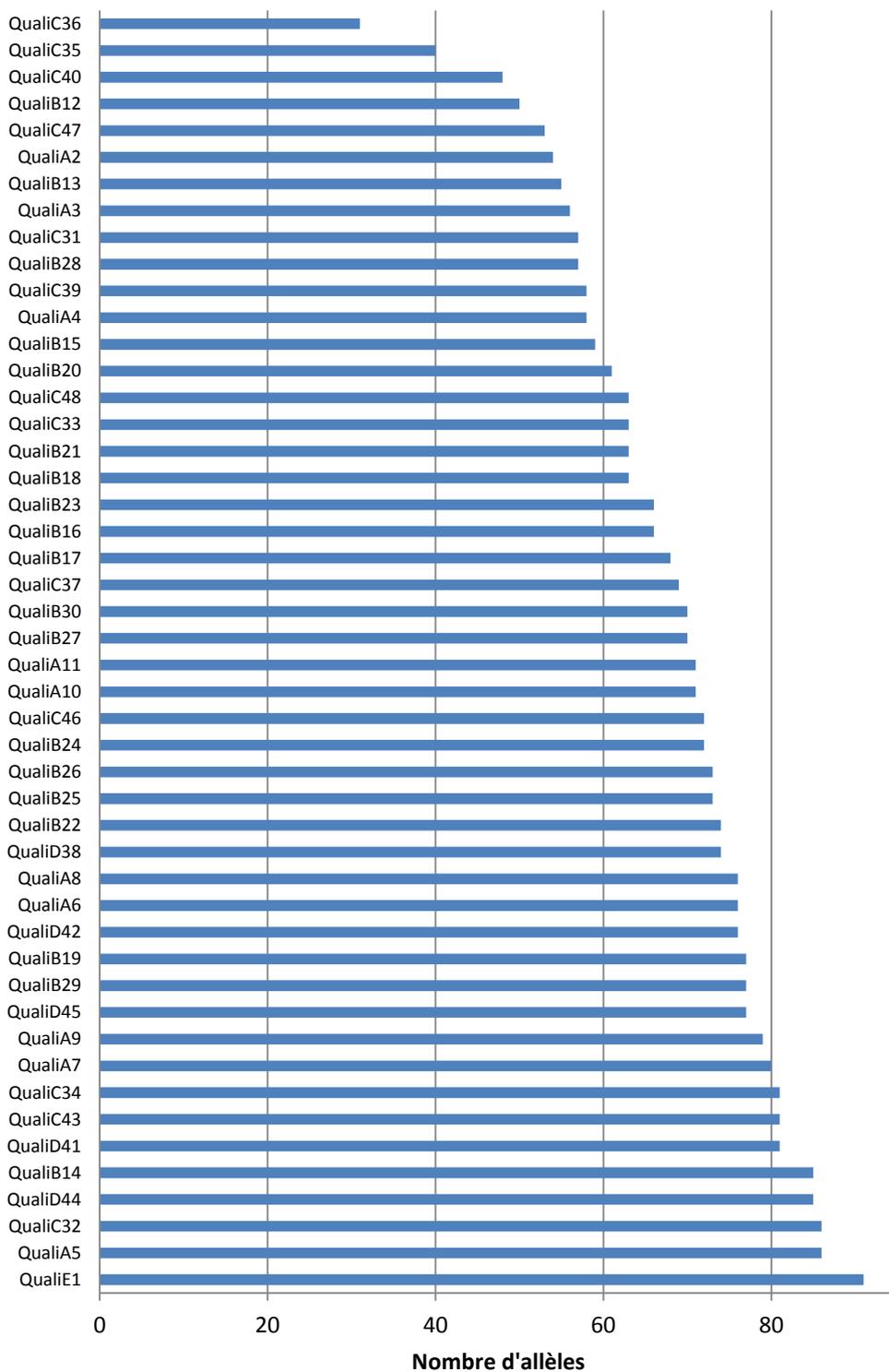


Figure 2.13 : Histogramme représentant le nombre d'allèles totaux pour chacun des 48 génotypes.

QualiC35 possède 40 allèles sur les 170 possibles, il est homozygote pour le même allèle chez 3 marqueurs, alors que 11 sont caractérisés par des structures génotypiques homozygotes et/ou hétérozygote avec 2 allèles et les 5 autres par des génotypes partageant 3 allèles. QualiC40 possède 48 allèles sur les 170 possibles, il est homozygote pour le même allèle chez 1 marqueur, alors que 8 marqueurs sont caractérisés par des génotypes avec 2 allèles, 9 marqueurs par des génotypes avec 3 allèles et 1 marqueur par des génotypes avec 4 allèles. Ces 3 génotypes ont des structures génotypiques atypiques comparativement aux autres génotypes de la collection. Il est possible d'en déduire que des régions chromosomiques entières sont probablement déjà fixées au sein de ces génotypes et d'autres en cours de fixation, certainement en relation avec le travail du sélectionneur. Ce dernier isole des plantes sur des critères phénotypiques précis et constitue des stocks de graines à travers des croisements frères-sœurs successifs ou récurrents. Cela a pu aboutir à fixer des régions tout en conservant à la fois une nature allogame et des régions du génome qui continuent de ségréger.

Un travail similaire de génotypage a été mené par Raulier *et al.* (2015), sur une collection de 19 *C. endivia* et 1 413 *C. intybus* dont des sauvages, des chicorées à salade, des Witloof et des chicorées industrielles, à l'aide de 15 marqueurs microsatellites. Ils ont mis en évidence une divergence liée à la sélection, à partir des chicorées sauvages, entre les chicorées à salade et les chicorées industrielles et Witloof. Ils ont notamment démontré que la diversité génétique est élevée pour les chicorées sauvages, les chicorées à salade et les chicorées industrielles et extrêmement faible pour le groupe de Witloof. Contrairement au groupe de Witloof, les chicorées à salade et les chicorées industrielles n'ont pas subi de sélection intensive. Ces travaux réalisés sur une plus grande collection de populations, avec des marqueurs différents et un peu moins nombreux, révèlent une diversité allélique importante au sein du pool des chicorées industrielles. Cela leur permet de structurer cette variabilité en fonction des culti-groupes, en séparant notamment le pool des chicorées industrielles belges et françaises. Dans notre cas, la diversité à structurer est différente, car elle focalise sur un pool de chicorées industrielles plus récent et plus large que l'étude de Raulier *et al.* (2015). Pour visualiser cette diversité au sein de notre collection de génotypes, une classification hiérarchique ascendante utilisant la méthode de Ward est effectuée à partir de la matrice de distances euclidiennes calculée à partir des fréquences alléliques (**figure 2.14**). Deux standards ont été ajoutés aux analyses génotypiques. Le standard 41 et le standard 17 correspondent, respectivement, à un individu de QualiC39 et QualiC35 déjà génotypés en 2009. Ce sont des individus récurrents qui sont ajoutés à chaque fois qu'un génotypage est réalisé. Ils servent de contrôle pour s'assurer de l'efficacité du génotypage et ils servent également à standardiser les données d'une série de génotypage à une autre.

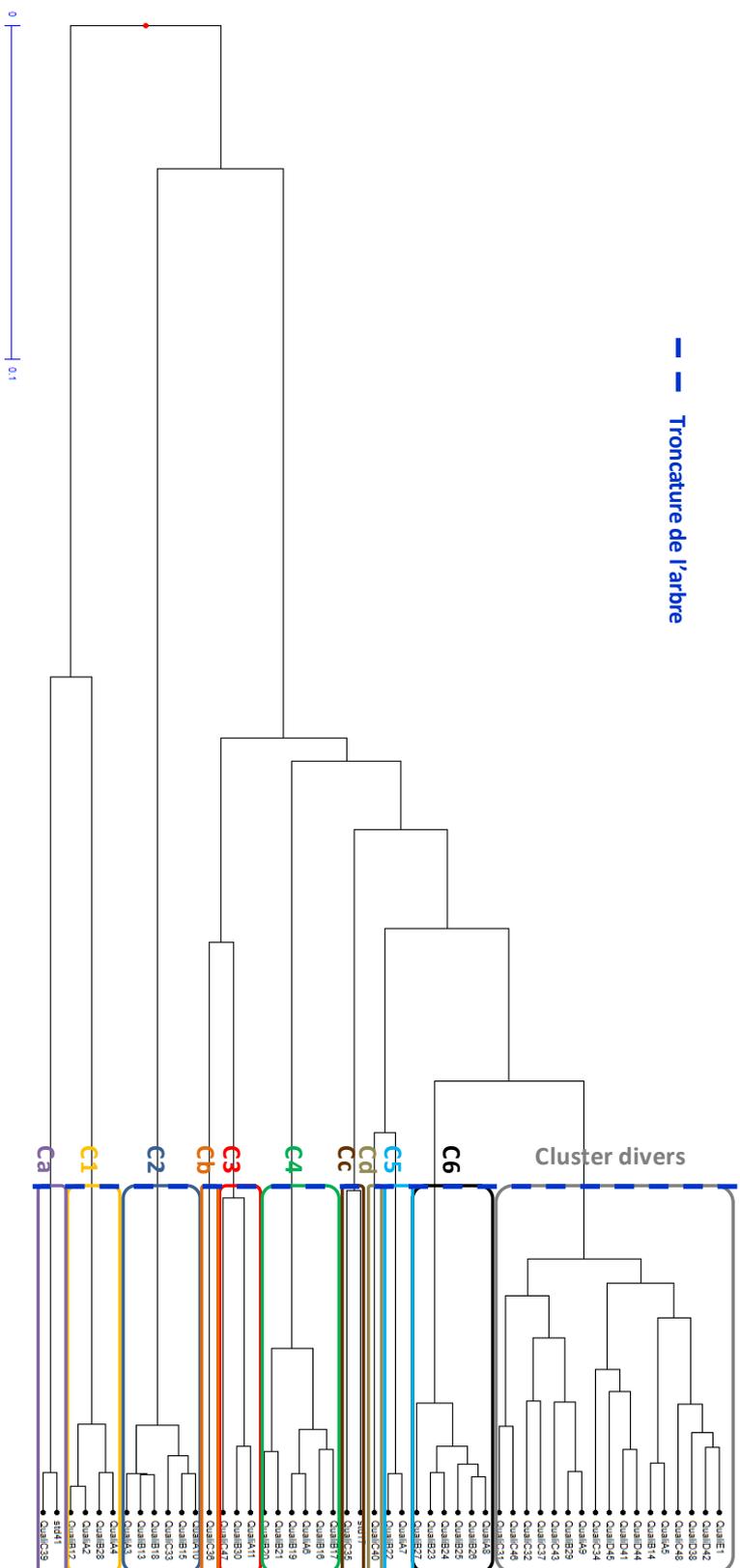


Figure 2.14 : Discrimination des génotypes par classification hiérarchique ascendante des 48 génotypes de racine fraîche à partir des distances euclidiennes (logiciel Darwin v5.0.158), obtenues après transformation des données de génotypes de 19 marqueurs microsatellites en fréquences alléliques.

Le choix de la troncature d'un arbre est souvent complexe et arbitraire. D'après des méthodes analytiques proposées par le logiciel SYSTAT, l'arbre obtenu est tronqué en 4 branches, Ca, C1, C2 et tous les autres dans un même cluster. Or ce dernier cluster n'est pas très satisfaisant, il regroupe des génotypes très apparentés entre eux. Nous proposons donc d'utiliser les standards et leur regroupement logique avec leur génotype Quali correspondant comme base de la troncature. A partir de cette troncature, 11 clusters sont ainsi mis en évidence par cette classification. Les clusters C1, C2, C3, C4, C5 et C6 regroupent 80 % des génotypes du groupe A avec leurs génotypes apparentés du groupe B : QualiA2, QualiA3, QualiA4, QualiA6, QualiA7 et QualiA8, QualiA10, QualiA11. En d'autre terme, les informations de généalogie et d'apparentement entre génotypes fournies par le sélectionneur corroborent très bien la classification obtenue. A l'inverse le cluster nommé « divers » regroupe 35 % des génotypes dont QualiA5, QualiA9, QualiE1, QualiD41, QualiD44, QualiD38, QualiD42 et QualiD45. Dans ce cas, la saturation des génotypes établie par la classification ascendante n'est pas claire. Ces observations sont confirmées par des analyses en coordonnées principales (PCoA, logiciel Darwin v5.0.158) basées sur la matrice des distances euclidiennes (**figure 2.15**).

L'impossibilité de séparer les génotypes du cluster « divers » est probablement due au fait que ces génotypes possèdent une plus grande diversité intra-génotypique comparée à la diversité inter-génotypique. En outre, le faible nombre d'individus génotypés (12 plantes seulement sur les 150 plantes constitutives de la parcelle) n'est peut-être pas un effectif suffisant pour bien appréhender la diversité allélique de plusieurs génotypes de la collection, ce qui pourrait induire des difficultés pour les discriminer. A partir de 15 marqueurs microsatellites, Raulier *et al.* (2015) mettent aussi en évidence un faible index de diversité (Nei's : distance standard) pour la variété « Magdeburg », une ancienne chicorée à racine utilisée comme substitut du café (Doré & Varoquaux, 2006), en raison du faible nombre d'individus analysé (17 plantes). Au regard du polymorphisme des génotypes constituant le cluster divers, 71 % font partis des 15 génotypes ayant le plus grand nombre d'allèles, tels que QualiE1 avec 91 allèles ou encore QualiA5 avec 86 allèles (**figure 2.13**). La multitude de combinaisons alléliques possibles suggère une forte variabilité intra-génotypique. Cette variation élevée et la faible diversité allélique inter-génotypique mis en évidence par les 12 individus génotypés, empêcheraient la distinction des 17 génotypes composant le cluster « divers ».

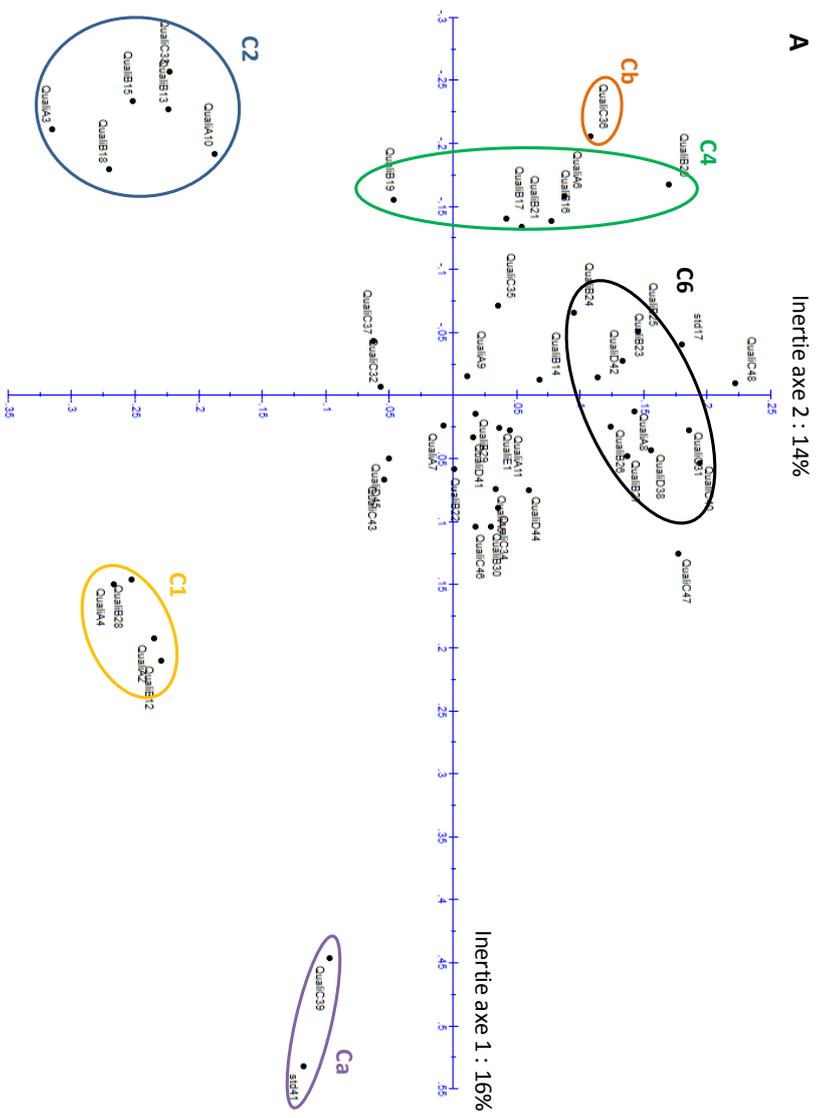


Figure 2.15 : Analyse en coordonnées principales des distances euclidiennes obtenues à partir des fréquences alléliques issues des données de génotypage (logiciel Darwin v5.0.158). A. PCoA représentant l'axe 1 (16 % de l'inertie totale) et l'axe 2 (14 %) et l'axe 3 (9 %). Code couleur équivalent à la **figure 2.14**.

Le **tableau 2.3** récapitule l'ensemble des observations obtenues par les données issues des analyses métabolomiques et des analyses de génotypage. Des constats similaires, sur la base des classifications réciproques des données chimiques et génotypiques sont observés.

Parmi les 7 génotypes ne présentant pas de répétabilité biologique pour les données métabolomiques, 71 % sont retrouvés dans le cluster divers des analyses génotypiques : QualiD42, QualiA9, QualiC31, QualiC43 et QualiC46 (**tableau 2.3 a. et e.**). Ces résultats supposent une diversité génétique intra-génotypique élevée pour ces 5 génotypes. Contrairement à cela, 10 % des génotypes regroupant l'ensemble de leurs répétitions biologiques sous un même cluster, tant au niveau des données de génotypage que chimiques, possèdent les plus faibles nombres d'allèles : QualiC36 (31 allèles), QualiC35 (40 allèles), QualiB12 (50 allèles), QualiA2 (54 allèles) et QualiC47 (53 allèles) (**tableau 2.3 c. et f.**). Il existe une correspondance entre le classement des génotypes obtenu sur la base des marqueurs génotypiques et chimiques.

Que ce soit d'un point de vue chimique ou génotypique, les résultats sont en cohérence avec les aspects généalogiques du germoplasme (**tableau 2.1**). Au niveau des données de génotypage, les liens de parenté expliquent une part de la classification. Quatre vingt pour cent des génotypes du groupe A sont associés à leur génotype apparenté du groupe B, ce qui n'est pas le cas pour QualiA5, QualiA9 et QualiE1 (**tableau 2.3 g.**). En ce qui concerne les données chimiques seul 40 % des génotypes du groupe A sont regroupés avec leur génotype apparenté du groupe B : QualiA4, QualiA2, QualiA5, et QualiA7 (**tableau 2.3 d.**).

Un cluster identique entre les deux analyses est observable, c'est celui regroupant QualiA4 et QualiA2 avec leur génotype apparenté respectif. D'après le **tableau 2.4**, ces deux génotypes du groupe A possèdent des parents en communs. Ces hiérarchisations chimie et génotypique sont donc en cohérence avec la généalogie. De la même façon, au niveau des résultats issus des données de génotypage, QualiA3 et QualiA10 ainsi que leur génotype apparenté sont également regroupés dans le même cluster. A l'inverse QualiA5 et QualiA8 ont 4 parents en commun sur 5 et pourtant ils ne sont pas rassemblés, tant au niveau des données chimiques que des données de génotypage. Cela est dû au polymorphisme élevé des individus de QualiA5, puisqu'il possède 86 allèles sur les 170 possibles (**figure 2.13**).

Tableau 2.4 : Présentation codée des croisements effectués pour l'obtention des génotypes ayant des parents communs.

Génotype	Parent(s)					Type de variété
QualiA3	P1					Hybride
QualiA10	P1					Hybride
QualiA4	P2		P3			Synthétique
QualiA2	P2					Hybride
QualiA5	P4	P5	P6	P7	P8	Synthétique
QualiA8	P4	P5	P6	P7	P26	Synthétique

Tableau 2.3 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus par les données issues des analyses métabolomiques et des analyses génotypiques. Les neufs génotypes sélectionnés sont présentés en **rouge**.

Répartition des 48 génotypes	
Analyses métabolomiques	Analyses génotypiques
<p>a.</p> <ul style="list-style-type: none"> 7 génotypes ne regroupent pas 2/3 répétitions biologiques <ul style="list-style-type: none"> QualiA3 - QualiD42 QualiA9 - QualiC43 QualiB25 - QualiC46 QualiC31 	<p>e.</p> <ul style="list-style-type: none"> 17 génotypes sont regroupés dans le cluster divers <ul style="list-style-type: none"> QualiE1 - QualiC32 QualiA5 - QualiC34 QualiA9 - QualiC37 QualiB14 - QualiD38 QualiB29 - QualiD41 QualiC31 - QualiD42
<p>b.</p> <ul style="list-style-type: none"> 22 génotypes restant, dont QualiC40, regroupent 2/3 répétitions biologiques dans le même cluster 	
<p>c.</p> <ul style="list-style-type: none"> 19 génotypes regroupent les 3 répétitions biologiques dans le même cluster <ul style="list-style-type: none"> QualiA4 - QualiB15 QualiA8 - QualiB22 QualiB14 - QualiB28 dont 10 génotypes regroupent les 3 répétitions biologiques regroupées sous un même noeud <ul style="list-style-type: none"> QualiA2 - QualiC34 QualiA6 - QualiC35 QualiA7 - QualiC36 QualiB12 - QualiC47 QualiB17 - QualiC48 	<p>f.</p> <ul style="list-style-type: none"> Génotypes particuliers : peu d'allèles <ul style="list-style-type: none"> QualiC36 : 31/170 allèles possibles QualiC35 : 40/170 allèles possibles QualiC40 : 48/170 allèles possibles QualiB12 : 50/170 allèles possibles QualiC47 : 53/170 allèles possibles QualiA2 : 54/170 allèles possibles
Cluster de génotypes respectant la généalogie	
<p>d.</p> <ul style="list-style-type: none"> 8 génotypes apparentés sont regroupés <ul style="list-style-type: none"> Cluster spécifiques (figure 2.12) <ul style="list-style-type: none"> QualiD41 avec QualiD44 (cluster 3) QualiA2 et QualiA4 avec leur génotype apparenté respectif (cluster 4) QualiB19 avec QualiB20 et QualiB21 (cluster 7) QualiA6 avec QualiB17 (cluster 10) QualiA8 avec QualiB23, QualiB24 et QualiB27 (cluster 11) 	<p>g.</p> <ul style="list-style-type: none"> 24 génotypes apparentés sont rassemblés <ul style="list-style-type: none"> Cluster spécifiques (figure 2.14) <ul style="list-style-type: none"> QualiA2 et QualiA4 avec leur génotype apparenté respectif (cluster C1) QualiA3 avec QualiB13 et QualiA10 avec QualiB15 (cluster C2) QualiC47 et QualiA11 avec QualiB30 (cluster C3) QualiA6 avec 5/6 de ses génotypes apparentés, QualiB16, QualiB17, QualiB19, QualiB20, QualiB21 (cluster C4) QualiA7 avec QualiB22 (cluster C5) QualiA8 avec ses 5 génotypes apparentés QualiB23, QualiB24, QualiB25, QualiB26, QualiB27 (cluster C6)
Analyses métabolomiques	
Analyses génotypiques	

La sélection de génotypes est effectuée sur la base :

- du matériel, c'est-à-dire de la diversité disponible en sélection, il s'agit de semences de bases des constituants des variétés commerciales du moment,
- de variables chimiques, aspects quantitatif et qualitatif,
- et de la caractérisation génotypique *via* des marqueurs microsatellites.

L'ensemble des analyses aboutit à une collection de 9 génotypes :

- QualiC36, 31 allèles, cluster 9 au niveau des analyses métabolomiques, cluster Cb pour les analyses de génotypage,
- QualiC35, 40 allèles, cluster 8 au niveau des analyses métabolomiques, cluster Cc pour les analyses de génotypage,
- QualiC40, 48 allèles, cluster 5 au niveau des analyses métabolomiques, cluster divers pour les analyses de génotypage,
- QualiB12, 50 allèles, cluster 4 au niveau des analyses métabolomiques, cluster C1 pour les analyses de génotypage,
- QualiC47, 53 allèles, cluster 5 au niveau des analyses métabolomiques, cluster C3 pour les analyses de génotypage,
- QualiB15, 59 allèles, cluster 8 au niveau des analyses métabolomiques, cluster C2 pour les analyses de génotypage,
- QualiB23, 66 allèles, cluster 11 au niveau des analyses métabolomiques, cluster C6 pour les analyses de génotypage,
- QualiB27, 70 allèles, cluster 11 au niveau des analyses métabolomiques, cluster C6 pour les analyses de génotypage,
- QualiD41, 81 allèles, cluster 3 au niveau des analyses métabolomiques, cluster Cd pour les analyses de génotypage.

Ces 9 génotypes représentent 6 et 8 clusters différents pour, respectivement, les données issues des analyses métabolomiques et de génotypage. Cette sélection permet de disposer d'une collection de référence constituée des génotypes les plus distants au point de vue chimique, en cohérence avec la majorité des données issues du marquage moléculaire, ce qui permettra, dans la suite de notre étude, de mettre en évidence des biomarqueurs de l'amertume.

Dans le but de valider cette sélection, la diversité chimique est visualisée à partir des 32 métabolites identifiés par RMN-¹H et par HPLC-DAD dans la racine fraîche de chicorée (**figure 2.16**). L'ensemble de l'ACP explique 51,81 % de l'inertie totale, CP1 expliquant 27,88 % et CP2 23,93 %. Avec un cos² supérieur à 0,5, le fumarate, la DHLc, la DHdLc, la dLc et la DHLp participent à la formation de l'axe 1. Tandis que l'arginine, l'isoleucine, la leucine, la phénylalanine, le tryptophane et la valine contribuent à la formation de l'axe 2 (**figure 2.16**, carte des variables). Cinq groupes de métabolites sont visualisés : les acides aminés, les di- et polysaccharides, les LST, les ACG et les monosaccharides. Concernant les acides organiques, le fumarate et le malate sont regroupés mais séparés du citrate. Avec une teneur moyenne de 12,2 mg/g de MS, le citrate est 3,4 fois et 160 fois plus présent dans la racine fraîche que le malate et le fumarate, respectivement. Les travaux de Gaber *et al.* (1990) ont également déterminé que le citrate est l'acide organique le plus abondant dans la racine de chicorée, alors que le fumarate n'est pas détecté dans leur étude. Du point de vue de la carte des individus, quel que soit le plan de projection (CP1 contre CP2 ou CP1 contre CP3 ou CP2 contre CP3), QualiD41 est centré sur l'ACP, il contient des teneurs intermédiaires pour les variables en jeu. En ce qui concerne les 8 autres génotypes, l'ACP reflète les effets variétaux sur les teneurs des composés. Le **tableau 2.5** renseigne sur les teneurs moyennes (mg/g de MS) en monosaccharides, di- et polysaccharides, acides aminés, acides organiques, LST, ACG, trigonelline, choline et scyllitol pour la sélection de génotypes de la racine. Les teneurs en monosaccharides, inuline, fumarate, LST, ACG, trigonelline et choline ne sont pas significativement différentes entre les 9 génotypes (*p*-value > 0,05).

Tableau 2.5 : Teneurs moyennes en mg/g de matière sèche de monosaccharide (mono.), saccharose (sacch.), inuline (inul.), acides aminés (AA), citrate, fumarate, malate, LST, ACG, trigonelline (trigo.), choline et scyllitol pour les 9 génotypes de la racine fraîche de chicorée.

mg/g de MS	mono.	di- polysaccharides		AA	acides organiques			LST	ACG	trigo.	choline	scyllitol
		sacch.	inul.		citrate	fumarate	malate					
QualiB12	8,0a	25,3bc	798,2a	19,5b	12,8ab	0,062a	3,3bd	230,9a	32,5a	0,052a	0,406a	0,632ab
QualiB15	8,1a	26,0bc	827,3a	20,0b	11,5ab	0,068a	2,6cd	191,7a	18,3a	0,066a	0,344a	0,604ab
QualiB23	6,7a	23,0c	712,1a	20,2ab	13,8a	0,052a	2,4d	139,9a	14,1a	0,060a	0,316a	0,373e
QualiB27	7,2a	26,9bc	820,3a	19,5b	13,6a	0,069a	2,7cd	207,2a	20,9a	0,059a	0,359a	0,413ce
QualiC35	8,2a	26,7bc	831,0a	22,2ab	10,9ab	0,108a	3,5bd	291,8a	30,7a	0,066a	0,422a	0,711a
QualiC36	7,7a	34,2a	915,5a	26,4a	12,6ab	0,095a	3,7bc	149,5a	14,0a	0,069a	0,408a	0,501be
QualiC40	8,3a	23,3c	768,9a	18,9b	11,9ab	0,069a	3,3bd	173,3a	18,3a	0,063a	0,379a	0,383de
QualiD41	9,5a	31,2ab	898,7a	20,4ab	13,1ab	0,067a	4,0b	190,6a	22,0a	0,065a	0,391a	0,521bc
QualiC47	8,8a	27,3bc	814,3a	22,7ab	9,6b	0,099a	6,8a	262,4a	22,0a	0,046a	0,375a	0,507bcd

Les différentes lettres au sein d'une même colonne indiquent une différence significative (*p*-value < 0,05)

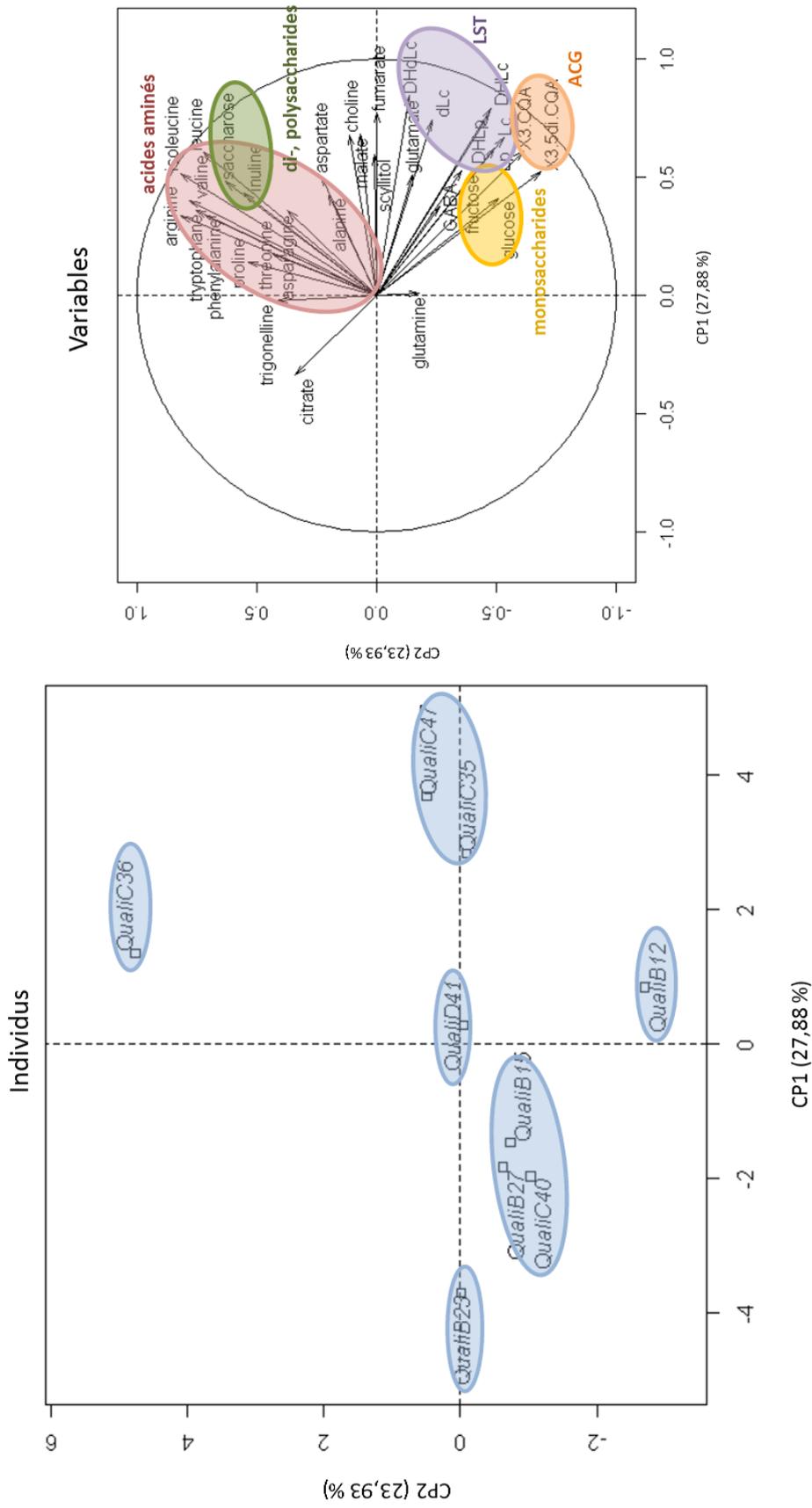


Figure 2.16 : Visualisation, par une analyse en composantes principales (avec CP1 expliquant 27,88 % et CP2 23,93 %) (logiciel R v2.15.), de la répartition des 9 génotypes selon leur composition chimique pour les 32 métabolites identifiés lors des analyses métabolomiques de la racine fraîche de chicorée industrielle.

L'axe 1 de l'ACP est défini par QualiB23 opposé à QualiC35 et QualiC47. Pour QualiB23, ces observations s'expliquent par une teneur significativement plus élevée en citrate, et des teneurs plus faibles en scyllitol et en polysaccharide, notamment pour le saccharose. A l'inverse de QualiB23, la composition de QualiC47 est plus riche en malate, et plus pauvre en citrate. Enfin, concernant QualiC35, sa composition est plus riche en scyllitol (**tableau 2.5**).

L'axe 2 est défini par QualiC36 et QualiB12, leur répartition est influencée selon une séparation entre d'une part les métabolites primaires et secondaires et d'autre part entre les di- et polysaccharides et les monosaccharides. QualiC36 est ainsi plus riche en acides aminés et en saccharose. *A contrario*, QualiB12 contient 26 % moins d'acides aminés que QualiC36, il en est de même pour QualiB15, QualiB27 et QualiC40 (**tableau 2.5**).

Les différences quantitatives au niveau chimique nous confortent dans le choix des neuf génotypes qui a été réalisé pour retenir la plus grande diversité chimique. Dans la suite de nos études, cette sélection sera utilisée pour poursuivre les analyses sur les produits transformés de chicorée et ainsi démontrer un effet du processus de transformation sur la composition en métabolites.

2. Impact du processus de transformation sur la composition chimique native de la racine de chicorée

Pour parvenir aux produits finis, la racine fraîche de chicorée subit deux étapes principales de transformation : le séchage puis la torréfaction. A partir de la collection de génotypes de référence sélectionnée à l'issue de l'analyse de diversité génétique de la collection de chicorée, l'impact du processus de transformation industrielle sur la composition native de la racine a été évalué et ceci en recherchant, par le biais d'analyses statistiques, des signaux apparaissant, disparaissant et évoluant au cours du processus de transformation.

L'ensemble des analyses métabolomiques, HPLC-DAD, LC-QTOF-MS et RMN-¹H, a permis de quantifier 3 867 signaux qui se répartissent dans les différents produits de la chicorée (**figure 2.17**). Le nombre de signaux détectés et quantifiés augmente au cours de la transformation de la racine de chicorée. La majorité des signaux sont présents dans la matière première (91 %), 78 % sont quantifiés dans les cossettes séchées et 70 % dans les produits torréfiés.

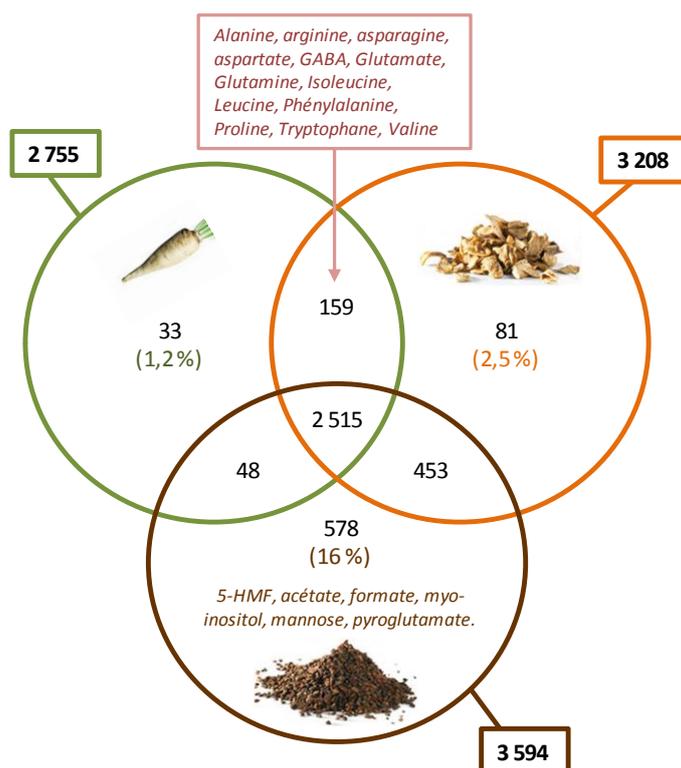


Figure 2.17 : Diagramme de Venn représentant la répartition de l'ensemble des signaux détectés et quantifiés par HPLC-DAD, LC-QTOF-MS et RMN-¹H. Racine fraîches : vert, cossettes séchées : orange, produits torréfiés : marron. Les chevauchements des cercles représentent les signaux en commun.

Le profilage chimique ciblé des ACG et des LST n'étant pas effectué dans les cossettes séchées l'impact du séchage ne peut pas être établi sur ces composés. Cependant, des changements qualitatifs et quantitatifs sont observés entre la racine fraîche et les produits torréfiés. Concernant les LST, la DHLc disparaît et les teneurs en DHLp, DHdLc, Lp et Lc diminuent respectivement de 63, 83, 85 et 86 % lors du processus de transformation. A l'inverse, la teneur en dLc augmente de 45 %. Au niveau des ACG, les teneurs en 3-CQA et en 3,5-diCQA augmentent respectivement de 94 et 93 % dans les produits torréfiés. Les résultats obtenus lors des travaux qui se sont focalisés sur l'évolution des LST, des ACG et de l'amertume au cours de la transformation de la racine (chapitre 1, Article 2), mettent en évidence une augmentation des teneurs en ACG et en LST lors du séchage puis une dégradation par la torréfaction. Le 3,5-diCQA était dégradée alors que le 3-CQA n'apparaissait pas affecté par la torréfaction. D'après Leloup *et al.* (1995) les diCQA sont partiellement hydrolysés en monomère. Cette observation est renforcée par les études de Bicho *et al.* (2011) qui démontre que les diCQA sont plus sensibles lors de la torréfaction du grain de café que les CQA. En ce qui concerne les LST, nos précédents travaux indiquent un impact du séchage sur leurs teneurs (augmentation moyenne de 46 %), un impact de la torréfaction (diminution moyenne de 86 %) et une dégradation complète de la DHLc. Ainsi, la torréfaction dégrade plus de LST que le séchage en générale. L'évolution des LST lors d'un processus thermique n'a pas encore été décrite. Toutefois, des études similaires indiquent que le processus de torréfaction dégrade les LST de la racine de chicorée (Pazola, 1987).

Le diagramme de Venn présenté en **figure 2.17**, permet de visualiser la répartition des signaux entre les 3 produits. Ainsi, cette distribution révèle deux tiers de signaux communs à la racine fraîche, aux cossettes séchées et aux produits torréfiés. Le tiers restant représente 1 352 signaux non-communs, dont 50 % sont strictement spécifiques et 50 % sont partagés entre 2 produits. La proportion de signaux propres à chaque produit augmente lors de la transformation passant de 1,2 à 2,5 % de la racine fraîche à la cossette séchée puis à 16 % dans le produit torréfié. Cette observation indique une génération par libération (ou hydrolyse), conversion ou encore néosynthèse lors du processus de transformation. Les travaux de Wei *et al.* (2012) sur la torréfaction du grain de café démontrent, par exemple, une libération de l'acide quinique par la dégradation des acides chlorogéniques. Ils démontrent également la production γ -quinide et de l'acide *sylo*-quinique par estérification et isomérisation de l'acide quinique. Mais aussi, la formation de molécules néoformées telles que le 2-furylméthanol, le γ -butyrolactone ou encore le 5-HMF.

En valeur nette, la production de signaux est majoritaire au cours du séchage (453) et elle est plus faible lors de la torréfaction (338). Lors du séchage de la racine fraîche, 16 % des signaux des cossettes séchées sont générés, dont 2,5 % leurs sont spécifiques. A l'inverse, seul 3 % des signaux de la racine fraîche disparaissent. Lors de la torréfaction des cossettes séchées, 17,5 % des signaux des produits torréfiés apparaissent. Parmi ceux-ci, six sont identifiés : le 5-hydroxyméthylfurfural,

l'acétate, le formate, le *myo*-inositol, le mannose et le pyroglutamate. A l'inverse, 7,5 % des signaux des cossettes séchées disparaissent, 2,5 % leurs sont propres et 5 % sont des signaux communs à la racine et aux cossettes séchées dont 13 sont connus : l'alanine, l'arginine, l'asparagine, l'aspartate, le GABA (acide γ -aminobutyrique), le glutamate, la glutamine, l'isoleucine, la leucine, la phénylalanine, la proline, le tryptophane et la valine, majoritairement des acides aminés (**figure 2.17**).

Quatre vingt douze pourcent des acides aminés détectés et quantifiés dans la racine fraîche de chicorée sont dégradés lors de la torréfaction. Des résultats similaires ont été publiés lors de la torréfaction du grain café. En effet, des études menées par Wei *et al.* (2012) sur le grain Arabica ont mis en évidence la diminution puis la disparition de l'acide glutamique, l'alanine, l'asparagine et le GABA, après 4 minutes de torréfaction. D'après Rössner *et al.* (1990), la consommation des acides aminés par la réaction Maillard permet la formation du pyroglutamate. Lors de notre étude, la formation de pyroglutamate est détectée dans les produits torréfiés de chicorée. Des corrélations sont effectuées entre les teneurs en pyroglutamate et en acides aminés (**tableau 2.6**). L'ensemble des acides aminés détectés et quantifiés est corrélé significativement (p -value < 0,001) à la formation de pyroglutamate. Treize d'entre eux sont corrélés négativement et un seul, la thréonine, est corrélé positivement. Ces observations sont en cohérence avec la littérature, la formation de pyroglutamate est en lien avec la consommation des acides aminés lors de la torréfaction *via* la réaction de Maillard.

Tableau 2.6: Résultats des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les teneurs en pyroglutamate et en acides aminés.

R ²	Pyroglutamate
Alanine	- 0,80***
Arginine	- 0,91***
Asparagine	- 0,90***
Aspartate	- 0,86***
GABA	- 0,87***
Glutamine	- 0,72***
Glutamate	- 0,88***
Isoleucine	- 0,89***
Leucine	- 0,91***
Phénylalanine	- 0,88***
Proline	- 0,91***
Thréonine	0,68***
Tryptophane	- 0,86***
Valine	- 0,83***

*** p -value < 0,001.

Des différences quantitatives de la composition chimique sont également constatées entre les 3 produits issus de la racine de chicorée. La **figure 2.18** illustre les résultats obtenus par les séries d'ANOVA effectuées pour chacun des 9 génotypes, à partir des 2515 signaux communs. Elle répartie les signaux en fonction de leur évolution au cours du processus de transformation.

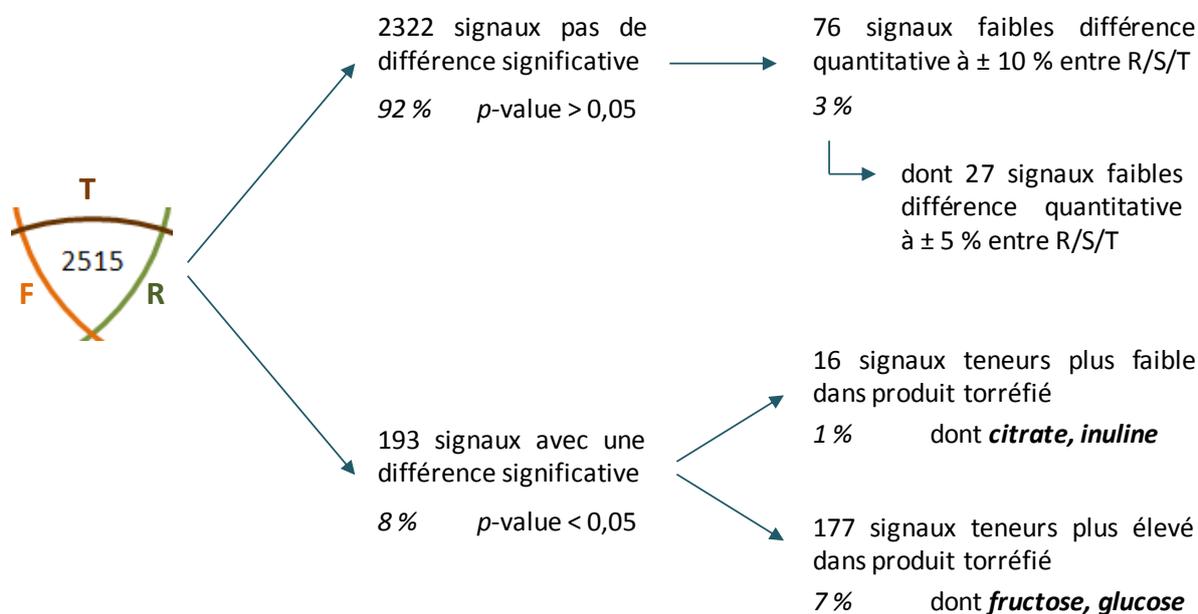


Figure 2.18 : Illustration des résultats obtenus par les tests ANOVA à un facteur ajusté par la méthode de Bonferroni (logiciel MeV v.4.9), à partir des 2 515 signaux communs aux 9 génotypes sélectionnés de racine (R), de cossette séchée (S) et de produit torréfié (T).

La majorité des signaux, 2 322 exactement, soit 92 %, ne présente pas de différence significative ($p\text{-value} > 0,05$) parmi les produits quel que soit le génotype. Trois pour cent d'entre eux, se caractérisent par une faible variation ($\pm 10\%$) de teneur entre les trois produits. Plus particulièrement, 27 signaux inconnus possèdent une variation quantitative inférieure à 5 %. Un premier groupe de signaux est ainsi détecté, ceux dont la quantité n'évolue pas au cours du processus de transformation.

Concernant les 193 signaux ayant une différence significative ($p\text{-value} < 0,05$), deux groupes de signaux apparaissent. Un premier groupe se compose de 16 signaux dont les teneurs diminuent au cours du processus de transformation, parmi lesquels deux sont connus : le citrate et l'inuline. Un deuxième groupe rassemble 177 signaux dont la teneur augmente au cours du processus, notamment le fructose et le glucose. La répartition des signaux associés à une diminution (**figure 2.19**) et ceux associés à une augmentation (**figure 2.20**) quantitative au cours du processus de transformation s'effectue différemment dans les produits de la chicorée. La projection des ACP, regroupant les individus par catégorie, se fait selon les stades de traitement. Ainsi, les axes 1 reflètent au niveau quantitatif l'effet de la torréfaction et les axes 2 celui du séchage.

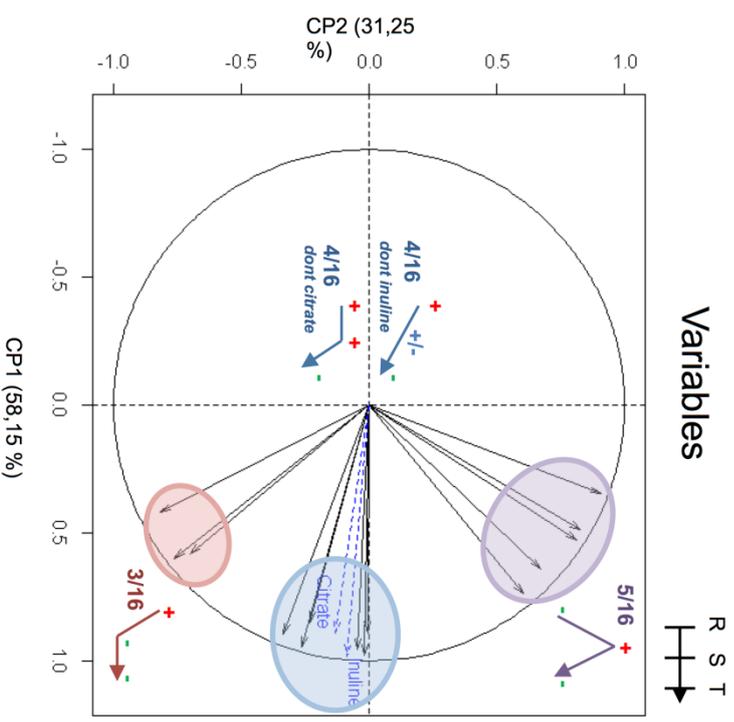
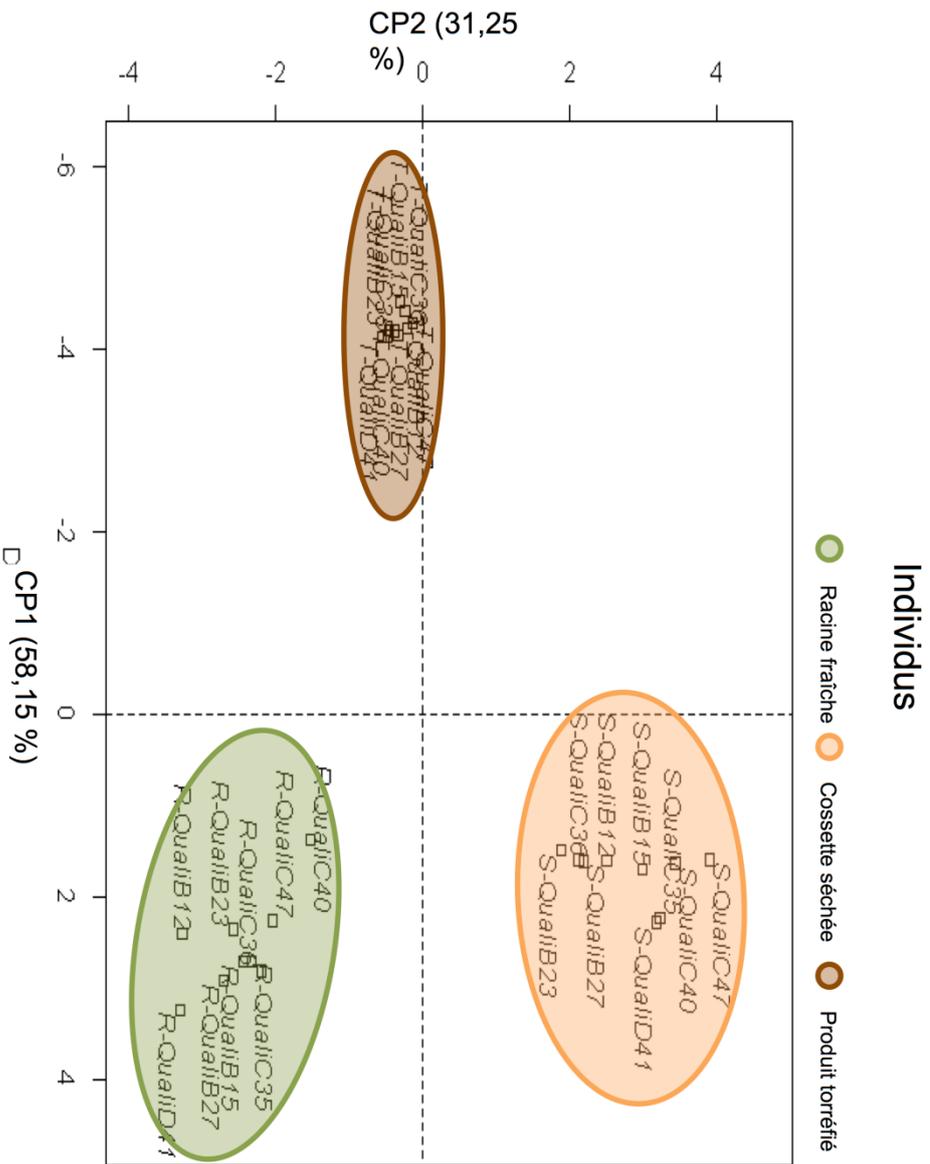


Figure 2.19 : Analyse en composante principale (avec CP1 expliquant 58,15 % et CP2 31,25 %) (logiciel R v2.15.) des 16 signaux qui diminuent de façon significativement différents (p -value < 0,05) pour les 9 génotypes de racine fraîche (R), cossettes séchées (S) et produit torréfié (T) de chicorée industrielle.

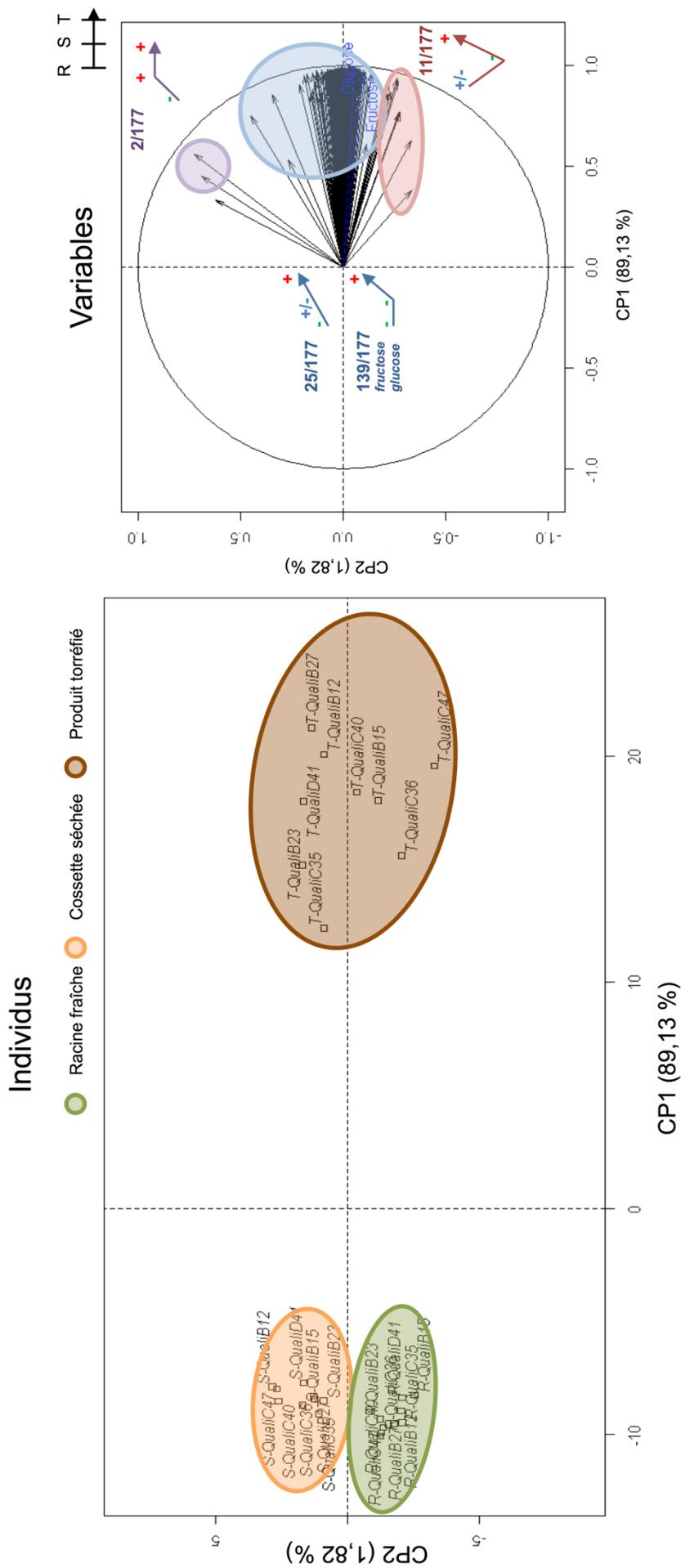


Figure 2.20 : Analyse en composante principale (avec CP1 expliquant 89,13 % et CP2 1,82 %) (logiciel R v2.15.) des 177 signaux qui augmentent de façon significativement différents (p -value < 0,05) pour les 9 génotypes de racine fraîche (R), cossettes séchées (S) et produit torréfié (T) de chicorée industrielle.

Les produits torréfiés se différencient de la racine fraîche et des cossettes séchées par des teneurs significativement (p -value < 0,05) inférieures pour les 16 signaux (**figure 2.19**, carte des variables) et supérieures pour les 177 signaux (**figure 2.20**, carte des variables). L'effet du séchage est moins ressenti sur les 177 signaux puisque les teneurs de 78,5 % d'entre eux, dont le glucose et le fructose, n'ont aucune différence quantitative (p -value > 0,05) entre la racine fraîche et les cossettes séchées. Cela explique également que l'axe 2 représente uniquement 1,82 % de l'inertie totale (**figure 2.20**). Toutefois, pour les 16 signaux, une différenciation des cossettes séchées et de la racine fraîche est observée par des teneurs contrastées pour particulièrement 8 signaux (**figure 2.19**, carte des variables). Les teneurs de 5 d'entre eux augmentent lors du séchage alors que celles des 3 autres diminuent. Ainsi, 50 % des signaux diminuant au cours du processus sont influencés dès le séchage.

L'ensemble de ces observations indique que les signaux détectés dans la racine fraîche évoluent différemment au cours du processus de transformation. Différents groupes sont détectés, il y a :

- ceux dont les teneurs restent stables lors du séchage mais diminuent (citrate) ou augmentent (fructose, glucose) lors de la torréfaction,
- ceux dont les teneurs augmentent lors du séchage mais diminuent lors de la torréfaction,
- ceux dont les teneurs diminuent lors du séchage mais augmentent lors de la torréfaction,
- ceux dont les teneurs diminuent ou augmentent lors du séchage puis restent stables lors de la torréfaction
- et ceux dont les teneurs diminuent (inuline) ou augmentent progressivement au cours du processus de transformation.

Les études de Löhmar & Theurillat (2003) sur la chicorée industrielle indiquent que la formation de la couleur, des saveurs et des composés aromatiques caractéristiques des produits torréfiés de la chicorée résultent du processus de torréfaction. Les composés tels que l'inuline, le saccharose ou encore les acides aminés libres subissent des changements partiels ou totaux principalement dus à la réaction de Maillard et à la caramélisation des sucres.

Parmi les signaux évoluant lors de la transformation, trois formes de sucres sont détectées et quantifiées, les di- et polysaccharides, et les monosaccharides. Les di- et polysaccharides regroupent l'inuline, polymère de fructose se terminant par une unité glucose, et le saccharose, disaccharide de glucose et de fructose. Les monosaccharides rassemblent le glucose, le fructose et le mannose. Nos études démontrent la diminution des teneurs en inuline et en saccharose au cours de la transformation de la racine de chicorée, alors que les teneurs en glucose et en fructose augmentent lors de la torréfaction (**figure 2.21**).

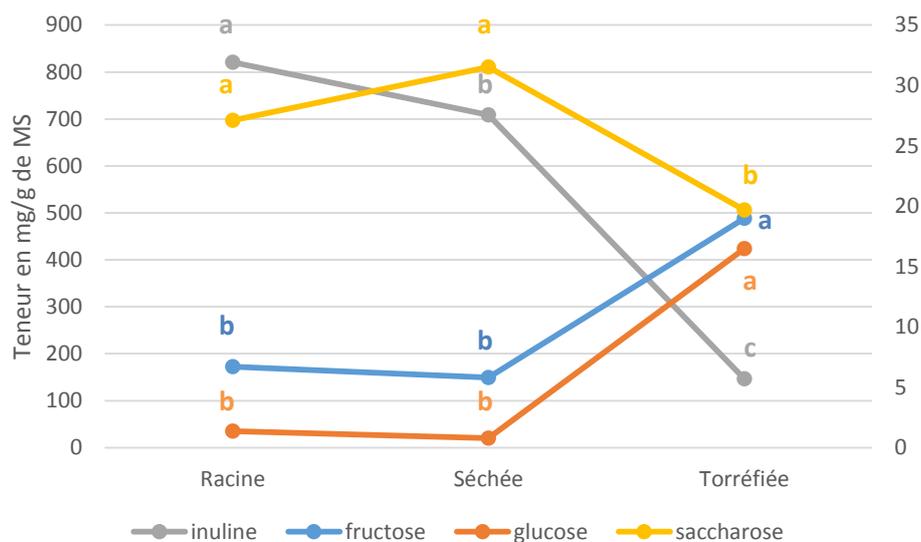


Figure 2.21 : Evolution des teneurs, en mg/g de matière sèche de l'inuline (échelle de gauche) et du fructose, glucose et saccharose (échelle de droite) au cours du processus de transformation. Les différentes lettres d'une même couleur indiquent une différence significative (p -value < 0,05).

Les études de Löhmar & Theurillat (2003) indiquent une dégradation de l'inuline et du saccharose et une augmentation des teneurs en glucose et en fructose lors de la torréfaction de la chicorée. Les travaux menés par Böhm *et al.* (2005) ont pu démontrer la libération de fructose et de glucose lors de la dégradation thermique de l'inuline, purifiée à partir de chicorée, d'artichaut et de dahlia. Dans notre étude, des corrélations sont effectuées entre les teneurs en di- et polysaccharides et en monosaccharides. Des corrélations négatives et significatives (p -value < 0,001) sont obtenues entre les teneurs en inuline et saccharose et celles en fructose et glucose (**tableau 2.7**). La libération des unités fructose et glucose s'accompagne donc de la dégradation de l'inuline et du saccharose.

Tableau 2.7 : Résultats des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les teneurs en di- et polysaccharides et en monosaccharides.

R ²	Inuline	Saccharose
Fructose	- 0,88***	- 0,55***
Glucose	- 0,93***	- 0,64***

*** p -value < 0,001.

Le processus de torréfaction consomme également les monomères issus de la dégradation des di- et polysaccharides. En effet, 28,4 mg/g de MS de monosaccharides sont générés alors que 615 mg/g de MS de di- et polysaccharides sont dégradés. Les travaux de Ginz *et al.* (2000) ont démontré la dégradation du saccharose en fructose et en glucose lors de la torréfaction du grain de café. Ces travaux et ceux de Wei *et al.* (2012) ont, également, indiqués que le saccharose, sucre principale du café vert, est le précurseur de plusieurs classes de composés comme les furannes, les aldéhydes, les acides aliphatiques et des acides organiques tels que l'acide acétique, l'acide formique ou encore les acides lactique et glycolique. Ginz *et al.* (2000), après avoir ajouté 3,5 fois plus de fructose, de glucose ou de saccharose dans le grain de café vert, ont obtenu 6 fois plus d'acide glycolique et 2 fois plus d'acide formique et d'acide acétique après la torréfaction. Aucune différence significative n'est perceptible avec le témoin pour l'acide lactique. Les rendements de formation de ces acides, lors d'une faible torréfaction, sont plus élevés pour le fructose et le glucose par rapport aux saccharoses. Cela s'explique par la liaison glycoside du saccharose qui doit d'abord être clivé pour produire des sucres réducteurs. Les études de Barlianto & Maier (1995) ont démontré la formation d'acides lors de la torréfaction de la racine de chicorée, dont l'acide acétique et l'acide formique. Des résultats comparables sont retrouvés lors de nos travaux puisque les acides acétique, formique et pyroglutamique ont été détectés uniquement dans le produit torréfié. Ainsi, des corrélations sont effectuées entre les teneurs en inuline, saccharose, fructose et glucose et les teneurs en acides acétique formique et pyroglutamique (**tableau 2.8**). Des corrélations significatives (p -value < 0,001) et négatives sont déterminées pour l'inuline et le saccharose alors que des corrélations significatives (p -value < 0,001) et positives sont obtenues pour le fructose et le glucose. L'ensemble de ces observations indique que la formation des acides formiques, acétique et pyroglutamique résulte de la dégradation de l'inuline qui en libérant les monomères de fructose et de glucose fournit les précurseurs nécessaires, parmi lesquels le glucose serait un substrat privilégié.

Tableau 2.8 : Résultats des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les teneurs en sucres et les acides organiques.

R ²	Acide acétique	Acide formique	Acide pyroglutamique
Inuline	- 0,84***	- 0,92***	- 0,92***
Saccharose	- 0,49***	- 0,66***	- 0,62***
Fructose	0,85***	0,32***	0,89***
Glucose	0,89***	0,93***	0,94***

*** p -value < 0,001.

Nos travaux indiquent que la quantité de glucose et de fructose est multipliée, respectivement, par 9,3 et 2,5 au cours du processus de transformation de la racine de chicorée. Un nouveau monosaccharide apparaît également lors de la torréfaction, il s'agit du mannose avec 2,3 mg/g de matière sèche. Les études de Ginz *et al.* (2000) réfèrent la possibilité d'une conversion entre le fructose et le glucose, lors de la torréfaction du grain de café. La transformation de Lobry de Bruyn – Alberda van Eckenstein (Hodge & Osman, 1976) permet la transformation d'un aldose, type glucose ou mannose, en cétose type fructose et inversement (**figure 2.22**). Cette réaction peut se dérouler en milieu acide, basique ou neutre.

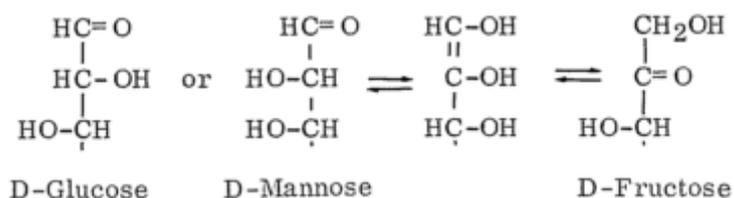


Figure 2.22 : Transformation de Lobry de Bruyn – Alberda van Eckenstein (Hodge & Osman, 1976).

D'après Eskin & Shahidi (2013), la cuisson du fructose à forte température, avec un pH compris entre 3 et 6,9, augmente fortement la teneur en glucose. Quelques traces de fructose sont détectées lorsque le glucose est chauffé dans les mêmes conditions. Les études de Löhmar & Theurillat (2003) sur la chicorée industrielle démontre un impact de la transformation sur le pH. Ils indiquent une diminution passant de 5,7, 4,7, 4,6, 4,4 dans respectivement les cossettes séchées, les produits faiblement, moyennement et fortement torréfiés. L'acidité de la racine de chicorée torréfiée permet d'envisager la conversion du fructose en glucose et/ou en mannose, justifiant leur apparition et augmentation respectives. Des corrélations entre leurs teneurs respectives confirment cette hypothèse (**tableau 2.9**).

Tableau 2.9 : Résultats des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les teneurs en fructose et en mannose et glucose.

R ²	Mannose	Glucose
Fructose	0,93***	0,95***

*** p -value < 0,001.

Au vue de ces résultats, il est très difficile de déterminer la part de fructose, de glucose et de mannose produit par la dégradation des di- et polysaccharides et par la transformation de Lobry de Bruyn – Alberda van Eckenstein. Il est également difficile d’indiquer la part des monosaccharides consommée lors de la torréfaction pour la production des nouvelles molécules, notamment des acides. Les études de Wei *et al.* (2012), ont également démontré que les sucres sont les précurseurs de plusieurs classes de composés. Il a été démontré que la production du 5-HMF est générée à partir du fructose et du saccharose au cours de la pyrolyse à haut température (Locas & Yaylayan, 2008). Ces observations ont été constatées lors de la cuisson de biscuit tels que des cookies (Ait Ameer *et al.*, 2008), lors de la torréfaction du grain de café (Murkovic & Bornik, 2007 ; Wei *et al.*, 2012) et dans la racine de chicorée torréfiée (Sannai *et al.*, 1982). Lors de notre étude, la formation de 5-HMF est détectée dans les produits torréfiés de la chicorée avec une concentration moyenne de 17,6 mg/g de MS. Cette teneur est en cohérence avec la littérature, les recherches de Loaëc *et al.* (2014) indiquent des teneurs comprises entre 0,59 et 13 mg/g dans les racines de chicorée torréfiée. Le grain de café torréfié contient des teneurs en 5-HMF comprises entre 0,3 et 2,9 mg/g de MS, la torréfaction de la chicorée forme jusqu’à 4,5 fois plus de 5-HMF (Murkovic & Pichler, 2006). L’ensemble des sucres détecté et quantifié est corrélé significativement (p -value < 0,001) à la formation du 5-HMF (**tableau 2.10**) Des corrélations positives sont établies pour le glucose, le fructose et le mannose et négative pour l’inuline et le saccharose. Cela est cohérent étant donné que la dégradation de l’inuline et du saccharose est liées à la production de fructose et de glucose. Une part des monomères issus de la dégradation de l’inuline et du saccharose est utilisée dans la formation du 5-HMF.

Tableau 2.10 : Résultats des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les teneurs en 5-HMF et en fructose, glucose, mannose, saccharose et inuline.

R ²	Fructose	Glucose	Mannose	Saccharose	Inuline
5-HMF	0,84***	0,95***	0,97***	- 0,73***	- 0,93***

*** p -value < 0,001.

Au vue de l’ensemble des observations, la consommation de molécules natives et notamment la consommation des acides aminés et celle des sucres (di- poly- et monomères) n’est pas totalement expliquée. Lors de la torréfaction, 640 mg/g de matière sèche de composés connus sont dégradé alors que seul 53,6 mg/g de matière sèche sont produits. Cette différence peut s’expliquer par la production

de plus de 500 signaux inconnus et spécifiques aux produits torréfiés. Plusieurs études sur la chicorée torréfiée font état de la réaction de Maillard, notamment pour la formation de composés volatils (Baek & Cadwallader, 1998 ; Löhmar & Theurillat, 2003 ; Fadel *et al.*, 2008) De nombreux travaux sur la réaction de Maillard démontrent la possibilité de nombreuses combinaisons acide aminé – sucre, avec des proportions différentes, pouvant entraîner la génération de multitude de molécules néoformées encore non identifiées.

Parmi ces molécules formées, lors de la torréfaction, il existe des composés aromatiques tels que les pyrazines, les pyrroles, les thiazoles, les oxazoles ou encore les oxazolines. Les pyrazines sont des composés aromatiques très puissants qui ont été identifiées dans presque tous les aliments transformés y compris les produits à base de soja, le fromage fondu, le café, le thé et les noix de pécan grillées (Maga & Sizer, 1973 ; Maga, 1981). Koehler & Odell (1970) ont démontré la formation de méthylpyrazines et de diméthylpyrazines avec un système sucre – asparagine. Ils indiquent que le fructose offre de meilleur rendement à l'inverse de l'arabinose. Ils suggèrent que le rendement et le type de pyrazine sont déterminés par la nature du sucre. Les travaux de Baek & Cadwallader (1998) et de Fadel *et al.* (2008) indiquent la présence de nombreuses pyrazines dans la racine de chicorée torréfiée dont trois, 2-éthyl-6-méthylpyrazine, 2-éthyl-3,6-diméthylpyrazine et 2-éthyl-3,5-diméthylpyrazine ont en commun des arômes de noisette. Les pyrroles sont un groupe important de composés aromatiques. La formation de dérivés pyrroles a été identifié dans de nombreux systèmes sucre – acide aminé (Ferretti & Flanagan, 1971 ; Shigematsu *et al.*, 1972 ; Ferretti & Flanagan, 1973 ; Rizzi, 1974). Par exemple, Shaw & Berry (1977) décrit la formation du 2-acétylpyrrole et du 5-méthylpyrrole-2-carboxyaldéhyde dans le système fructose – alanine. Les études de Baek & Cadwallader (1998) et de Sannai *et al.* (1982) ont identifié des pyrroles dans la racine de chicorée torréfiée dont les N-furfurylpyrrole, le N-furfuryl-2-acétylpyrrole et le N-furfuryl-2-formylpyrrole. D'autres composés aromatiques tels que les thiazoles sont identifiés dans le café, les cacahuètes grillées et les chips de pomme de terre (Stoll *et al.*, 1967a ; Stoll *et al.*, 1967b ; Walradt *et al.*, 1971 ; Buttery & Ling, 1974). Ce groupe de composés est aussi retrouvé dans la chicorée torréfiée en plus faible quantité comme le benzothiazole (Sannai *et al.*, 1982 ; Fadel *et al.*, 2008). Les oxazoles et oxazolines, quant à eux, ont été identifiés dans les composés volatils du café (Stoffelsma & Pypker, 1968) et des cacahuètes grillées (Lee *et al.*, 1981). Le rôle de ces composés dans la saveur des aliments a été rassemblé dans la revue de Maga (1978). Ils participent aux saveurs sucré, noisette, végétale, boisé ou encore champignon. Jusqu'à aujourd'hui, ces composés n'ont pas été identifiés dans la racine de chicorée torréfiée.

Les travaux de Baek & Cadwallader (1998) ont identifié d'autres groupes de composés tels que les aldéhydes, les cétones et les furanes. Le 2-furaldéhyde (furfural), produit de caramélisation des sucres, est le furane le plus important dans la racine de chicorée torréfiée. Il serait probablement important en tant que précurseur dans la formation d'autres composés aromatiques.

Parmi les 578 signaux inconnus spécifiques du produit torréfié, il est possible de retrouver des pyrazines, des pyrroles, des thiazoles, des cétones, des aldéhydes ou encore des furanes. Toutefois, aucun nom ne peut être proposé sur ces inconnus car aucun standard n'est disponible et l'identification de plus de 500 composés n'est pas possible dans le délai imparti.

CONCLUSION

Les analyses métabolomiques et les analyses génotypiques ont permis de rendre compte de la diversité génétique et chimique au sein de notre collection de génotypes. A partir de la comparaison des données, 9 génotypes représentatifs de la collection ont été sélectionnés : QualiC35, QualiC36, QualiC47, QualiC40, QualiB12, QualiB15, QualiB23, QualiB27 et QualiD41.

L'analyse métabolomique des 9 génotypes de la racine fraîche, des cossettes séchées et des produits torréfiés, a permis de mettre en évidence une évolution des métabolites connus et des signaux au cours du processus de transformation. De façon générale, l'avancée du processus s'accompagne d'une apparition, d'une disparition des signaux mais aussi d'une augmentation ou d'une diminution des teneurs relatives aux signaux. A partir des 3 867 signaux se répartissant dans les produits de chicorée, 65 % sont communs aux 3 produits, 2 755 décrivent la racine fraîche, 3 208 décrivent les cossettes séchées et 3 594 décrivent les produits torréfiés.

Le processus de séchage produit 16 % de signaux et conduit à la dégradation de 3 % de signaux. La torréfaction, quant à elle, produit plus de signaux avec 17,5 % dont le 5-HMF, l'acide acétique, l'acide formique, le *myo*-inositol, le mannose et le pyroglutamate, mais dégrade aussi plus de signaux avec 7,5 % dont majoritairement des acides aminés. Toutefois, qu'il s'agisse du séchage ou de la torréfaction, le processus génère plus de signaux qu'il n'en modifie, voir n'en dégrade.

Concernant les deux tiers des signaux communs aux trois produits, les analyses statistiques des données chimiques ont mis en évidence des signaux n'évoluant pas au cours du processus de transformation, puisque 27 signaux ont ± 5 % de variation quantitative. Ils peuvent potentiellement jouer le rôle d'indicateurs de la qualité de la matière première. En effet, quels que soient le génotype et le stade de transformation, leurs quantités restent constantes. Par exemple, des études ont été menées pour contrôler la croissance et la maturité des plantes, une compréhension accrue des changements métabolomiques lors du développement et de la maturation des fruits peut aider à développer de nouvelles stratégies pour améliorer la durée de vie et la qualité des fruits après récolte (Matas *et al.*, 2009). Sánchez Pérez *et al.* (2011) identifient et quantifient les composés les plus abondants dans les tomates, y compris les sucres, les acides aminés et les acides organiques. Ils ont constaté que l'acide γ -aminobutyrique (GABA) est un bon marqueur pour la surveillance du processus de maturation tandis que les teneurs en fructose, acide citrique et acide malique sont dépendants de la variété. On peut imaginer utiliser la même démarche pour contrôler le séchage et la torréfaction.

D'autres groupes de variables communs aux trois produits sont mis en avant par les analyses statistiques. Il s'agit des 177 signaux pour lesquels les teneurs augmentent, dont le fructose et le glucose, et des 16 signaux dont les teneurs diminuent, dont l'inuline et le citrate, au cours du processus de transformation.

L'ensemble de ces observations a permis de faire des corrélations significatives entre :

- la dégradation des acides aminés et l'apparition de pyroglutamate dans les produits torréfiés,
- la dégradation des di- et polysaccharides et l'augmentation des monosaccharides tout au long du processus,
- la consommation du fructose et l'augmentation du glucose et du mannose par conversion,
- la consommation des sucres et l'apparition de l'acide acétique, de l'acide formique, du pyroglutamate et du 5-HMF dans les produits torréfiés,

Toutefois, l'ensemble des modifications ne peut pas être totalement expliqué du fait du grand nombre de molécules non identifiées et surtout par la multitude des combinaisons possibles.

CHAPITRE 3 :

**Influence du degré de torréfaction sur la
composition de la racine – Conséquence sur
l'amertume des produits torréfiés**

INTRODUCTION

Les travaux précédents ont permis de sélectionner 9 génotypes de référence au sein d'une collection et de décrire l'impact du processus de transformation sur la composition native de la racine de chicorée. De façon générale, le processus de transformation s'accompagne de modifications quantitative et qualitative des signaux. Les évolutions de la composition ont été étudiées et des corrélations ont pu être établies entre la dégradation de molécules natives et l'apparition de composés néoformés tels que le 5-HMF ou encore le pyroglutamate. Toutefois, l'ensemble des modifications n'a pas pu être expliqué à cause de la possibilité de nombreuses combinaisons entre les molécules natives, suite à la réaction de Maillard ou encore à la caramélisation, pouvant entraîner la génération de multitude de molécules néoformés encore non identifiées. En résumé, ces travaux ont démontré l'influence du processus de transformation sur les modifications de la composition chimique native de la racine de chicorée.

L'objectif de l'étude présentée dans ce chapitre est (i) de confirmer l'impact de la torréfaction sur la composition chimique native et (ii) de caractériser l'évolution sensorielle au cours de ce processus. Pour cela, l'intensité de torréfaction est modulée et trois degrés ont été retenus : une torréfaction faible, moyenne et forte. L'hypothèse est que la modification de cette étape de torréfaction engendre des profils chimique et sensorielle différents. L'intégration de ces données doit permettre l'identification d'une (des) molécule(s) responsable(s) de l'amertume des produits torréfiés de la chicorée.

La chicorée torréfiée est consommée sous forme de boissons. Différents produits existent : les grains de chicorée, la chicorée liquide et la poudre soluble. La chicorée liquide est obtenue après extraction à l'eau chaude des grains torréfiés et la poudre soluble après atomisation de la chicorée liquide. Dans notre étude, nous travaillons donc sur le grain torréfié car suite au processus de torréfaction il ne subit pas d'autres transformations. Les grains de chicorée torréfiés sont préparés par décoction par les consommateurs. Ce principe consiste à placer les grains dans l'eau bouillante maintenue à température pendant une durée variable entre 15 à 20 minutes. L'ensemble est ensuite filtré afin d'être consommé. Ainsi, pour être dans les mêmes conditions que le consommateur, des décoctions alimentaires sont réalisées à partir des produits obtenus par torréfaction à 3 degrés différents des racines des 9 génotypes. Une analyse métabolomique est réalisée pour évaluer les compositions chimiques de ces extraits et déterminer l'impact de la torréfaction et du génotype sur celles-ci. Des analyses ciblées et non ciblées sont menées par RMN-¹H, HPLC-DAD et LC-QTOF-MS. En parallèle, un profilage organoleptique, effectué par un panel d'experts de la société Adrianor (Tilloy-lès-Mofflaines, France), est mené sur l'ensemble des décoctions. Enfin, les données

métabolomiques et sensorielles sont intégrées et corrélées par l'analyse statistique afin de mettre en avant des molécules impliquées dans l'amertume des produits torréfiés de la chicorée.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels biologiques

Les analyses métabolomiques et sensorielles sont effectuées sur des produits torréfiés issus de la racine de chicorée industrielle pour les 9 génotypes préalablement sélectionnés (n = 3), QualiB12, QualiB15, QualiB23, QualiB27, QualiC35, QualiC36, QualiC40, QualiD41 et QualiC47. Les torréfactions des cossettes séchées sont réalisées comme ceci a été décrit dans le chapitre 2. La torréfaction est suivie par colorimétrie à l'aide du CTN. Trois niveaux de torréfaction sont recherchés :

- CTN 'light' (L) correspond aux échantillons faiblement torréfiés,
- CTN 'medium' (M) correspond aux échantillons moyennement torréfiés,
- CTN 'dark' (D) correspond aux échantillons fortement torréfiés.

Des problèmes techniques n'ont pas permis la réalisation des différentes torréfactions sur les trois répétitions biologiques. La torréfaction moyenne (CTN 'medium') a été conduite la première, l'ensemble des répétitions a été torréfié. Dans un second temps, la torréfaction forte (CTN 'dark') n'a pas été menée sur la totalité des répétitions. Seule 100 % de la répétition 1 et 92 % de la répétition 2 ont été torréfiées à cause d'un départ de feu dans le pilote. En raison de sa dangerosité, cette torréfaction ne sera pas reproduite. Enfin, la torréfaction faible (CTN 'light') a été conduite en dernière. Le départ de feu ayant causé la perte de matériel, la production du dernier niveau de torréfaction a nécessité de rassembler les répétitions 1 et 2. La répétition biologique numéro 3 étant la seule commune au CTN 'medium' et 'light', elle a été choisie pour chaque génotype et répétée trois fois techniquement. Pour avoir un aperçu de l'impact d'une torréfaction élevée sur les composantes chimiques et sensorielles, la répétition 2 du génotype QualiB12 (choisit sans *a priori*), sera analysée pour le CTN 'dark' (**tableau 3.1**).

Tableau 3.1 : Récapitulatif des répétitions torréfiées selon les trois degrés de torréfaction. Les répétitions représentées en orange sont celles utilisées pour les analyses chimiques et sensorielles.

Génotype	Répétition	CTN 'light'	CTN 'medium'	CTN 'dark'
QualiB12	1	torréfiées	torréfiée	torréfiée
	2	ensemble	torréfiée	torréfiée
	3	torréfiée	torréfiée	pas torréfiée
QualiB15	1	torréfiées	torréfiée	torréfiée
	2	ensemble	torréfiée	pas torréfiée
	3	torréfiée	torréfiée	pas torréfiée
QualiB23	1	torréfiées	torréfiée	torréfiée
	2	ensemble	torréfiée	torréfiée
	3	torréfiée	torréfiée	pas torréfiée
QualiB27	1	torréfiées	torréfiée	torréfiée
	2	ensemble	torréfiée	torréfiée
	3	torréfiée	torréfiée	pas torréfiée
QualiC35	1	torréfiées	torréfiée	torréfiée
	2	ensemble	torréfiée	torréfiée
	3	torréfiée	torréfiée	pas torréfiée
QualiC36	1	torréfiées	torréfiée	torréfiée
	2	ensemble	torréfiée	torréfiée
	3	torréfiée	torréfiée	pas torréfiée
QualiC40	1	torréfiées	torréfiée	torréfiée
	2	ensemble	torréfiée	torréfiée
	3	torréfiée	torréfiée	pas torréfiée
QualiD41	1	torréfiées	torréfiée	torréfiée
	2	ensemble	torréfiée	torréfiée
	3	torréfiée	torréfiée	pas torréfiée
QualiC47	1	torréfiées	torréfiée	torréfiée
	2	ensemble	torréfiée	torréfiée
	3	torréfiée	torréfiée	pas torréfiée

2. Décoction alimentaire

Afin d'être dans les conditions de consommation, les 9 génotypes de CTN 'light' (répétition 3, n = 3), les 9 génotypes de CTN 'medium' (répétitions 3, n = 3) et le génotype Quali12 du CTN 'dark' (répétition 2, n = 3), soit 57 échantillons, subissent une décoction alimentaire. Pour cela, 10 ml d'eau ultra pure préalablement chauffés à 85°C (\pm 5°C) sont ajoutés à 200 mg d'échantillons. L'ensemble est infusé pendant 20 minutes au bain marie à 80°C avec une légère agitation. A la suite de cette étape, les échantillons sont décantés puis filtrés à l'aide d'un filtre à café disposé sur un entonnoir (**figure 3.1**). Ce filtrat est ensuite centrifugé à 30 000 g, à 4°C pendant 10 minutes.

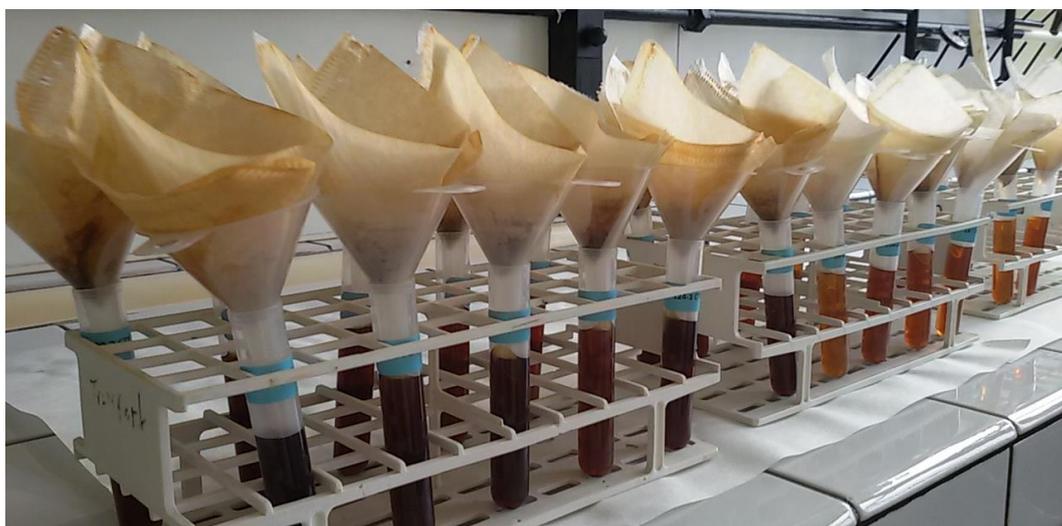


Figure 3.1 : Filtration des extraits de décoction alimentaire qui seront utilisés pour les analyses métabolomiques et sensorielles.

3. Analyses métabolomiques

3.1. Profilage chimique ciblé des métabolites secondaires par HPLC-DAD

Pour l'analyse chromatographique en phase liquide, les surnageants des décoctions alimentaires sont filtrés à l'aide d'un système de plaque de filtration (0,45 µm) fixée à une plaque de collecte, puis l'ensemble est centrifugé à 5 000 rpm à 4 °C pendant 5 minutes. Ces filtrats sont ensuite analysés par HPLC-DAD Prominence (Shimadzu, Marne la Vallée, France) afin d'identifier et de quantifier les métabolites majeurs de la chicorée en utilisant les mêmes paramètres que ceux décrits dans le chapitre 2 (page 111), à savoir les 2 acides chlorogéniques (3-CQA, 3,5-diCQA) et les 6 lactones sesquiterpéniques (DHLc, Lc, DHdLc, dLc, DHLp, Lp). Toutefois, pour des raisons de compatibilité avec le circuit HPLC, l'acide *ortho*-phosphorique utilisé précédemment est remplacé par l'acide formique, le gradient reste inchangé. Les teneurs en métabolites sont exprimées en µg/g de matière sèche (MS).

3.2. Profilage chimique non ciblé des composés polaires par LC-QTOF-MS

Pour les analyses en spectrométrie de masse, les surnageants des décoctions alimentaires sont également filtrés à l'aide d'un système de plaque de filtration (0,45 µm) fixée à une plaque de collecte, puis centrifugé à 5 000 rpm à 4 °C pendant 5 minutes. Un profilage chimique non ciblé des composés polaires et semi-polaires est effectué par LC-MS micrOTOF-Q (Dionex et Bruker) en utilisant les paramètres décrits dans le chapitre 2 (page 114). Pour ces analyses, le contrôle qualité (QC), injecté tous les 10 échantillons, est composé d'un mélange de 2 échantillons CTN 'medium', 2 échantillons CTN 'light' et d'un échantillon CTN 'dark'.

Le traitement par XCMS peak picking / alignement ainsi que l'annotation des isotopes et des adduits sont effectués par l'interface Galaxy : workflow4metabolomics (Giacomoni *et al.*, 2014) en utilisant les modules décrits dans la **figure i.15**. Ces analyses ont permis la détection de 3 037, 3 028 et 2 972 signaux pour, respectivement, les produits faiblement, moyennement et fortement torréfiés. Enfin, ces signaux sont normalisés par les QC qui les entourent. Chaque signal est quantifié de manière relative.

3.3. Profilages chimiques ciblé et non ciblé des composés polaires par RMN-¹H

Pour les analyses RMN, les surnageants des décoctions alimentaires sont dilués par 2,8 pour être dans la même gamme de concentrations que les analyses du chapitre 2 et ainsi garder les mêmes paramètres. Ces extraits sont ensuite lyophilisés et les résidus secs sont solubilisés dans 500 µl de

tampon phosphate 200 mM contenant 2 mM d'EDTA préparé dans D₂O puis titrés à pH 6 avant une seconde lyophilisation. Cette seconde lyophilisation est nécessaire pour réduire le signal résiduel de l'eau (H₂O). Les extraits secs sont conservés en atmosphère sèche avant les analyses RMN-¹H quantitatives enregistrées à 500,162 MHz et 300 K sur un spectromètre Bruker Avance (Wissembourg, France) comme décrit dans le chapitre 2 (page 116).

L'acquisition par RMN-¹H a permis de détecter et de quantifier 5 sucres (glucose, saccharose, inuline, mannose, et fructose), 6 acides organiques (citrate, fumarate, malate, lactate, formate et acétate), 3 acides aminés (tyrosine, valine et isoleucine), 2 molécules néoformées (5-HMF et pyroglutamate), 1 alcaloïde (trigonelline), 1 nutriment essentiel (choline), le *myo*-inositol et un de ses isomères : le scyllitol (aussi appelé *scyllo*-inositol) et 18 métabolites inconnus. Les teneurs sont exprimées en µg/g de MS pour les connus et en unité arbitraire pour les composés inconnus.

4. Analyses sensorielles

4.1. Qualification du panel

Les analyses ont été effectuées par la société Adrianor (Tilloy-lès-Mofflaines, Pas-de-Calais). Dans un premier temps, les candidats sont évalués selon leur aptitude à reconnaître les saveurs sucrée, salée, amère et acide (**tableau 3.2**). Ces tests permettent de détecter d'éventuelles incapacités comme ici l'agueusie (perte du goût) ou encore la dysgueusie (altération du goût), et ainsi effectuer une présélection du panel.

Tableau 3.2 : Dispositif du test de reconnaissance des saveurs.

Saveurs	Sucré	Salé	Amer	Eau	Acide
Concentration	6 g/l	1,2 g/l	0,4 g/l	/	0,7 g/l
N° codification	789	896	365	546	023
	888	346	303	423	657

Dans un second temps, ils sont soumis à différents tests comme des tests de détection du daltonisme (**figure 3.2**) ou encore des tests de logique (**figure 3.3**) afin d'évaluer leur capacité à émettre un raisonnement.

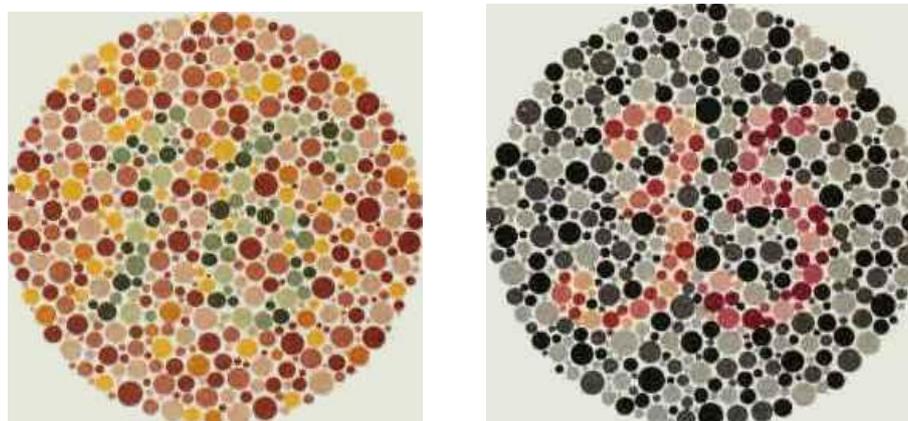


Figure 3.2 : Exemple de test de détection du daltonisme, il s'agit de visualiser les numéros dans les deux figures. Si aucun numéro n'est perçu par le candidat, il est probablement porteur d'une anomalie de la vision des couleurs.

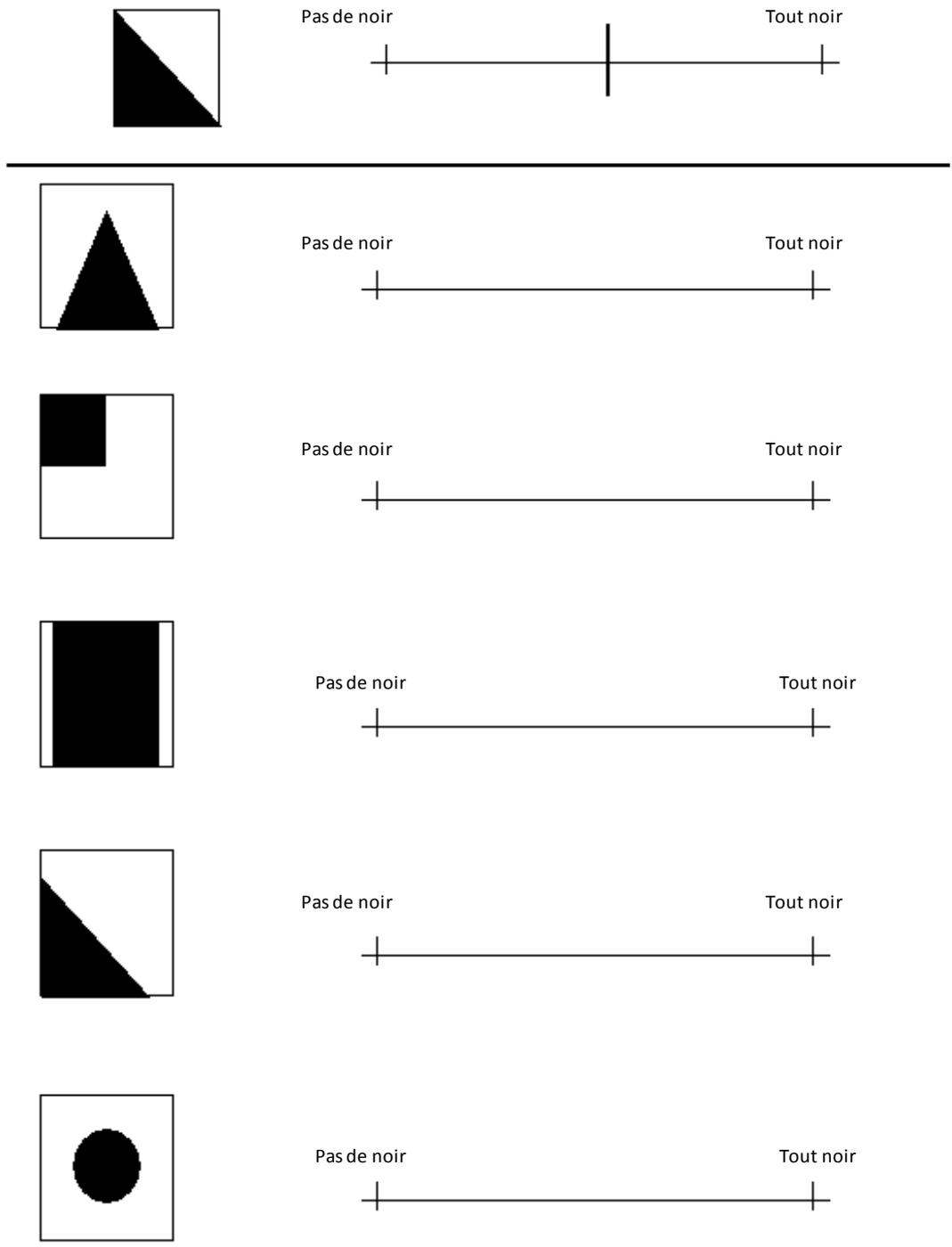


Figure 3.3 : Exemple de test de logique. Il consiste à estimer la proportion que représente la surface noircie par rapport à la surface totale du carré.

4.2. Entrainement du panel

Les membres du panel, préalablement sélectionnés, subissent plusieurs entrainements de classement des 4 saveurs qui sont l'amertume, le sucré, le salé et l'acide (**tableau 3.3**). Ces séances permettent d'entraîner le panel sur la répétabilité des réponses quantitatives mais aussi de déterminer la capacité de discrimination des panélistes afin de détecter l'hyper- et/ou l'hyposensibilité à une saveur.

Tableau 3.3 : Dispositif du test de classement des saveurs.

Saveurs	Acide				Amer				Sucré				Salé			
Concentration (g/l)	C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3	C4
	0,4	0,6	0,8	1	0,4	0,6	0,8	1	5	7	9	11	0,5	1	1,5	2

Les candidats valident leur entrainement lorsque leur répétabilité est inférieure à la marge fixée par l'animateur sensoriel, ici 20 %, afin d'éliminer les candidats dont les tests ne sont pas répétables. Cette marge est fixée selon que l'on choisit d'être plus restrictif ou non. Une fois que les membres du panel ont validé leur entrainement, les tests de notations sur les produits chicorée (cossettes, concentré et soluble) peuvent commencer. Cette deuxième étape permet de familiariser les panélistes à la description de produits spécifiques à la chicorée.

4.3. Génération de descripteurs et entrainement

A partir d'un vaste « espace produit » de chicorée, représenté par la cossette fraîche (racine fraîche), du grain torréfié commercial, du grain torréfié de l'usine Leroux et du grain torréfié du pilote de transformation, les membres du panel doivent identifier les descripteurs discriminants des produits de la chicorée. Ces descripteurs sont des termes utilisés pour nommer une saveur qui décrit d'un point de vue sensoriel les produits. Après suppression des descripteurs peu pertinents, termes redondants, à connotation hédonique ou à vocation quantitative, 13 descripteurs sont sélectionnés lors de trois séances de génération. Enfin, un référent sensoriel est associé pour chaque descripteur afin d'entraîner les panélistes en identification et en notation (**tableau 3.4**). Pour cela, 8 séances sont mises en place.

Tableau 3.4 : Liste des 13 descripteurs et de leur référent.

Descripteurs	Référents sensoriels	Protocole
Acide	Acide malique	0,7 g/l d'eau
Amer	Caféine pure	0,5 g/l d'eau
Astringent	Acide tannique	0,5 g/l d'eau + 0,1 g/l d'acide ascorbique
Caramel blond	Arôme caramel FT2615 Eurospechim	0,05 g/l d'eau froide
Caramel brun	Nappage caramel marque VAHINE	Déjà préparé, à déguster à la cuillère
Céréale (blé)	Germes de blé marque GERBLE	Infuser 20 g/l dans de l'eau chaude pendant 15 minutes, puis filtrer
Endive cuite	Endive crue « Perle du Nord » Leclerc	Eau de cuisson d'endive après filtration : 1 endive pour 1l d'eau, cuire pendant 20 minutes à l'étouffée avec 0,1 g/l d'acide ascorbique
Noisette	Poudre de noisette marque VAHINE	Déjà préparé, à déguster à la cuillère
Réglisse	Arôme réglisse FT2573 Brenntag	0,05 g/l d'arôme Réglisse FT2573 dans l'eau froide
Sucré	Saccharose	
Terreux / boisé	Terpinene-1-ol-4	0,02 g/l d'eau
Tisane / végétal	Tisane au tilleul Marque Repère Leclerc	4 sachets pour 1l d'eau, infuser pendant 5 minutes
Torréfié / grillé	Grains de café noir pur Arabica, Marque Repère Leclerc	25 g de grains pour 1l d'eau, infuser pendant 15 minutes

4.4. Profil sensoriel

Un total de 19 décoctions alimentaires de produit torréfié est soumis au profil sensoriel : les 9 génotypes de CTN 'light' (répétition 3), les 9 génotypes de CTN 'medium' (répétitions 3) et le génotype QualiB12 du CTN 'dark' (répétition 2) (**tableau 3.1**).

Les décoctions sont obtenues à partir d'une infusion à 70 °C de 15 g d'échantillon dans 1 litre d'eau chaude pendant 20 minutes. L'ensemble est ensuite filtré à l'aide d'un filtre à café. Les échantillons sont présentés les uns après les autres de façon aléatoire. Cet ordre est différent pour chaque membre du panel. Les panelistes sont placés en lumière rouge dans les cabines de dégustation pour atténuer les différences éventuelles de couleur.

Afin d'éviter la saturation du goût en bouche lors des analyses, qui fausserait les évaluations, les échantillons sont divisés en deux groupes :

- les 9 génotypes du CTN 'medium',
- les 9 génotypes du CTN 'light' + le génotype CTN 'dark'.

Chaque échantillon est évalué lors de deux sessions séparées, par chacun des juges experts, pour les 13 descripteurs précédemment générés (**tableau 3.5**). La note est placée sur une échelle graduée de 0 à 10 (**figure 3.4**).

Tableau 3.5 : Organisation des sessions.

Session	Groupe	Nb de juges
1	CTN 'medium'	10
2	CTN 'medium'	11
3	CTN 'light' + CTN 'dark'	11
4	CTN 'light' + CTN 'dark'	10

PROFIL CHICOREE N°088 du 14/10/2014

Nom : _____ Prénom : _____ CABINE N°: _____

Goûtez l'échantillon de chicorée N°088 et notes l'intensité perçue sur une échelle de 0 à 10 pour les critères cités ci-dessous.

Rappelez-vous que pour chaque produit : 0 = absence de perception

EN BOUCHE (présent dès la 1ère seconde)

SAVEUR SUCRE

Echantillon 088

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Absente</i>					<i>Très intense</i>					

SAVEUR AMBRE

Echantillon 088

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Absente</i>					<i>Très intense</i>					

ASTRINGENT

Echantillon 088

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Absent</i>					<i>Très intense</i>					

SAVEUR ACIDE

Echantillon 088

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Absente</i>					<i>Très intense</i>					

CARAMEL BRUN

Echantillon 088

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Absent</i>					<i>Très intense</i>					

CARAMEL BLOND

Echantillon 088

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Absent</i>					<i>Très intense</i>					

NOISETTE GRILLÉE

Echantillon 088

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Absent</i>					<i>Très intense</i>					

TORREFIÉ/GRILLÉ

Echantillon 088

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Absent</i>					<i>Très intense</i>					

REGLISSE

Echantillon 088

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Absent</i>					<i>Très intense</i>					

ENDIVE CUITE

Echantillon 088

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Absent</i>					<i>Très intense</i>					

TISANE/VEGETALE

Echantillon 088

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Absent</i>					<i>Très intense</i>					

FERRUX/BOISE

Echantillon 088

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Absent</i>					<i>Très intense</i>					

CEREALE

Echantillon 088

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Absent</i>					<i>Très intense</i>					

Autres sensations perçues /

.....

Figure 3.4 : Questionnaire présenté aux membres du panel d'experts pour le profilage sensoriel des produits torréfiés de la chicorée. Chaque produit est noté de 0 (absence) à 10 (très intense) pour les 13 descripteurs.

5. Analyses statistiques

Afin de mettre en évidence un effet de la torréfaction sur la composition chimique et une évolution des propriétés sensorielles au cours de la torréfaction de la racine de chicorée, différentes méthodes de statistiques univariées et multivariées sont utilisées.

Les analyses de la variance (ANOVA), ajustées par la méthode de Bonferroni, et les tests de Student ont été réalisés en utilisant le logiciel Multi Experiment Viewer (MeV) version 4.9. Ces tests ont permis la discrimination respective, des signaux et des descripteurs sensoriels affectés significativement par la torréfaction.

Le logiciel R version 2.15 (Ihaka & Gentleman, 1996) a été utilisé pour réaliser des analyses en composantes principales (ACP) des données chimiques. Ces analyses factorielles permettent de simplifier l'observation des données en visualisant graphiquement sans aucun *a priori* l'appartenance d'un individu ou d'une variable à un groupe donné. Les corrélations de Pearson ont aussi été effectuées avec le logiciel R version 2.15 sur les données chimiques et sensorielles. Elles ont également été utilisées afin d'associer la composition chimique à des valeurs sensorielles dans le but de déterminer des biomarqueurs de l'amertume.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Influence des différents niveaux de torréfaction sur la composition chimique des produits torréfiés

De nombreuses études ont démontré l'impact de la torréfaction sur la composition du grain de café vert (Moreira *et al.*, 2012 ; Wei *et al.*, 2012), de la bière (Coghe *et al.*, 2006) mais aussi sur des produits de boulangerie, notamment sur les biscuits (Ait Aneur *et al.*, 2007 ; Gökmen *et al.*, 2007 ; Gökmen *et al.*, 2008) et le pain (Ramirez-Jiménez *et al.*, 2000 ; Capuano *et al.*, 2008). Nos précédents travaux ont mis en évidence une influence de la torréfaction sur la composition native de la racine de chicorée. Dans le but de confirmer ces résultats, l'impact de la torréfaction est évalué à l'aide de produits faiblement, moyennement et fortement torréfiés.

Les analyses métabolomiques menées par HPLC-DAD, LC-QTOF-MS et RMN-¹H sur les décoctions alimentaires des produits torréfiés a permis de détecter et de quantifier 3 081, 3 068 et 3 009 signaux pour les produits faiblement (CTN 'light'), moyennement (CTN 'medium') et fortement (CTN 'dark') torréfiés, respectivement (**figure 3.5**).

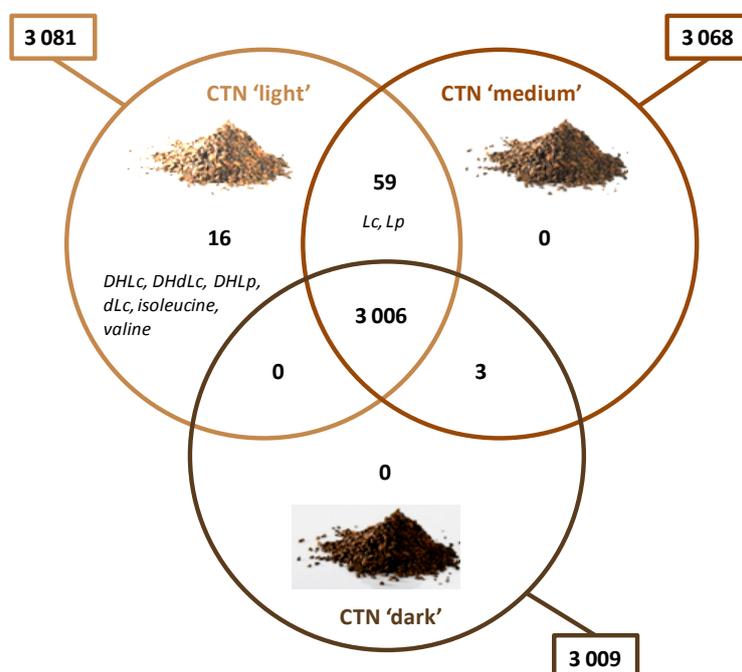


Figure 3.5 : Diagramme de Venn représentant la distribution de l'ensemble des signaux détecté et quantifié par HPLC-DAD, LC-QTOF-MS et RMN-¹H pour les trois degrés de torréfaction de la racine de chicorée. Les chevauchements des cercles représentent les signaux en commun.

La totalité des signaux quantifiés s'élève à 3 084 signaux dont seulement 78, soit 2,5 %, sont non-communs aux produits faiblement, moyennement et fortement torréfiés. Seize signaux, dont la DHLc, la DHdLc, la DHLp, la dLc, l'isoleucine et la valine, disparaissent et 3 signaux inconnus apparaissent dès lors que les cossettes séchées sont moyennement torréfiées. Lors d'une forte torréfaction, 59 signaux, dont la Lc et la Lp, sont totalement dégradés et aucun signal n'apparaît. La disparition des acides aminés quantifiés dans les produits faiblement torréfiés s'explique par leur consommation progressive dans la réaction de Maillard. En effet, c'est à partir d'acides aminés et de sucres réducteurs qu'il y a la possibilité de former de nouvelles molécules (Ames, 1998 ; Martins *et al.*, 2001). Koehler & Odell (1970) ont démontré la formation de méthylpyrazines et de diméthylpyrazines avec un système sucre – asparagine. Shaw & Berry (1977) décrivent également la formation du 2-acétylpyrrole et du 5-méthylpyrrole-2-carboxyaldéhyde dans le système fructose – alanine. En ce qui concerne les lactones sesquiterpéniques, les dérivés dihydro-, déoxy- et dihydrodéoxy- sont plus sensibles à la torréfaction que la lactucine et la lactucopicrine, dont la présence persiste lors d'une torréfaction moyenne. Par leur structure différente, les LST sont influencées différemment lors de la torréfaction. Jusqu'à présent, aucune étude ne décrit l'impact du processus sur ces molécules.

De façon générale, une torréfaction plus longue entraîne davantage de dégradation totale que de néoformation. Les études de Wei *et al.* (2012), sur l'évolution de la composition chimique lors de la torréfaction du grain de café, ne démontrent aucune néoformation lors d'une forte torréfaction, à 220 °C pendant 9 minutes. Dans les mêmes travaux, Wei *et al.* (2012) démontrent qu'une torréfaction moyenne, à 220 °C pendant 7 minutes, entraîne la dégradation totale du 5-HMF et une torréfaction élevée engendre la disparition des acides chlorogéniques. Dans nos travaux, les dégradations totales restent malgré tout faibles, inférieures à 1 % pour les produits moyennement torréfiés et inférieures à 2 % pour les produits fortement torréfiés. Une très faible différence qualitative est donc observée entre les trois niveaux de torréfaction.

D'un point de vue quantitatif, les teneurs, absolues ou relatives, des signaux sont différentes selon le degré de torréfaction (**figure 3.6**). Une ACP a été réalisée à partir des 3 006 signaux communs. Le premier plan factoriel formé par CP1 et CP2 explique 42,33 % de la variance totale. La représentation des individus sur ce plan permet de séparer les échantillons en fonction de leur degré de torréfaction par rapport à CP1. La répartition démontre une progressivité avec une zone de « confusion » entre les produits 'light' et 'medium', la composition de M-QualiC36 et de M-QualiC35 est proche du produit 'light', L-QualiC27. De plus, les 9 génotypes de CTN 'light' sont plus dispersés que ceux du CTN 'medium'. La torréfaction n'affecte pas la composition chimique de chacun des échantillons de manière équivalente. Exceptés pour M-QualiC40, elle a tendance à niveler la diversité entre les génotypes 'medium'. L'hétérogénéité du processus peut expliquer ces observations. Elle peut

être générée par le pilote de transformation et/ou par les conditions de torréfaction. Toutefois, les trois degrés de torréfaction sont décrits par différents groupes de signaux. Il y a ceux représentant les produits ‘light’, ceux représentant les produits ‘medium’ et ‘dark’ et ceux n’ayant subi aucun changement quantitatif entre les niveaux de torréfaction.

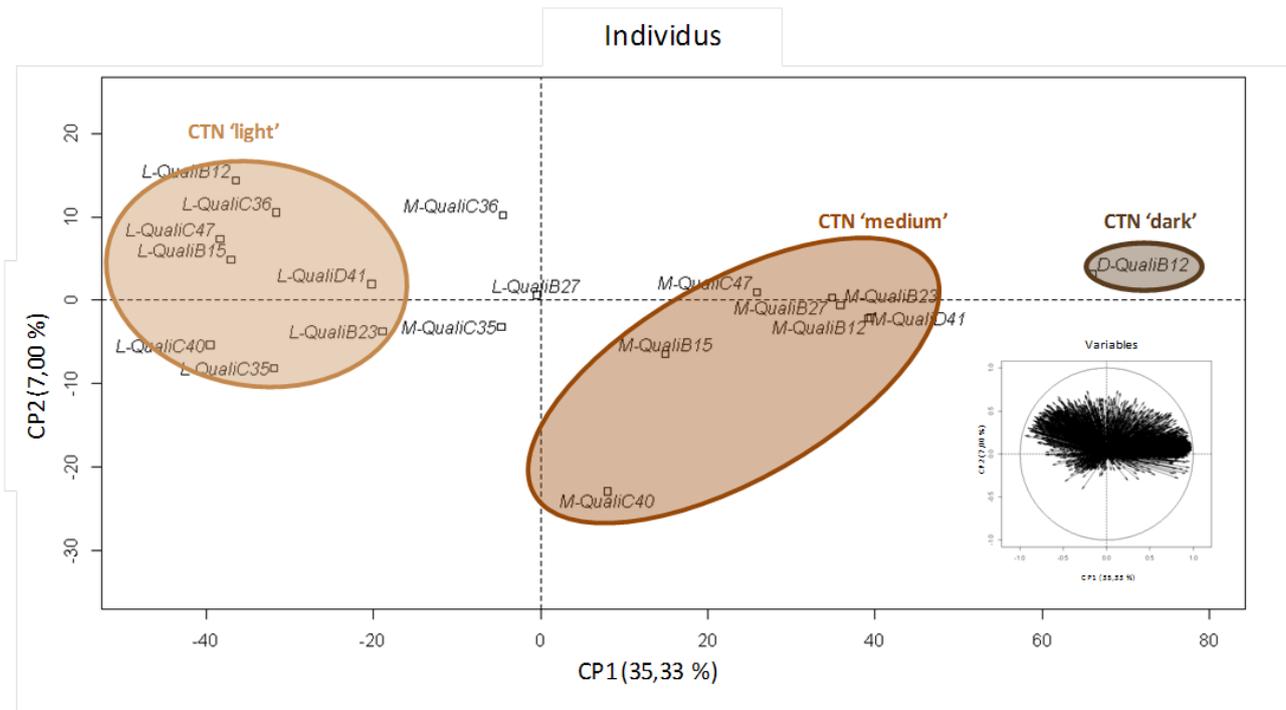


Figure 3.6 : Visualisation, par analyse en composantes principales (avec CP1 expliquant 35,33 % et CP2 7,00 %) (logiciel R v2.15.), de la répartition des génotypes pour chacun des trois degrés de torréfaction : faible (L, CTN ‘light’), moyenne (M, CTN ‘medium’) et forte (D, CTN ‘dark’) en utilisant les 3 006 signaux communs.

Avec un seul génotype à comparer, la torréfaction élevée (CTN ‘dark’) apporte peu d’information. Celle-ci n’ayant pas pu être reproduite à cause du risque de départ de feu, sera mise de côté pour la suite de notre étude.

Des différences quantitatives de la composition chimique commune entre une torréfaction ‘light’ et ‘medium’ sont mises en évidence par des séries de test de Student pour chacun des 9 génotypes (**figure 3.7**).

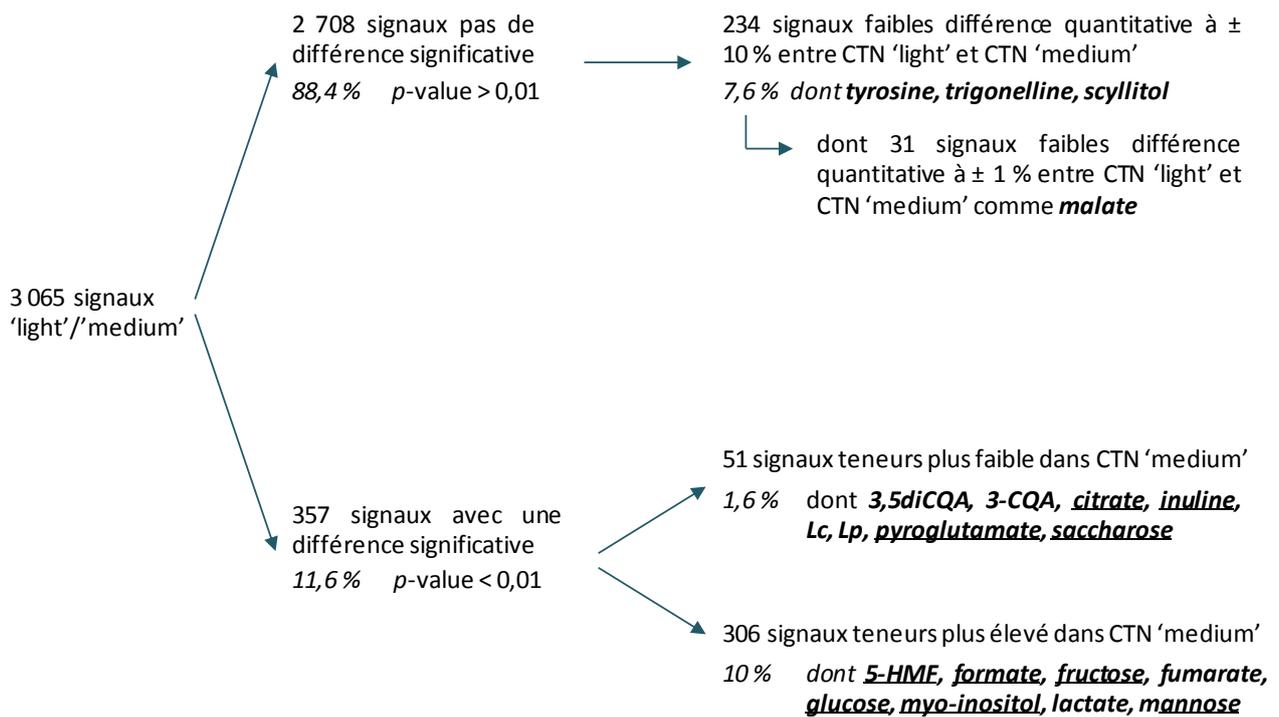


Figure 3.7 : Illustration des résultats obtenus par les tests de Student (logiciel MeV v.4.9) à partir des 3 065 signaux communs aux 9 génotypes sélectionnés de CTN 'light' et CTN 'medium'. Les signaux connus sont cités en **gras** et ceux identiques aux analyses effectuées en chapitre 2 (**figure 2.17 et 2.18**) sont soulignés.

Les analyses statistiques mettent en évidence 2 708 signaux, soit 88,4 %, n'ayant pas de différence quantitative significative ($p\text{-value} > 0,01$) entre les deux conditions de torréfaction 'light' et 'medium'. Parmi ces signaux, 7,6 % d'entre eux se caractérisent par une faible différence de teneur entre les deux produits, avec plus ou moins 10 % de variation quantitative dont la tyrosine, la trigonelline et le scyllitol. Plus particulièrement 31 signaux, dont le malate, possèdent une variation quantitative inférieure à 1 %. Ils sont définis par une teneur n'évoluant pas au cours de la torréfaction.

Les analyses révèlent 357 signaux, soit 11,6 %, ayant une différence quantitative significative ($p\text{-value} < 0,01$) entre une torréfaction 'light' et 'medium'. Ce faible taux peut s'expliquer par une diminution de la diversité des produits moyennement torréfiés *via* le processus et/ou les conditions de torréfaction. D'une part, 51 signaux sont caractérisés par une diminution de leur teneur lors du passage de la torréfaction faible à moyenne, dont le 3-CQA (- 55 %), le 3,5-diCQA (- 70 %), la Lc (- 80 %), la Lp (- 80 %), l'inuline (- 66 %), le saccharose (- 50 %), le citrate (- 21 %) et le pyroglutamate (- 32 %). D'autre part, 306 signaux ont une teneur qui augmente si le degré de torréfaction est accentué. Il s'agit notamment du fructose (+ 13 %), du glucose (+ 54 %), du mannose (+ 110 %), du formate (+ 1,7 %), du fumarate (+ 2,5 %), du lactate (+ 2,5 %), du *myo*-inositol (+ 23,6 %) et du 5-HMF (+ 400 %). L'ensemble de ces observations est cohérent avec les résultats obtenus dans le chapitre 2. Des

corrélations avaient pu être obtenues entre la dégradation des di- et polysaccharides et l'augmentation des monosaccharides (Ginz *et al.*, 2000 ; Böhm *et al.*, 2005) et entre la consommation des sucres et l'apparition des acides organiques (Ginz *et al.*, 2000 ; Wei *et al.*, 2012) et du 5-HMF (Locas & Yaylayan, 2008). De nouvelles corrélations entre les métabolites augmentant et ceux diminuant d'une torréfaction 'light' à 'medium' sont effectuées (**tableau 3.6**). Des résultats similaires à ceux énoncés précédemment sont observés. Des corrélations négatives significatives (p -values < 0,001) sont obtenues entre la dégradation des di- et polysaccharides et l'augmentation des monosaccharides, notamment le glucose et le mannose, et entre la dégradation des di- et polysaccharides et l'augmentation des acides organiques et du 5-HMF. Inversement, des corrélations positives significatives (p -values < 0,001) sont observées entre la consommation des monosaccharides et l'augmentation des acides organiques et du 5-HMF, excepté pour le fructose. En ce qui concerne les monosaccharides, ils sont corrélés significativement (p -values < 0,001). Ce résultat indique la conversion du fructose en glucose et/ou en mannose par la transformation de Lobry de Bruyn – Alberda van Eckenstein (Hodge & Osman, 1976), qui permet la transformation d'un aldose en cétose.

Tableau 3.6 : Présentation des résultats significatifs des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les métabolites diminuant et ceux augmentant d'une torréfaction 'light' à 'medium'.

R ²	fructose	glucose	mannose	inuline	saccharose
fructose	-	0,79***	0,66***	-0,29	-0,05
glucose	0,79***	-	0,94***	-0,74***	-0,55***
mannose	0,66***	0,94***	-	-0,85***	-0,71***
myo-inositol	0,42*	0,43*	0,38	-0,17	-0,03
formate	0,48***	0,79***	0,87***	-0,82***	-0,72***
fumarate	0,32	0,71***	0,88***	-0,93***	-0,89***
lactate	0,14	0,54***	0,73***	-0,9***	-0,91***
5-HMF	0,28	0,71***	0,86***	-0,97***	-0,95***

*** p -value < 0,001, ** p -value < 0,01, * p -value < 0,05.

Dans le chapitre précédent, le pyroglutamate faisait partie des métabolites néoformés lors de la torréfaction de la racine de chicorée *via* la consommation des acides aminés par la réaction Maillard (Rössner *et al.*, 1990). Dans cette étude, les teneurs en pyroglutamate et en acide citrique diminuent de 32 % et de 21 %, respectivement, après une torréfaction faible. Les études de Barlianto & Maier (1995) indiquent que le pyroglutamate et l'acide citrique sont des acides retrouvés de la racine de chicorée torréfiée, au même titre que l'acide phosphorique et malique. Dans les mêmes travaux, Barlianto & Maier (1995) étudient l'évolution des teneurs en acides au cours de la torréfaction de la racine de chicorée. Ils indiquent une diminution de 42 % et de 64 % pour l'acide pyroglumatique et l'acide citrique, respectivement. D'après Feldman *et al.* (1969), la diminution de la teneur en acide citrique au cours de la torréfaction du grain de café est due à sa consommation pour former d'autres acides tels que les acides itaconique, citraconique et mésaconique. D'autres études menées par

Barlianto & Maier (1994) ont identifié ces trois acides dans la racine de chicorée torréfiée. Leurs travaux de 1995 (Barlianto & Maier, 1995b) ont également déterminé une diminution de la teneur en acide citrique et une augmentation en acides itaconique, citraconique et mésaconique lors d'une forte torréfaction. Cependant aucune corrélation n'a été établie entre la dégradation de l'acide citrique et la formation des acides coniques.

Les observations obtenues sur l'évolution des métabolites connus entre les processus de transformation et le processus de torréfaction sont synthétisées dans le **tableau 3.7**. Ce tableau synthétique présente 4 groupes de métabolites, subdivisés en 10 sous-groupes. La torréfaction influence différemment les métabolites et plusieurs cas de figure sont possibles :

- les métabolites sont présents dans la racine fraîche et les cossettes séchées et ils sont :
 - soit dégradés lors d'une faible torréfaction, c'est le cas de la plupart des acides aminés,
 - soit dégradés lors d'une torréfaction moyenne, tels que l'isoleucine la valine ou encore la DHLc,
 - soit dégradés lors d'une torréfaction forte, tels que la Lc et la Lp,
- les métabolites sont absents dans la racine fraîche et les cossettes séchées, ils sont formés lors de la torréfaction et leur teneur :
 - augmente dès une faible torréfaction, tels que le 5-HMF ou encore le *myo*-inositol,
 - ou diminue dès une faible torréfaction, c'est le cas du pyroglutamate,
 - ou reste stable au cours de la torréfaction, comme l'acétate,
- les métabolites sont présents dans la racine fraîche, les cossettes séchées et les produits torréfiés mais leur teneur diminue :
 - soit lors du séchage, tel que l'inuline,
 - soit dès une torréfaction faible, comme le 3-CQA ou encore le saccharose,
- les métabolites sont présents dans la racine fraîche, les cossettes séchées et les produits torréfiés mais leur teneur augmente dès une faible torréfaction, c'est le cas du glucose et du fructose,
- et les métabolites sont présents dans la racine fraîche, les cossettes séchées et les produits torréfiés et leur teneur n'évolue pas au cours de la transformation, tels que le malate, la trigonelline, la choline ou encore le scyllitol.

Tableau 3.7 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus sur l'évolution des métabolites au cours de processus de transformation (chapitre 2) et du processus de torréfaction (chapitre 3).

Présent dans la racine fraîche et les cossettes séchées et dégradation totale par la torréfaction (Résultats chapitre 2)		Présence dans les produits torréfiés 'light' / 'medium' (Résultats chapitre 3)	Evolution lors de la transformation
Alanine Arginine Asparagine Aspartate GABA Glutamate	Glutamine Leucine Phénylalanine Proline Tryptophane Thrénine	Non détecté dans CTN 'light' Non détecté dans CTN 'medium'	Dégradation dès une faible torréfaction
Isoleucine Valine DHLc	DHdLc DHLp dLc	Détecté dans CTN 'light' Non détecté dans CTN 'medium'	Dégradation lors d'une torréfaction moyenne
Lc Lp		Détecté dans CTN 'light' Détecté dans CTN 'medium' Non détecté dans CTN 'dark'	Dégradation lors d'une torréfaction forte
Absent dans la racine fraîche et les cossettes séchées et apparition lors de la torréfaction (Résultats chapitre 2)		Présence dans les produits torréfiés 'light' / 'medium' (Résultats chapitre 3)	Evolution lors de la transformation
5-HMF Formate Lactate	<i>myo</i> -inositol Mannose	Détecté dans CTN 'light' Détecté dans CTN 'medium'	Apparition et augmentation des teneurs dès une faible torréfaction
Acétate		Détecté dans CTN 'light' Détecté dans CTN 'medium'	Apparition et stabilisation des teneurs au cours de la torréfaction
Pyroglutamate		Détecté dans CTN 'light' Détecté dans CTN 'medium'	Apparition et diminution des teneurs dès une faible torréfaction
Présent dans la racine fraîche et les cossettes séchées et diminution des teneurs par torréfaction (Résultats chapitre 2)		Présence dans les produits torréfiés 'light' / 'medium' (Résultats chapitre 3)	Evolution lors de la transformation
3-CQA 3,5-dicQA	Citrate Saccharose	Détecté dans CTN 'light' Détecté dans CTN 'medium'	Diminution des teneurs dès une faible torréfaction
Inuline		Détecté dans CTN 'light' Détecté dans CTN 'medium'	Diminution des teneurs dès le séchage
Présent dans la racine fraîche et les cossettes séchées et augmentation des teneurs par torréfaction (Résultats chapitre 2)		Présence dans les produits torréfiés 'light' / 'medium' (Résultats chapitre 3)	Evolution lors de la transformation
Glucose Fructose Fumarate		Détecté dans CTN 'light' Détecté dans CTN 'medium'	Augmentation des teneurs dès une faible torréfaction
Métabolites dont les teneurs « n'évoluent pas » (Résultats chapitre 2)		Présence dans les produits torréfiés 'light' / 'medium' (Résultats chapitre 3)	Evolution lors de la transformation
Malate Trigonelline	Choline Scyllitol	Détecté dans CTN 'light' Détecté dans CTN 'medium'	Teneur n'évoluant pas tout au long du processus de transformation

Des études sur des jus de pamplemousse indiquent que la teneur en acide malique n'est pas influencée par la pasteurisation des jus (Igual *et al.*, 2010). Ce processus de conservation consiste à chauffer les aliments à une température comprise entre 62 à 88 °C pendant une durée déterminée avant un refroidissement brusque. A l'inverse, les travaux de Wei *et al.* (2012) démontrent la dégradation progressive de l'acide malique et de la trigonelline dès une torréfaction faible du grain de café. Dans ces mêmes études, Wei *et al.* (2012) révèlent que la caféine, le *myo*-inositol et la choline sont des molécules thermiquement stables. Dans nos travaux, la choline n'est pas affectée par le processus de transformation alors que la teneur en *myo*-inositol augmente significativement lors de la torréfaction moyenne. Les différences de résultats observés entre la torréfaction de la racine de chicorée et celle du grain de café peuvent s'expliquer par des différences qualitatives et quantitatives de la composition native qui engendreraient des voies de consommation différentes. Un effet matrice est donc constaté. La torréfaction, *via* la réaction de Maillard et la caramélisation, n'a pas le même impact entre les produits alimentaires. Toutefois, des similitudes persistent au niveau des évolutions chimiques lors de la torréfaction. En effet, les études de Wei *et al.* (2012) mettent également en évidence la dégradation des acides chlorogéniques, la formation du 5-HMF, la diminution de l'acide citrique et l'augmentation de l'acide lactique lors de la torréfaction du grain de café.

Pour visualiser et confirmer l'hétérogénéité du processus sur la diversité chimique des produits torréfiés, des ACP sont effectuées à partir des 16 signaux connus évoluant lors de la torréfaction pour les génotypes du CTN 'light' (**figure 3.8**) et du CTN 'medium' (**figure 3.9**).

La discrimination des génotypes 'light' s'effectue principalement selon l'axe 1 de l'ACP (**figure 3.8**). Celui-ci, expliquant 57,89 % de l'inertie, contribue à l'aspect quantitatif des variables mais il mesure également la répartition des composés selon leur classe de métabolites. Cinq groupes se distinguent : les monosaccharides, les di- et polysaccharides, les ACG, les LST et les acides organiques. Concernant ce dernier groupe, le formate, le fumarate et le lactate sont regroupés mais séparés du citrate. Cette observation est également obtenue lors de la discrimination des génotypes de racine fraîche (chapitre 2, **figure 2.16**). En effet, le citrate est l'acide organique le plus abondant dans la racine fraîche de chicorée (Gaber *et al.*, 1990). Ainsi, contrairement au formate, au lactate et au fumarate, dont les teneurs augmentent respectivement de 40,6, 59,8 et 60 %, la teneur en citrate diminue en moyenne de 21,5 % lors d'une torréfaction moyenne (**tableau 3.8**). Les groupes de métabolites sont donc également discriminés selon l'impact du processus de torréfaction sur leur teneur. Les monosaccharides, le 5-HMF et les acides organiques, excepté le citrate, sont formés au cours de la torréfaction, c'est pourquoi ils sont associés. De même, les di- et polysaccharides, les ACG, les LST et le pyroglutamate sont regroupés car ils sont dégradés au cours de la torréfaction (**figure 3.8**, carte des variables).

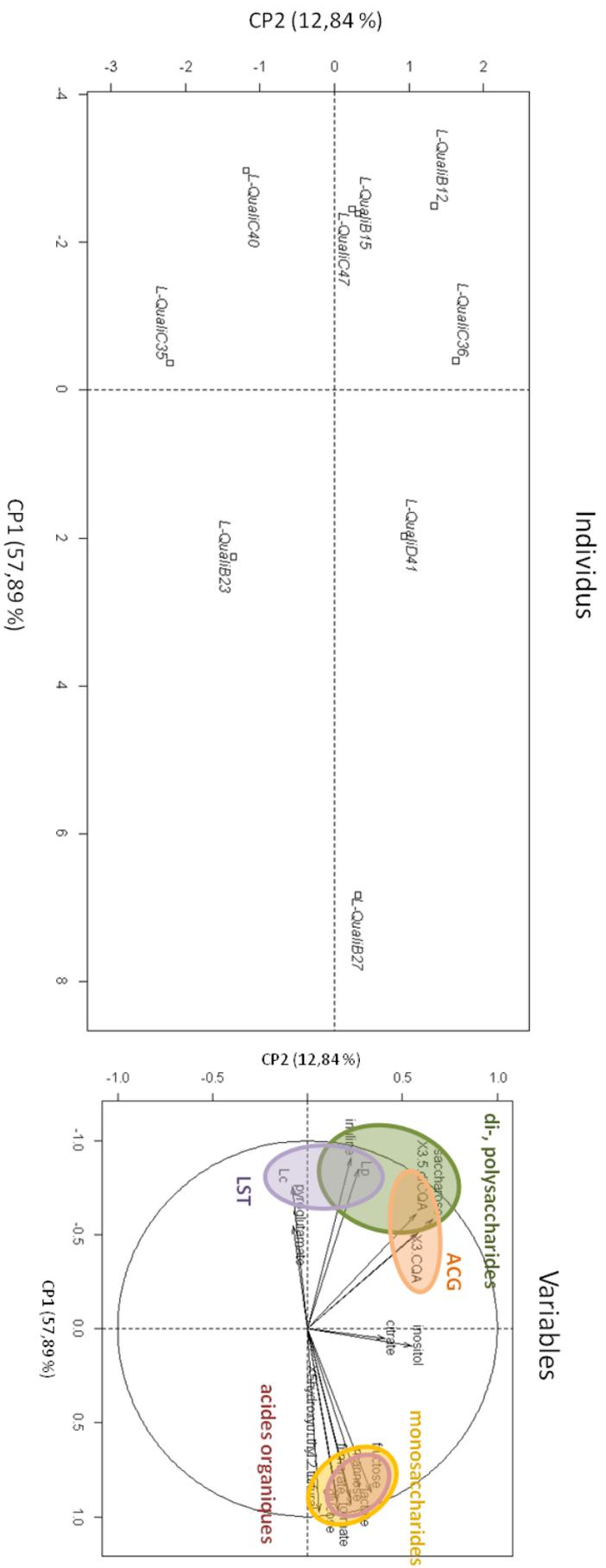


Figure 3.8 : Répartition des 9 génotypes de produit torréfié CTN 'light' (L), visualisée par analyse en composantes principales (avec CP1 expliquant 57,89 % et CP2 12,84 %) (logiciel R v2.15.), en fonction des 16 métabolites connus qui évoluent de façon significativement différents (p -value < 0,01) au cours de la torréfaction. En vert les métabolites qui diminuent et en orange ceux qui augmentent.

Tableau 3.8 : Teneur moyenne en mg/g de matière sèche d'acides chlorogéniques, de lactones sesquiterpéniques, de di- et polysaccharides, de monosaccharides, d'acides organiques, de *myo*-inositol (inositol), de pyroglutamate (pyro.) et de 5-HMF pour les 9 génotypes faiblement ('light') et moyennement ('medium') torréfiés.

mg/g de MS	CTN	ACG			LST			polysaccharides			monosaccharides			acides organiques				pyro.	5-HMF
		3,5dicQA	3-CQA	Lc	LP	sacch.	inul.	fructose	glucose	mannose	citrate	formate	fumarate	lactate	inositol				
QualiB12	'light'	0.256a	0.888a	0.038ab	0.021ab	49.43ab	693.60ac	33.07cd	10.25cd	1.31cd	9.21b	0.246c	0.070cd	0.285bc	1.02c	10.61bc	1.95de		
	'medium'	0.037bcd	0.225bd	0.0c	0.0c	13.15f	102.30e	31.01c	16.08de	3.13a	8.42bc	0.617ab	0.234a	1.147a	1.54ac	5.65cd	21.20a		
QualiB15	'light'	0.202ab	0.527bd	0.035ab	0.018b	47.19ab	781.64a	30.42d	8.50e	10.24ab	0.262c	0.042e	0.282bc	1.49ab	7.91de	1.94de			
	'medium'	0.071ac	0.253bc	0.010ab	0.004b	28.56c	261.21b	40.73b	21.44a	3.04a	7.44cd	0.525ab	0.152de	0.621c	1.78ab	4.83d	14.12c		
QualiB23	'light'	0.125ce	0.433bd	0.019ac	0.011d	37.18d	467.65d	36.79bc	14.58b	1.80b	11.45a	0.378bc	0.084bc	0.337bc	0.93c	10.74b	4.54b		
	'medium'	0.022d	0.179d	0.0c	0.0c	13.78ef	109.87e	31.02c	13.48e	2.13b	8.96b	0.541ab	0.191bc	1.073a	1.13c	10.38a	19.25ab		
QualiB27	'light'	0.117de	0.387d	0.009c	0.009d	38.33cd	404.51d	45.77a	20.14a	2.87a	9.53b	0.590a	0.128a	0.491a	1.19ac	7.22e	8.70a		
	'medium'	0.025cd	0.163d	0.002c	0.0c	17.96de	133.46de	43.82b	20.09abc	3.25a	7.52cd	0.482b	0.174cd	0.918ab	1.02c	6.04bd	19.48ab		
QualiC35	'light'	0.096e	0.410cd	0.025ac	0.013cd	45.14abc	659.18bc	34.72bd	10.79cd	1.04ce	7.12c	0.276c	0.058de	0.274bc	1.04c	9.06cd	2.33cd		
	'medium'	0.058bcd	0.282b	0.014a	0.007a	33.98b	414.34a	40.58b	17.42bc	2.17b	6.30de	0.467b	0.116e	0.555c	1.26bc	6.61bc	8.75d		
QualiC36	'light'	0.168bcd	0.540bc	0.019ac	0.017bc	52.08a	691.77ac	39.04b	12.27c	1.40bc	11.30a	0.302bc	0.065cd	0.320bc	1.53a	10.97b	2.56c		
	'medium'	0.111a	0.362a	0.007b	0.008a	44.56a	452.37a	52.90a	20.50ab	3.21a	10.69a	0.486b	0.131e	0.537c	2.00a	7.26b	9.90d		
QualiC40	'light'	0.170bcd	0.499bd	0.043a	0.022ab	44.44bd	735.61ab	30.05d	8.95de	0.91de	10.64ab	0.241c	0.051de	0.232c	0.92c	13.14a	1.83e		
	'medium'	0.030cd	0.191cd	0.008b	0.003b	19.97d	170.51cd	43.11b	21.82a	3.45a	7.24cd	0.565ab	0.184bd	0.668c	1.51ac	7.13bc	19.53ab		
QualiD41	'light'	0.178bc	0.559b	0.017bc	0.013cd	47.51ab	591.84c	38.90b	15.46b	1.82b	10.02ab	0.450ab	0.096b	0.364b	1.13bc	8.81de	4.45c		
	'medium'	0.050bcd	0.226bd	0.0c	0.0c	15.36ef	109.55e	40.16b	18.01bd	3.14a	7.67bc	0.635ab	0.216ab	0.991a	1.16c	5.96bd	21.20a		
QualiC47	'light'	0.260a	0.564b	0.029ac	0.024a	47.16ab	761.46ab	34.27bd	8.58e	1.03ce	9.33b	0.257c	0.063cd	0.315bc	0.84c	10.62bc	1.66e		
	'medium'	0.083ab	0.263b	0.011ab	0.004b	21.64d	201.59c	42.93b	19.73abc	3.58a	5.51e	0.734a	0.246a	0.725bc	1.10c	6.32bd	17.57b		

Les différentes lettres d'une même couleur au sein d'une même colonne indiquent une différence significative (p -value < 0,05).

Au niveau des individus, l'axe 1 de l'ACP est défini par L-QualiB27 opposé à L-QualiB12, L-QualiB15, L-QualiC47 et L-QualiC40. Pour L-QualiB27, ces observations s'expliquent par des teneurs plus élevées en monosaccharides, en 5-HMF et en acides organiques, excepté pour le citrate, et des teneurs plus faibles en LST, en pyroglutamate, en 3-CQA et en inuline (**tableau 3.8**). En général, L-QualiB27 est le génotype 'light' qui possède les teneurs les plus faibles en composés natifs de la racine et les teneurs les plus élevées en composés formés lors de la torréfaction. A l'inverse, L-QualiB15 est riche en inuline mais pauvre en monosaccharides et en acides organiques, tels que le formate et le fumarate. L-QualiB12 est le plus riche en ACG, L-QualiC47 est le plus pauvre en 5-HMF et L-QualiC40 est le plus riche en pyroglutamate (**tableau 3.8**). En ce qui concerne L-QualiC36, L-QualiD41, L-QualiB23 et L-QualiC35 leurs teneurs pour ces 16 métabolites sont intermédiaires. La torréfaction 'light' maintient la diversité chimique entre les génotypes.

La répartition des génotypes 'medium' sur l'ACP, s'effectue selon les deux axes, CP1 expliquant 50,12 % et CP2 17,84 % (**figure 3.9**). L'axe 1 reflète au niveau quantitatif le 5-HMF et 4 groupes de métabolites : les LST, les ACG, les di- et polysaccharides et les acides organiques. La même observation est constatée pour les acides organiques, le formate, le fumarate et le lactate sont regroupés mais séparés du citrate. L'axe 2 est représenté par les monosaccharides, le citrate et le pyroglutamate. A l'inverse de la carte des variables de l'ACP discriminant les génotypes 'light' (**figure 3.8**), les groupes de métabolites ne sont plus regroupés de la même manière. Les acides organiques et le 5-HMF restent associés et opposés aux ACG, LST et di- et polysaccharides alors que les monosaccharides sont opposés au pyroglutamate et au citrate. Ces observations mettent en avant 3 groupes de métabolites influencés différemment lors de la torréfaction :

- les précurseurs de molécules formées lors du processus, dont les teneurs diminuent au cours de la torréfaction, il s'agit du 3-CQA, du 3,5-diCQA, de la Lc, de la Lp, du saccharose et de l'inuline,
- les métabolites intermédiaires, dont les teneurs augmentent et qui sont consommés au cours de la torréfaction, il s'agit du glucose, du fructose, du mannose, du pyroglutamate et du citrate,
- les molécules néoformés finales, elles apparaissent et leur teneur augmente au cours de la torréfaction, il s'agit du 5-HMF, du fumarate, du formate et du lactate.

Au niveau des individus, l'axe 1 de l'ACP est défini par M-QualiC35 et M-QualiC36 opposés à M-QualiB12 et M-QualiD41. Pour M-QualiC35 et M-QualiC36, ces observations s'expliquent par une teneur plus élevée en di- et polysaccharides, notamment en inuline, et des teneurs plus faibles en 5-HMF et en acides organiques, excepté pour le citrate. De plus, M-QualiC36 est le génotype le plus riche en LST, en citrate et en monosaccharides, notamment le fructose et le glucose. M-QualiC35, quant à lui, est le génotype le plus riche en LST (**tableau 3.8**). En général, M-QualiC35 et M-QualiC36 sont les génotypes 'medium' possédant les teneurs les plus élevées en composés natifs de la racine et les teneurs les plus faibles en composés formés lors de la torréfaction.

Contrairement à cela, M-QualiD41 et M-QualiB12 possèdent des teneurs plus élevées en 5-HMF et en acides organiques, notamment le fumarate et le lactate, et des teneurs plus faibles en LST et en di- et polysaccharides, notamment l'inuline (**tableau 3.8**). Concernant l'axe 2, il est défini par M-QualiC47 opposé à M-QualiB23. Cette répartition s'explique par une teneur plus élevée en pyroglutamate et des teneurs plus faibles en ACG, en LST et en inuline pour M-QualiB23 alors que M-QualiC47 est plus pauvre en citrate et plus riche en acides organiques notamment le formate et le fumarate. Pour les génotypes M-QualiB27, M-QualiC40 et M-QualiB15, dont la composition pour leur génotype 'light' était opposée, possèdent en générale des teneurs moyennes pour les 16 métabolites. La diversité chimique entre les génotypes 'medium' est toujours présente après une torréfaction moyenne.

Toutefois, une fois le degré de torréfaction moyen atteint les groupes de génotypes ne sont pas maintenus. Ces observations confirment la présence d'une hétérogénéité du processus qui peut être générée par le pilote de transformation et/ou par les conditions de torréfaction. Aucun répétition du processus n'a été effectuée afin d'évaluer la répétabilité du pilote de transformation. Nous ne pouvons donc pas conclure sur la (les) source(s) de variabilité.

Ces travaux mettent en évidence un maintien de la diversité chimique au sein des génotypes 'light' et 'medium' ainsi que des changements métabolomiques au cours de la torréfaction. L'intégration de ces données avec celles de l'analyse sensorielle, à l'aide d'une analyse des corrélations simples, permettra de déterminer des marqueurs de l'amertume des produits torréfiés de la chicorée.

2. Influence de la torréfaction sur les propriétés sensorielles

L'analyse sensorielle a pour objectif de classer les produits torréfiés en fonction de l'intensité des descripteurs générés. Le profilage sensoriel des décoctions des produits faiblement, moyennement et fortement torréfiés a été effectué par un panel d'expert par la société Adrianor (Tilloy-lès-Mofflaines, Pas-de-Calais).

Lors de 8 séances de génération, 13 descripteurs ont été sélectionnés. Il s'agit des saveurs sucrée, amère, astringente, acide et des arômes caramel brun, caramel blond, noisette, torréfié / grillé, réglisse, endive cuite, tisane / végétal, terreux / boisé et céréale (**tableau 3.4**). La perception du goût ne se limite donc pas à la perception des saveurs et comprend également la perception des arômes. Les saveurs sont transmises par les papilles gustatives de la langue alors que les arômes sont produits par des molécules volatiles et parviennent par la bouche jusqu'au nerf olfactif.

La **figure 3.10** représente les notes moyennes d'intensité obtenues, de 0 à 10, pour chaque descripteur pour les 9 génotypes 'light' et 'medium' et le génotype 'dark'. Une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur, ajustée par la méthode de Bonferroni (logiciel MeV v.4.9), indique une différence d'intensité significative (p -value < 0,05) pour 8 des 13 descripteurs entre les trois degrés de torréfaction. Les saveurs sucrée et astringente et les arômes caramel blond, noisette et céréale ne sont pas perçus comme significativement différents (p -value > 0,05) entre les différentes torréfactions. Les travaux de Laing (1994) et de Grosch (2001) indiquent que les caractères aromatiques intenses, formés pendant la torréfaction, peuvent masquer les notes moins puissantes, ce qui complique la détection des différences entre les échantillons.

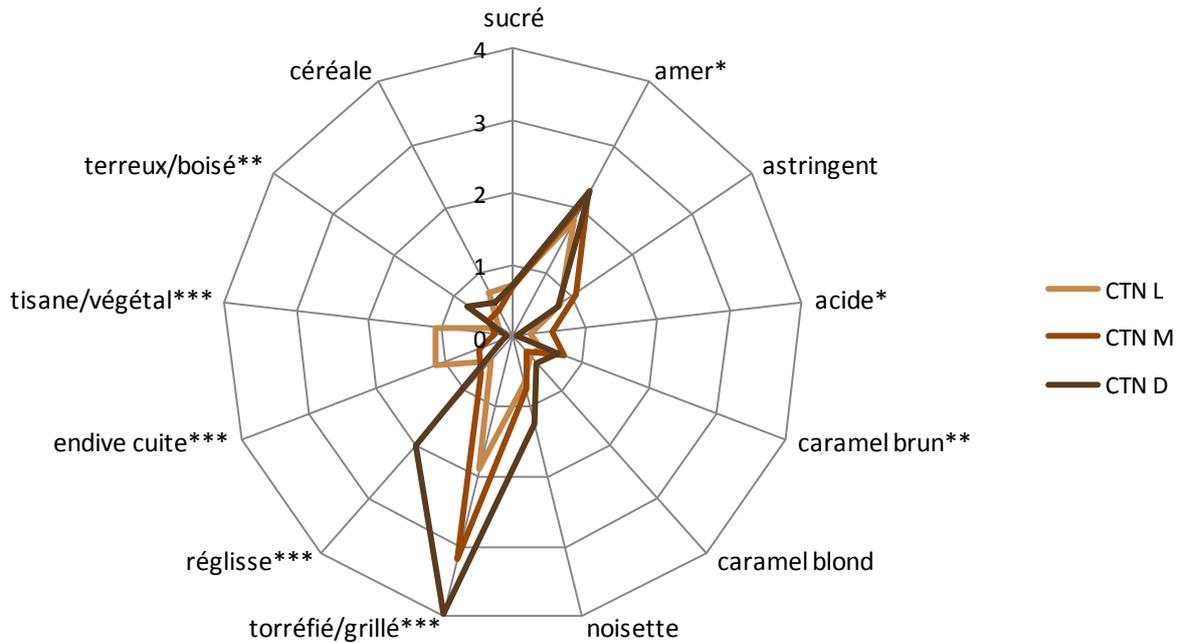


Figure 3.10 : Représentation en radar de l'intensité moyenne, note de 0 à 10, perçue par les juges pour chaque descripteur. Les résultats d'ANOVA (logiciel MeV v.4.9) indiquent une différence significative, entre les trois temps de torréfaction, pour 8 descripteurs, *** p -value < 0,001, ** p -value < 0,01, * p -value < 0,05.

L'intensité des saveurs amère, acide et des arômes caramel brun, torréfié / grillé, réglisse, endive cuite, tisane / végétal et terreux / boisé, dépend de l'évolution du processus de torréfaction. La saveur amère (p -value < 0,05) et les arômes torréfié / grillé (p -value < 0,001), réglisse (p -value < 0,001) et terreux / boisé (p -value < 0,01) sont ressentis plus intense dans le CTN 'dark' et moins prononcés dans le CTN 'light'. Autrement dit, plus le degré de torréfaction est important, plus l'intensité de ces descripteurs est accentuée. A l'inverse, les arômes endive cuite (p -value < 0,001) et tisane / végétal (p -value < 0,001) sont moins intense dans le CTN 'dark' et plus prononcés dans le CTN 'light', plus le degré de torréfaction est élevé, plus l'intensité de ces arômes est diminuée. Ces 6 descripteurs sont liés à l'augmentation progressive de la torréfaction. En ce qui concerne la saveur acide (p -value < 0,05) et l'arôme caramel brun (p -value < 0,01) l'intensité est maximale dans le CTN 'medium'. Dans ce cas, les caractères organoleptiques sont accentués lors d'une torréfaction moyenne et s'effacent lors d'une torréfaction plus poussée. Des études sur l'évolution des arômes lors de la torréfaction du grain de café ont démontré des résultats similaires (Bhumiratana *et al.*, 2011). Ils démontrent un impact de la torréfaction sur les propriétés organoleptiques. Ainsi, l'intensité des arômes torréfié, « brulé / acre », « cendré / fumé », aigre et piquant augmente avec le degré de torréfaction. A l'inverse, l'intensité de la saveur sucrée et de l'arôme cacao diminue avec une torréfaction élevée. Les grains de café faiblement torréfiés sont donc ressentis avec des arômes sucré,

de noisette et de chocolat alors que les grains fortement torréfiés sont perçus avec des arômes café, torréfiée, « brûlé / acre », acide et « cendré / fumé ». Ils en concluent que les arômes caractéristiques du café étaient non seulement affectés par le mode de préparation (mouture, décoction) mais aussi par le degré de torréfaction. Des résultats similaires ont été observés dans les études de Czerny *et al.* (1999) sur la torréfaction du grain de café. Ils ont trouvé que les attributs organoleptiques tels que le torréfié, terreux et fumé augmentés avec le degré de torréfaction. Les travaux de Akiyama *et al.* (2008) reportent également que les arômes fumé / torréfié, sucré / caramel et végétal sont corrélés positivement avec le degré de torréfaction du grain de café alors que les arômes sucré / fruité et la saveur acide sont corrélés négativement. Que ce soit dans les études sur la torréfaction du grain de café ou dans nos travaux, certains saveurs et certains arômes évoluent de la même façon au cours de la torréfaction (**tableau 3.9**). Seules les corrélations avec un R² supérieur ou égale à |0,5| et une *p*-value ajustée inférieure à 0,05 sont représentées dans le **tableau 3.9**. La saveur amère est corrélée positivement avec l'astringence et l'arôme torréfié / grillé. Ce dernier est également corrélé positivement aux arômes caramel brun et réglisse. L'intensité de ces 5 descripteurs évolue de la même façon. Elle est accentuée au cours de la torréfaction. Les arômes torréfié / grillé et caramel brun sont également corrélés négativement aux arômes d'endive cuite et de tisane / végétal, eux même corrélés positivement entre eux avec une *p*-value inférieure à 0,001. Ces 4 descripteurs évoluent dans le sens opposé puisque les arômes d'endive cuite et de tisane / végétal sont dégradés par la torréfaction alors que ceux de torréfié / grillé et de caramel brun sont générés. Ces résultats n'indiquent pas de corrélations avec le sucré, l'acidité et les arômes caramel blond, terreux / boisé et céréale. Pour les saveurs sucrée, astringente et l'arôme caramel blond, l'absence de corrélation s'explique par l'incapacité des membres du panel d'experts à détecter des différences entre les échantillons. Cette difficulté est due aux descripteurs plus intenses, tels que le torréfié / grillé ou encore l'amertume, qui ont tendance à masquer les notes moins puissantes (Laing, 1994 ; Grosch, 2001).

Tableau 3.9 : Résultats des corrélations de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les 13 descripteurs sensoriels. Seules les corrélations significatives, R² supérieur ou égale à 0,5 et une *p*-value ajustée inférieure à 0,05, sont représentées dans ce tableau.

R ²	Amer	Caramel brun	Endive cuite	Réglisse	Tisane / végétal
Astringent	0,62**	0,39	-0,22	0,17	-0,3
Endive cuite	-0,39	-0,54*	1	-0,42	0,71
Noisette	-0,02	0,24	-0,32	0,59**	-0,31
Tisane / végétal	-0,43	-0,66***	0,71***	-0,43	1
Torréfié / grillé	0,67***	0,62**	-0,69***	0,55*	-0,75***

*** *p*-value < 0,001, ** *p*-value < 0,01, * *p*-value < 0,05.

Les seules études qui font référence à la caractérisation des arômes des produits torréfiés de la chicorée sont les travaux de Sannai *et al.* (1982) et de Baek & Cadwallader (1998). Cependant, ces

études ne concernent pas l'évolution des propriétés organoleptiques lors de la torréfaction de la racine de chicorée. Sannai *et al.* (1982) mettent en évidence, par une technique de fractionnement des composés volatils, 7 fractions aux arômes différents (**tableau 3.10**). Cette étude décrit la chicorée torréfiée avec des arômes « cireux », « huileux », sucré, floral, noisette, vanille et brûlé. Certaines similitudes subsistent avec les descripteurs générés lors de notre étude, tels que la saveur sucrée et l'arôme noisette. De plus, les arômes floral et brûlé peuvent être respectivement associés aux arômes végétal et grillé de nos analyses. Toutefois, les travaux Sannai *et al.* (1982) n'ont pas caractérisé la saveur amère par leur technique de fractionnement des composés volatils.

Tableau 3.10 : Fractionnement des arômes volatils de la racine de chicorée torréfiée (Sannai *et al.*, 1982).

N° Fr.	Aroma	Traduction possible
1	Waxy	« Cireux »
2	Fatty oily	« Huileux »
3	Weak sweet, floral	Doux en sucre, note florale
4	Sweaty	Sucré
5	Strong sweet, nutty	Fort en sucre, noisette
6	Vanilla-like	Similaire à l'arôme vanille
7	Burnt-like	Similaire à l'arôme brûlé

Les études de Baek & Cadwallader (1998) ont caractérisé les arômes de la chicorée torréfiée par GC-MS-olfactométrie. A partir des 95 composés volatils isolés des produits torréfiés, ils ont mis en évidence un certain nombre d'arôme décrivant ces produits dont les arômes chocolaté, sucré, végétal, noisette, floral, brûlé et chicorée. De même que pour les travaux de Sannai *et al.* (1982), Baek & Cadwallader (1998) n'ont pas caractérisé la saveur amère dans les produits torréfiés de chicorée. Il semblerait que la saveur amère ne soit pas caractérisée par les composés volatils. Dans les travaux de Geel *et al.* (2005), les arômes et les saveurs solubles sont étudiés afin de déterminer les préférences des consommateurs sur différents types de café et de substituts, tels que la chicorée pure et des mélanges café / chicorée. Ils mettent en évidence de fortes différences d'arôme et de saveur entre les produits. La chicorée pure, regroupée avec les mélanges café / chicorée, est décrite par la saveur amère et l'arôme racine. A l'inverse les cafés purs sont perçus avec des arômes malté, cacao, céréales grillées, piquant, torréfié et noisette et des saveurs astringente, amère, torréfiée, noisette et avec une note corsée. Geel *et al.* (2005) décrivent l'amertume comme une saveur et non pas comme un arôme, comme peut l'être le sucre ou l'acide. Ces travaux renforcent notre volonté d'identifier une (des) molécule(s) soluble(s) responsable de l'amertume des produits torréfiés.

Pour visualiser l'impact de la torréfaction sur la diversité sensorielle des produits torréfiés, une ACP est effectuée à partir des 8 descripteurs significativement différents (p -value < 0,05) pour les 3 degrés de torréfaction (**figure 3.11**). Cette représentation décrit la torréfaction 'light' avec des arômes de tisane / végétal et d'endive cuite et les torréfactions 'medium' et 'dark' avec la saveur amère et des arômes de caramel brun et de torréfié / grillé. Ces observations confirment que plus la torréfaction est poussée, plus l'intensité de l'amertume et des arômes caramel brun, torréfié / grillé est accentuée et plus celle des arômes tisane / végétal et endive cuite est minimisée. Ces observations permettent également de regrouper les similitudes que le panel a pu percevoir. La projection regroupe les produits en fonction de leur niveau de torréfaction *via* l'axe 1 qui différencie les CTN 'light', 'medium' et 'dark'. Toutefois, la perception du génotype M-QualiC47 est sensiblement proche de D-QualiB12, il est perçu comme un produit fortement torréfié avec une intensité de la saveur amère et des arômes torréfié / grillé et caramel brun plus élevée que les autres produits moyennement torréfiés. La projection de l'ACP regroupe également M-QualiC36, M-QualiC35, L-QualiB27 et L-QualiC36, ils se situent entre une torréfaction faible et une torréfaction moyenne. Ces similitudes, exceptées pour L-QualiC36, ont également été obtenues avec les données chimiques (**figure 3.6**). Ces génotypes sont centrés sur l'ACP c'est-à-dire qu'ils sont perçus moyennement intense pour l'ensemble des 8 descripteurs. Cependant, M-QualiC36 se détache légèrement du lot avec des notes plus intenses d'endive cuite, de réglisse et d'acide. Lorsque l'on s'intéresse plus en détails au groupe de la torréfaction 'light', une large gamme de diversité sensorielle est disponible. Les résultats de l'analyse de la variance indiquent une différence significative (p -value < 0,05) pour les arômes torréfié / grillé, endive cuite et tisane / végétal. L-QualiC47 est décrit avec des arômes d'endive cuite et de tisane / végétal plus prononcés que les autres génotypes faiblement torréfiés et une intensité de la saveur amère et de l'arôme torréfié / grillé plus douce. A l'inverse, L-QualiB23 est perçu avec une acidité et des arômes d'endive cuite, de réglisse, de terreux boisé et de caramel brun moins prononcés que les autres génotypes 'light'. Concernant le groupe de la torréfaction moyenne, une réduction de la variabilité est constatée, l'analyse de la variance des 13 descripteurs ne différencie pas les génotypes 'medium'. Toutefois, l'ACP permet de distinguer deux groupes. Ainsi, M-QualiD41 et M-QualiB15 ont des notes plus intenses pour la saveur acide et les arômes réglisse, terreux / boisé et caramel brun alors que M-QualiB27, M-QualiB12, M-QualiC40, M-QualiB23 sont perçus plus amer et avec un arôme torréfié / grillé plus intense. De même que pour les données chimiques, une réduction de la variabilité est constatée. L'hétérogénéité du processus de torréfaction a également un impact au niveau sensoriel. Les travaux de Bhumiratana *et al.* (2011) démontrent la difficulté de discriminer les profils aromatiques de 3 variétés de café après une torréfaction 'medium' et 'dark'. Cette absence de différence est causée par les fortes intensités des arômes générés au cours de la torréfaction (théorie de Laing, 1994 et Grosch, 2001).

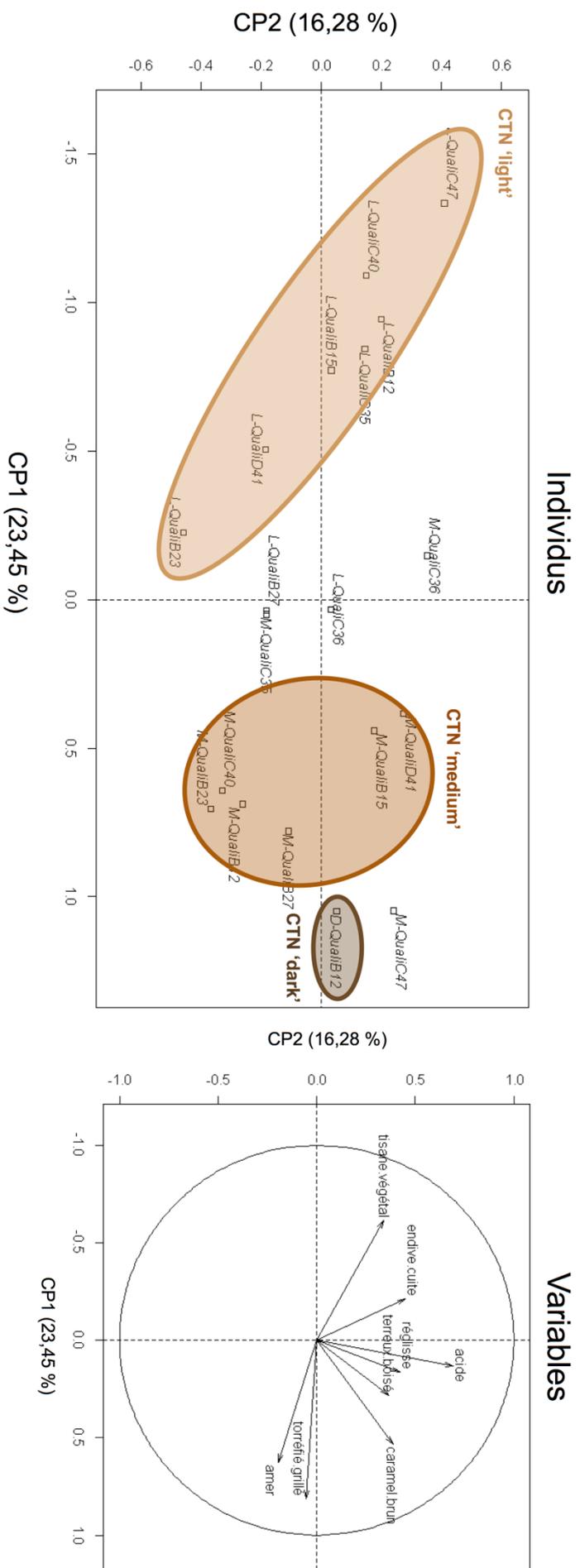


Figure 3.11 : Visualisation, par une analyse en composantes principales (avec CP1 expliquant 23,45 % et CP2 16,28 %) (logiciel R v2.15.), de la répartition des 9 génotypes de produit faiblement (L, CTN 'light') et moyennement (M, CTN 'medium') torréfiés et le génotype fortement torréfié (D, CTN 'dark') selon les 8 descripteurs significativement différents (p -value < 0,05) pour les 3 degrés de torréfaction.

Les résultats obtenus, par les analyses métabolomique et sensorielle, démontrent l'impact de la torréfaction sur la composition chimique et les propriétés organoleptiques de la chicorée. De plus, des différences significatives sont perçues entre les 3 degrés de torréfaction au niveau des données métabolomiques et de la saveur amère. Ainsi, l'intégration de ces données, *via* des analyses statistiques, vise à identifier un (des) marqueur(s) de l'amertume.

3. Implication des molécules dans l'amertume du produit torréfié

L'amertume du produit de chicorée torréfié dépend de sa composition chimique. Ainsi, dans le but d'identifier les déterminants responsables de l'amertume des produits finaux, la composition chimique mise en avant dans la première partie et les notes d'intensité amère des différents CTN ont été mises en relation par des analyses statistiques. La variabilité des génotypes mise en évidence au niveau chimique et sensorielle est donc la clé pour repérer des marqueurs responsables des propriétés sensorielles des produits torréfiés. Pour cela, les 357 signaux, évoluant au cours de la torréfaction, représentent une composante chimique à mettre en lien avec les données sensorielles. Dans notre étude, nous nous intéressons principalement à l'amertume et aux arômes qui lui ont été associés lors de nos précédents travaux : le torréfié / grillé et l'astringence. Ces derniers ont également été étudiés pour valider notre démarche expérimentale. Des corrélations entre les variations chimiques et les variations sensorielles, utilisant des analyses statistiques multivariées, ont alors été entreprises pour associer d'éventuels signaux avec les saveurs amère, astringente et l'arôme torréfié / grillé. Cette démarche a été utilisée dans les travaux de Pattee *et al.* (2000) pour mettre en relation le sucré, l'amertume et l'arôme torréfié avec la composition en sucre de 52 génotypes de cacahuètes grillées. Ainsi, ils ont pu mettre en évidence des corrélations positives entre la composition totale en sucre et la saveur sucrée mais aussi avec l'arôme torréfié. A l'inverse, des corrélations négatives ont été établies entre la composition totale en sucres et les saveurs amère et astringente. Les études de Vilanova *et al.* (2010) sur le vin ont permis, à l'aide de méthodes statistiques tels que l'ACP, la régression des moindres carrés partiels et la corrélation de Pearson, de relier la composition en molécules volatiles avec les propriétés sensorielles du vin blanc espagnol d'Albariño. A partir de 35 échantillons représentant 5 zones géographiques, Vilanova *et al.* (2010) ont déterminé que l'arôme fruité du vin était lié aux concentrations en ester d'éthyle et en acétate et que l'arôme floral était associé aux concentrations des molécules de la famille des monoterpènes. D'autres travaux utilisent cette démarche pour corrélérer des variations de la composition chimique aux propriétés sensorielles dans le but d'identifier des marqueurs responsables des propriétés organoleptiques. C'est le cas chez le vin rouge (Preys *et al.*, 2006 ; Sáenz-Navajas *et al.*, 2010), chez le kiwi (Paterson *et al.*, 1991) ou encore chez le pain (Heenan *et al.*, 2009).

Dans notre étude, des corrélations significatives sont obtenues entre les 357 signaux évoluant lors de la torréfaction de la racine de chicorée et la saveur amère (**figure 3.12**), l'arôme torréfié / grillé et la saveur astringente (**annexe 2**). Les corrélations significatives sont définies par

- un R^2 supérieur à $|0,5|$ et
- une p -value inférieure à 0,05.

Ces paramètres sont déterminés pour être les plus restrictifs dans le but de diminuer les faux positifs. Avec ces conditions, la saveur amère est corrélée négativement avec la teneur en saccharose, avec un

R² de -0,62 (*p*-value = 0,005), et celle de l'inuline, avec un R² de -0,57 (*p*-value = 0,0233). Des corrélations négatives entre les teneurs en sucres totaux et l'amertume ont également été mises en évidence dans les études de Brueckner *et al.* (2010) chez l'asperge blanche et les études de Pattee *et al.* (2000) chez la cacahuète. A l'inverse, nos travaux établissent des corrélations positives pour le fumarate, avec un R² de 0,65 (*p*-value = 0,002), le lactate, avec un R² de 0,62 (*p*-value de 0,0047) et le 5-HMF, avec un R² de 0,63 (*p*-value de 0,0036).

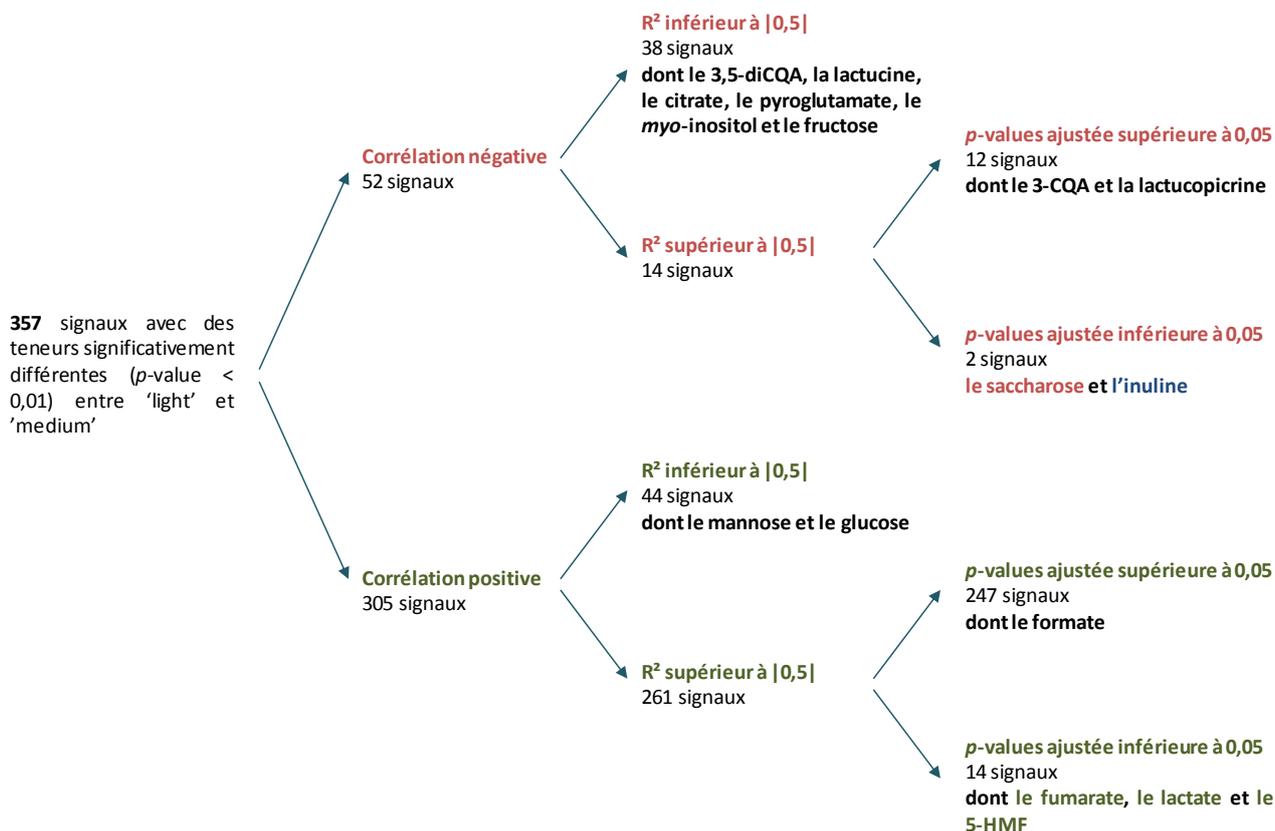


Figure 3.12 : Illustration des résultats obtenus par corrélation de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les 357 signaux évoluant au cours de la torréfaction de la racine de chicorée et la saveur amère. Le saccharose est également corrélé négativement à la saveur astringente et à l'arôme torréfié / grillé. Le fumarate, le citrate et le 5-HMF sont également corrélés positivement à la saveur astringente et à l'arôme torréfié / grillé. L'inuline est également corrélée négativement à l'arôme torréfié / grillé.

Des corrélations similaires sont également obtenues avec l'arôme torréfié / grillé et l'astringence (**annexe 2**). En effet, le saccharose est corrélé négativement et le fumarate, le lactate et le 5-HMF sont corrélés positivement. Des travaux de Bin *et al* (2012) et de Jiang & Peterson (2013), sur l'identification des composés amers dans le pain de blé entier, ont permis d'isoler 8 composés responsables de l'amertume dont le 5-HMF. Ces études sont les seules à recenser le 5-HMF comme molécule néoformée amère.

Le 5-HMF est un composé majeur produit par la caramélisation et la réaction de Maillard dans de nombreux aliments à partir des sucres (Antal *et al.*, 1990 ; Locas & Yaylayan, 2008). Janzowski *et al.* (2000) passent en revue les différentes données disponibles concernant ce composé. Dans une analyse de détection de près de 500 échantillons alimentaires, des concentrations en 5-HMF relativement fortes (supérieur à 1 g/kg) ont été détectées dans des produits spécifiques tels que les fruits secs, les produits caramélisés et les jus à base de prunes séchées. Des concentrations élevées jusqu'à 3,5 g/kg ont été retrouvées dans les poires séchées, jusqu'à 9,5 g/kg dans les produits de caramélisation, jusqu'à 6,2 g/kg dans les poudres de café solubles et jusqu'à 13,9 dans les substituts de café (chicorée). Dans notre étude, la concentration de 5-HMF peut varier de 1,5 à 8,8 g/kg de matière sèche dans les produits de chicorée faiblement torréfiés et de 8,7 à 22,8 g/kg de matière sèche dans les produits moyennement torréfiés. Les études de Kanjahn & Maier (1997) reportent de grandes variations des taux de 5-HMF entre les produits de racines de chicorée torréfiés et les cafés solubles : 0,2 à 22 g/kg et 0,4 à 4,1 g/kg, respectivement. Des résultats similaires sont obtenus dans les travaux de Loaëc *et al.* (2014) avec des variations de 0,7 à 13 g/kg pour les substituts de café et 0,6 à 5 g/kg pour les cafés solubles. Ces deux études indiquent que la grande différence de concentrations entre les échantillons des deux catégories de boisson est principalement liée à la quantité de sucres présents dans les matières premières (précurseurs du 5-HMF) et aux processus de transformation. Dans nos travaux, les corrélations obtenues à partir des résultats des données chimiques ont démontré des corrélations significativement (p -value < 0,001) négatives entre le 5-HMF et les di- et polysaccharides, l'inuline et le saccharose, et des corrélations significativement (p -value < 0,001) positives avec les monosaccharides, le glucose et le mannose (**tableau 3.6**). La production du 5-HMF est générée par la consommation des monosaccharides issus de la dégradation du saccharose et de l'inuline (Antal *et al.*, 1990 ; Hu *et al.*, 2009). La diminution des di- et polysaccharides dans la racine fraîche de chicorée ouvre une piste pour diminuer la teneur en 5-HMF dans les produits torréfiés et abaisser le taux d'amertume des produits transformés.

La base de données « BitterDB » regroupe plus de 680 composés dont l'amertume est perçue par l'homme. Elle est construite à partir de la littérature et du Merck Index, répertoriant les données physiques, chimiques et biomédicales de nombreuses molécules (<https://www.rsc.org/merck-index>). Les composés peuvent être recherchés par nom, structure chimique ou encore similitude avec d'autres composés amers. A cause du manque de bibliographies, le 5-HMF n'y est pas répertorié. Nous avons pu comparer le SMILES (Simplified Molecular-Input Line-Entry System), notation linéaire décrivant la structure chimique de la molécule, du 5-HMF avec la base de données BitterDB. Le coefficient de Tanimoto indique les similarités entre les structures, plus le coefficient est proche de 1 plus les molécules se ressemblent. Les résultats de comparaison indiquent 6 molécules ayant un coefficient de similitude supérieur à 0,5. Le coefficient le plus élevé est de 0,89 pour l'alcool furfurylique (**figure 3.13**).

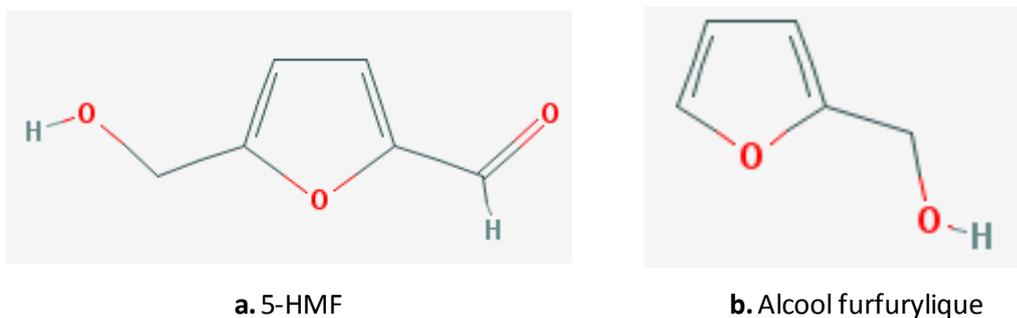
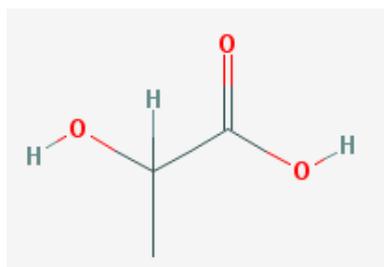


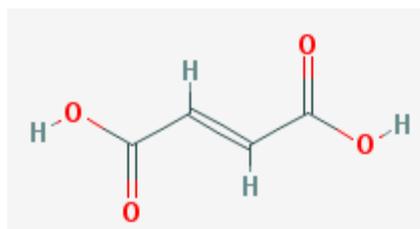
Figure 3.13 : Structures chimiques du 5-HMF (a) et de l'alcool furfurylique (b) (PubChem.ncbi.nlm.nih.gov). La similarité des structures de ces deux composés, renseignée par le coefficient de Tanimoto, est de 0,89.

L'alcool furfurylique est un composé formé par la réaction de Maillard et il est présent dans le café (Kreppenhofer *et al.*, 2011; Swasti & Murkovic, 2012), le chocolat (Counet *et al.*, 2002) ou encore la chicorée (Choi, 1999). Toutefois, il n'a pas été associé à l'amertume dans ces produits. Dans le café l'alcool furfurylique est connu pour être le précurseur de molécules amères : (furan-2-yl)methylated benzene diols et triols (Kreppenhofer *et al.*, 2011). Son amertume est référencée dans l'ouvrage The Merck Index (2001). Sa similarité de structure avec le 5-HMF conforte l'hypothèse de l'implication du 5-HMF dans l'amertume des produits torréfiés de la chicorée.

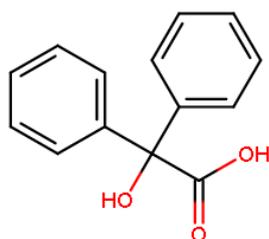
Dans notre étude, des corrélations positives ont également été obtenues avec l'amertume des produits torréfiés de la chicorée. Il s'agit du fumarate et du lactate. Nous avons également comparé le SMILES du lactate et du fumarate avec la base de données BitterDB, puisqu'ils n'y sont pas répertoriés. Pour le fumarate, 20 résultats sont obtenus mais les coefficients de Tanimoto sont inférieurs à 0,5. La première molécule est le magnésium lactate trihydrate avec un coefficient de 0,47. Pour le lactate, 2 résultats ont un coefficient de Tanimoto supérieurs à 0,5. Ce sont l'acide benzylique et le magnésium lactate trihydrate (**figure 3.14**). L'amertume de l'acide benzylique est reportée dans l'ouvrage The Merck Index (2006), et celle du magnésium lactate trihydrate dans le brevet de Nadland & Kleppe (1990). La similarité de structure entre les acides organiques et ces deux molécules laisse penser à la possible implication de ces deux acides organiques dans l'amertume des produits torréfiés de la chicorée. De même que pour le 5-HMF, nos précédents résultats indiquent des corrélations significatives (p -value < 0,001) entre la consommation des monosaccharides, notamment le glucose et le mannose, la dégradation des di- et polysaccharides et la production des acides lactique et fumarique (**tableau 3.6**). Ces résultats appuient de nouveau l'hypothèse que la diminution des teneurs en polysaccharide dans la racine fraîche minimiserait la production du 5-HMF, du lactate et du fumarate lors de la torréfaction diminuant ainsi l'amertume des produits torréfiés de la chicorée.



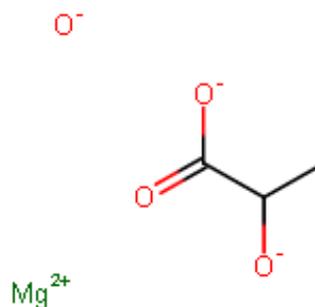
a. Lactate



b. Fumarate



c. Acide benzylique



d. Magnésium lactate trihydrate

Figure 3.14 : Structures chimiques du lactate (a) et du fumarate (b) (PubChem.ncbi.nlm.nih.gov), de l'acide benzylique (b) et du magnésium lactate trihydrate (c) (BitterDB.agri.huji.ac.il).

Les corrélations mettent également en évidence 11 signaux inconnus corrélés significativement et positivement à l'amertume des produits torréfiés de chicorée. Six d'entre eux présentent des caractéristiques supplémentaires qui les lient plus spécifiquement à l'amertume puisqu'ils se corrélaient positivement et significativement à l'arôme torréfié / grillé (**tableau 3.11**), associé à l'amertume, et voient également leur teneur augmenter avec le degré de torréfaction. En l'état actuel, leur identification permettrait de confirmer s'il s'agit de composés répertoriés comme amers.

Tableau 3.11 : Molécules inconnues dont les teneurs sont corrélées positivement à l'amertume.

R ²	Amertume	Torréfié / grillé
M359T140	0,69 *	0,71 *
M175T556	0,71 *	0,7 *
M481T522	0,69 *	0,7 *
M461T143	0,69 *	0,69 *
M397T220	0,69 *	0,69 *
M163T629	0,69 *	0,69 *
M389T139	0,72 *	-
M387T141	0,72 *	-
M596T216	0,71 *	-
M186T188	0,7 *	-
M481T555	0,69 *	-

*** p -value < 0,001, ** p -value < 0,01, * p -value < 0,05.

Le processus de torréfaction induit, *via* les différentes conditions, de la variabilité chimique et sensorielle. L'obtention de variabilité est essentielle pour associer des changements phénotypiques avec l'amertume des produits finaux. Ainsi, par l'intermédiaire de méthodes statistiques, 6 signaux inconnus mais aussi le 5-HMF, le lactate et le fumarate sont associés significativement (p -value < 0,05) à l'amertume des produits torréfiés de la chicorée. Ces métabolites ainsi que la saveur amère sont influencés de la même manière par le degré de torréfaction. Plus la torréfaction est poussée, plus l'intense de l'amertume et les teneurs en 5-HMF, en lactate et en fumarate sont élevées. La production de ces métabolites dépend de la quantité de leurs précurseurs présents dans la matière première, qui sont le fructose, le glucose et le mannose. Or, ces composés sont libérés par l'hydrolyse de l'inuline et du saccharose lors du traitement thermique. La diminution des quantités en di- et polysaccharide dans la matière première engendrerait une diminution des teneurs en 5-HMF, en fumarate et en lactate ce qui induirait une diminution de l'intensité de la saveur amère.

Dans la racine fraîche les teneurs en fructose, en glucose et en inuline ne sont pas significativement différentes entre les 9 génotypes (**tableau 2.5**). De plus, l'absence de différences significatives au niveau de la saveur amère pour chaque groupe de CTN ne permet pas de construire un modèle prédisant l'intensité d'amertume dans les produits torréfiés, par l'intermédiaire de la composition finale, à partir de la composition en sucre de la matière première.

CONCLUSION

L'analyse métabolomique des produits de la chicorée soumis à différents degrés de torréfaction, pour les 9 génotypes représentatifs d'une collection de chicorée industrielle, a permis de démontrer l'impact de la torréfaction sur la composition des produits transformés. Ainsi, une torréfaction poussée engendre moins de néoformations mais plus de dégradation. Toutefois, cette dégradation reste faible puisque 3 081, 3 068 et 3 009 signaux sont détectés respectivement dans les produits faiblement, moyennement et fortement torréfiés. Au niveau quantitatif, la teneur de 11,6 % des signaux communs aux différents produits torréfiés évolue avec le degré de torréfaction. Ainsi pour 1,6 % des signaux, parmi lesquels on retrouve le 3,5-diCQA, du 3-CQA, du citrate, du pyroglutamate, de l'inuline, de la Lc, de la Lp et du saccharose, les teneurs diminuent. Pour les 10 % restants qui voient leur teneur augmenter tout au long de la torréfaction, on trouve notamment le 5-HMF, le formate, le fructose, le fumarate, le glucose, le *myo*-inositol, le lactate et le mannose. Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus dans nos précédents travaux étudiant l'impact de la transformation sur la composition native de la racine de chicorée (chapitre 2). En effet, des corrélations ont également été obtenues entre la dégradation des di- et polysaccharides et l'augmentation des monosaccharides, entre la consommation du fructose et l'augmentation du glucose et du mannose par conversion ou encore entre la consommation des sucres et l'augmentation des acides organiques et du 5-HMF. L'évolution de la plupart des molécules est initiée dès une torréfaction faible. Cependant, concernant le pyroglutamate, molécule néoformée dès la torréfaction faible, sa teneur diminue significativement lors d'une torréfaction plus poussée. L'ensemble des résultats issus des données chimiques met en avant 3 groupes de métabolites influencés différemment lors de la torréfaction :

- les précurseurs, tels que le 3-CQA, le 3,5-diCQA, la Lc, la Lp, le saccharose ou encore l'inuline,
- les métabolites intermédiaires, qui sont formés puis consommés, tels que le glucose, le fructose, le mannose, le pyroglutamate ou encore le citrate,
- les molécules néoformées finales, tels que le 5-HMF, le fumarate, le formate ou encore le lactate.

Notre étude a également démontré un impact de la torréfaction sur les propriétés sensorielles des produits torréfiés de chicorée. Ainsi, une torréfaction plus poussée engendre une augmentation des intensités de la saveur amère et des arômes torréfié / grillé, réglisse et terreux / boisé alors qu'elle diminue celles des arômes endive cuite et tisane / végétal. Ces 6 descripteurs sont liés à l'augmentation progressive de la torréfaction. En ce qui concerne la saveur acide et l'arôme caramel brun leur intensité est maximale dans le CTN 'medium'. Dans ce cas, les caractères organoleptiques sont accentués lors d'une torréfaction moyenne et s'effacent lors d'une torréfaction plus poussée.

La combinaison des données métabolomiques et sensorielles, *via* les corrélations de Pearson, associe 6 signaux inconnus ainsi que le 5-HMF, le fumarate et le lactate à l'amertume. Seule deux études, sur l'amertume du pain, décrivent le 5-HMF comme une molécule amère (Bin *et al.*, 2012 ; Jiang & Peterson, 2013). La comparaison des SMILES au niveau de la base de données BitterDB présente des molécules amères structurellement similaires. Il s'agit de l'alcool furfurylique, de l'acide benzylique et du magnésium lactate trihydrate. Ces résultats renforcent l'hypothèse d'une possible implication du 5-HMF, du lactate et du fumarate dans l'amertume des produits torréfiés de la chicorée. Ces métabolites sont formés lors de la torréfaction par la consommation des di- et polysaccharides et des monosaccharides. Les sucres de la racine fraîche semblent donc être impliqués dans l'amertume des produits torréfiés. La diminution de leur teneur dans la racine fraîche peut être une hypothèse pour diminuer l'amertume des produits torréfiés de la chicorée. Toutefois, l'absence de différence significative pour la saveur amère au sein des 9 génotypes faiblement mais aussi moyennement torréfiés ne permet pas d'établir les conséquences de la composition initiale de la racine sur l'amertume des produits torréfiés.

Une étape de validation sera nécessaire pour confirmer l'implication du 5-HMF, du fumarate, du lactate mais aussi des 6 signaux inconnus dans l'amertume des produits torréfiés de la chicorée. Une démarche senso-guidée pourra être envisagée afin d'isoler un ou des déterminants de l'amertume. Les échantillons torréfiés les plus amers seraient soumis à diverses techniques de fractionnement (extraction liquide-liquide, liquide-solide, chromatographies séparatives). Les fractions obtenues seraient testées par analyse sensorielle afin de détecter les principales activités organoleptiques et de conduire à l'isolement puis l'identification des composés responsables de l'amertume. C'est à l'aide de cette démarche que Jiang & Peterson (2013) ont identifié des composés responsables de l'amertume du pain de blé entier. En effet, après avoir utilisé différentes techniques d'extraction, les fractions obtenues par HPLC ont été soumises à une analyse sensorielle afin d'évaluer l'intensité de la saveur amère. Les fractions sélectionnées pour leur intensité élevée en amertume ont été fractionnées pour isoler les métabolites. Après avoir été soumis à une analyse sensorielle, les composés associés à une forte intensité amère ont été identifiés structurellement. Ainsi Jiang & Peterson (2013) ont identifié 8 composés, dont le 5-HMF, responsables de l'amertume du pain de blé entier. Les études de Czepa & Hofmann (2003) ont identifié structurellement les composés responsables de l'arrière-gout amer chez la carotte. Après avoir fractionné la composition chimique de la carotte, les fractions ont été soumises à une analyse de dilution du goût de la saveur amer. Plus la dilution est élevée, plus la fraction est amère. Cette dernière est fractionnée plus finement et de nouveau soumise à une analyse sensorielle. Ainsi, ils ont pu mettre en évidence le falcarindiol et le 6-méthoxymellein comme molécules responsables de l'arrière-gout amer chez la carotte. Ces méthodes ont également été utilisées pour identifier les déterminants inconnus responsables de l'amertume du cacao (Stark *et al.*, 2005 ; Stark & Hofmann, 2005a, 2005b ; Stark *et al.*, 2006) et du café (Frank *et al.*, 2006 ; Frank *et al.*, 2007 ; Frank

et al., 2008). Ces méthodes s'appliquent également à d'autres propriétés sensorielles. En effet, Hufnagel & Hofmann (2008) les utilisent pour identifier les composés responsables de l'astringence et de l'amertume du vin rouge ou encore Brock & Hofmann (2008) les emploient déterminer les composés impliqués dans l'astringence des épinards.

CONCLUSION GENERALE

ET PERSPECTIVES

Dès l'antiquité, la chicorée a été utilisée en Egypte, en Grèce ou encore en Italie comme produit alimentaire mais aussi à des fins curatives pour guérir les maladies du foie ou encore de l'intestin. La littérature médicinale décrit la chicorée comme anti-hépatique, apéritive ou encore fébrifuge. De nos jours, elle est cultivée pour ses feuilles, qui sont consommées en salades crues ou cuites (*Cichorium endivia*, *Cichorium intybus* var. *sylvestre* et var. *foliosum*), et pour sa racine (*Cichorium intybus* var. *sativum*). La chicorée industrielle, est exploitée comme source d'inuline, ingrédients et également comme produits alimentaires. C'est au 17^{ème} siècle qu'a été mis au point le processus industriel de torréfaction permettant d'obtenir des produits torréfiés de la chicorée. Ce marché s'est renforcé lors du blocus continental décrété par Napoléon en 1806, qui provoqua une pénurie de café. Actuellement, la chicorée industrielle est principalement cultivée en Inde, Afrique du Sud et surtout dans le Nord de l'Europe : France, Belgique et Pays-Bas. Elle est commercialisée sous forme de grain, de liquide concentré ou encore sous forme de poudre soluble. Avec 1 500 à 2 000 hectares, la chicorée est une culture de niche qui a besoin de se renouveler.

La racine de chicorée et ses produits dérivés alimentaires sont connus pour leur amertume. L'amertume est la propriété sensorielle qui provoque le plus de rejets bien qu'elle contribue à la complexité et l'appréciation de certains aliments. Ce rejet a longtemps été considéré comme un système de défense innée. Les systèmes chimiques de défense des plantes (toxiques) impliquent souvent des composés amers tels que la quinine ou encore les tanins. C'est pourquoi la saveur amère de la racine de chicorée peut représenter un frein pour attirer de nouveaux consommateurs. En effet, le goût demeure une composante essentielle de l'acceptabilité et de l'attraction du consommateur pour un aliment. Des études sur la racine fraîche de chicorée attribuent la saveur amère aux composés terpéniques (Rees & Harborne, 1985) et principalement à la dihydrolactucopicrine et à la lactucopicrine (Van Beek et al., 1990). Toutefois, les produits de chicorée industrielle commercialisés et consommés sont les produits issus du séchage et de la torréfaction de la racine fraîche. Le produit brut subissant une transformation, les lactones sesquiterpéniques participent-elles encore à l'amertume des produits transformés ? Par ailleurs, part leur présence dans la racine de chicorée et de leur participation connue en tant que précurseur dans l'amertume du café, les ACG ne peuvent-ils pas également être impliqués dans la saveur amère des produits torréfiés de la chicorée ?

Afin de répondre à cette question, il a fallu développer et valider une méthode, incluant l'extraction et l'analyse, pour la détermination simultanée des LST et des ACG libres de la racine de *Cichorium intybus* var. *sativum* et de ses dérivés alimentaires. Ainsi, le mélange ternaire H₂O/CHCl₃/MeOH (30/30/40, v/v/v) a permis d'extraire simultanément le contenu en acides chlorogéniques et en lactones sesquiterpéniques de la racine fraîche, des cossettes séchées et des produits torréfiés de la chicorée. Par le biais de cette méthode d'analyse et de l'évaluation sensorielle, les travaux suivants ont porté sur la contribution des LST et des ACG dans l'amertume de la racine de

chicorée, avant et après torréfaction. Concernant la racine fraîche, les résultats obtenus ont révélé une différence de teneurs en LST et en ACG entre 5 variétés. Après torréfaction, aucune différence significative des teneurs en LST n'a été observée. En effet, une disparition quasi-totale de ces composés a été constatée lors de la torréfaction. L'évaluation sensorielle, a permis de différencier significativement 5 variétés de racine fraîche et les produits torréfiés correspondants, notamment les variétés Calcite et Chrysolite. Si dans la racine fraîche les LST ont pu être corrélées positivement à l'amertume, cela n'est pas le cas pour les produits torréfiés. Ces résultats soulèvent une nouvelle interrogation, quel(s) composé(s) est (sont) responsable(s) de l'amertume de la racine de chicorée torréfiée ?

Les qualités gustatives du produit torréfié dépendent de sa composition chimique, cette dernière résultant de l'interaction de la torréfaction sur la composition native de la racine. L'évolution de la composition native lors de la torréfaction reste encore inconnue.

A travers l'étude de la diversité génétique, 9 génotypes représentatifs de la variabilité chimique globale de notre collection de 48 génotypes ont pu être sélectionnés. Cette sélection a été nécessaire pour respecter les contraintes de l'analyse sensorielle tant au niveau des compétences du panel, qu'au niveau du délai et du budget établis. Ainsi, la caractérisation des 9 génotypes a été effectuée d'un point de vue moléculaire, chimique et organoleptique.

L'analyse chimique de la racine fraîche, des cossettes séchées et des produits torréfiés à différents degrés (faible, moyen et fort) a permis d'aboutir à l'examen de la composition, sous la forme de signaux triés puis identifiés ou non identifiés, pour chaque stade du traitement. Par un long processus d'exploration et de sélection, les résultats ont démontré l'impact du procédé de transformation, notamment de la torréfaction, sur la composition native de la racine de chicorée. Ainsi, les LST et les acides aminés sont majoritairement dégradés lors de la torréfaction alors que d'autres composés comme le 5-HMF, l'acétate, le lactate, le fumarate, le formate, le *myo*-inositol, le mannose ou encore le pyroglutamate sont formés par le traitement thermique. Ces études ont également mis en évidence que les teneurs en 3,5-diCQA, en 3-CQA, en citrate, en inuline, en Lc, en Lp, en saccharose et en pyroglutamate diminuent dès une faible torréfaction. A l'inverse, les teneurs en 5-HMF, en formate, en fructose, en fumarate, en glucose, en *myo*-inositol, en lactate et en mannose augmentent au cours de la torréfaction. L'ensemble de ces observations a permis de mettre en évidence trois groupes de métabolites influencés différemment lors du processus de torréfaction : les précurseurs (ACG, LST, di- et polysaccharides, acides aminés), les composés néoformés (5-HMF, acétate, lactate, formate, *myo*-inositol) et les composés intermédiaires. Ces derniers sont formés puis consommés lors du processus de torréfaction (glucose, fructose, mannose, pyroglutamate, citrate). L'analyse des relations entre les composés, à l'aide de corrélations simples, a mis en évidence des voies réactionnelles entre la dégradation de composés présents dans la racine fraîche et l'augmentation de teneurs voir l'apparition

de nouvelles molécules lors de la torréfaction. Ainsi, la dégradation des di- et polysaccharides a pu être corrélée à l'augmentation des monosaccharides ou encore la consommation du fructose à l'augmentation du glucose et du mannose par conversion. De plus, l'apparition du pyroglutamate a été corrélée à la dégradation des acides aminés et celles du 5-HMF, de l'acide acétique et de l'acide formique associées à la dégradation des di- et polysaccharides et la consommation des monosaccharides. Toutefois, ces travaux n'ont pas permis d'expliquer l'ensemble des modifications (apparitions, disparitions, augmentation et diminution) à cause du nombre important de molécules non identifiées. De plus, la caramélisation et la réaction de Maillard induisent une multitude de combinaisons possibles entre les molécules natives ce qui accroît la difficulté de mettre en lumière toutes les voies réactionnelles. Ces deux réactions, se produisant lors du traitement thermique des aliments, sont à l'origine des molécules néoformées telles que le 5-HMF et le pyroglutamate mais sont aussi responsables des odeurs, des arômes et des pigments caractéristiques des aliments cuits (Machiels & Istasse, 2002).

L'utilisation de la métabolomique dans mes travaux de thèse, *via* les analyses ciblées et non ciblées menées par différents outils, offre l'étendue la plus large de la composition chimique de la racine fraîche de chicorée, des cossettes séchées et des produits torréfiés. Cette approche est pour la première fois utilisée pour caractériser la racine de chicorée industrielle et ses produits alimentaires dérivés. Cette méthodologie possède, néanmoins, des inconvénients. En effet, la génération de multitudes de données nécessite l'utilisation de démarches statistiques adaptées permettant à la fois de nettoyer et d'éclaircir le jeu de données. En effet, en fonction de la matrice biologique, cette étape peut s'avérer plus ou moins longue. De plus, l'absence de banque de données, notamment pour les produits transformés, engendre un nombre important de métabolites non identifiés.

L'analyse sensorielle, menée sur les décoctions des produits faiblement, moyennement et fortement torréfiés, a démontré un impact de la torréfaction sur les propriétés organoleptiques. Les produits faiblement torréfiés sont décrits avec des arômes d'endive cuite, et de tisane / végétal. Les produits moyennement torréfiés sont perçus acide avec un arôme de caramel brun intense. Les produits fortement torréfiés sont, quant à eux, décrits avec une saveur amère et des arômes torréfié / grillé, réglisse et terreux / boisé. Plus le degré de torréfaction est important, plus les intensités des notes de cuisson tels que la saveur amère, et des arômes torréfié / grillé, réglisse et terreux / boisé sont accentuées et plus celles des notes naturelles tels que les arômes endive cuite et tisane / végétal sont diminuées. En ce qui concerne les intensités des notes dites de début de cuisson, la saveur acide et de l'arôme caramel brun, elles sont accentuées lors d'une torréfaction moyenne puis s'effacent lors d'une torréfaction plus poussée.

L'analyse sensorielle a permis de décrire pour la première fois l'impact de la torréfaction sur les propriétés organoleptiques des produits torréfiés de la chicorée. Toutefois, l'absence de répétabilité des tests sensoriels, s'appuyant sur les compétences des membres du panel, ont pu être observées entre

les sujets et entre les différentes sessions. Cet « outil » n'est jamais acquis, les membres du panel doivent donc s'entraîner régulièrement pour maintenir leur acuité sensorielle. De plus, l'effet de saturation ou encore la lassitude des sujets impliquent que le nombre d'échantillons évalués lors d'une session n'excède pas, en général, une dizaine de produits. Du fait de ces contraintes, la mise en place d'analyse sensorielle s'étudie et s'organise.

L'intégration des données métabolomiques et sensorielles a permis d'associer 6 signaux inconnus, le 5-HMF, le fumarate et le lactate à l'amertume. Le 5-HMF est un bon candidat puisque deux études, sur l'amertume du pain, le décrivent comme une molécule amère (Bin *et al.*, 2012 ; Jiang & Peterson, 2013). La comparaison des composés identifiés à la base de données « BitterDB », regroupant 680 composés amers, a révélé des correspondances avec des structures répertoriées. Ceci renforce notre hypothèse sur l'implication de ces molécules dans l'amertume des produits torréfiés de la chicorée. Le 5-HMF, le fumarate et le lactate sont formés lors de la torréfaction par la dégradation des di- et polysaccharides et la consommation des monosaccharides. Les sucres de la racine fraîche semblent être impliqués dans l'amertume des produits torréfiés de la chicorée.

A court terme, il sera envisagé d'annoter et d'identifier les 6 signaux corrélés à l'amertume des produits torréfiés de la chicorée. Cette étape est en cours de traitement sur la plateforme en ligne : workflow4metabolomics (plateforme Galaxy). La validation de la fonction amère des composés identifiés *in silico* sera conduite par une étape de purification combinée à une évaluation par analyse sensorielle. La démarche consistera au fractionnement senso-guidé du produit torréfié. Les fractions présentant une amertume seront alors sous-fractionnées par des méthodes chromatographiques plus fines afin d'isoler et d'identifier structurellement les composés amers. La confirmation des candidats permettra d'entrevoir la possibilité d'identifier d'éventuels précurseurs dans la matière première.

L'exploitation de l'ensemble des données a permis d'établir une démarche compilant des méthodes univariée et multivariée pour filtrer et sélectionner les variables. Mes travaux de thèse ont permis la création de 2 bases de données, l'une chimique et l'autre sensorielle. Celles-ci pourront être utilisées, à moyen terme, pour l'identification de molécules solubles (non-volatils) impliquées dans d'autres propriétés sensorielles des produits torréfiés, tels que les arômes torréfié / grillé, réglisse ou encore la saveur acide.

A plus long terme, l'objectif sera d'identifier le maximum de signaux dans le but d'établir des réseaux entre la composition initiale et la composition finale des produits de la chicorée. En incluant les données sensorielles, la finalité de la démarche sera de créer des modèles de prédictions de la qualité organoleptique des produits torréfiés, à partir de la connaissance de la composition de la racine fraîche. La connaissance des déterminants chimiques associée aux qualités organoleptiques permettra

de moduler la composition de la matière première par la création variétale pour répondre au mieux aux préférences des consommateurs.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Articles scientifiques

- Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 2(4), 433–459.
- Ahmad, M., Qureshi, R., Arshad, M., Khan, M. A., & Zafar, M. (2009). Traditional herbal remedies used for the treatment of diabetes from district attock (Pakistan). *Pakistan Journal of Botany*, 41(6), 2777–2782.
- Ahmed, B., Al-Howiriny, T. A., & Siddiqui, A. B. (2003). Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 237–240.
- Ait Ameer, L., Mathieu, O., Lalanne, V., Trystram, G., & Birlouez-Aragon, I. (2007). Comparison of the effects of sucrose and hexose on furfural formation and browning in cookies baked at different temperatures. *Food Chemistry*, 101(4), 1407–1416.
- Ait Ameer, L., Rega, B., Giampaoli, P., Trystram, G., & Birlouez-Aragon, I. (2008). The fate of furfurals and other volatile markers during the baking process of a model cookie. *Food Chemistry*, 111, 758–763.
- Ait Ameer, L., Trystram, G., & Birlouez-Aragon, I. (2006). Accumulation of 5-hydroxymethyl-2-furfural in cookies during the baking process: Validation of an extraction method. *Food Chemistry*, 98(4), 790–796.
- Akiyama, M., Murakami, K., Hirano, Y., Ikeda, M., Iwatsuki, K., Wada, A., ... Iwabuchi, H. (2008). Characterization of headspace aroma compounds of freshly brewed Arabica coffees and studies on a characteristic aroma compound of Ethiopian coffee. *Journal of Food Science*, 73(5), C335–C346.
- Akoka, S., Barantin, L., & Trierweiler, M. (1999). Concentration measurement by proton NMR using the ERETIC method. *Analytical Chemistry*, 71(95), 2554–2557.
- Ames, J. M. (1998). Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chemistry*, 62(4), 431–439.
- Antal, M. J., Mok, W. S. L., & Richards, G. N. (1990). Mechanism of formation of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde from D-fructose and sucrose. *Carbohydrate Research*, 199, 91–109.
- Antal, M., Péter, S., Regöly-Mérei, A., Biró, L., Arató, G., Schmidt, J., ... Martos, É. (2010). Effects of oligofructose containing diet in obese persons. *Clinical and Experimental Medical Journal*, 4(1), 141–152.
- Arimura, G., Garms, S., Maffei, M., Bossi, S., Schulze, B., Leitner, M., ... Boland, W. (2008). Herbivore-induced terpenoid emission in *Medicago truncatula*: concerted action of jasmonate, ethylene and calcium signaling. *Planta*, 227(2), 453–464.
- Baek, H. H., & Cadwallader, K. R. (1998). Roasted chicory aroma evaluation by gas chromatography/mass spectrometry/olfactometry. *Journal of Food Science*, 63(2), 234–237.

- Barlianto, H., & Maier, H. G. (1994). Acids in chicory roots and malt 1. Identification in roasted products and method of determination. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*, 198, 215–222.
- Barlianto, H., & Maier, H. G. (1995a). Acids in chicory roots and malt 2. Determination of acids derived from carbohydrates. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*, 200, 273–277.
- Barlianto, H., & Maier, H. G. (1995b). Acids in chicory roots and malt 3. Determination of acids present in the raw products and of their pyrolysis products. *Zeitschrift Für Lebensmittel-Untersuchung Und Forschung*, 201, 375–377.
- Beckmann, M., Enot, D. P., Overy, D. P., & Draper, J. (2007). Representation, comparison, and interpretation of metabolome fingerprint data for total composition analysis and quality trait investigation in potato cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3444–3451.
- Bhumiratana, N., Adhikari, K., & Chambers, E. (2011). Evolution of sensory aroma attributes from coffee beans to brewed coffee. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2185–2192.
- Bicho, N. C., Leitão, A. E., Ramalho, J. C., & Lidon, F. C. (2011). Identification of chemical clusters discriminators of the roast degree in Arabica and Robusta coffee beans. *European Food Research and Technology*, 233(2), 303–311.
- Bin, Q., Jiang, D., Cho, I. H., & Peterson, D. G. (2012). Chemical markers for bitterness in wheat bread. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(6), 454–458.
- Bischoff, T. a, Kelley, C. J., Karchesy, Y., Laurantos, M., Nguyen-Dinh, P., & Arefi, A. G. (2004). Antimalarial activity of lactucin and lactucopicrin: sesquiterpene lactones isolated from *Cichorium intybus* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 455–457.
- Bodera, P. (2008). Influence of prebiotics on the human immune system (GALT). *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*, 2(2), 149–153.
- Böhm, A., Kaiser, I., Trebstein, A., & Henle, T. (2005). Heat-induced degradation of inulin. *European Food Research and Technology*, 220, 466–471.
- Brock, A., & Hofmann, T. (2008). Identification of the key astringent compounds in spinach (*Spinacia oleracea*) by means of the taste dilution analysis. *Chemosensory Perception*, 1(4), 268–281.
- Brueckner, B., Schwarzbach, A., & Schrödter, R. (2010). Correlation between sugar and saponin contents and sensory attributes of white asparagus. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 5, 305–311.
- Buttery, R. G., & Ling, L. C. (1974). Alkylthiazoles in potato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(5), 912–914.
- Cadalen, T., Mörchen, M., Blassiau, C., Clabaut, A., Scheer, I., Hilbert, J.-L., ... Quillet, M.-C. (2010). Development of SSR markers and construction of a consensus genetic map for chicory (*Cichorium intybus* L.). *Molecular Breeding*, 25, 699–722.
- Capuano, E., Ferrigno, A., Acampa, I., Ait-Ameur, L., & Fogliano, V. (2008). Characterization of the Maillard reaction in bread crisps. *European Food Research and Technology*, 228(2), 311–319.

- Carazzone, C., Mascherpa, D., Gazzani, G., & Papetti, A. (2013). Identification of phenolic constituents in red chicory salads (*Cichorium intybus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *138*(2-3), 1062–1071.
- Cavaliere, B., De Nino, A., Hayet, F., Lazez, A., Macchione, B., Moncef, C., ... Tagarelli, A. (2007). A metabolomic approach to the evaluation of the origin of extra virgin olive oil: a convenient statistical treatment of mass spectrometric analytical data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 1454–1462.
- Cavin, C., Delannoy, M., Malnoe, A., Debefve, E., Touché, A., Courtois, D., & Schilter, B. (2005). Inhibition of the expression and activity of cyclooxygenase-2 by chicory extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *327*(3), 742–749.
- Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., & Rodrick, G. E. (2009). Metabolomic analysis in food science: a review. *Trends in Food Science & Technology*, *20*, 557–566.
- Chira, K., & Teissedre, P.-L. (2014). Chemical and sensory evaluation of wine matured in oak barrel: effect of oak species involved and toasting process. *European Food Research and Technology*, *240*(3), 533–547.
- Cho, A.-S., Jeon, S.-M., Kim, M.-J., Yeo, J., Seo, K.-I., Choi, M.-S., & Lee, M.-K. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 937–943.
- Cho, I. H., Kim, Y.-S., & Choi, H.-K. (2007). Metabolomic discrimination of different grades of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.) using ¹H NMR spectrometry and multivariate data analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *43*(3), 900–904.
- Choi, S. H. (1999). Aroma components of chicory (*Cichorium intybus* L.) tea and its model system. *Journal of Food Science and Nutrition*, *4*(2), 88–91.
- Clarke, M. A., Edey, L. A., & Eggleston, G. (1997). Sucrose decomposition in aqueous solution, and losses in sugar manufacture and refining. In D. Horton (Ed.), *In advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* (pp. 441–470).
- Coghe, S., Gheeraert, B., Michiels, A., & Delvaux, F. R. (2006). Development of Maillard reaction related characteristics during malt roasting. *Journal of the Institute of Brewing*, *112*(2), 148–156.
- Cordeiro, G. M., Pan, Y.-B., & Henry, R. J. (2003). Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant Science*, *165*(1), 181–189.
- Coudray, C., Bellanger, J., Castiglia-Delavaud, C., Rémésy, C., Vermorel, M., & Rayssiguier, Y. (1997). Effect of soluble or partly soluble dietary fibres supplementation on absorption and balance of calcium, magnesium, iron and zinc in healthy young men. *European Journal of Clinical Nutrition*, *51*, 375–380.
- Counet, C., Callemien, D., Ouwerx, C., & Collin, S. (2002). Use of gas chromatography–olfactometry to identify key odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 2385–2391.

- Coxam, V. (2005). Inulin-type fructans and bone health: state of the art and perspectives in the management of osteoporosis. *British Journal of Nutrition*, 93(S1), S111–S123.
- Culleré, L., Ferreira, V., Venturini, M. E., Marco, P., & Blanco, D. (2013). Chemical and sensory effects of the freezing process on the aroma profile of black truffles (*Tuber melanosporum*). *Food Chemistry*, 136(2), 518–525.
- Czepa, A., & Hofmann, T. (2003). Structural and sensory characterization of compounds contributing to the bitter off-taste of carrots (*Daucus carota* L.) and carrot puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3865–3873.
- Czerny, M., Mayer, F., & Grosch, W. (1999). Sensory study on the character impact odorants of roasted Arabica coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 695–699.
- D'Auria, J. C., & Gershenzon, J. (2005). The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(3), 308–316.
- De Leenheer, L., & Hoebregs, H. (1994). Progress in the elucidation of the composition of chicory inulin. *Starch/Stärke*, 46, 193–196.
- Demeulemeester, M. A. C., & De Proft, M. P. (1999). In vivo and in vitro flowering response of chicory (*Cichorium intybus* L.): influence of plant age and vernalization. *Plant Cell Reports*, 18, 781–785.
- Demeulemeester, M. A. C., Verdoodt, V., & De Proft, M. P. (1998). Interaction between physiological age and cold treatment on the composition and concentration of carbohydrates in chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Plant Physiology*, 153, 437–445.
- Desprez, B., Delesalle, L., Dhellemmes, C., & Desprez, M. (1994). Genetics and breeding of industrial chicory. *Comptes Rendus de L'académie D'agriculture de France*, 80, 47–62.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, J., Poizat, C., Zanetto, A., ... Laigret, F. (2002). Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105(1), 127–138.
- Doré, C., & Varoquaux, F. (2006). *Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées*. (I. national de la recherche Agronomique, Ed.) (p. 840). Paris.
- Dos Santos, M. D., Gobbo-Neto, L., Albarella, L., De Souza, G. E. P., & Lopes, N. P. (2005). Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (*Arnica da serra*). *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 545–549.
- Eenink, A. H. (1981). Compatibility and incompatibility in witloof-chicory (*Cichorium intybus* L.). 2. The incompatibility system. *Euphytica*, 30, 77–85.
- Eenink, A. H. (1982). Compatibility and incompatibility in witloof-chicory (*Cichorium intybus* L.). 3. Gametic competition after mixed pollinations and double pollinations. *Euphytica*, 31, 773–786.
- El-Hilaly, J., Hmammouchi, M., & Lyoussi, B. (2003). Ethnobotanical studies and economic evaluation of medicinal plants in Taounate province (Northern Morocco). *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 149–158.

- Eskin, N. A. M., & Shahidi, F. (2013). *Biochemistry of foods*. (N. A. M. Eskin & F. Shahidi, Eds.) (3ed ed.).
- Evaluation sensorielle - guide de bonnes pratiques*. (1999) (actia.).
- Fadel, H. H. M., Abdel Mageed, M. a., & Lotfy, S. N. (2008). Quality and flavour stability of coffee substitute prepared by extrusion of wheat germ and chicory roots. *Amino Acids*, *34*(2), 307–314.
- Farah, a., Monteiro, M. C., Calado, V., Franca, A. S., & Trugo, L. C. (2006). Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, *98*(2), 373–380.
- Feldman, J. R., Ryder, W. S., & Kung, J. T. (1969). Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *17*, 733–739.
- Fernie, A. R. (2007). The future of metabolic phytochemistry: larger numbers of metabolites, higher resolution, greater understanding. *Phytochemistry*, *68*(22-24), 2861–2880.
- Ferretti, A., & Flanagan, V. P. (1971). The lactose-casein (Maillard) browning system: volatile components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *19*(2), 245–249.
- Ferretti, A., & Flanagan, V. P. (1973). Characterization of volatile constituents of an N-Formyl-L-lysine-D-Lactose browning system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *21*(1), 35–37.
- Fraisse, D., Felgines, C., Texier, O., & Lamaison, J. (2011). Caffeoyl derivatives: major antioxidant compounds of some wild herbs of the Asteraceae family. *Food and Nutrition Sciences*, *2*, 181–192.
- Franck, A. (2007). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, *87*(2), 287–291.
- Frank, O., Blumberg, S., Krumpel, G., & Hofmann, T. (2008). Structure determination of 3-O-caffeoyl-epi- γ -quinide, an orphan bitter lactone in roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 9581–9585.
- Frank, O., Blumberg, S., Kunert, C., Zehentbauer, G., & Hofmann, T. (2007). Structure determination and sensory analysis of bitter-tasting 4-vinylcatechol oligomers and their identification in roasted coffee by means of LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 1945–1954.
- Frank, O., Zehentbauer, G., & Hofmann, T. (2006). Bioresponse-guided decomposition of roast coffee beverage and identification of key bitter taste compounds. *European Food Research and Technology*, *222*, 492–508.
- Gaber, C., Löhmar, K., & Maier, H. G. (1990). Determination of the main acids of chicory roots by HPLC. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, *338*(3), 300–301.
- Geel, L., Kinnear, M., & De Kock, H. L. (2005). Relating consumer preferences to sensory attributes of instant coffee. *Food Quality and Preference*, *16*, 237–244.
- Giacomoni, F., Le Corguillé, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Pétéra, M., ... Caron, C. (2014). Workflow4Metabolomics: A collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics*, *btu813*.

- Giacomoni, F., Le Corguillé, G., Monsoor, M., Landi, M., Pericard, P., Pétéra, M., ... Caron, C. (2015). Workflow4Metabolomics: a collaborative research infrastructure for computational metabolomics. *Bioinformatics*, *31*(9), 1493–1495.
- Ginz, M., Balzer, H. H., Bradbury, A. G. W., & Maier, H. G. (2000). Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee. *European Food Research and Technology*, *211*(6), 404–410.
- Ginz, M., & Engelhardt, U. H. (2001). Analysis of bitter fractions of roasted coffee by LC-ESI-MS-new chlorogenic acid derivatives. In *19ème Colloque Scientifique International sur le Café, Trieste, Italy, 14-18 mai 2001*. (pp. 1-5). Association Scientifique Internationale du Café (ASIC).
- Gökmen, V., Açar, Ö. Ç., Köksel, H., & Acar, J. (2007). Effects of dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies. *Food Chemistry*, *104*(3), 1136–1142.
- Gökmen, V., Açar, Ö. Ç., Serpen, A., & Morales, F. J. (2008). Effect of leavening agents and sugars on the formation of hydroxymethylfurfural in cookies during baking. *European Food Research and Technology*, *226*(5), 1031–1037.
- Grosch, W. (2001). Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission. *Chemical Senses*, *26*, 533–545.
- Guarrera, P. M., Forti, G., & Marignoli, S. (2005). Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, *96*, 429–444.
- Gupta, A. K., & Kaur, N. (1997). Fructan storing plants: a potential source of high fructose syrups. *Journal of Scientific & Industrial Research*, *56*, 447–452.
- Gupta, A. K., & Kaur, N. (2000). *Fructan metabolism in Jerusalem artichoke and chicory*. (A. K. Gupta & N. Kaur, Eds.) *Developments in Crop Science* (Carbohydrate., Vol. 26, pp. 223–248). Elsevier Science.
- Hagler, J. R., & Buchmann, S. L. (1993). Honey bee (Hymenoptera: Apidae) foraging responses to phenolic-rich nectars. *Journal of the Kansas Entomological Society*, *66*(2), 223–230.
- Hall, R. D., Brouwer, I. D., & Fitzgerald, M. A. (2008). Plant metabolomics and its potential application for human nutrition. *Physiologia Plantarum*, *132*(2), 162–175.
- Hance, P., Martin, Y., Vasseur, J., Hilbert, J. L., & Trotin, F. (2007). Quantification of chicory root bitterness by an ELISA for 11 β , 13-dihydrolactucin. *Food chemistry*, *105*(2), 742-748.
- Hanlidou, E., Karousou, R., Kleftoyanni, V., & Kokkini, S. (2004). The herbal market of Thessaloniki (N Greece) and its relation to the ethnobotanical tradition. *Journal of Ethnopharmacology*, *91*, 281–299.
- Hartman, T. (1956). After effects of low temperature on leaf morphology of *Cichorium intybus* L. *Proc. K. Ned. Akad. Wet.*, *59*, 677–684.
- Heenan, S. P., Dufour, J.-P., Hamid, N., Harvey, W., & Delahunty, C. M. (2009). Characterisation of fresh bread flavour: Relationships between sensory characteristics and volatile composition. *Food Chemistry*, *116*(1), 249–257.

- Heldt, H.-W., & Piechulla, B. (2004). *Plant biochemistry* (Academic P.).
- Hemmerle, H., Burger, H., Below, P., Schubert, G., Rippel, R., Schindler, P. W., ... Herling, A. W. (1997). Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. *Journal of Medicinal Chemistry*, *40*(2), 137–145.
- Hodge, J. E., & Osman, E. M. (1976). Carbohydrates. In *Principles of food science. Part I. Food Chemistry*. New York.
- Hu, S., Zhang, Z., Zhou, Y., Song, J., Fan, H., & Han, B. (2009). Direct conversion of inulin to 5-hydroxymethylfurfural in biorenewable ionic liquids. *Green Chemistry*, *11*(6), 873–877.
- Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 1376–1386.
- Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M. M., & Martínez-Navarrete, N. (2010). Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chemistry*, *118*(2), 291–299.
- Ihaka, R., & Gentleman, R. (1996). R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, *5*(3), 299–314.
- Ikeda, T., Kanaya, S., Yonetani, T., Kobayashi, A., & Fukusaki, E. (2007). Prediction of Japanese green tea ranking by fourier transform near-infrared reflectance spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 9908–9912.
- IUPAC. (1976). Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC- IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN), 1976. Nomenclature of cyclitols. *Biochemical Journal*, *153*(23-31).
- Jaiswal, R., Kiprotich, J., & Kuhnert, N. (2011). Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. *Phytochemistry*, *72*(8), 781–790.
- Janzowski, C., Glaab, V., Samimi, E., Schlatter, J., & Eisenbrand, G. (2000). 5-Hydroxymethylfurfural: assessment of mutagenicity, DNA-damaging potential and reactivity towards cellular glutathione. *Food and Chemical Toxicology*, *38*(9), 801–809.
- Jarić, S., Popović, Z., Macukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mijatović, M., Karadžić, B., ... Pavlović, P. (2007). An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *Journal of Ethnopharmacology*, *111*, 160–175.
- Jiang, D., & Peterson, D. G. (2013). Identification of bitter compounds in whole wheat bread. *Food Chemistry*, *141*(2), 1345–1353.
- Jouad, H., Haloui, M., Rhiouani, H., El Hilaly, J., & Eddouks, M. (2001). Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane). *Journal of Ethnopharmacology*, *77*, 175–182.
- Kaddurah-Daouk, R., & Krishnan, K. R. R. (2009). Metabolomics: a global biochemical approach to the study of central nervous system diseases. *Neuropsychopharmacology*, *34*(1), 173–186.

- Kandeler, R., & Ullrich, W. R. (2009). Symbolism of plants: examples from European-Mediterranean culture presented with biology and history of art. *Journal of Experimental Botany*, 60(14), 3973–3974.
- Kanjahn, D., & Maier, H. G. (1997). Hydroxymethylfurfural and furfural in coffee and related beverages. II. Coffee. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 93(2), 44–46.
- Kaur, N., & Gupta, A. K. (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Biosciences*, 27(7), 703–714.
- Kiers, A. M. (2000). Endive, chicory, and their wild relatives. A systematic and phylogenetic study of Cichorium (Asteraceae). *Gorteria Suppl*, 5, 1–78.
- Kim, M.-Y., Iwai, K., & Matsue, H. (2005). Phenolic compositions of Viburnum dilatatum Thunb. fruits and their antiradical properties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(8), 789–802.
- Kim, S., Park, R., Jeon, H., Kwon, Y., & Chun, W. (2005). Neuroprotective effects of 3, 5-dicaffeoylquinic acid on hydrogen peroxide-induced cell death in SH-SY5Y cells. *Phytotherapy Research*, 19(3), 243–245.
- Kim, Y., Faqih, M. ., & Wang, S. . (2001). Factors affecting gel formation of inulin. *Carbohydrate Polymers*, 46(2), 135–145.
- Kisiel, W., & Zielinska, K. (2001). Guaianolides from Cichorium intybus and structure revision of Cichorium sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 57, 523–527.
- Kleessen, B., Schwarz, S., Boehm, A., Fuhrmann, H., Richter, A., Henle, T., & Krueger, M. (2007). Jerusalem artichoke and chicory inulin in bakery products affect faecal microbiota of healthy volunteers. *British Journal of Nutrition*, 98, 540–549.
- Kleessen, B., Sykura, B., Zunft, H.-J., & Blaut, M. (1997). Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65, 1397–1402.
- Koehler, P. E., & Odell, G. V. (1970). Factors affecting the formation of pyrazine compounds in sugar-amine reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18(5), 895–898.
- Kokoska, L., Polesny, Z., Rada, V., Nepovim, A., & Vanek, T. (2002). Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 82, 51–53.
- Kreppenhof, S., Frank, O., & Hofmann, T. (2011). Identification of (furan-2-yl)methylated benzene diols and triols as a novel class of bitter compounds in roasted coffee. *Food Chemistry*, 126(2), 441–449.
- Krishna, G. K., Zhang, J., Burow, M., Pittman, R. N., Delikostadinov, S. G., Lu, Y., & Puppala, N. (2004). Genetic diversity analysis in valencia peanut (Arachis hypogaea L.) using microsatellite markers. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9, 685–697.
- Krysiak, W. (2006). Influence of roasting conditions on coloration of roasted cocoa beans. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 449–453.

- Kupchan, S. M., Aynehchi, Y., Cassady, J. M., Schnoes, H. K., & Burlingame, A. L. (1969). Tumor inhibitors XL. The isolation and structural elucidation of elephantin and elephantopin, two novel sesquiterpenoid tumor inhibitors from *Elephantopus scaber*. *The Journal of Organic Chemistry*, *34*(12), 3867–3875.
- Kusch, U., Greiner, S., Steininger, H., Meyer, A. D., Corbière-divialle, H., Harms, K., & Rausch, T. (2009). Dissecting the regulation of fructan metabolism in chicory (*Cichorium intybus*) hairy roots, 127–140.
- Labbe, D., Rytz, A., & Hugi, A. (2004). Training is a critical step to obtain reliable product profiles in a real food industry context. *Food Quality and Preference*, *15*(4), 341–348.
- Laing, D. G. (1994). Perceptual odour interactions and objective mixture analysis. *Food Quality and Preference*, *5*, 75–80.
- Laparra, J. M., Glahn, R. P., & Miller, D. D. (2009). Assessing potential effects of inulin and probiotic bacteria on Fe availability from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to Caco-2 cells. *Journal of Food Science*, *74*(2), H40–H46.
- Lee, K., Meck, R., & Piantadosi, C. (1973). Antitumor Agents. 4Cytotoxicity and in vivo activity of helenalin esters and related derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, *16*(3), 299–301.
- Lee, M.-H., Ho, C.-T., & Chang, S. S. (1981). Thiazoles, oxazoles, and oxazolines identified in the volatile flavor of roasted peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *29*, 684–686.
- Lefebvre, A., & Bassereau, J. F. (2003). L'analyse sensorielle, une méthode de mesure au service des acteurs de la conception: ses avantages, ses limites, ses voies d'amélioration. Application aux emballages. In *Dixième séminaire CONFERE* (pp. 3–11). Belfort, France.
- Leloup, V., Louvrier, A., & Liardon, R. (1995). Degradation mechanisms of chlorogenic acids during roasting. In *16th International Conference on Coffee Science (ASIC)*. Kyoto, Japan.
- Leporatti, M. L., & Ivancheva, S. (2003). Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, *87*, 123–142.
- Leroy, T., De Bellis, F., Legnate, H., Kananura, E., Gonzales, G., Pereira, L. F., ... de Kochko, A. (2011). Improving the quality of African robustas: QTLs for yield- and quality-related traits in *Coffea canephora*. *Tree Genetics & Genomes*, *7*(4), 781–798.
- Limami, A., Roux, L., Laville, J., & Roux, Y. (1993). Dynamics of nitrogen compounds in the chicory (*Cichorium intybus* L.) tuberised tap root during the growing season and cold storage period. *Journal of Plant Physiology*, *141*, 263–268.
- Liu, B. H. (1997). *Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis* (CRC press.).
- Loaëc, G., Jacolota, P., Heloua, C., Niquet-Léridona, C., & Tessiera, F. J. (2014). Acrylamide, 5-hydroxymethylfurfural and Nε-carboxymethyl-lysine in coffee substitutes and instant coffees. *Food Additives & Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *31*(4), 593–604.
- Loaëc, G., Niquet-Léridon, C., Henry, N., Jacolot, P., Volpoet, G., Goudemand, E., ... Tessier, F. J. (2014). Effects of variety, agronomic factors, and drying on the amount of free asparagine and

- crude protein in chicory. Correlation with the acrylamide formation during roasting. *Food Research International*, 63, 299–305.
- Locas, C. P., & Yaylayan, V. A. A. Y. (2008). Isotope labeling studies on the formation of 5-(Hydroxymethyl) -2-furaldehyde (HMF) from sucrose by pyrolysis-GC MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6717–6723.
- Löhmar, K., & Theurillat, V. (2003). Chicory beverages. *Elsevier Science Ltd*, 1144–1149.
- Loi, M. C., Maxia, L., & Maxia, A. (2005). Ethnobotanical Comparison Between the Villages of Escolca and Lotzorai (Sardinia, Italy). *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 11(3), 67–84.
- Machiels, D., & Istasse, L. (2002). La réaction de Maillard: importance et applications en chimie des aliments. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 146, 347–352.
- Macrae, R., Robinson, R. K., & Sadler, M. J. (1993). *Encyclopaedia of food science, food technology, and nutrition*.
- Maga, J. A. (1978). Oxazoles and oxazolines in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(5), 1049–1050.
- Maga, J. A. (1981). Pyrroles in foods. *American Chemical Society*, 29(4), 691–694.
- Maga, J. A., & Sizer, C. E. (1973). Pyrazines in foods. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21(1), 22–30.
- Mares, D., Romagnoli, C., Tosi, B., Andreotti, E., Chillemi, G., & Poli, F. (2005). Chicory extracts from *Cichorium intybus* L. as potential antifungals. *Mycopathologia*, 160, 85–92.
- Markowicz, D., Monaro, É., Siguemoto, É., & Séfora, M. (2012). Maillard reaction products in processed food: Pros and Cons. In B. Valdez (Ed.), *Food Industrial Processes - Methods and Equipment* (pp. 281–300). In Tech.
- Martins, S. I. F. S., Jongen, W. M. F., & van Boekel, M. A. J. S. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 364–373.
- Mathlouti & Rogè (2005). Le caramel. Dossier CEDUS. Centre d'études et de documentation du sucre
- Masi, C., Dinnella, C., Barnabà, M., Navarini, L., & Monteleone, E. (2013). Sensory properties of under-roasted coffee beverages. *Journal of Food Science*, 78(8), S1290–S1300.
- Matas, A. J., Gapper, N. E., Chung, M.-Y., Giovannoni, J. J., & Rose, J. K. C. (2009). Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf-life. *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 197–203.
- Mérot-L'Anthoëne, V., Mangin, B., Lefebvre-Pautigny, F., Jasson, S., Rigoreau, M., Husson, J., ... Crouzillat, D. (2014). Comparison of three QTL detection models on biochemical, sensory, and yield characters in *Coffea canephora*. *Tree Genetics & Genomes*, 10(6), 1541–1553.
- Meyer, D., & Stasse-Wolthuis, M. (2009). The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63, 1277–1289.

- Milala, J., Grzelak, K., Król, B., Juśkiewicz, J., & Zduńczyk, Z. (2009). Composition and properties of chicory extracts rich in fructans and polyphenols. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 59(1), 35–43.
- Miraldi, E., Ferri, S., & Mostaghimi, V. (2001). Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 77–87.
- Moing, A., Maucourt, M., Renaud, C., Gaudillère, M., Brouquisse, R., Lebouteiller, B., ... Rolin, D. (2004). Quantitative metabolic profiling by 1-dimensional ¹H-NMR analyses: application to plant genetics and functional genomics. *Functional Plant Biology*, 31, 889–902.
- Montavon, P., Duruz, E., Rumo, G., & Pratz, G. (2003). Evolution of green coffee protein profiles with maturation and relationship to coffee cup quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2328–2334.
- Moreira, A. S. P., Nunes, F. M., Domingues, M. R., & Coimbra, M. a. (2012). Coffee melanoidins: structures, mechanisms of formation and potential health impacts. *Food & Function*, 3(9), 903–915.
- Murkovic, M., & Bornik, M.-A. (2007). Formation of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) and 5-hydroxymethyl-2-furoic acid during roasting of coffee. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(4), 390–394.
- Murkovic, M., & Pichler, N. (2006). Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 842–846.
- Muys, C., Thienpont, C.-N., Dauchot, N., Maudoux, O., Draye, X., & Van Cutsem, P. (2014). Integration of AFLPs, SSRs and SNPs markers into a new genetic map of industrial chicory (*Cichorium intybus* L. var. *sativum*). *Plant Breeding*, 133(1), 130–137.
- Nadland, K. J., & Kleppe, M. A. (1990). Magnesium additive for nutrients, feed, and medicaments.
- Nagahara, Y., Nagamori, T., Tamegai, H., Hitokuwada, M., Yoshimi, Y., Ikekita, M., & Shinomiya, T. (2012). Inulin stimulates phagocytosis of PMA-treated THP-1 macrophages by involvement of PI3-kinases and MAP kinases. *BioFactors*, 37(6), 447–454.
- Niggeweg, R., Michael, A. J., & Martin, C. (2004). Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology*, 22(6), 746–754.
- O'Neil, M.J. (ed.). *The Merck Index - An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2006, p. 179
- O'Neil, M.J. (ed.). *The Merck Index - An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals*. 13th Edition, Whitehouse Station, NJ: Merck and Co., Inc., 2001, p. 764
- Ott, J. (1992). Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *American Journal of Human Genetics*, 51(2), 283–290.
- Paterson, V. J., Macrae, E. a, & Young, H. (1991). Relationships between sensory properties and chemical composition of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 57(2), 235–251.

- Pattee, H. E., Isleib, T. G., Giesbrecht, F. G., & McFeeters, R. F. (2000). Relationships of sweet, bitter, and roasted peanut sensory attributes with carbohydrate components in peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 757–763.
- Pazola, Z. (1987). The chemistry of chicory and chicory-product beverages. In R. J. Clarke & R. Macrae (Eds.), *Coffee. Related beverages* (Elsevier A., pp. 19–57).
- Peters, A. M., Haagsma, N., Gensch, K., & Amerongen, A. Van. (1996). Production and characterization of polyclonal antibodies against the bitter sesquiterpene lactones of chicory (*Cichorium intybus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*, 3611–3615.
- Peters, A. M., & Van Amerongen, A. (1998). Relationship between levels of sesquiterpene lactones in chicory and sensory evaluation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *123*(2), 326–329.
- Piccolo, D., & D'Elia, A. (2008). A new approach for modelling consumers' preferences. *Food Quality and Preference*, *19*(3), 247–259.
- Picman, A. K. (1986). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*, *14*(3), 255–281.
- Pieroni, A. (2000). Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, *70*, 235–273.
- Pieroni, A., Quave, C., Nebel, S., & Heinrich, M. (2002). Ethnopharmacy of the ethnic Albanians (Arbereshe) of northern Basilicata, Italy. *Fitoterapia*, *73*, 217–241.
- Plaschke, J., Ganal, M. W., & Röder, M. S. (1995). Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, *91*(6-7), 1001–1007.
- Pongsuwan, W., Bamba, T., Harada, K., Yonetani, T., Kobayashi, A., & Fukusaki, E. (2008). High-throughput technique for comprehensive analysis of Japanese green tea quality assessment using ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry (UPLC/TOF MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 10705–10708.
- Preys, S., Mazerolles, G., Courcoux, P., Samson, A., Fischer, U., Hanafi, M., ... Cheynier, V. (2006). Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1-2), 126–136.
- Price, K. R., DuPont, M. S., Shepherd, R., Chan, H. W.-S., & Fenwick, G. R. (1990). Relationship between the chemical and sensory properties of exotic salad crops -coloured lettuce (*Lactuca sativa*) and chicory (*Cichorium intybus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *53*, 185–192.
- Pushparaj, P. N., Low, H. K., Manikandan, J., Tan, B. K. H., & Tan, C. H. (2007). Anti-diabetic effects of *Cichorium intybus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *111*(2), 430–4.
- Rambaud, C., Dubois, J., & Vasseur, J. (1993). Male-sterile chicory cybrids obtained by intergeneric protoplast fusion. *Theoretical and Applied Genetics*, *87*(3), 347–352.

- Ramirez-Jiménez, A., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2000). Browning indicators in bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4176–4181.
- Raulier, P., Maudoux, O., Notté, C., Draye, X., & Bertin, P. (2016). Exploration of genetic diversity within *Cichorium endivia* and *Cichorium intybus* with focus on the gene pool of industrial chicory. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 63(2), 243–259.
- Rees, S. B., & Harborne, J. B. (1985). The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochemistry*, 24(10), 2225–2231.
- Respondek, F., Swanson, K. S., Belsito, K. R., Vester, B. M., Wagner, A., Istasse, L., & Diez, M. (2008). Short-chain fructooligosaccharides influence insulin sensitivity and gene expression of fat tissue in obese dogs. *The Journal of Nutrition*, 138(9), 1712–1718.
- Ritota, M., Casciani, L., & Valentini, M. (2013). PGI chicory (*Cichorium intybus* L.) traceability by means of HRMAS-NMR spectroscopy: a preliminary study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7), 1665–1672.
- Rizzi, G. P. (1974). Formation of N-alkyl-2-acylpyrroles and aliphatic aldimines in model nonenzymic browning reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22(2), 279–282.
- Roberfroid, M. B. (2005). Introducing inulin-type fructans. *British Journal of Nutrition*, 93(S1), S13–S25.
- Roberfroid, M. B., Van Loo, J. A. E., & Gibson, G. R. (1998). The Bifidogenic Nature of Chicory Inulin and Its Hydrolysis Products. *The Journal of Nutrition*, 128, 11–19.
- Rössner, J., Velisek, J., Pudil, F., & Davídek, J. (1990). Strecker degradation products of aspartic and glutamic acids and their amides. *Czech Journal of Food Sciences*, 19, 41–45.
- Rumessen, J. J., Bodé, S., Hamberg, O., & Gudmand-Hoyer, E. (1990). Fructans of Jerusalem artichokes: intestinal transport, absorption, fermentation, and influence on blood glucose, insulin, and C-peptide responses in healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 52, 675–681.
- Rüngeler, P., Castro, V., Mora, G., Gören, N., Vichnewski, W., Pahl, H. L., ... Schmidt, T. J. (1999). Inhibition of Transcription Factor NF- κ B by Sesquiterpene Lactones: a Proposed Molecular Mechanism of Action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7, 2343–2352.
- Sáenz-Navajas, M.-P., Tao, Y.-S., Dizy, M., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2010). Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of premium Spanish red wines and their correlation to quality perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12407–12416.
- Sakamura, S., Furukawa, K., & Kasal, T. (1978). Bitter diketopiperazines in roasted malts for beer brewing. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(3), 607–612.
- Sánchez Pérez, E. M., García López, J., Iglesias, M. J., López Ortiz, F., Toresano, F., & Camacho, F. (2011). HRMAS-nuclear magnetic resonance spectroscopy characterization of tomato “flavor varieties” from Almería (Spain). *Food Research International*, 44(10), 3212–3221.

- Sannai, A., Fujimori, T., & Kato, K. (1982). Studies on flavor components of roasted chicory root studies on flavor components of roasted chicory root. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46(2), 429–433.
- Sarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., & Saukel, J. (2011). Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 1051–1076.
- Savikin, K., Zdunić, G., Menković, N., Zivković, J., Cujčić, N., Tereščenko, M., & Bigović, D. (2013). Ethnobotanical study on traditional use of medicinal plants in South-Western Serbia, Zlatibor district. *Journal of Ethnopharmacology*, 146, 803–810.
- Seo, H.-S., Lee, S.-Y., & Hwang, I. (2009). Development of sensory attribute pool of brewed coffee. *Journal of Sensory Studies*, 24(1), 111–132.
- Seto, M., Miyase, T., Umehara, K., Ueno, A., Hirano, Y., & Otani, N. (1988). Sesquiterpene lactones from *Cichorium endivia* L., and *Cichorium intybus* L. and cytotoxic activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36, 2423–2429.
- Sezik, E., Yesilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., & Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in turkey X. folk medicine in central anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 75, 95–115.
- Shaw, P. E., & Berry, R. E. (1977). Hexose-amino acid degradation studies involving formation of pyrroles, furans, and other low molecular weight products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(3), 641–644.
- Shigematsu, H., Kurata, T., Kato, H., & Fujimaki, M. (1972). Volatile compounds formed on roasting DL-a-alanine with D-glucose. *Agricultural and Biological Chemistry*, 36(9), 1631–1637.
- Silvestrini, M., Junqueira, M. G., Favarin, A. C., Guerreiro-Filho, O., Maluf, M. P., Silvarolla, M. B., & Colombo, C. a. (2007). Genetic diversity and structure of Ethiopian, Yemen and Brazilian *Coffea arabica* L. accessions using microsatellites markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(6), 1367–1379.
- Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R., & Siuzdak, G. (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical Chemistry*, 78(3), 779–787.
- Son, H.-S., Hwang, G.-S., Kim, K. M., Ahn, H.-J., Park, W.-M., Van Den Berg, F., ... Lee, C.-H. (2009). Metabolomic studies on geographical grapes and their wines using ¹H NMR analysis coupled with multivariate statistics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1481–1490.
- Stark, T., Bareuther, S., & Hofmann, T. (2005). Sensory-guided decomposition of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) and structure determination of taste-active polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), 5407–5418.
- Stark, T., Bareuther, S., & Hofmann, T. (2006). Molecular definition of the taste of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) by means of quantitative studies and sensory experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5530–5539.

- Stark, T., & Hofmann, T. (2005a). Isolation, structure determination, synthesis, and sensory activity of N-phenylpropenoyl-L-amino acids from cocoa (*Theobroma cacao*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(13), 5419–5428.
- Stark, T., & Hofmann, T. (2005b). Structures, sensory activity, and dose/response functions of 2,5-diketopiperazines in roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(13), 7222–7231.
- Stoffelsma, J., & Pypker, J. (1968). Some new constituents of roasted coffee. *Receuil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas*, *87*, 241–242.
- Stoll, M., Dietrich, P., Sundt, E., & Winter, M. (1967). Recherches sur les arômes 15e communication [1] Sur l'arôme du cacao II. *Helvetica Chimica Acta*, *50*(7), 2065–2067.
- Stoll, M., Winter, M., Gautschi, F., Flament, I., & Willhalm, B. (1967). Recherches sur les arômes 13e communication [1] Sur l'arôme de café. I. *Helvetica Chimica Acta*, *50*(2), 628–694.
- Stone, H., & Sidel, J. L. (2004). *Sensory evaluation practices, Third Edition, Academic*. San Diego.
- Street, R. a, Sidana, J., & Prinsloo, G. (2013). Cichorium intybus: traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and toxicology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1–13.
- Süntar, I., Akkola, E. K., Kelesb, H., Yesiladac, E., Sarkerd, S. D., & Baykala, T. (2012). Comparative evaluation of traditional prescriptions from Cichorium intybus L. for wound healing: stepwise isolation of an active component by in vivo bioassay and its mode of activity. *Journal of Ethnopharmacology*, *143*(1), 299–309.
- Swasti, Y. R., & Murkovic, M. (2012). Characterization of the polymerization of furfuryl alcohol during roasting of coffee. *Food & Function*, *3*(9), 965–969.
- Tarachiwin, L., Masako, O., & Fukusaki, E. (2008). Quality evaluation and prediction of *Citrullus lanatus* by ¹H NMR-based metabolomics and multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 5827–5835.
- Tarachiwin, L., Ute, K., Kobayashi, A., & Fukusaki, E. (2007). ¹H NMR based metabolic profiling in the evaluation of Japanese green tea quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 9330–9336.
- Tetik, F., Civelek, S., & Cakilcioglu, U. (2013). Traditional uses of some medicinal plants in Malatya (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, *146*, 331–346.
- Thomson, M. J., Septiningsih, E. M., Suwardjo, F., Santoso, T. J., Silitonga, T. S., & McCouch, S. R. (2007). Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, *114*(3), 559–568.
- Trethewey, R. N. (2004). Metabolite profiling as an aid to metabolic engineering in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*(2), 196–201.
- Trugo, L. C., & Macrae, R. (1984). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry*, *15*(3), 219–227.
- Trugo, L. C., & Macrae, R. (1984). Chlorogenic acid composition of instant coffees. *Analyst*, *109*, 263–266.

- Ungnade, H. E., & Hendley, E. C. (1948). The bitter principle of *Helenium tenuifolium*. *Journal of the American Chemical Society*, *70*, 3921–3924.
- Van Beek, T. A., Maas, P., King, B. M., Leclercq, E., Voragen, A. G. J., & De Groot, A. (1990). Bitter sesquiterpene lactones from chicory roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*(4), 1035–1038.
- Van Boekel, M. A. J. S. (2006). Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*, *24*, 230–233.
- Van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., & Verstraete, W. (2004). Prebiotic effects of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbiology Ecology*, *51*, 143–53.
- Van den Ende, W., Mintiens, A., Speleers, H., Onuoha, A. A., & Van Laere, A. (1996). The metabolism of fructans in roots of *Cichorium intybus* during growth, storage and forcing. *New Phytologist*, *132*, 555–563.
- Van Den Heuvel, E. G. H. M., Muys, T., Van Dokkum, W., & Schaafsma, G. (1999). Oligofructose stimulates calcium absorption in adolescents 1–3. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *69*, 544–548.
- Van Laere, A., & Van den Ende, W. (2002). Inulin metabolism in dicots: chicory as a model system. *Plant, Cell and Environment*, *25*, 803–813.
- Van Stallen, N., Vandenbussche, B., Londers, E., Noten, V., & de Proft, M. (2005a). QTL analysis of important pith characteristics in a cross between two inbred lines of chicory (*Cichorium intybus* var. *foliosum*): a preliminary study. *Plant Breeding*, *124*, 54–58.
- Van Stallen, N., Vandenbussche, B., Londers, E., Noten, V., & de Proft, M. (2005b). QTL analysis of production and taste characteristics of chicory (*Cichorium intybus* var. *foliosum*). *Plant Breeding*, *124*, 59–62.
- Van Wyk, B. E., Van Oudtshoorn, B., & Gericke, N. (1997). *Medicinal plants of South Africa* (Briza Publ.). Pretoria, South Africa.
- Variyar, P., Ahmad, R., Bhat, R., Niyas, Z., & Sharma, A. (2003). Flavoring components of raw monsooned arabica coffee and their changes during radiation processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 7945–7950.
- Verbrugghe, A., Hesta, M., Gommeren, K., Daminet, S., Wuyts, B., Buyse, J., & Janssens, G. P. J. (2009). Oligofructose and inulin modulate glucose and amino acid metabolism through propionate production in normal-weight and obese cats. *The British Journal of Nutrition*, *102*(5), 694–702.
- Vilanova, M., Genisheva, Z., Masa, A., & Oliveira, J. M. (2010). Correlation between volatile composition and sensory properties in Spanish Albariño wines. *Microchemical Journal*, *95*(2), 240–246.
- Villegas, R. J. A., Shimokawa, T., Okuyama, H., & Kojima, M. (1987). Purification and characterization of chlorogenic acid: Chlorogenate caffeoyl transferase in sweet potato roots. *Phytochemistry*, *26*(6), 1577–1581.

- Vranová, E., Coman, D., & Gruissem, W. (2013). Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 665–700.
- Walradt, J. P., Pittet, A. O., Kinlin, T. E., Muralidhara, R., & Sanderson, A. (1971). Volatile components of roasted peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *19*(5), 972–979.
- Wei, F., Furihata, K., Koda, M., Hu, F., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2012). Roasting process of coffee beans as studied by nuclear magnetic resonance: time course of changes in composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 1005–1012.
- Wesołowska, A., Nikiforuk, A., Michalska, K., Kisiel, W., & Chojnacka-Wójcik, E. (2006). Analgesic and sedative activities of lactucin and some lactucin-like guaianolides in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *107*(2), 254–258.
- Willeman, H., Hance, P., Fertin, A., Voedts, N., Duhal, N., Goossens, J.-F., & Hilbert, J.-L. (2014). A method for the simultaneous determination of chlorogenic Acid and sesquiterpene lactone content in industrial chicory root foodstuffs. *The Scientific World Journal*, 1–11.
- Wishart, D. S. (2008a). Applications of metabolomics in drug discovery and development. *Drugs in R&D*, *9*(5), 307–322.
- Wishart, D. S. (2008b). Metabolomics: applications to food science and nutrition research. *Trends in Food Science & Technology*, *19*, 482–493.
- Yeretzian, C., Jordan, A., & Lindinger, W. (2003). Analysing the headspace of coffee by proton-transfer-reaction mass-spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, *223-224*, 115–139.
- Zawirska-Wojtasiak, R., Wojtowicz, E., Przygoński, K., & Olkowicz, M. (2014). Chlorogenic acid in raw materials for the production of chicory coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *94*, 2118–2123.

Sites internet

Groupement national interprofessionnel des semences et plants, Gnis : gnis.org

Infrastructure nationale en métabolomique et en fluxomique Plateforme métabolomique métaboHUB : metabohub.fr

Plateforme Workflow4metabolomics : galaxy.workflow4metabolomics.org

PRWeb, 2013. Prebiotic Ingredients Market– Global Industry Analysis, Size, Share, Trends, and Forecast, 2012 – 2018 : <http://www.prweb.com/releases/2013/8/prweb11077932.htm>

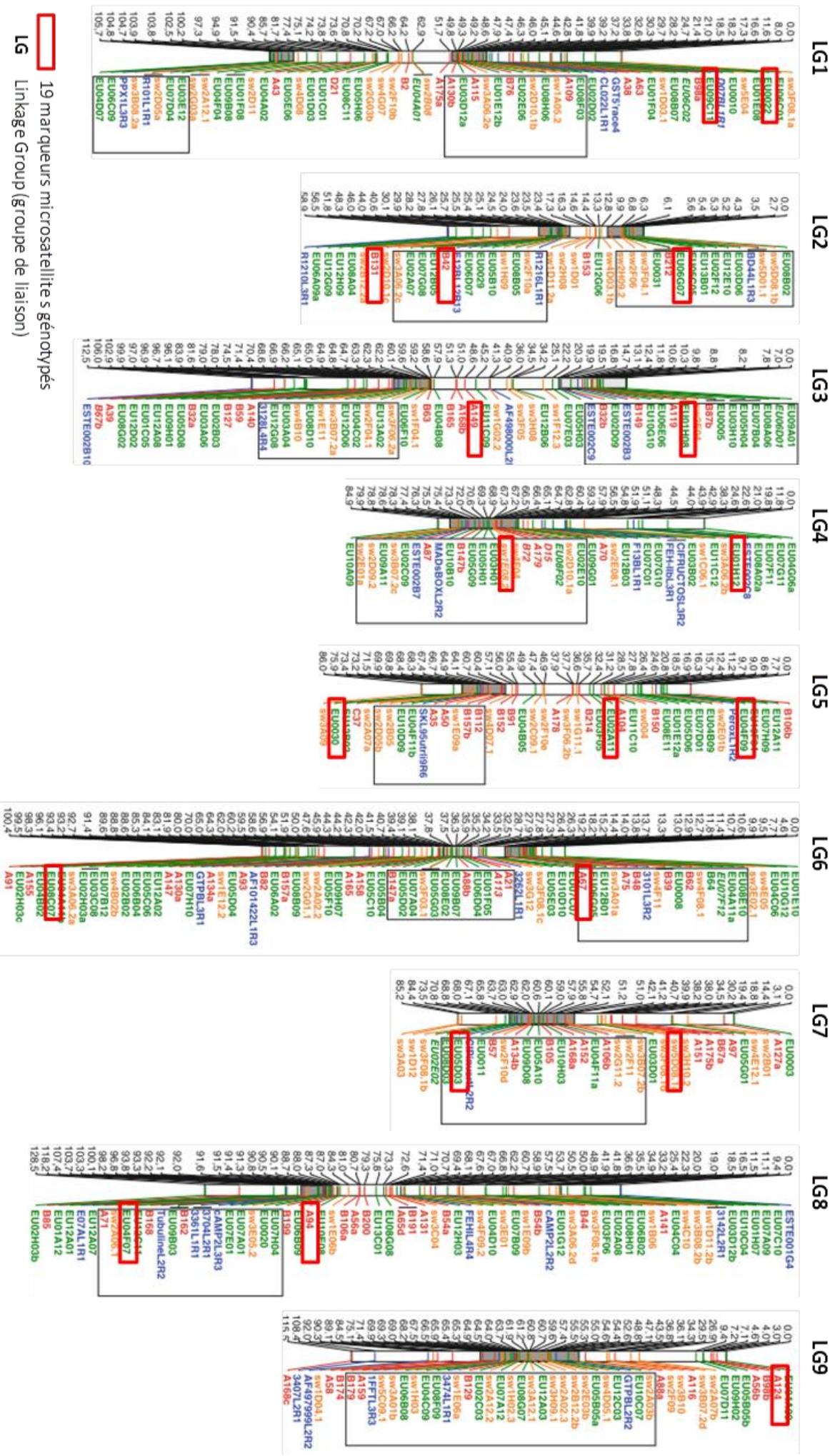
Site internet de la base de données des composés amers BitterDB : BitterDB.agri.huji.ac.il.

Site internet PubChem : PubChem.ncbi.nlm.nih.gov

Société Leroux : leroux.com

Union Française des Semenciers : ufs-semenciers.org

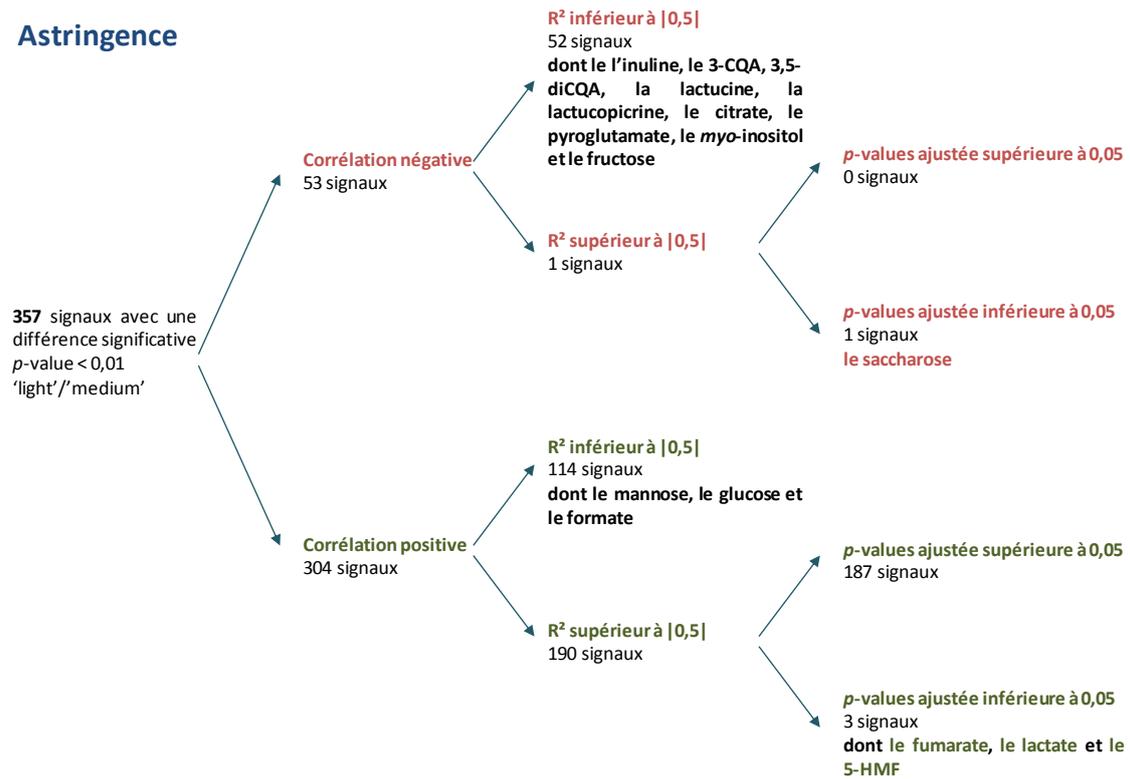
ANNEXES



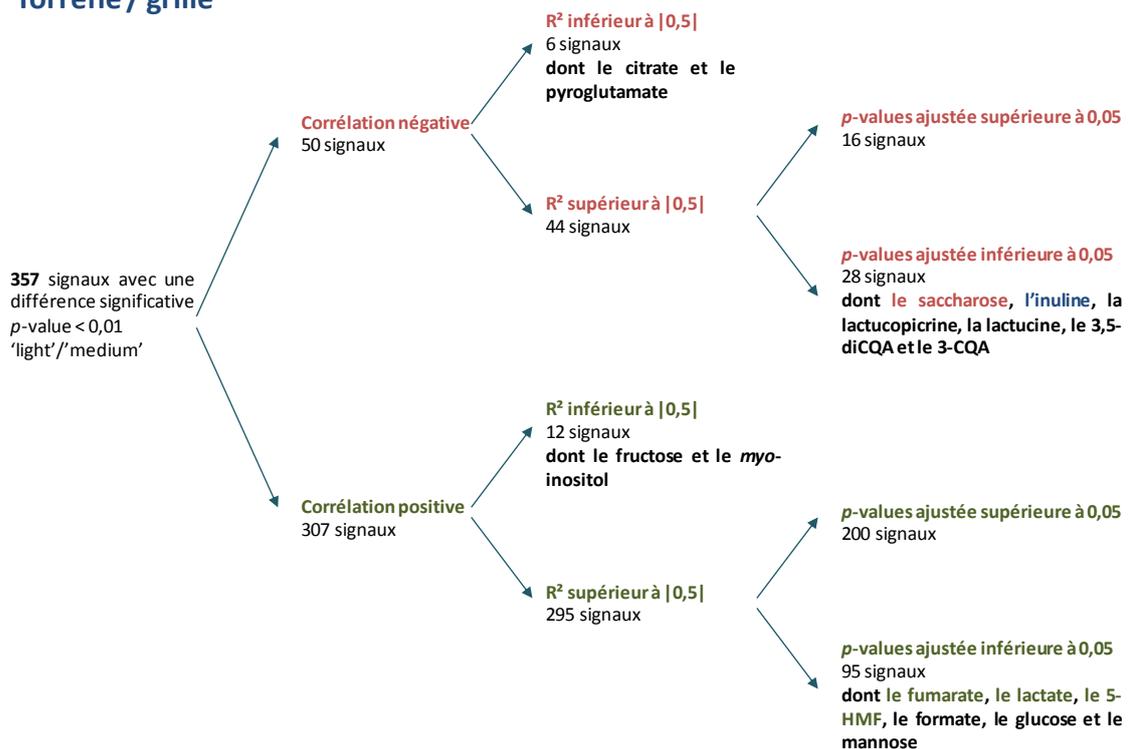
19 marqueurs microsatellite s génotypés
 LG Linkage Group (groupe de liaison)

Annexe I : Emplacement des 19 marqueurs microsatellites génotypés sur la carte génétique de référence de la chicorée (Cadalen et al., 2010)

Astringence



Torréfié / grillé



Annexe 2 : Illustration des résultats obtenus par corrélation de Pearson (logiciel R v2.15.) entre les 357 signaux évoluant au cours de la torréfaction de la racine de chicorée et la saveur astringente et l'arôme torréfié / grillé. Le saccharose est également corrélé négativement à la saveur amère. Le fumarate, le citrate et le 5-HMF sont également corrélés positivement à la saveur amère. L'inuline est également corrélée négativement à la saveur amère.

VALORISATION

Valorisation sous forme de publication

Willeman, H., Hance, P., Fertin, A., Voedts, N., Duhal, N., Goossens, J.-F., & Hilbert, J.-L. (2014). A method for the simultaneous determination of chlorogenic acid and sesquiterpene lactone content in industrial chicory root foodstuffs. *The Scientific World Journal*, 1–11.

Valorisation sous forme de poster

- Profilage sensométabolique par LC-DAD et LC-ESI-MSⁿ des produits alimentaires de la racine de chicorée industrielle (*Cichorium intybus* var. *sativum*). H. Willeman, A. Fertin, Y. Guitton, N. Voedts, J.-L. Hilbert & P. Hance. 6^{ème} Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, 21 au 23 mai 2012 à Nantes.
- Roasting and variety effect on the composition of the roasted product from the root of industrial chicory (*Cichorium intybus* var. *sativum*) – Metabolomic analysis by LC-DAD, LC-QTOF-MS and ¹H-NMR. H. Willeman, A. Moing, M. Maucourt, S. Bernillon, C. Deborde, N. Voedts, N. Henry, M. Janssens, J.-L. Hilbert & P. Hance. 8^{ème} Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique, 19 au 21 mai 2014 à Lyon.
- Metabolomic analysis of chicory root and its foodstuffs related to variety effect and industrial processing. H. Willeman, A. Moing, M. Maucourt, S. Bernillon, C. Deborde, N. Voedts, N. Henry, M. Janssens, J.-L. Hilbert & P. Hance. 8^{ème} congrès Jeunes Chercheurs de la Société Française de Biologie Végétale, 25 au 27 juin 2014 à Tours.
- Dosage par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem des acides chlorogéniques de la racine de chicorée industrielle. N. Duhal, H. Willeman, P. Hance, J.-L. Hilbert, J.-F. Goossens. 32^{ème} Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, 15 au 18 septembre 2015 à Ajaccio.