

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

iserit l'
Université Abou Bekr Belkaid - Tlemcen

Faculté des Sciences

Département de biologie Moléculaire et cellulaire

Laboratoire des produits naturels

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en Biologie

Option: BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

Présentée par: BEGHADAD Mohammed Choukri

Thème

Etude Phytochimique et Activité Antioxydante
de Quelques Espèces Végétales du Nord-ouest Algérien

Soutenue publiquement le. 09 Novembre 2009 *Devant le jury, composé de:*

Président:

M' TALEB-BENDIAB Sid-Ahmed, Professeur à l'UABB (Tlemcen)

Examineurs:

MCI BOUTEKDJIRET Chahrazed, Professeur à l'ENP d'Alger

Mtm ATTIK Fouzia, Professeur à l'UABB (Tlemcen)

M' BENALI Mohamed, Professeur à l'UDL (Sidi Bel-Abbes)

M CHEMAT Farid, Professeur à l'Université d'Avigfin (Francè)

Rapporteur:

Mtm BELARBI Meriem, Professeur à l'UABB (Tlemcen)

ANNEE UNIVERSITAIRE 2009/2010

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche a été physiquement effectué au laboratoire des Produits t' (Laprona) du Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire de la Faculté des Université Abou Bekr Bekaid (UABB) sous la direction de Mtm le Professeur M. BEL l'UMR A 408 1NRA- UAPV, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végét d'Avignon et des Pays de Vaucluse sous la direction de M' le Professeur F. CHEMK

Je tiens à rendre un hommage respectueux à Madame le Professeur M., / choix du sujet, le suivi et l'intérêt qu'elle m'a apportés tout au long de ce trav l'expression de ma profonde gratitude pour ses précieux conseils et ses encoi.

r mprcjements à Monsieur >i

LISTE DES FIGURES

	Pages
Figure 1.1. Evolution de la consommation apparente de fruits et légumes dans le monde	10
Figure 1.2. Evolution de la consommation apparente de fruits et légumes.....	10
Figure 1.3. Evolution des volumes et des prix à la consommation des fruits et légumes de 1960à2005.....	
Figure 1.4. Evolution des achats de fruits et légumes frais des ménages de 1998 à 2006	13
Figure 1.5. Consommation apparente de fruits et légumes dans quelques pays développés moyennestriennales 2001-2003	14
Figure 1.6. Contribution des F&L aux apports journaliers d'énergie et de nutriments dans l'alimentation calculée à partir des données de l'enquête INCA 1	28
Figure 1.7. Structure de quelques composés phénoliques.....	33
Figure 1.8. Structures des tannins hydrolysables et des acides associés.....	39
Figure1.9. Structure des tannins condensés	40
Figure 1.10. Synthèse des gallotannins et ellagitannins à partir des pentagalloylgiucose	41
Figure1.11. Structure de base des flavonoïdes.....	51
Figure 1.12. Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyl CoAet de la phénylalanine	52
Figure1.13. Les diverses classes de flavonoïdes	53
Figure 1.14. Structures et espèces végétales associées aux différents alcaloïdes	63
Figure 1.15. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives del'oxygène impliqué en biologie.....	74
Figure 1.16. Formule brute de a tocophérol ou vitamine E (5-7-8 triméthyl tocol)	78
Figure 1.17. Formule brute du j3-carotène	78
Figure 1.18. Formule brute de l'acide ascorbique ou vitamine C.....	79
Figure 1.19. Réaction d'oxydation et de réduction de l'acide ascorbique.....	79
Figure 1.20. Formule brute du rétinol ou vitamine A.....	80
Figure 1.21. Forme oxydée de l'acide alpha-lipoïque.....	81
Figure11.1. Photographie de la Mauve (<i>Malva sylvestris</i>)	91
Figure 11.2. Photographie du Cardon (<i>Cynara cardunculus</i>)	93
Figure 11.3. Structure de la cynarine.....	96
Figure 11.4. Composition des acides gras. de l'huile des graines du cardon	96
Figure 11.5. Photographie du Chou vert (<i>Brassica oleracea</i>)	97
Figure 11.6. Extracteur des fibres brutes (FIWE-VELP SCIENTIFICA)	106
Figure 11.7.a. Distillateur BUCHI K-314	108
Figure 11.7.b. Minéralisateur	108
Figure 11.8. Schéma d'un analyseur automatique type Mikrotechna AAA 881	109
Figure 11.9. Diagramme des tests phytochimiques réalisés sur le cardon, la mauve etle chou vert	114
Figure 11.10. Forme libre et réduite du DPPH	119
Figure11.11. Teneurs en eau de quelques légumes	123

	Figure 11.12. Teneurs en (%) des protéines totales et des protéines pures	126
	Figure 11.13. Teneurs en (%) d'azote total, protéique et non protéique.....	127
	Figure 11.14. Profil des teneurs des acides aminés totaux.....	129
	Figure 11.15. Teneurs en % de protéine totale des acides aminés par groupes chimiques...	
	Figure 11.16. Indice d'hydrophobicité (HPS) des protéines	133
	Figure 11.17. Rendement massique en % des huiles.....	
	Figure 11.18. Composition en acides gras des huiles du cardon (%).....	135
T	Figure 11.19. Composition en acides gras des huiles du chou vert (%).....	135
	Figure 11.20. Composition en acides gras des huiles de la mauve (%).....	135
	Figure 11.21. Taux des sucres totaux en (%) MS du cardon, de la mauve et du chou vert comparé à celui d'autres légumes	138
	Figure 11.22. Taux des fibres alimentaires en % MS du cardon, de la mauve et du chou vert comparé à d'autres légumes.....	140
T	Figure 11.23. Taux de la matière minérale en % de MS du cardon, de la mauve et du chou vert comparé à d'autres légumes	141
	Figure 11.24. Rendement massique en % des tannins, des flavonoïdes et des alcaloïdes..	143
	Figure 11.25. Teneurs en (%) des tannins condensés et des tannins hydrolysables	144
	Figure 11.26. Teneurs en phénols totaux (<i>mg/100g</i>) et flavonoïdes (<i>mg/kg</i>)	145
	Figure 11.27. Variation du taux de phénols totaux (<i>mg/100g</i>) chez quelques légumes	145
T	Figure II.28.a. CCM préliminaires des fractions Fn, développement Toi! AcOEt/ MeOH (80: 18 :2).....	148
	Figure II.28.b. CCM préliminaires des fractions Fn, développement HCC13 / MeOH (90: 10).....	149
T	Figure 11.28.c. CCM préliminaires des fractions Fn, développement AcOEt/MeOH /H ₂ O (100:13.5: 10).....	150
T	Figure II.29.a. Pouvoir antioxydant des EF de la mauve.....	152
	Figure II.29.b. Pouvoir antioxydant des EF du chou vert	152
	Figure II.29.c. Pouvoir antioxydant des EF du cardon	153
	Figure 11.29.d. Activité antioxydante du Trolox	153
	Figure 11.29.e. Activité antioxydante de l'acide ascorbique	153
	e'-' e'-' e'-'	
	Figure 111.1. Les différents types d'extraction par solvants volatils.....	161
	Figure 111.2. Le spectre électromagnétique.....	162
	Figure 111.3. Schéma d'un four micro-ondes monomode (A) et multimode (B)	163
	Figure 111.4. Frissonnement des dipôles soumis à une irradiation micro-ondes	165
	Figure 111.5. Transferts thermiques sous chauffage conventionnel et micro-ondes	166
	Figure 111.6. L'extraction par solvant assistée par micro-ondes (ESMO).....	167
	Figure 111.7. Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite (VMHD)	168
	Figure 111.8. Extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM).....	169
	Figure 111.9. a) Principe du nouveau dispositif M.I.S., b) Dispositif M.I.S.....	179
	Figure 111.10. Surfaces obtenues par une étude avec multivariation.....	182

LISTE DES TABLEAUX

Tableau Li. Evolution de la consommation des <i>fruits</i> et légumes (en kg/hab/an),.....	16
Tableau 1.2. Evolution du pourcentage d'autosuffisance	16
Tableau 1.3. Evolution des superficies, des productions et des rendements de la pomme de terre.....	
Tableau 1.4. Evolution des superficies, des productions et des rendements de la tomate	18
Tableau 1.5. Evolution des prix moyens à la production	19
Tableau 1.6. Evolution des prix à la consommation en DA courants	20
Tableau 1.7. Propriétés et effets reconnus ou suggérés des fibres alimentaires sur la santé.....	24
Tableau 1.8. Principaux constituants d'intérêt nutritionnel des fruits et légumes.....	26
Tableau 1.9. Teneur en flavonoïdes de quelques légumes et fruits en mg/kg de MF.....	
Tableau 1.10. Sources alimentaires des flavonoïdes.....	56
Tableau 11.1. Composition chimique en (%) de matière fraîche MF)	123
Tableau H.2. Composition chimique en (%) de matière sèche MS)	124
Tableau 11.3. Teneurs en protéines de différentes espèces végétales en % de la matière sèche.....	125
Tableau 11.4. Analyse comparée de la composition en acides aminés essentiels du cardon, de la mauve et du chou vert avec celle, des farines animales et végétales	131
Tableau H.5. Valeur biologique des protéines du cardon, de la mauve et du chou vert comparée à celle des farines végétales.....	132
Tableau 11.6. Composition en % des groupes d'acides gras	136
Tableau 11.7. Tests phytochimiques réalisés sur le cardon, la mauve et le chou vert	142
Tableau 11.8. Teneurs en phénols totaux, en tannins totaux et en inhibiteurs de trypsine.....	146
Tableau 11.9. EC ₅₀ et puissance antioxydante (ARP) du cardon, de la mauve et du chou vert comparé aux antioxydants standard (Acide ascorbique et Trolox)	154
Tableau 111.1. Brevets sur l'extraction assistée par micro-ondes de produits naturels	170
Tableau 111.2. Recensement des plantes soumises à une extraction par micro-ondes.....	172
Tableau 111.3. Comparaison du temps d'extraction, d'énergie, de quantité de CO ₂ émise et de récupération du solvant pour l'extraction Soxhlet et M I S	183
Tableau 111.4. Rendements d'extraction et composition en acides gras obtenus par M I S et Soxhlet conventionnel pour les extraits de cardon, chou et mauve	184

LISTE DES ABREVIATIONS

—	activité antioxydante
Ac OEt	: acétate d'éthyle
ADN	: acide désoxyribonucléique
AFSSA	agence française de sécurité sanitaire des aliments
Al Cl ₃	chlorure d'aluminium
ANC	apport national conseillé
AOCS	: (american oil chemists'society)
ARN	acide ribonucléique
ÀJU'	: puissance antiradicalaire ou puissance antioxydante
T BAPNA	benzôyl arginine-p-nitroanilide
BOR	: <i>Brassica oleracea</i>
T BuOH	n-butanol
C	: Degré Celsius
Ca CO ₃	: carbonate de calcium
CCD	: <i>Cynara cardunculus</i>
CCM	chromatographie sur couche mince
Cf	: se conférer
r cm	: centimètre
CO ₂	: dioxyde de carbone
CPGIMS	: chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
D	: dextrogyre
T Da	: dalton (unité de masse moléculaire)
DA	: Dinar Algérien
DPPH	diphényl picrylhydrazyl
EAA inde3	indice des acides aminés essentiels
EC59	: concentration efficace réduisant 50% de la concentration initiale de DPPH
TF	: extraits de flavonoïdes
ESMO	: extraction par solvant assisté par micro-ondes
ESSAM	: extraction sans solvant assisté par micro-ondes
FAO	(food and agricultural organization)
F&L	: fruits et légumes
L Fe	: fer
Fe Cl ₃	: chlorure de fer
FMASE	(focused microwave-assisted Soxhlet extraction)
g	gramme
GHz	: gigahertz
b	: heure
H	hydrogène
ha	hectare
hab	habitant
HCCl ₃	: chloroforme
HCl	: acide chlorhydrique
HD	: hydrodistillation
HPLC	: chromatographie liquide haute pression
HFS	indice d'hydrophobicité des protéines
1120	: eau distillée

H ₂ SO ₄	: acide sulfuriflue
INCA	: étude individuelle et nationale sur les consommations alimentaires
J	: jour
kfla	: kitodalton
kg	: kilogramme
kWh	: kilowattheure
LDL	: (low density lipoprotein)
L	: levogyre
m	: mètre
M	: molarité
MA	: maladie d'Alzheimer
MAE	: (microwave assisted extraction)
MAP	: (microwave assisted process)
MCV	: maladie cardiovasculaire
MF	: matière fraîche
MeOH	: méthanol
rneq	: milliequivalent
mg	: milligramme
MgSO ₄	: sulfate de magnésium
MHz	: mégahertz
min	: minute
MIS	: (microwave integrated Soxhiet)
	: millilitre
mm	: millimètre
mm	: millimole
MS	: matière sèche
MSV	: <i>Malva sylvestris</i>
N	: normalité
NaNO ₂	: nitrate de sodium
NaOH	: hydroxyde de sodium
NH ₄ OH	: hydroxyde d'ammonium
nm	: nanomètre
nM	: nanomole
NNP	: azote non protéique
NO	: monoxyde d'azote
N	•: azote protéique
NT	: azote total
OMS	: organisation mondiale de la santé
ONS	: organisation national des statistiques
PM	: poids moléculaire
PTFE	: polytétrafluoro éthylène
q ^s p	: quantité suffisante pour
Rdmt	: rendement
R-f	: rapport frontal
RMN	: résonance magnétique nucléaire
ROS	: (reactives oxygen species)
	: seconue
SPE	: (simultaneous distillation extraction)
TCA	: acide trichloroacétique
TI	: inhibiteur de trypsine
Toi	: toluène

T U I	: unité de trypsine inhibée
U T	: unité de trypsine
UV	: ultra violet
UV-Vis	: ultra violet visible
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VMHD	(vacuum microwave hydrodistillation)
W	: watt
%	: pourcentage
	: microgramme
µl	microlitre
µm	micromètre

Résumé

D'après les données des bilans alimentaires établis par la FAO, les consommations totales dans le monde en 2005, atteignaient 145 kg par personne pour les légumes et 84 kg pour les fruits. Cette consommation par personne pour l'ensemble des fruits et des légumes croît régulièrement depuis la fin des années 70, et tend à être stable pour les légumes depuis le début du 21^{ème} siècle mais une consommation croissante pour les fruits. Dans ce présent travail nous avons choisi trois légumes méditerranéens pour une étude phytochimique à savoir le cardon *Cynara cardunculus*, la mauve *Malva sylvestris* et le chou vert *Brassica oleracea*. Le cardon *Cynara cardunculus* est un légume qui est caractérisé par une teneur élevée en protéines avec un pouvoir antioxydant de ses extraits de flavonoïdes satisfaisant. Mauve *Malva sylvestris* est une véritable source de protéines avec une huile très riche en acides gras essentiels tels que l'acide linoléique et l'acide linoléique. Chou vert *Brassica oleracea* présente une similitude dans son profil en acides aminés avec celui des autres légumes étudiés en bibliographie. Il a été montré que le Soxhlet assisté par micro-ondes peut être une bonne alternative par rapport au Soxhlet traditionnel tout en offrant le même rendement mais avec un temps, une quantité de solvant et une consommation d'énergie réduites.

Mots clés: fruits et légumes, étude phytochimique, *Cynara cardunculus*, *Malva sylvestris*, *Brassica oleracea*, Soxhlet, micro-ondes.

According to the data of the food balances established by FAO, the overall consumptions in the world in 2005, reached 145 kg per person for vegetables and 84 kg for the fruits. This consumption by person for the whole of the fruits and vegetables believes regularly since the end of the Seventies, and tends to being stable for vegetables since the beginning of the 21st century but an increasing consumption for the fruits. In this present work we chose three Mediterranean vegetables for a phytochemical study with knowing the cardoon *Cynara cardunculus*, the mallow *Malva sylvestris* and the curly kale *Brassica oleracea*. Cardoon *Cynara cardunculus* is a vegetable which is characterized by a high percentage of proteins with an antioxidant capacity of its extracts of flavonoids satisfactory. Mauve *Malva sylvestris* is a true source of proteins with an oil very rich in essential fatty acids such as the linoleic acid and the linoleic acid. Curly kale *Brassica oleracea* presents a similarity in its profile in amino acids with that of other vegetables studied in bibliography. It was shown that Soxhlet assisted by microwaves can be a good alternative compared to traditional Soxhlet while offering the same output but with a time, a quantity of solvent and a reduced consumption of energy.

Key words: fruit and vegetables, phytochemical study, *Cynara cardunculus*, *Malva sylvestris*, *Brassica oleracea*, Soxhlet, microwaves.

fl

84 kg pour les fruits. Cette consommation par personne pour l'ensemble des fruits et des légumes croît régulièrement depuis la fin des années 70, et tend à être stable pour les légumes depuis le début du 21^{ème} siècle mais une consommation croissante pour les fruits. Dans ce présent travail nous avons choisi trois légumes méditerranéens pour une étude phytochimique à savoir le cardon *Cynara cardunculus*, la mauve *Malva sylvestris* et le chou vert *Brassica oleracea*. Le cardon *Cynara cardunculus* est un légume qui est caractérisé par une teneur élevée en protéines avec un pouvoir antioxydant de ses extraits de flavonoïdes satisfaisant. Mauve *Malva sylvestris* est une véritable source de protéines avec une huile très riche en acides gras essentiels tels que l'acide linoléique et l'acide linoléique. Chou vert *Brassica oleracea* présente une similitude dans son profil en acides aminés avec celui des autres légumes étudiés en bibliographie. Il a été montré que le Soxhlet assisté par micro-ondes peut être une bonne alternative par rapport au Soxhlet traditionnel tout en offrant le même rendement mais avec un temps, une quantité de solvant et une consommation d'énergie réduites.

n

Soxhlet

bedesmatèreg

INTRODUCTION GENERALE	01
PREMIERE PARTIE: Analyse Bibliographique: Importance des légumes dans l'alimentation	.04
INTRODUCTION.....	05
CHAPITRE E : Légumes verts: importance économique et nutritionnelle.....	07
1- Production et consommation des F&L dans le monde.....	08
1.1. Le niveau et l'évolution de la consommation.....	08
1.2. Tendances récentes de la consommation et recommandations.....	12
1.3. Comparaisons internationales	. 13
1.4. Production et consommation des F&L en Algérie.....	15
2- Besoin nutritionnel	23
2.1. Les caractéristiques nutritionnelles des fruits et légumes frais et transformés	23
2.2. F&L et couverture des besoins nutritionnels	28
CHAPITRE II : Phytochimie des légumes verts.....	30
1- Métabolites secondaires	31
1.1. Composés phénoliques ou polyphénols.....	32
1.2. Alcaloïdes	59
1.3. Inhibiteur de trypsine.....	65
CHAPITRE III: Les antioxydants dans les légumes.....	71
1- Introduction	72
2- Le stress oxydatif et les radicaux libres	72
2.1. Les radicaux libres	73
2.2. Principaux radicaux libres.....	73
2.3. Origine et des radicaux libres	73
2.4. Conséquences du stress oxydatif.	75
3- Les antioxydants	76
3.1. Les antioxydants endogènes	77
3.2. Les antioxydants naturels	77
4- Les antioxydants des fruits et légumes	82
4.1. F&L et maladies cardiovasculaires	83
4.2. F&L et cancers	84
4.3. F&L et autres maladies	85

	DEUXIEME PARTIE: Etude phytochimique de trois légumes de la région de Tlemcen: cardon, mauve et chou vert.....	87
	INTRODUCTION.....	88
	CHAPITRE I : Synthèse bibliographique: Présentation des légumes étudiés.....	90
	1- <i>Malva sylvestris</i> (mauve).....	91
	1.1. Position systématique.	91
	1.2. Caractères botaniques et écologiques.....	92
	1.3. Travaux scientifiques antérieurs sur la mauve.....	92
	2- <i>Cynara cardunculus</i> (cardon)	93
T	2.1. Position systématique.....	93
	2.2. Caractères botaniques et écologiques.....	93
	2.3. Travaux scientifiques antérieurs sur le cardon	95
T	3- <i>Brassica oleracea</i> (chou vert)	97
	3.1. Position systématique.....	97
	3.2. Caractères botaniques et écologiques	98
	3.3. Travaux scientifiques antérieurs sur le chou vert	100
	CHAPITRE II . Protocoles opératoires et Méthodes d'analyse.....	103
	1- Détermination de la teneur de la matière sèche.....	104
	2- Détermination de la teneur en matière grasse	104
	3- Analyse de la composition chimique des huiles par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée au Spectre de Masse (CPGIMS)	105
	3.1. Préparation des methyl-esters des acides gras	105
	3.2. Analyse par la CPGf1'IS	106
	3.3. Conditions opératoires de la CPGIMS	106
	4. Détermination de la teneur en fibres alimentaires.....	106
	5. Détermination de la teneur en cendres.....	107
	6. Détermination des sucres totaux	107
	7. Dosage des protéines totales	107
	8. Dosage de l'azote protéique.....	108
	9- Dosage des acides aminés totaux.....	109
	10- Estimation de la valeur nutritionnelle des protéines	110
	10.1. Indice basé sur l'acide aminé limitant	110
	10.2. Indice prenant compte tous les acides aminés indispensables	111
	11- Dosage de l'activité de l'inhibiteur de trypsine	112
	12. Tests phytochimiques	114
	13. Dosage des phénols totaux	115
	14. Rendement massique	115
	14.1. Rendement massique des tanins	115
	14.2. Rendement massique des flavortoïdes	115
	14.3. Rendement massique des alcaloïdes	115
	14.4. Calcul du rendement	116
	15- Dosage des tannins condensés (test de la vanilline avec 11_2SO_4).....	116
	16- Dosage des tannins hydrolysables (Chlorure ferrique)	116
	17- Dosage des flavonoides	116
	18- Identification par chromatographie r coche nince	117

19- Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode du 2,2 diphenyl-i- pycrylhydrazyl(DPPH).....	119
19.1. Préparation de la solution de DPPH.....	119
19.2. Solution d'extrait.....	120
19.3. Essai au DPPH.....	120
19.4. Expression des résultats.....	120
 CHAPITRE III : Résultats et discussion.....	 121
1- Teneur en eau.....	122
2- Composition chimique.....	122
2.1. Teneur en matières azotées (protéines)	124
2.2. Teneur de la fraction lipidique (matière grasse)	133
2.3. Teneur des sucres totaux.....	137
2.4. Teneur des fibres alimentaires.....	139
2.5. Teneur de la matière minérale (cendres).....	140
3- Extractions sélectives des métabolites secondaires du cardon, de la mauveet du chou vert.....	141
4- Teneurs en tannins condensés et tannins hydrolysables.....	143
5- Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes.....	144
6- Composés antinutritionnels	146
7- Screening chimique général par CCM.....	147
7.1. Interprétation des CCM du chou vert (<i>BOR</i>).....	151
7.2. Interprétation des CCM du cardon (<i>CCD</i>)	151
7.3. Interprétation des CCM de la mauve (<i>MSV</i>)	151
8- Estimation du pouvoir antioxydant des polyphénols.....	152
 TROISIEME PARTIE: Innovation dans l'extraction de la matière grasse des légumes verts: Soxhiet assisté par micro-ondes.....	 155
INTRODUCTION.....	157
 CHAPITREI : Extraction par micro-ondes.....	 158
1- Introduction.....	159
2- Les techniques conventionnelles d'extraction par solvant.....	160
3- Extraction par micro-ondes	162
3.1. Principe.....	162
3.2. Technologie du four à micro-ondes.....	163
3.3. Principe du chauffage micro-ondes.....	164
3.4. Les procédés d'extraction assistés par micro-ondes.....	166
4- Recensement des brevets déposés concernant l'extraction par micro-ondes deproduits naturels d'origine végétale.....	170
5- Recensement des plantes Soumises à une extraction assistée par micro-ondes	171
6- Paramètres régissant les extractions assistées par micro-ondes.....	171
6.1. Rapidité de l'extraction.....	172
6.2. Choix du solvant.....	174
6.3. Puissance micro-ondes appliqué.....	174
6.4. Composition chimique.....	175
6.5. Effet des micro-ondes sur le matériel végétal.....	175

CHAPITRE II : Extraction par le Soxhiet assisté par micro-ondes concept, optimisation et application.....	176
1- Introduction.....	177
2-M.I.S: Dispositif et Mode Opérateur.....	178
2.1. Description du dispositif M.I.S.....	178
2.2. Mode opératoire du M.i.S	180
2.3. Optimisation du M.I.S.....	181
3- M.I.S. : Coût, Energie et Ecologie.....	183
4- Légumes.....	184
5- Mécanisme d'extraction.....	185
 CONCLUSION GENERALE.....	 186
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	 190
 ANNEXE.....	 220
 PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUE.....	 226

Introduction Générale

La consommation de fruits et légumes est considérée par de nombreuses instances comme un enjeu de santé publique et fait l'objet de recommandations nutritionnelles au niveau mondial par la FAO et l'OMS. Le secteur des fruits et légumes frais a réalisé des efforts importants d'adaptation au cours des 15 dernières années. Les gains de productivité ont ainsi été supérieurs à bon nombre d'autres secteurs agricoles, dans un contexte où les exigences sanitaires et qualitatives, portées par des objectifs d'assurance des consommateurs et de segmentation du marché, se sont notablement renforcées. Les légumes apportent dans notre alimentation quotidienne des fibres, des vitamines, des minéraux, dont les apports nutritionnels conseillés ont été établis par des chercheurs et des médecins. Ils représentent la source alimentaire quasi exclusive de certains nutriments. Ils renferment aussi une grande variété de composés, dépourvus de valeur nutritionnelle appelés métabolites secondaires. Ces composés appartiennent à différentes familles : les polyphénols, les caroténoïdes, les composés soufrés comme les glucosinolates et les phytostérols. Ces métabolites secondaires sont reconnus pour leurs activités biologiques nombreuses et leurs effets positifs sur la santé.

Cette thèse est consacrée à l'étude phytochimique de trois légumes méditerranéens, cardon *Cynara cardunculus*, mauve *Malva sylvestris* et chou vert *Brassica oleraceae* issues du screening de légumes traditionnellement utilisés dans le bassin méditerranéen en général et dans la région de Tlemcen (Algérie) en particulier. Le but de cette étude consiste à renforcer la connaissance phytochimique de ces légumes et à mettre en évidence les composés chimiques pour chacun des trois légumes en vue de l'utilisation ultérieure de leurs extraits dans des études complémentaires. Dans une première partie introductive, nous aborderons en premier lieu l'importance économique et nutritionnelle des légumes dans le monde en général et en Algérie en particulier. Une étude bibliographique sur l'intérêt de leurs constituants phytochimiques sera aussi abordée et traitée d'une manière exhaustive.

L'état de connaissance bibliographique botanique sur les trois légumes sera présenté dans une seconde partie. Nous développerons également les résultats de l'étude phytochimique du cardon *Cynara cardunculus*, de la mauve *Malva sylvestris* et du chou vert *Brassica oleraceae*. Nous insisterons sur la comparaison de ces résultats d'une part entre ces trois légumes étudiés et d'autre part avec les différents légumes traités en bibliographie.

La troisième partie sera consacrée à une étude innovante sur l'extraction de la matière grasse de ces trois légumes verts grâce à un nouveau procédé de Soxhlet assisté par micro-ondes.

T

n

Première Partie

**Analyse bibliographique :
importance des légumes dans
l'alimentation**

in*fi

En attendant de nouveaux progrès dans le domaine de la santé, nous disposons au moins d'une certitude la consommation de fruits et légumes a un impact très favorable sur le maintien de la santé et doit être encouragée. Les espèces réactives d'oxygène sont omniprésentes dans la vie humaine. Comme l'oxygène, le glucose et le fer, elles sont à la fois salutaires et nocives. Le rôle des espèces réactives d'oxygène dans le processus de vieillissement et de maladie humaine est énergiquement étudié, en particulier pour les maladies neurodégénératives, où les lésions de neurones aggravées des radicaux libres sont évidentes. Sur le plan de la prévention de la maladie, il est peu probable que de fortes doses d'antioxydants simples soient généralement salutaires et, tout ce que l'on peut dire en ce moment de façon concluante c'est que manger moins de graisses et plus de légumes et de fruits frais pourrait être profitable à certaines populations. Ce dernier concept était même bien connu d'Hippocrate, qui ne savait rien des antioxydants mais était parvenu à la même conclusion en utilisant de simples observations cliniques et en se fiant à son propre bon sens.

Dans cette partie bibliographie, nous présenterons les aspects phytochimiques et nutritionnels des fruits et légumes en général. Cette analyse bibliographique fera état des travaux antérieurs sur les fruits et légumes ainsi que la description de leur composition chimique et leur effet sur la santé humaine. Dans un premier chapitre, l'importance économique et nutritionnelle des fruits et légumes seront présentés. Le second chapitre traitera de leur phytochimie. Dans le dernier chapitre, on détaillera la composition en antioxydants des fruits et légumes et leur impact positif et/ou négatif sur le corps humain.

Chapitre I

Légumes verts :
importance économique et nutritionnelle

1. Production et consommation des fruits et légumes dans le monde:

La production mondiale des fruits et légumes frais ou transformés est de l'ordre du milliard de tonnes dont 55 % de légumes (Loeuilhet et Fajac, 1998). Le commerce mondial des fruits et légumes (75 millions de tonnes) est en pleine extension ; il dépasse 55 milliards de dollars et correspond à plus de 15 % des échanges mondiaux de produits alimentaires (Daviron, 1996). Un exercice récent de recherches statistique (FAOSTAT, 2005), sur la base des données fournies par la FAO pour l'année 2005, a permis de mettre en évidence le poids stratégique de la Méditerranée et de ses pays riverains dans les productions mondiales de fruits et de légumes. Pour cadrer globalement ce sujet, sans doute convient-il de souligner que le Bassin méditerranéen couvre environ 16% de la production mondiale de fruits et 13% de la production mondiale de légumes. Cette position tend cependant à s'atténuer depuis plusieurs années. Ainsi, au début des années 1970, la Méditerranée couvrait 26% de la production mondiale de fruits (Mediterra, 2007). Cette lente érosion s'explique notamment par le développement de la production dans les pays sud-américains et asiatiques, avec en particulier la montée en puissance de la Chine. Cette dernière assure désormais 36% de la production mondiale en fruits et légumes. Les Etats-Unis en couvrent pour leur part 5% environ.

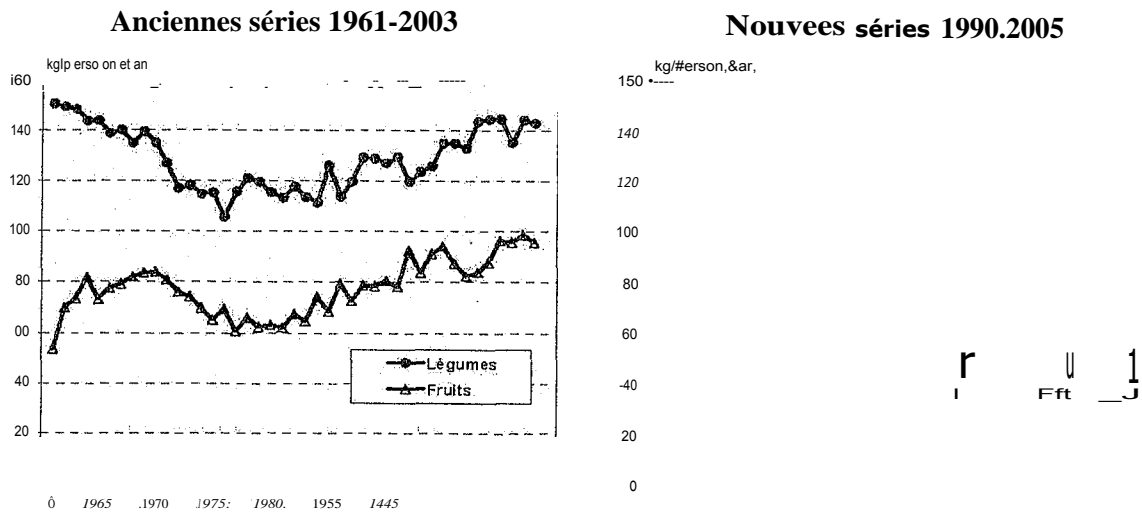
1.1. Le niveau et l'évolution de la consommation:

La consommation de fruits et légumes est considérée par de nombreuses instances comme un enjeu de santé publique et fait l'objet de recommandations nutritionnelles au niveau mondial par la FAO et l'OMS. Bien que les consommateurs reconnaissent l'intérêt d'une consommation accrue de fruits et légumes, leur consommation n'évolue que très peu, et reste caractérisée par de fortes inégalités dans la population.

Dans le même temps, le marché des fruits et légumes représente un enjeu économique pour les producteurs. La filière des fruits et légumes exerce ses activités dans un contexte commercial international qui génère une concurrence accrue sur les prix. D'après les données des bilans alimentaires établis par la FAO, les consommations totales dans le monde, en 2005, atteignaient 145 kg par personne pour les légumes et 84 kg pour les fruits, soit une consommation apparente totale de l'ordre de 630 g par personne et par jour. Rappelons que cette estimation correspond à l'ensemble des utilisations de fruits et légumes dans le monde, quelles que soient les formes et les

lieux de consommation (frais, transformé, à domicile, au restaurant, dans les institutions...). L'évaluation intègre tous les fruits et légumes transformés (conserves, surgelés, soupes, jus de fruits, compotes, confiture...), qui sont convertis en "équivalents primaires". Ce mode de calcul permet de tenir compte de l'ensemble des formes de consommation y compris celles dans lesquelles les fruits et légumes ne sont pas toujours l'ingrédient dominant (plats préparés, pizza, desserts lactés...). En revanche, ces consommations incluent des quantités qui sont perdues aux divers stades de la transformation, de la distribution et de la préparation finale des aliments. Elles surestiment donc les quantités effectivement ingérées par les consommateurs. Une étude réalisée sur les consommations alimentaires aux USA (**Kantor et al., 1997**) estime le montant des pertes à 32% pour les fruits et légumes frais et 16% pour les fruits et légumes transformés. Les données issues des bilans d'approvisionnement présentent l'intérêt d'être disponibles sur de longues périodes et dans tous les pays du monde. La **figure 1.1.** montre l'évolution de la consommation par personne dans le monde depuis 1961 pour l'ensemble des fruits et des légumes (hors pommes de terre et féculents). Selon ces données, les consommations totales apparaissent régulièrement croissantes depuis la fin des années soixante-dix. Les nouvelles séries, établies avec une méthodologie améliorée, qui couvre la période 1990-2005, montrent que, depuis le début des années 2000, la consommation apparente totale de légumes est stable, et que celle des fruits augmente légèrement. La **figure 1.2.** confirme la faible croissance de la consommation apparente des légumes, qui concerne essentiellement les conserves et le surgelé. Du côté des fruits, ce sont aussi les produits transformés, et en particulier les jus de fruits, qui expliquent l'augmentation de la consommation apparente depuis le début des années quatre-vingt dix. En 2004, les données des Comptes Nationaux estiment la consommation totale de légumes à 125 kg (92 kg pour les légumes frais et 33 kg pour les conserves et le surgelé), et la consommation de fruits à 63 kg pour les fruits frais, 7 kg pour les fruits transformés et 23 litres pour les jus de fruits et les nectars. Ces données sont de même nature que celles issues de bilans alimentaires de la FAO. Elles concernent l'ensemble de la consommation dans le monde (à domicile, hors domicile et dans les institutions, et elle inclue une estimation de l'autoconsommation des produits des exploitations agricoles et des jardins familiaux). Contrairement aux données de la FAO, elles ne sont pas estimées en termes d'équivalents primaires, mais en termes de quantités mises en marché. Les pertes lors de la transformation sont donc exclues, mais pas celles qui interviennent lors de la

distribution, du stockage et de la préparation domestique.



Source FAOSTAT

Figure Li. Evolution de la consommation apparente de fruits et légumes -dans le monde d'après les bilans alimentaires de la FAO (FAOSTAT, 2005).

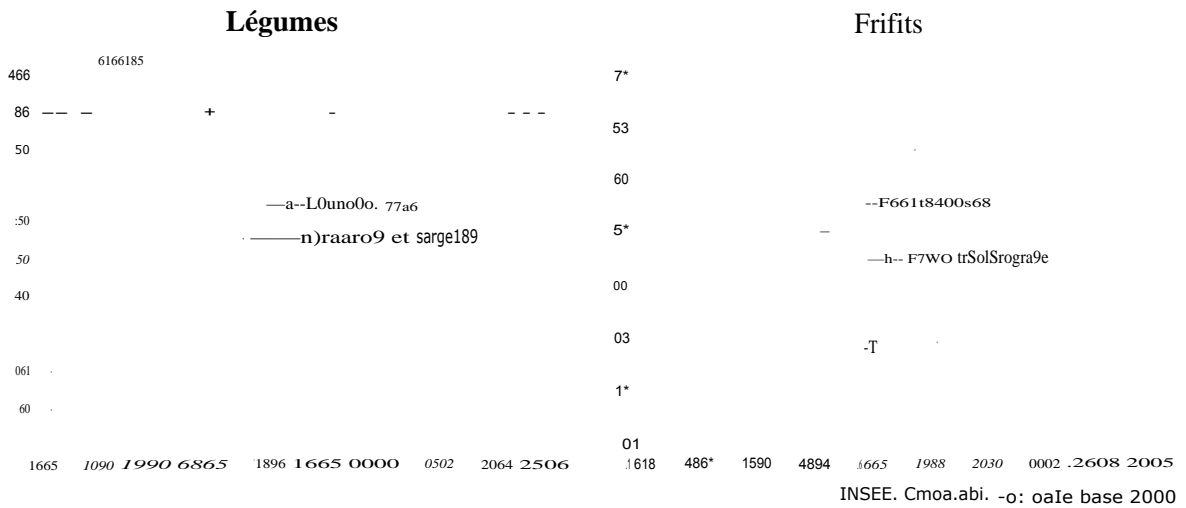


Figure 1.2. Evolution de la consommation apparente de fruits et légumes d'après la Comptabilité Nationale (INSEE, Comptabilité Nationale, base 2000).

Les évolutions en volume confirment cette croissance plus marquée des -légumes et des fruits

transformés (Figure 1.3.). La comparaison de l'évolution des prix et des volumes consommés montre que la croissance de la consommation est beaucoup plus forte pour les produits transformés dont les prix ont augmenté beaucoup moins vite que ceux des produits frais. De 1960 à 2005, les prix à la consommation des légumes *frais* ont augmenté de 40% de plus que l'ensemble des prix alimentaires, et les prix des légumes transformés ont baissé de 40% par rapport à la moyenne des prix alimentaires (Figure 1.3.). Dans le cas des fruits, les écarts entre les produits frais et transformés est de moindre ampleur. Il n'apparaît qu'à la fin des années quatre-vingt, et résulte pour une large part de la baisse du prix des jus de fruits. Conjointement à l'évolution favorable des prix relatifs, l'évolution des modes de vie privilégiant l'économie de temps a fortement stimulé la demande de fruits et légumes transformés.

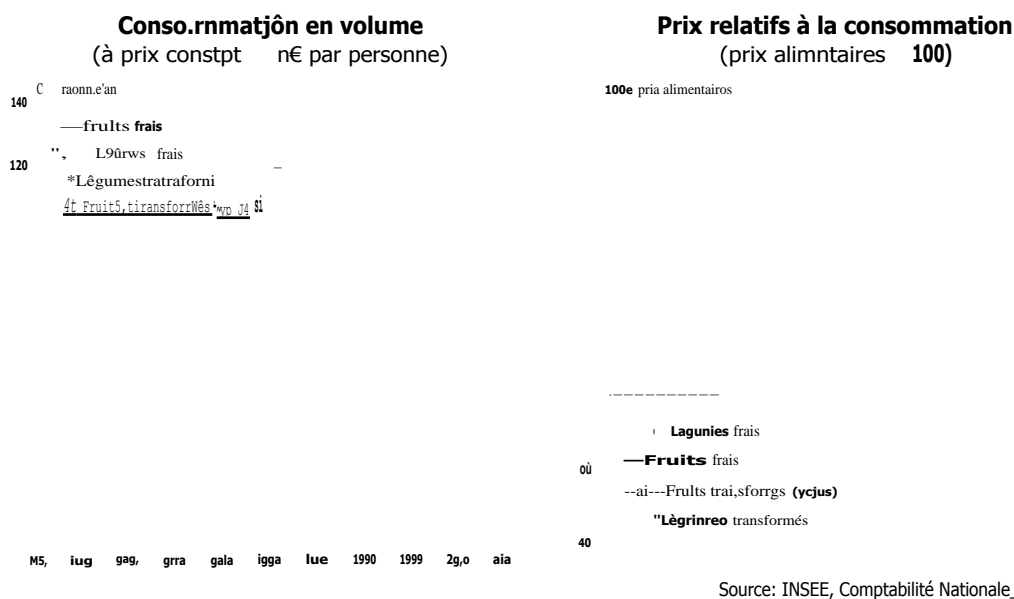


Figure 1.3. Evolution des volumes et des prix à la consommation des fruits et légumes de 1960 à 2005 (INSEE, Comptabilité Nationale, base 2000).

1.2. Tendances récentes de la consommation et recommandations:

Depuis la fin des années quatre-vingt dix, les données des panels d'achats des ménages et des enquêtes alimentaires individuelles mettent en évidence une tendance à la baisse de la consommation. Les données recueillies par l'INS World panel et publiées par les organismes internationaux montrent que, de 1998 à 2006, les achats de fruits et légumes frais des ménages pour la consommation à domicile ont baissé de façon régulière en quantité. Les dépenses correspondantes par ménage sont restées, elles, quasiment stables (**Figure 1.4**). L'évolution des quantités effectivement consommées par les individus à partir de l'enquête INCA 1 de 1998-99 et de l'enquête CCAF (Comportement et Consommation Alimentaire en France), réalisée en 2002-2003, conduites toutes les deux avec la même méthodologie, montre également une baisse de la consommation totale de fruits et légumes dans la population des adultes (Hebel, 2007). L'ensemble des sources statistiques (disponibilités, panels d'achat, enquêtes de consommation) fournit donc des estimations un peu différentes. Les panels et les enquêtes alimentaires montrent une baisse qui n'apparaît pas dans les données globales sur les consommations. Finalement, compte tenu des difficultés de mesure et des incertitudes sur la composition des produits élaborés, une hypothèse prudente consiste à considérer que les estimations de la consommation totale des fruits et légumes fluctuent autour d'une moyenne qui ne varie probablement pas beaucoup depuis la fin des années quatre-vingt dix. Cette consommation reste, en tout cas, inférieure aux recommandations nutritionnelles (400 g/jour) pour une large fraction de la population. Les données de l'enquête INCA I indiquent qu'environ 60% des individus adultes ont une consommation inférieure à ce repère. Exprimée en fréquence de consommation ("5 fruits et légumes par jour"), la recommandation est suivie par une fraction encore plus faible de la population adulte (moins de 5% d'après l'enquête INCA 1, de l'ordre de 10% d'après le Baromètre Santé Nutrition). Les différentes enquêtes font également ressortir des proportions élevées de petits consommateurs (moins de 3,5 portions par jour). Ces différentes observations, jointes au constat de la quasi-stationnarité de la consommation depuis la fin des années quatre-vingt dix, sont à l'origine des recommandations du deuxième Plan international nutrition santé relatives à la nécessité d'augmenter la consommation des fruits et légumes, et particulièrement celle des petits consommateurs (AFSSA, IENPES 2004).

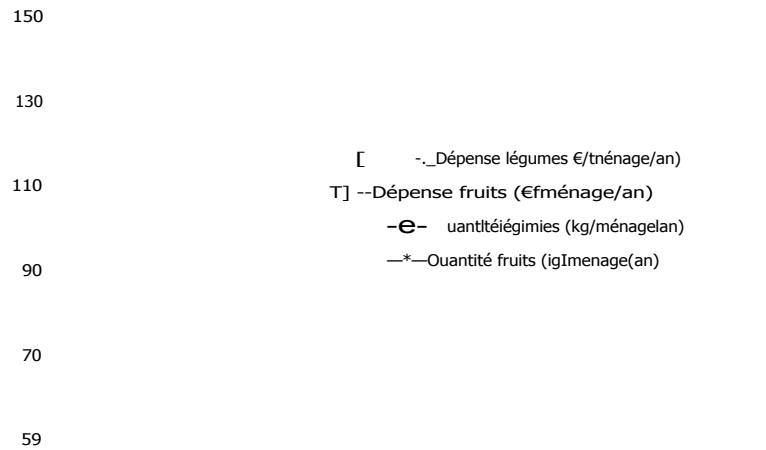


Figure 1.4. Evolution des achats de fruits et légumes frais des ménages de 1998 à 2006 (Hebel, 2007).

1.3. Comparaisons internationales:

Il existe quelques publications de données d'enquête permettant de mettre en évidence des tendances de consommation de fruits et légumes au niveau international, mais les bilans alimentaires établis par la FAO restent la principale source d'information pour comparer les niveaux de consommation des différents pays dans le monde. La **figure 1.5.** rassemble les moyennes triennales 2001-2003 des consommations apparentes totales de fruits et légumes fournies par les bilans alimentaires de la FAO pour quelques pays développés ou en transition économique. On observe des écarts importants entre les pays forts consommateurs (pays de l'Europe du Sud, Turquie, Chine) et les pays faibles consommateurs (Europe du Nord et de l'Est, Japon).

Au niveau mondial, l'exploitation regroupée des données de consommation apparente de la FAO par le programme GEMS-FOOD Regional Diet de l'OMS montre une consommation moyenne de légumes (hors pommes de terre) plus forte dans le modèle européen (372 *glj*) que dans les modèles moyen-oriental (233 *glj*), asiatique (1 79 *glj*), latino-américain (1 50 *glj*) et africain (77 *glj*). Pour les fruits, les consommations moyennes sont plus fortes dans le modèle latino-américain (271 *g/j*) que dans les modèles européen (212 *g/j*), moyen oriental (204 *glj*) asiatique (85 *g/j*) et africain (95 *g/j*).

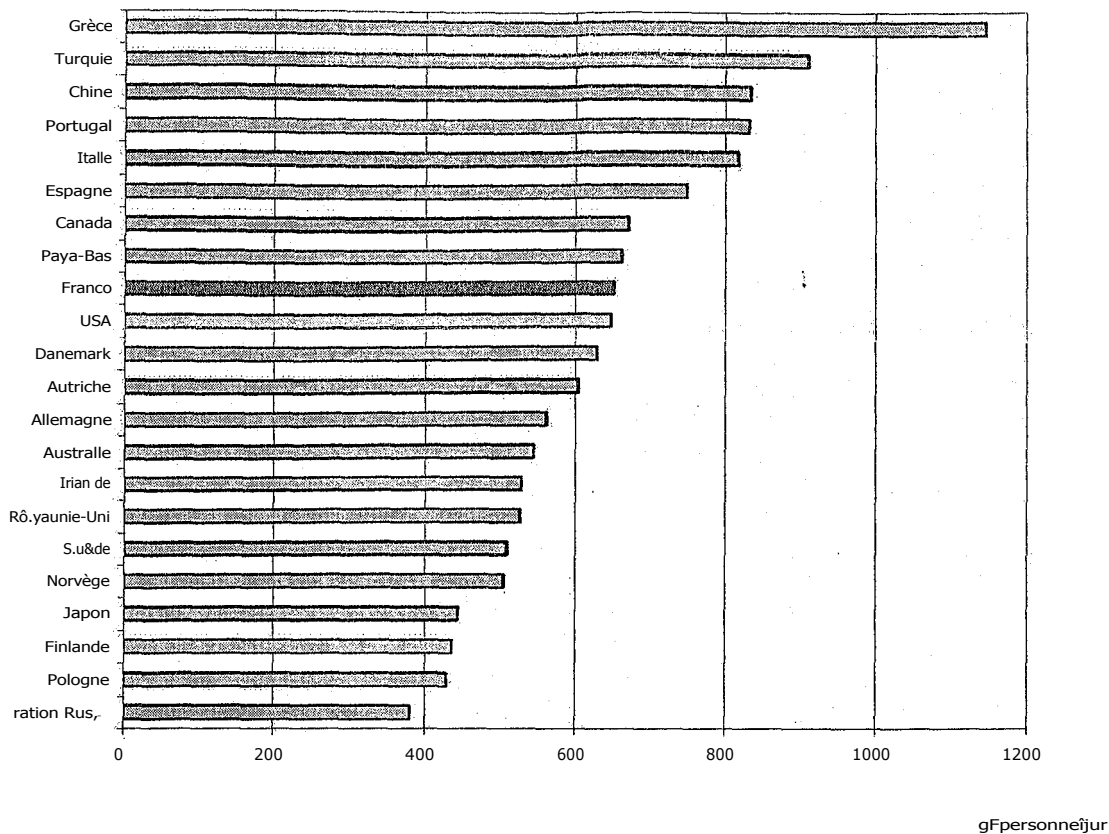


Figure 1.5. Consommation apparente de fruits et légumes dans quelques pays développés, moyennes triennales 2001-2003 (Bilans alimentaires FAO, 2003).

En Europe, l'étude EPIC dans 27 centres répartis dans 10 pays montre que la consommation de fruits et légumes est plus importante dans les pays méditerranéens et que la consommation la plus faible est enregistrée en Scandinavie et aux Pays-Bas pour les hommes comme pour les femmes (Agudo et al., 2002). Ce gradient Nord-Sud de la consommation de fruits et légumes en Europe est confirmé par l'étude DAFNE basée sur les achats des ménages (Naska, 2000). En Suède, le projet MONICA a permis de comparer dans le temps quatre études individuelles transversales de méthodologie comparable dans le Nord de la Suède où la consommation de fruits et légumes était traditionnellement faible. Une augmentation significative de la fréquence de consommation de fruits était constatée entre 1986 et 1999 pour les fruits (hommes et femmes) et pour les légumes (femmes seulement). Seules les consommations de jus de fruits, de bananes et de laitues augmentaient à la fois chez les hommes et les femmes. Les consommations d'épinards, de choux blancs, d'oranges et de baies rouges baissaient chez les hommes ainsi que la consommation d'épinards chez les femmes (Krachler et al., 2005).

T En Finlande, l'étude annuelle sur les comportements en matière de santé des adultes (AVTK-survey) montre une augmentation régulière de la fréquence de consommation quotidienne de légumes entre

1978 et 2002 pour les hommes comme pour les femmes. Cependant, ces fréquences restent basses T 40% chez les femmes et 28% chez les hommes en 2002 (Prattala, 2003). Au Danemark, l'étude nationale de consommation alimentaire individuelle montre une nette augmentation de la part des fruits (+64%) et des légumes (+33%) dans l'alimentation de la population totale entre 1995 et 20002002 (DFVF, 2005). Ces augmentations de consommation des fruits et légumes dans les pays scandinaves se font dans des régions ou pays où la consommation était traditionnellement basse. En revanche, aux Pays Bas, les études de consommation alimentaire individuelle FCS montrent plutôt une décroissance de la consommation de fruits et légumes entre 1987 et 1998 (Voedingscentrum, 1998)

Plusieurs publications font également mention d'une augmentation de la consommation de fruits et légumes dans des pays asiatiques comme la Corée (Lim et al., 2005) ou la Thaïlande (Schmidt et Isvilanonda, S., 2004). Aux Etats-Unis, les études de consommation alimentaire individuelle du ministère de l'agriculture CSFII montrent une légère amélioration de la consommation de fruits et de légumes entre 1977 et 1998 (Kranz et al., 2004).

Les tendances de consommation de fruits et légumes apparaissent donc contrastées selon les pays avec une augmentation dans les pays Scandinaves qui étaient traditionnellement très peu consommateurs.

1.4. Production et consommation des fruits et légumes en Algérie:

L'Algérie traditionnellement exportatrice de fruits et légumes fait face depuis une quinzaine d'années à de sérieux problèmes d'approvisionnement et de régulation de son marché. La consommation de fruits et légumes frais n'a cessé de croître et continuera vraisemblablement en raison de la forte demande. Dans cette partie, nous proposons un aperçu sur le secteur des fruits et légumes frais, à travers l'évolution de la consommation, du niveau de la production et des contraintes auxquelles fait face le secteur, notamment dans le domaine de la distribution. La consommation des légumes frais a beaucoup augmenté en Algérie à la suite de l'essor démographique et à la relative amélioration des niveaux de vie. Par contre, la consommation de fruits n'a cessé de diminuer.

De 1981 à 1992, la consommation de légumes frais a presque doublé, passant de 73,1 à 135,5 kg/hab./an. La pomme de terre et la tomate constituent près de 50 % de la consommation des légumes frais. La part des autres légumes reste assez faible : 0,5 kg/hab./an pour l'ail ; 1 kg pour l'aubergine ; 4 kg pour le poivron ; 10 kg pour l'oignon. La consommation a stagné entre 1985 et 1988 à cause de la forte réduction des importations de pomme de terre. La consommation fruitière a par contre diminué,

passant de 41 à 31 kg/hab./an entre 1981 et 1992. Cette régression résulte de la diminution de la production fruitière et d'une forte croissance démographique (**Tableau 1.1.**).

Le secteur des fruits et légumes frais enregistre le taux d'autosuffisance le plus élevé. Les taux d'autosuffisance en fruits et légumes ont connu des évolutions opposées. Ce taux était satisfaisant pour les fruits entre 1981 et 1984 et faible pour les légumes, il s'inversera entre 1986 et 1990 (**Tableau 1.2.**).

Tableau 1.1. Evolution de la consommation des fruits et légumes (en kg/hab/an) (ONS, 1991a; Ministère de l'Agriculture, 1993)

	1972	1985	1988	1992
Lait	0	73.1	101.3	13
Pommes de terre	2.2	33.2	32.5	4.8
Tomates	1.0	90	194	225
		40g	35	
Fruits		5	7.5	6

Tableau 1.2. Evolution du pourcentage d'autosuffisance (Bédrani, 1993).

	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987	1988	1989	1990
Légumes verts	61	39	49	58	60	84	99	98	91	89
Fruits	117	86	96	100	73	76	77	77	74	65

La non-satisfaction des besoins de consommation en légumes produits localement s'explique essentiellement par la part importante qu'occupe la pomme de terre dans la consommation et dont la production locale reste faible. Les objectifs de la production de légumes frais, selon le ministère de l'Agriculture pour l'an 2000, visent la satisfaction des besoins globaux estimés à 5,2 millions de tonnes

grâce à un accroissement des rendements et à l'extension des superficies à 350 000 hectares (Mekhlef, 1993) (Tableau 1.3.). D'après l'Institut National des Etudes Stratégiques Globales, le taux d'autosuffisance en fruits et légumes est estimé à 90 % pour les années 2000 et 2010, soit le plus haut niveau pour les produits agricoles et alimentaires.

Durant les trois dernières décennies, les cultures de légumes se sont fortement développées ; l'intérêt particulier que portent les agriculteurs à ces cultures a entraîné une forte extension de leurs superficies qui ont quadruplé entre 1965 et 1992, passant de 85 000 ha à 330 620 ha. Certains légumes, à savoir les pommes de terre et les tomates, représentent 46 % de la production légumière. Malgré le fait que la culture de la pomme de terre occupe plus du tiers des surfaces légumières, l'Algérie n'arrive pas encore à la satisfaction totale de ses besoins. La tendance générale pour les superficies, la production et les rendements est vers la hausse. Cette évolution ne sera pas sans conséquences dans la satisfaction des besoins locaux et contribuera dans une large mesure à réduire les importations. La tomate est le second produit maraîcher de par la place qu'elle occupe dans les habitudes alimentaires en Algérie. Contrairement à la pomme de terre, la tomate n'a pas connu une grande hausse des superficies (une augmentation de 13 % seulement a été enregistrée). La culture de plein champ n'arrive pas à satisfaire la demande en tomates, d'où la place importante qu'occupe la conduite sous abri plastique (Tableau 1.4.).

Tableau 1.3. Evolution des superficies, des productions et des rendements de la pomme de terre (1980-1981 = année de base) (Ministère de l'Agriculture, 1993).

Moyennes Périodes	Superficies		Productions		Rendements	
	hectares	indice	tonnes	indice	tonnes/ha	indice
1980_81	77 360	102	506158	86	6.54	85
1958:8	9337.0	123	76.2968	12.9	8.17	106
1988-.8.9	.97600	128	898820	152	9.11	119
1989-90	104060	137	1060 000	180	10.19	131
1990-91	102430	135	808 541	137	7.89	102
1991-92	97 500	128	1 300 000	220	13.33	171
1992-93	85000	112	1280000	216	15.06	194

Tableau 1.4. Evolution des superficies, des productions et des rendements de la tomate (1980-1981 = année de base) (Ministère de l'Agriculture, 1993).

Moyennes Périodes	Superficies		Productions		Rendements	
	hectares	indice	tonnes	indice	tonnes/ha	indice
1980-84	16684	880	167568	920	10-D 4	1050
1985-88	17905	940	238680	1310	13--33	1390
1928-89	19 50	102.5	291 231	159.7	1433	156.2
1989-90	19460	102.3	282 841	155.2	1433	151.6
190:91	19 ¹⁷⁰	100.7	306644	168.2	16.00	1663
1991-92	18.020	:94.7	2.95892	162.3	16À2	1714
1992-93	18 840	99.0	315 35 ¹	173.0	16.74	174.7

1.4.1. Evolution des prix à la production:

- En l'absence d'informations, il est difficile d'analyser les prix et les coûts. Notons que, globalement, la hausse des prix à la production suit la même tendance que celles des facteurs de production (**Tableau 1.5.**). Cette hausse limitée entre 1988 et 1991, va s'accroître dès 1992 ; ceci s'explique essentiellement par la forte hausse qu'ont connue les semences et les produits de traitement. Si la tendance générale T entre 1988 et 1993 est à la hausse, l'indice de variation annuelle montre une tendance fluctuante, négative par moment, comme c'est le cas pour la tomate dont le prix a chuté en 1991 par rapport à 1990. Il en est de même pour les oranges dont les prix accusent une régression en 1992 par rapport à 1993.

1.4.2. Evolution des prix à la consommation:.

- T L'indice des prix des fruits et légumes est en hausse constante passant de 100 en 1982 à 315 en 1993 pour les légumes, et de 333,5 en 1993 contre 372,8 en 1992. Il faut noter que, que ce soit pour les légumes ou pour les fruits, la hausse a été constante mais relativement lente ; dès 1990, elle sera brutale

comme nous le montre la variation annuelle, à l'exception des fruits qui semblent atteindre le plafond dès 1992. La tendance *générale* des fruits est confirmée par les oranges dont les prix ont été multipliés par 3 entre 1982 et 1992, pour se stabiliser après avoir accusé une forte hausse en 1990 (**Tableau 1.6.**). Jusqu'à la campagne 1986, la tomate était conduite en plein champ et n'était disponible qu'en saison et en grande quantité avec des prix relativement bas (entre 4 et 10 DA). Avec le lancement des cultures sous abris plastiques, elle sera disponible pratiquement tout au long de l'année mais à des prix excessivement élevés. Les écarts sont importants entre les prix des tomates de saison et ceux en hors saison.

La tendance générale est à la hausse, sauf pour la campagne 1991, pour les raisons évoquées plus haut. A part en 1989 et 1992, la hausse des prix à la consommation a été constante pour la pomme de terre. Les variations annuelles pour les trois produits considérés seront très fluctuantes, ce qui s'explique par la complexité des marchés des fruits et légumes. En effet, le constat sur le terrain est que les niveaux des prix ne répondent généralement à aucune logique ; en tous cas, ils n'ont aucun rapport avec les coûts ou les prix à la production. L'importante marge qui se dégage entre ces prix et les prix à la consommation le montre clairement.

Tableau 1.5. Evolution des prix moyens à la production (Mekhlef, 1993; * Ministère de l'Agriculture, 1992a).

	1988	1989	1990	1991	1992	1993
Tomate (DA/kg)	5.3	7.6	10.5	9.0	13.0	18.3
Indice	100.0	138.0	191.0	164.0	236.0	336.0
Variation annuelle (%)	-	33.2	38.2	44.3	44.3	41.4
Pomme de terre (DA/kg)	2.7	10	3.3	4.0	6.5	6.3
Indice	100.0	111.0	120.0	148.0	241.0	241.0
Variation annuelle (%)	-	11.0	8.3	23.0	62.3	0.0
Orange* (DA/kg)	5.0	5.3	6.0	7.5	7.0	7.1
Indice	100.0	106.0	120.0	150.0	140.0	142.0
Variation annuelle (%)	-	6.0	13.2	25.0	6.6	14.0

Tableau 1.6. Evolution des prix à la consommation en DA courants (ONS, 1991b).

	1982	1988	1989	1990	1991	1992	1993
Tomate (DA/kg)	8.60	10.75	13.40	16.00	15.80	16,10	22.80
Indice base 100	10000	12500	15600	18600	18400	18700	26500
Variation annuelle (%)	-	-	24.60	19.40	1.20	1.60	50.90
Pomme de terre (DA/kg)	3.14	6.00	5.80	7.60	9.40	3.30	11.10
Indice base 100	10000	19100	18500	24200	29900	26400	3400
Variation annuelle (%)	-	-	-3.30	31.00	23.60	-11.70	33.70
Orange (DA/kg)	670	1050	1290	1800	1900	2190	2000
Indice base 100	10000	1500	193.00	26900	28400	32700	29900
Variation annuelle (%)	-	-	22.80	39.50	530	1520	

Le cas des pommes de terre et des oranges et, dans une moindre mesure, des tomates, sont significatifs. La rente prélevée aux différents stades de la distribution profite en premier lieu aux intermédiaires et, dans une moindre mesure, au producteur qui commercialise sa production. Malgré la relative amélioration de la production due en partie à l'extension des surfaces et non à l'accroissement des rendements, le secteur des fruits et légumes reste confronté à certaines contraintes qui limitent son expansion et parmi lesquelles on peut citer:

a- Les contraintes naturelles:

L] L'eau : les cultures légumières et arboricoles sont grandes consommatrices d'eau. Malgré les efforts consentis en matière d'investissements hydrauliques, un manque d'eau est toujours enregistré. Ce déficit provient essentiellement

de l'envasement des barrages, ce qui limite leurs capacités;

de la sécheresse persistante de ces dernières années qui a obligé les producteurs à surexploiter les nappes souterraines et donc leur épuisement;

du détournement de l'eau réservée à l'agriculture au profit de l'industrie et des villes. Plus du tiers des cultures légumières ne reçoivent qu'une irrigation d'appoint.

LII La conduite en zone montagneuse cet aspect concerne surtout l'arboriculture qui, à part les agrumes et certains arbres à noyaux et à pépins, est implantée dans des zones montagneuses au sol pauvre et au relief accidenté et de densité hétérogène, ce qui a conduit aux faibles rendements que nous avons présentés.

b- Les contraintes techniques et organisationnelles:

Les cultures légumières et fruitières sont généralement menées dans de petites exploitations avec une absence totale d'encadrement. Malgré leur expérience, les producteurs font preuve d'une faible technicité qui ne leur permet pas de respecter les itinéraires techniques pour une bonne conduite culturale. En dépit de la faible dimension de leurs exploitations, ils ne profitent toujours pas de l'opportunité des spécificités de maraîchage qui leur permet de pratiquer durant la même campagne plusieurs cultures, augmentant ainsi le coefficient d'utilisation du sol. Pour diverses raisons (financières, méconnaissance, indisponibilité, ...), on assiste à une très grande insuffisance dans l'utilisation des produits phytosanitaires et des amendements organiques ; c'est ce qui explique en partie la faiblesse des rendements obtenus et leurs fluctuations.

Les problèmes des semences constituent sans aucun doute la contrainte majeure du secteur légumier. En effet, les semences représentent l'élément fondamental et le plus déterminant de la production agricole, car leur volume et leur qualité dépendent dans une large mesure de l'utilisation de variétés performantes et de l'emploi de semences de qualité. L'approvisionnement des producteurs en semences dépend en grande partie du marché extérieur, ce qui se traduit souvent par l'irrégularité des livraisons, un matériel végétal non adapté, l'introduction de maladies... A cela, il faudrait ajouter une rigidité administrative dans la distribution caractérisée par une multitude d'intervenants. Afin d'atténuer les importations (85 % des semences potagères et 70 % des semences de pommes de terre sont importées), des efforts ont été consentis pour relancer la production nationale par la reconversion des anciennes fermes pilotes en fermes semencières mais très vite celles-ci furent déviées de leur mission et l'objectif resta un voeu pieux. Les faibles capacités existantes restent encore insuffisantes tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif.

De par son importance, le cas de la pomme de terre reste un souci permanent pour les différents opérateurs. Jusqu'à présent, cette filière reste très mal maîtrisée au regard des nombreux problèmes posés par la production de semences:

D l'insuffisance des capacités de stockage a obligé à utiliser les lits des rivières et certaines forêts comme lieu de conservation des semences, ce qui ne manqua pas d'affecter sa qualité;

D comme les autres produits, la semence de pommes de terre connaît de faibles rendements dus en partie au manque de soins

D durant certaines campagnes, on assiste à la déviation de la production de semences vers le marché de consommation qui accuse un déficit et offre donc des prix plus intéressants que ceux espérés des prix des semences, entraînant ainsi la diminution du stock de semences. Ce qui ne fait que transférer le problème.

A ces contraintes, il faut ajouter le problème de la vulgarisation qui semble absente, ou inefficace. Les rares séances organisées ne trouvent pas écho chez les producteurs, soit que le produit vulgarisé est introuvable sur le marché ou qu'il nécessite un matériel adéquat non disponible chez le producteur ce qui enlève toute crédibilité à la vulgarisation - soit qu'il est vendu à des prix excessivement élevés limitant son achat par le producteur (**Baci, 1992**).

La dernière réforme du secteur public (1987) ne semble pas atteindre ses objectifs dans le sens où le désengagement de l'Etat, devant se traduire par une autonomie des producteurs dans le libre choix de leur plan de cultures et de la commercialisation de leur production, s'est soldé par un désintéressement de ces derniers du procès de production qui, faute de moyens, préfèrent louer leur terre devenant ainsi des rentiers - ou vendre sur pied leurs cultures à des intermédiaires n'ayant aucune relation avec l'agriculture. Le cas de l'arboriculture est significatif, notamment pour les agrumes où les « bénéficiaires » ne font que vendre sur pied les fruits sans aucun entretien des arbres.

c- Les contraintes économiques:

Le rôle de l'Etat dans la subvention des facteurs de production s'est fait lourdement sentir lors de son désengagement qui intervient dans une conjoncture économique très défavorable, particulièrement aux

producteurs. Ces derniers doivent supporter la flambée des prix de produits (semences, plants, engrais...) et autre matériel, jusque-là soutenus par l'Etat, et faire face aux nouvelles procédures d'octroi de crédits par la banque qui, elle-même, est soumise dorénavant au principe de la commercialité. Les premières mesures prises par la banque consistent à n'octroyer des financements qu'aux exploitants crédibles. Par ailleurs, elle a opéré une réévaluation des taux d'intérêts qui sont passés entre 1988 et 1992 de 5 % à 18 % pour le court terme, de 7 % à 20 % pour le moyen terme et de 11 % à 22 % pour le long terme (**Mekhlef, 1993**).

L'approvisionnement en semences dépend en grande partie du marché extérieur nécessitant la mobilisation de ressources financières très importantes et de plus en plus difficile à mobiliser eu égard à la conjoncture économique actuelle. L'augmentation des prix des facteurs de production sur le marché mondial, conjuguée à une forte dévaluation du dinar (1 \$ = 36 DA en 1994 contre 5,9 DA en 1988) ont entraîné une forte hausse des coûts de production et des prix à la consommation.

La hausse des prix des facteurs de production et des taux d'intérêts s'est répercutée négativement sur la production des fruits et légumes, notamment la plasticulture, où on assiste à un désinvestissement dans ce secteur comme nous le montre le recul des superficies couvertes. Par ailleurs, cette inflation ne permet pas une consommation adéquate des différents intrants nécessaires à l'accroissement de la productivité de ces cultures. Cette contrainte économique ne fait qu'accentuer dans une certaine mesure la faiblesse des rendements observés.

2. Besoin nutritionnel:

2.1 Les caractéristiques nutritionnelles des fruits et légumes frais et transformés:

2.1.1. Fibres:

Les fibres sont un groupe de molécules polymères présentant une hétérogénéité de structures. Les fibres sont, d'une part des polysaccharides ou polyosides, et d'autre part des lignines lesquels sont des polymères complexes de phénylpropane. Les polysaccharides sont constitués des structures suivantes la cellulose, les beta-glucanes, les hémicelluloses, les pectines, les gommes, les oligosaccharides et l'amidon résistant. Les fibres sont insolubles ou solubles. Les teneurs en fibres des fruits et légumes

varient de 1 à 5,2 g pour 100 g de matière fraîche (Lairou, 2001). Les propriétés des fibres et leurs effets sont rapportés dans le **Tableau 1.7**. Aussi les fibres sont-elles susceptibles d'être efficaces sur (1) les paramètres physiologiques comme la satiété, l'excrétion fécale et l'activité motrice de l'intestin (2) sur les paramètres métaboliques, notamment sur la réponse lipémique post-prandiale et, à plus long terme sur la lipémie basale et (3) les caractéristiques de la flore colique, dus aux effets prébiotiques de certaines fibres (Lairon, 2001; Lairon et Chanussot, 2001; James et al., 2003).

Tableau 1.7. Propriétés et effets reconnus ou suggérés des fibres alimentaires sur la santé.

	Type de fibre	Espèce chimique	Mécanismes impliqués	Aliments
Satiété, poids	solubles	Gommes, pectines, hémicelluloses...	T masse fécale délai vidanges	Fruits, produits céréaliers complets, légumes secs, légumes frais
Contrôle glycémie insulinémie	solubles visqueuses	Galactomannanes β - glucanes	T délai vidange gastrique vitesse de digestion glucides	Gomme de guar, fruit, avoine, légumes
Amélioration métabolisme des lipides	solubles	Gommes, pectines, hémicelluloses, β- glucanes	↓ absorption lipides ↑ délai vidange gastrique	Gomme de guar, son et farine d'avoine, psyllium
Constipation	insolubles	Cellulose, hémicelluloses, lignine	des troubles de motricité intestinale	Son de blé
Diverticulose colique	forte rétention d'eau		T teneur en eau du contenu colique	Son de blé, avoine
Fermentation colique	pectines, guar	Amidons résistants, fructo- oligosaccharides	Fermentation par les Bactéries coliques et production d'acides gras volatils	Oignon, ail, ^{→*} artichauts, légumes secs
Effet prébiotique		Fructo- oligosaccharides		
Prévention cancers (FDA)	générateur de butyrate	Fructo- oligosaccharides	Dilution composés cancérogènes, ↓ [NH ₄]	Graines, fruits, – légumes

Plusieurs études épidémiologiques ont été publiées sur la relation quantité de fibres ingérées et maladies cardiovasculaires. Une des premières études publiées par **Kromhout (Kronhout et al., 1982)** montre une importante diminution (rapport de 4) de la mortalité chez les hommes consommant au minimum 37 *glj* par rapport à ceux qui consomment moins de 20 g/j. Plus récemment, l'étude prospective conduite aux Etats Unis chez des hommes (**Rimm et al., 1996**) confirme une réduction de la mortalité cardiovasculaire (-60%) pour des forts consommateurs de fibres (30 g/j) par comparaison au quintile le plus faible consommateurs (10-17 g/j). Une étude conduite en Europe (**Pietinen et al., 1996**) montre qu'une augmentation de 3g/j de fibres solubles est associée à une diminution de 27% de la mortalité cardiovasculaire. Deux autres études confirment l'effet protecteur des fibres sur les coronaropathies. Aux Etats-Unis, il a été montré, après 10 ans, que le risque est diminué de 34% chez le quintile de femmes (âgées de 37 à 64 ans) consommant le plus de fibres (22,9 *glj* par rapport au quintile des plus faibles consommatrices (11,5 *glj*) (**Wolk et al., 1999**). Cet effet protecteur est confirmé dans l'étude également conduite aux Etats-Unis chez des hommes et des femmes récemment publiée par **Bazzano (2003)**.

L'artichaut et le cardon sont particulièrement riches en fibres solubles, de l'ordre de 35%, de même que les légumes secs (25% de fibres solubles). Les fruits secs comme les fruits séchés (figes, pruneaux et dattes) sont des sources intéressantes de fibres. Augmenter la consommation de fruits ou légumes pourrait permettre de mieux couvrir les besoins en fibres sans augmenter l'apport énergétique.

2.1.2. Substances spécifiques des fruits et légumes:

Les fruits et les légumes apportent une variété de composés, dépourvus de valeur nutritionnelle sensu stricto, qui pourraient avoir également des effets protecteurs vis-à-vis de diverses maladies dégénératives de par leurs effets biologiques rapportés dans de nombreux travaux (**Tableau 1.8.**). Pour toutes ces substances, il n'existe pas à l'heure actuelle d'apports nutritionnels conseillés.

n

u- Polyphénols: les fruits apportent environ 28% de l'apport total en polyphénols (**Brat et al., 2006**) lequel est estimé à environ 1g par jour soit 10 fois l'apport en vitamine C et 100 fois celui en vitamine E. Une récente compilation d'études prospectives (**Arts et Hoilman, 2005**) met en avant un effet

protecteur probable d'un plus grand apport en flavonoïdes *vis-à-vis* des maladies cardio-vasculaires confirmé dans le rapport FAO 2006. Mais il n'est apparu aucune association entre apport en flavonoïde et protection des cancers. A l'heure actuelle, il n'est pas possible d'établir des apports journaliers! recommandés pour les polyphénols.

La protection des polyphénols vis-à-vis des maladies cardiovasculaires est apparue essentiellement liée à leurs effets antioxydants (en particulier l'effet protecteur sur la peroxydation des lipoprotéines). Il a été montré dans de nombreuses études que les polyphénols neutralisent les radicaux libres, entités extrêmement réactives et délétères vis-à-vis de nos biomolécules (protéines, lipides, ADN). Au niveau du plasma, l'effet biologique des polyphénols ne semble pas être attribuable à un effet antiradicalaire direct, car leur biodisponibilité est faible (Ross et Kasum, 2002; Amiot et al., 2007). En revanche, les polyphénols peuvent moduler l'expression ou l'activité de molécules impliquées dans le processus athérosclérotique, et par exemple diminuer la production de facteurs pro-inflammatoires, et stimuler celle de facteurs anti-inflammatoires. Ils sont aussi capables de diminuer d'autres facteurs de risque des maladies cardio-vasculaires, comme l'hyperlipémie. Un effet antiradicalaire des polyphénols reste toutefois possible au niveau du tube digestif, où ils sont largement majoritaires lors de la digestion (Halliwell et al., 2005). Ils pourraient alors agir en limitant les effets délétères des substances pro-oxydantes présentes dans le repas et protéger les autres antioxydants alimentaires de la dégradation. Les polyphénols auraient certainement un rôle de synergie ou de complémentarité avec les autres antioxydants (vitamines C et E, caroténoïdes) dans la prévention du risque cardiovasculaire.

Tableau 1.8. Principaux constituants d'intérêt nutritionnel des fruits et légumes.

Composé	Nature	Effet biologique	Recommandation	Contribution des F&L aux apports(i)	Déficit dans la population	F&L riches [autres aliments riches en ces nutriments]
Fibres	polymères: polysaccharides et lignines	actions sur la fonction gastro-intestinale action des fibres solubles sur certains désordres métaboliques, (hyperglycémie, hyperinsulinémie)	25-30 g/jour 10 g de solubles	F+L = 38%	Environ 75% de la population n'atteignent pas 25 g/j	artichaut, fruits séchés [céréales]
Caroténoïdes	pigments liposolubles	Vitamine A : dans la vision	Vitamine A:	Vit. A:		fruits et légumes de

pro-vitamine A (α - et β - carotènes)		+ autres (embryogenèse, croissance..)	ANC = 900-700 pg ER pour homme-femme	F+L = 38%		couleur orange, légumes feuilles [produits animaux]
Vitamine 99 (acide folique)	hydrosoluble	Participe au métabolisme des acides aminés et des acides nucléiques	330-300 jig pour homme-femme	F-7L = 42%	chez 30-40% de la population Pb femmes enceintes	épinards, légumineuses, avocat, tomate [foie, levure de bière]
Vitamine C	hydrosoluble	antioxydant et cofacteur dans hydroxylation	ANC = 110 mg/j	F+L = 73%	chez >50% de la population	fruits frais agrumes et jus d'agrumes
Vitamine. K	liposoluble	rôle dans la coagulation (et le métabolisme osseux)		Fi-L = 29%	difficile à évaluer	légumes-feuilles — [huiles colza et soja]
Potassium	hydrosoluble	Maintien de l'équilibre acidobasique	31g (Europe)	F+L = 29% (90% des sels organiques)	75% <ANC	fruits et légumes frais
Magnésium	hydrosoluble	Participe à l'équilibre ionique des membranes	ANC = 6 mg Mg/kg/j	F-i-L = 22%	2/3 < ANC (SU.VI. MAX) ^o	fruits et légumes frais
Polyphénols	Grande diversité de structures composées de plusieurs noyaux phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes, tannins)	antioxydants (seuls ou en synergie) protecteurs probables / maladies cardiovasculaires (flavonoïdes)	pas d'ANC	F-i-L = 28%		fruits (petits fruits rouges), légumes (artichaut, chou) [café, thé, céréales, vin]
Caroténoïdes non pro- vitamine A	pigments liposolubles	antioxydants (seuls ou en synergie)	pas d'ANC	(non évalué)		légumes feuilles (lutéine), tomate (lycopène)
Glucosinolates	hydrosolubles	anticarcinogènes potentiels (détoxification) par leurs métabolites	pas d'ANC	(en cours d'évaluation)		crucifères
Phytostérols	liposolubles, structure analogue à celle du cholestérol	hypocholestérolémiant... à dose forte (> alimentaire, 2g)	pas d'ANC			crucifères

2.2. Fruits et légumes et couverture des besoins nutritionnels:

Les fruits et les légumes participent pour : 38,5% aux apports en fibres, 37,8% à ceux en vitamine A par leur richesse en caroténoïdes pro-vitaminiques A, 41,6% en vitamine B9, 73% en vitamine C, 28,8% en potassium et 22,15% en magnésium (Figure 1.6.). On *peut constater* également que les fruits ont une grande diversité de vitamines et minéraux. Peu énergétiques, ils représentent le groupe d'aliments avec la plus forte densité nutritionnelle. Les fruits et les légumes sont des aliments avec une forte densité nutritionnelle, soit un apport calorique faible et une grande richesse en vitamines, en minéraux et en substances spécifiques, les modes d'action de ces derniers commençant à être mieux connus. Pour certains micronutriments, les fruits et les légumes représentent des sources importantes de notre alimentation c'est le cas de la vitamine C, des folates et de la vitamine A apportée par les caroténoïdes pro-vitaminiques A. De plus, les fruits et légumes contribuent à l'apport quotidien d'autres vitamines, notamment celles du groupe B, ainsi qu'à une grande diversité de minéraux.

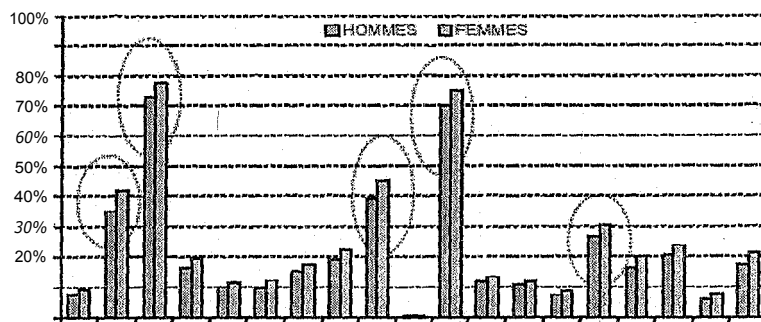


Figure 1.6. Contribution des F&L aux apports journaliers d'énergie et de nutriments dans l'alimentation calculée à partir des données de l'enquête INCA I (AFSSA, INPES 2004).

On peut considérer que les données INCA reflètent au plus juste la consommation moyenne de fruits et légumes, laquelle peut être évaluée à environ 350 g/j. Mais il existe une grande disparité de consommation au sein de la population mondiale. Tout d'abord on peut constater d'une part une consommation assez élevée de fruits et légumes et produits dérivés chez les consommateurs plus âgés, et d'autre part un pourcentage important de très faibles consommateurs (environ 25% de la population dont la consommation est inférieure à 250 g). Une telle disparité a déjà été rapportée pour différents pays d'Europe, même pour des pays présentant une consommation moyenne élevée comme la Grèce et

l'Espagne. Par ailleurs les femmes sont plus consommatrices de fruits et légumes.

De part la faible consommation de fruits et légumes, des déséquilibres apparaissent clairement dans la population mondiale notamment ceux en fibres, en vitamines B9 et C, et en minéraux, dont le potassium. D'après les données INCA (AFSSA, INPES 2004), il apparaît que les apports en ces nutriments sont très insuffisants surtout pour les très faibles consommateurs de fruits et légumes. Leurs apports pourraient être largement augmentés par une consommation plus importante de fruits et de légumes.

Certains groupes de population apparaissent ainsi à plus haut risque de non couverture de leurs besoins en micronutriments : il s'agit des enfants et adolescents, de la population féminine (jeunes filles, femmes en âge de procréer et femmes enceintes), des sujets âgés et des personnes en situation précaire.

On peut donc s'interroger sur l'évolution dans le temps des grandes différences de consommation de fruits et légumes observées entre les différents groupes d'âge. Nos données sont encore limitées. Les résultats de l'enquête INCA 2 qui seront publiés prochainement permettra de réactualiser nos connaissances sur les déficiences de la population mondiale et de les analyser en fonction de l'évolution de notre mode de vie et de nos habitudes alimentaires. Par ailleurs, des tables de composition réactualisées sont nécessaires pour mieux préciser les apports en nutriments et autres substances bioactives.

CHAPITRE II

des egumes *verts*

1. Métabolites secondaires:

Les végétaux, qui poussent d'eux-mêmes aux endroits qui leur conviennent le mieux, permettent de disposer d'un éventail considérable de composants alimentaires à savoir les constituants énergétiques (protéines, lipides, glucides) et les constituants non énergétiques (fibres alimentaires, minéraux, micronutriments). Les métabolites primaires tels que les nucléotides, les lipides acyles, les acides aminés et les acides organiques qu'on peut trouver chez tous les végétaux jouent un rôle métabolique essentiel (**Croteau et al., 2000**). Chez les végétaux, les processus qui permettent de synthétiser les composés organiques sont traditionnellement regroupés en métabolisme primaire et secondaire: on parle de métabolisme primaire pour les molécules qui ont des rôles spécifiques et indispensables, et que l'on retrouve de la même façon dans la quasi-totalité des cellules vivantes (**Salunkhe, 1990**).

A côté des métabolites primaires, les légumes accumulent fréquemment des métabolites dits secondaires à structure chimique souvent complexe dont la fonction physiologique n'est pas toujours évidente, mais qui représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire (**Macheix et al., 2005**). Cependant, il faut noter que de par la complexité de leurs structures chimiques et leurs voies de biosynthèses, ces métabolites à savoir notamment les composés phénoliques et les alcaloïdes ont été largement perçus comme biologiquement insignifiants et ont historiquement reçu peu d'attention de la plupart des biologistes. Par contre, les chimistes se sont bien intéressés à ces nouvelles molécules phytochimiques et ont largement étudiés leurs propriétés chimiques depuis la seconde moitié du XIXe siècle (**Croteau et al., 2000**).

Ce n'est qu'à partir de la deuxième moitié du XXe siècle qu'il y a eu explosion des recherches en ce domaine grâce à l'évolution du matériel d'analyse tels que la chromatographie (HPLC, CPG, CCM...), spectrophotométrie, résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrographie qui constituent les bases de la chimie organique moderne. De nombreux auteurs ont découvert récemment qu'un bon nombre de ces molécules ont un rôle chez les plantes:

- elles interviennent dans la structure des plantes,
- elles peuvent se comporter comme des réducteurs de la digestibilité,

- elles inhibent les attaques des microorganismes (antimicrobiennes),
 - elles participent à la prévention des cancers et des maladies cardiovasculaires (antioxydantes)
- (Rémésy *et al.*, 1996)

L'intérêt pour ces produits naturels n'a pas été purement académique mais plutôt il a été inspiré du fait de leurs nombreuses utilisations comme colorants, polymères, colles, huiles, cires, arômes et drogues. La connaissance des propriétés biologiques de ces métabolites a permis de faire une mise au point dans ce domaine, surtout dans la recherche de nouvelles drogues, antibiotiques, insecticides et herbicides. Cette appréciation croissante des effets biologiques hautement diversifiés de ces produits naturels a permis une réévaluation des rôles joués par ces composés chez les végétaux, surtout dans le contexte des interactions écologiques, comme la protection contre les agressions externes (herbivores et microorganismes), l'attraction pour la pollinisation et la dispersion des graines et aussi comme agents allélopatiques (influence de la compétition entre les espèces végétales) (Croteau *et al.*, 2000).

1.1. Composés phénoliques ou polyphénols:

Les composés phénoliques constituent un ensemble de molécules très largement répandues dans le règne végétal. On les trouve dans les plantes, depuis les racines jusqu'aux fruits. Les polyphénols naturels sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la reproduction. Ce sont notamment des pigments, des arômes, des tanins astringents, voire des composés sans couleur, sans odeur et sans saveur. On sait aujourd'hui qu'ils ne sont pas si secondaires que cela et qu'ils contribuent à protéger la plante contre les pathogènes, champignons de pourriture, rayonnement UV... Ces composés de structures chimiques extrêmement variées, sont souvent propres à une espèce ou à un groupe d'espèces et participe à l'identité chimique de la plante (Scalbert *et Williamson*, 2000). Parmi les polyphénols les plus abondants, citons l'épicatéchine (1), le kaempférol (2), l'acide ellagique (3), l'acide cinnamique (4), la procyanidine B 1 (5) (Figure 1.7), ainsi qu'une famille de molécules ayant un squelette carboné de base à quinze atomes de carbone: les flavonoïdes (Lugasi *et ai.*, 2003).

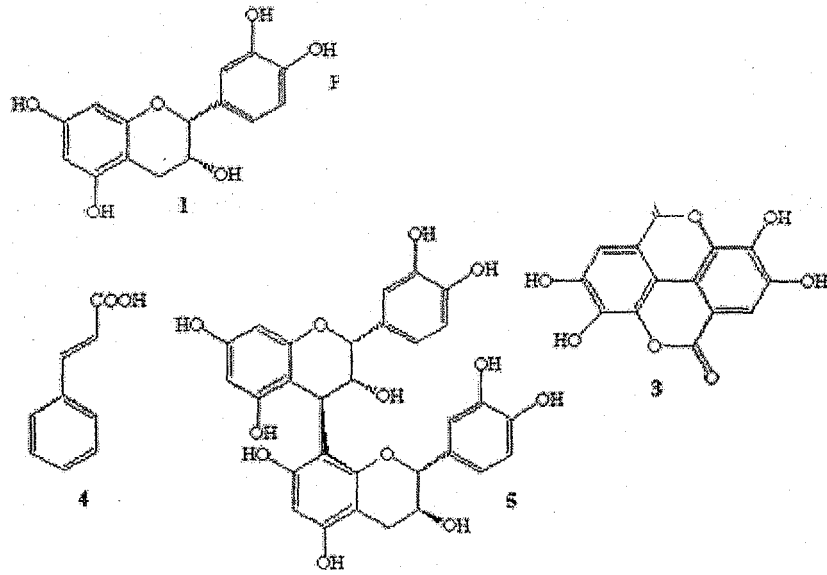


Figure 1.7. Structure de quelques composés phénoliques (Lugasi et *al.*, 2003).

Les fonctions des polyphénols au sein des plantes et de leur environnement sont multiples et pas toujours bien connues. **Haslam (1966)** les assimile plutôt aux tanins, composés phénoliques de haut poids moléculaire utilisés dans l'industrie du cuir, également responsables de l'astringence de certains aliments.

Les polyphénols végétaux ont d'abord été étudiés pour leurs effets protecteurs contre les pathogènes ou le rayonnement UV. Souvent présents en grande quantité dans les plantes consommées par les herbivores, ils limitent leur appétence et digestibilité. Ils ont donc été pendant longtemps considérés comme des facteurs antinutritionnels. C'est un regard tout à fait différent qu'on leur porte aujourd'hui, après la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et de leurs effets présumés sur la santé. Les recherches sur les effets santé des polyphénols ont cependant débuté beaucoup plus tardivement que pour les autres antioxydants. Ceci est largement expliqué par la très grande diversité de leurs structures chimiques. Plusieurs centaines de molécules ont été identifiées dans les aliments répartis en plusieurs classes : on peut citer parmi les plus importantes les anthocyanes responsables de la couleur des fruits rouges (cerise, cassis, fraise, etc.), les tanins responsables de l'astringence de divers fruits (pellicule et pépins du raisin, chair du kaki...), les flavanones responsables de l'amertume du pamplemousse et également abondants dans l'orange. Pour les légumes, on peut citer l'oignon riche en flavonols (quercétine).

Les polyphénols sont particulièrement abondants dans les fruits. Leurs teneurs peuvent atteindre 500 mg / 100 g dans certains fruits comme la pomme, le raisin ou les cerises. Le champion toutes catégories est le kaki avec des teneurs de 1 g / 100 g. Les légumes contiennent de plus faibles quantités de polyphénols, de l'ordre de 25 à 100 mg / 100 g (**Scalbert et Williamson, 2000**).

Selon **Harborne (1988)**, les polyphénols peuvent être divisés au moins en dix classes différentes selon leur structure chimique de base. Les deux classes les plus représentatives des composés phénoliques sont les tannins et les flavonoïdes que nous allons détailler un peu plus loin. La nature et les teneurs en polyphénols dans les divers fruits et légumes sont très variables. Ils sont classés en fonction de la structure de leur squelette carboné ce sont surtout les acides phénoliques, les flavonoïdes et dans une moindre mesure les stilbenes et les hgnanes. Les flavonoïdes sont eux-mêmes classés en fonction de leur degré d'oxydation en flavonols, flavones, isoflavones, anthocyanes, flavanols et proanthocyanidines. La structure des polyphénols à l'intérieur de chaque classe varie encore avec leur degré d'hydroxylation, de conjugaison avec des sucres ou des acides phénoliques ou leur degré de polymérisation. Cette immense diversité et les difficultés d'analyses sont en partie responsables de l'intérêt tardif des nutritionnistes pour ces antioxydants.

Compte tenu de cette diversité de structures et de teneurs dans les aliments, les apports en polyphénols associés à la consommation de fruits et légumes restent encore mal connus. La consommation journalière de polyphénols est d'environ un gramme. Les fruits et légumes y contribuent environ pour moitié, les boissons telles que jus de fruits, et surtout café, thé ou vin apportant le reste (**Scalbert et Williamson, 2000**).

Le rôle des polyphénols dans la prévention des maladies cardio-vasculaires et cancers est très étudié. L'ensemble des données scientifiques disponibles aujourd'hui n'a pas encore apporté les preuves définitives des effets protecteurs des polyphénols. Il est difficile de réaliser des études d'intervention analogues à celles réalisées avec la vitamine C compte tenu de la très grande diversité de leurs structures. Différentes directions de recherche devraient néanmoins concourir à apporter ces preuves de leur activité.

fl

- Etablissement d'associations plus fines entre consommation en polyphénols et pathologies par l'usage de marqueurs de consommation et de marqueurs précoces d'effets associés aux pathologies;
- Identification des métabolites potentiellement actifs présents dans les différents tissus;
- Etude des effets cellulaires par des approches génomiques et protéomiques.

T

Malgré cette absence de preuves définitives des effets bénéfiques de la consommation de polyphénols sur la santé, des industriels commercialisent dès à présent des aliments enrichis en polyphénols ou des suppléments alimentaires. Un apport excessif en polyphénols rendu possible par la forme même de ces nouveaux produits, pourrait avoir des conséquences contraires à celles attendues et néfastes pour la santé (effets prooxydants à doses élevées, inhibition de l'absorption du fer). Or l'aliment diffère fondamentalement du médicament par sa fonction et le consommateur attend d'un aliment un risque négligeable, ou mieux encore un réel bénéfice santé. Un apport modéré associé à une consommation suffisante de fruits et légumes reste la meilleure recommandation que l'on puisse formuler dans l'état actuel de nos connaissances (Mita *et al.*, 1996).

Les effets santé des polyphénols ne dépendent pas seulement de leurs niveaux de consommation mais aussi de leur biodisponibilité. Au laboratoire, la biodisponibilité de la quercétine a été particulièrement étudié, le principal flavonol consommé par l'homme. Ses effets biologiques sont très documentés: forte capacité antioxydante, effets vasculaires, anti-inflammatoires,

Longtemps, on n'a pu mettre en évidence la présence de quercétine dans le plasma chez l'homme. Grâce à des détecteurs plus sensibles, associés à des séparations par chromatographie, on a pu mesurer l'absorption de quercétine, chez 10 volontaires ayant pris un repas complexe à base de pomme, oignon, tomate, haricots verts, salade, fruits et vin rouge, apportant 87 mg de quercétine. Après ce repas, la teneur plasmatique de quercétine a décuplé, passant de 30 à 300 nM. De ces premiers travaux, on peut conclure que les sites de métabolisme et l'efficacité de l'absorption intestinale dépendent largement de la nature des flavonoïdes, et notamment de la glucosylation qui a un effet très positif sur la biodisponibilité. Par ailleurs, les polyphénols sont conjugués, avant leur passage dans le sang portai. La sécrétion par l'entérocyte d'une partie de ces composés conjugués directement dans la lumière, constitue sans doute un mécanisme de contrôle de l'absorption intestinale des flavonois. Dans

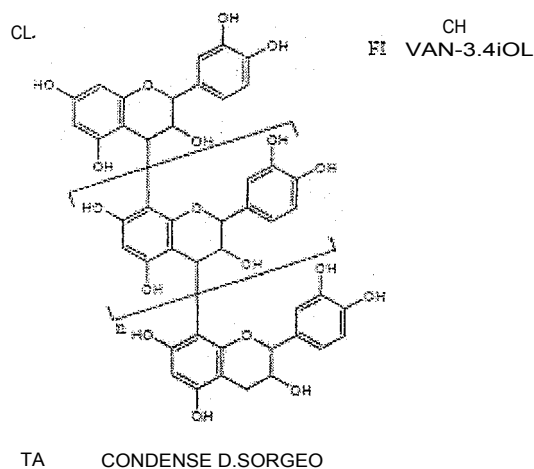


Figure 1.9. Structure des tannins condensés (Waghorn et McNabb, 2003).

c- Biosynthèse: les tannins sont synthétisés à partir de la phénylalanine par la voie dite de l'acide shikimique (Swain, 1979 ; Haslam, 1966).

La synthèse des tannins hydrolysables à partir d'acide gallique passe tout d'abord par l'ajout de groupements galloyle au noyau d'acide gallique, ce qui mène au pentagalloylglucose. Puis les gallotannins seront formés par addition de nouveaux groupements galloyle sur ce noyau pentagalloylglucose (Figure 1.10.), alors que les ellagitannins verront des processus d'oxydation créer des liaisons carbone entre différents pentagalloylglucoses, ce qui mènera à des dimères et oligomères dérivés (GrundhMer et al., 2001).

Les parois cellulaires du mésophylle des feuilles, les chloroplastes et les espaces intercellulaires sont le site privilégié de la synthèse des tannins hydrolysables (Grundhfer et al. , 2001 ; GrundhMer et Gross, 2001). La polymérisation des flavan-3 -ois (tannins condensés) se fait au moyen de liaisons entre les atomes de carbone positionnés en C4 et en C8.

• *Entre les espèces*: on rencontre assez peu de polyphénols parmi les champignons, algues et la plupart des monocotylédones. La plupart des tannins se trouvent dans quelques familles de dicotylédones comme les légumineuses. On en trouve chez la plupart des gymnospermes et ils sont très répandus chez les angiospermes ligneuses, moins chez les herbacées (**Aerts et al.**, 1999). Certaines espèces, notamment le chêne et l'érable, contiennent les deux sortes de tannins, hydrolysables et condensés (**Sahrnkhe, 1990**). Les feuilles des espèces herbacées, dans l'ensemble, contiennent peu ou pas de tannins dans leurs cellules, bien qu'il existe des exceptions (*Lathyrus pratensis*, 16 % de procyanidine soluble). La production de tannins semble très nettement liée à certaines familles de plantes plutôt qu'à d'autres, comme les herbacées qui ont largement tendance à en être dénuées. Ces différences interfamiliales ont été longuement étudiées par **Harborne** en 1976, en s'intéressant particulièrement aux flavonoïdes et aux tannins condensés (**Bernays et al.**, 1989).

Selon **BateSmith** et **Swain** dans les années 1970, les tannins condensés ont évolué parallèlement aux plantes vertes, probablement au Carbonifère lorsqu'elles devinrent largement répandues, et les Angiospermes au fil de leur évolution ont d'abord produit des tannins hydrolysables, puis des familles sont apparues qui n'en synthétisaient aucun des deux (**Bernays et al.**, 1989). Chez certaines espèces les différences seront importantes entre les individus, tandis que pour d'autres c'est au sein même d'un individu que les plus grandes variations seront observées (**Baldwin et al.**, 1987 ; **Schultz et al.**, 1982 ; **Fleck et Layne, 1990**).

Au sein de la plante: les composés phénoliques peuvent s'accumuler dans tous les organes de la plante (feuilles, tiges, racines, fleurs et fruits), dans des tissus spécifiques selon l'espèce, la plupart se trouvant dans les couches épidermiques ou subépidermiques. On rencontre cependant des exceptions, comme les organes de stockage (fruits, racines) : on trouve par exemple des flavonoïdes dans le péricarpe de certains fruits (mûres, fraises). Au sein d'une cellule, les composés phénoliques s'accumulent principalement à deux niveaux : la paroi cellulaire et la vacuole (**Hrazdina et Wagner, 1985**). Plus récemment, on a pu montrer, notamment chez une espèce de chêne (*Quercus robur*) que les tannins sont synthétisés et stockés dans les parois cellulaires, les chloroplastes ainsi que dans l'espace intercellulaire (**Grundhøfer et Gross, 2001**).

Les tannins condensés sont principalement stockés dans les tissus lignifiés et l'écorce (**Haslam, 1966**).

T Dans les graines de sorgho, plus de 80 % des tannins se situent dans l'enveloppe (**Salunkhe, 1990**).

T . *Avec le temps:* La teneur en composés phénoliques diminue avec le vieillissement des feuilles de sorgho (**Woodhead, 1981**), alors que chez les arbres certains auteurs trouvent une faible variation au cours de la saison, une fois passé le pic de la fin mai (**Schultz et al. , 1982**).

D'autres constatent une diminution dans les deux semaines suivant l'ouverture des bourgeons, suivie d'une augmentation constante du pourcentage de tannins dans les feuilles au cours de la saison, ce qui correspond en fait à une augmentation constante de la teneur en tannins : la dilution des tannins lors de la croissance de la feuille explique la diminution du pourcentage (**Horner, 1988**). La teneur en tannin des feuilles de chêne augmente pendant l'été (**Feeny, 1970 ; Forkner et al., 2004**). En effet, les feuilles plus âgées sont moins sujettes aux maladies et moins attractives pour les prédateurs (**Swain, 1977**).

Dans les fruits, le degré de polymérisation des tannins augmente avec la maturation, diminuant ainsi leur capacité à précipiter les protéines (**Goldstein et Swain, 1963**)

Facteurs physiologiques: il existe également des facteurs physiologiques qui régulent la production de tannins : les nutriments disponibles dans le sol ont une grande influence sur la production de phénols et notamment de tannins dans de nombreuses espèces (**Waterman et Mole, 1989**, cités par **Bernays et al., 1989**). On a montré par exemple, qu'une fertilisation azotée permet de diviser par cinq la teneur en tannins trouvée chez des légumes (**Bryant et al., 1987** cités par **Bernays et al., 1989**), et qu'une réduction des nutriments du sol entraînait une production accrue de composés secondaires (**Coley et al., 1985** cités par **Bernays et al., 1989**).

– La disponibilité des glucides est également un élément déterminant pour la construction de composés phénoliques de défense des plantes, et peut déterminer des différences de teneur en tannins (Larsson et al., 1986).

T *Facteurs abiotiques:* il existe une corrélation positive entre l'intensité lumineuse et la teneur en tannins des feuilles exposées (**Woodhead, 1981 ; Waterman et al., 1984 ; Mole et Waterman, 1988; Mole et**

al., 1988), les feuilles de la canopée étant plus concentrées en tannins que les feuilles inférieures (**Forkner et al.**, 2004). La synthèse de phénols induite par la lumière dans les feuilles les plus exposées conduit à une plus grande capacité à précipiter les protéines, et même parmi les feuilles ombragées, il y a suffisamment de tannins pour précipiter la totalité des protéines présentes dans la feuille (Mole et Waterman, 1988). Cette augmentation de la teneur en tannins dans des conditions d'ensoleillement intenses serait un mécanisme de défense contre les dégâts causés aux feuilles par la lumière (Close et McArthur, 2002). Les feuilles les plus exposées semblent ainsi moins digestes et semblent moins intéressantes pour les herbivores que les feuilles matures ombragées (**Waterman et al.**, 1984). L'eau est également un facteur déterminant de la production de tannins, à tel point que la teneur en eau d'une feuille permet de prédire, mieux que son âge, sa teneur en tannins (**Horner, 1988, 1990**). La concentration en composés phénoliques au sein d'une feuille varie de façon non linéaire avec l'eau elle augmente puis diminue selon une équation quadratique avec le déficit en eau (**Horner, 1990**).

Les attaques d'insectes et de champignons pathogènes augmentent notamment la teneur en composés phénoliques des plantes (**Woodhead, 1981**). Les feuilles endommagées par des déchirures voient également leur taux de composés phénoliques augmenter en quelques heures suite au dommage (**Baldwin et Schultz, 1983**).

c- Exemples de plantes riches en tannins: les tannins condensés sont fréquents dans les plantes de pâturage (plus de 300g/kg de matière sèche parfois, **Rittner et Reed, 1992** cités par **Waghorn et McNabb, 2003**), dans les enveloppes des graines, et on les trouve à de plus faibles concentrations dans certaines légumineuses (100 g/kg MS), par contre ils sont quasiment inexistantes dans les herbes (**Waghorn et McNabb, 2003**). Les graines de sorgho contiennent plus de 20 % de tannin en équivalent acide tannique (**Salunkhe, 1990**).

On trouve des tannins dans de nombreuses plantes utilisées dans l'alimentation, notamment céréales et légumineuses (sorgho, millet, orge, haricots secs, petits pois, caroube), et ils ont été bien décrits (Salunkhe, 1990) Les noix de cajou par exemple contiennent 34 % de polyphénols, les oignons et le persil respectivement jusqu'à 2 % et 0,2 % (Bravo, 1998).

Certains fruits en contiennent également en quantité appréciable (pomme, banane, mûre, canneberge,

datte, raisin, aubépine, pêche, poire, kaki, prune, framboise et fraise; **Chung et al., 1998**). Ils se situent principalement dans la peau, mais aussi dans la chair des fruits (**Salunkhe, 1990**). Les teneurs en polyphénols de divers aliments sont reprises par Bravo : parmi les fruits les plus riches en tannins se trouvent le cassis, la myrtille, le raisin, la canneberge, la mûre, l'a fraise, ayant des teneurs maximales observées entre 1,2 % et 0,2 % du poids frais (**Bravo, 1998**).

1.1.1.2. Métabolisme et toxicité:

a- Propriétés chimiques: les tannins contiennent de nombreux groupements hydroxyle (sur les noyaux phénoliques), ce qui leur permet de former des complexes insolubles avec des hydrates de carbone, des protéines et des ions métalliques (**Bravo, 1998 ; Haslam, 1996**). ils se lient à la quasi-totalité des protéines solubles, donnant naissance à des polymères insolubles à pH et force ionique normaux. Cette complexation, dépendant du pH, est donc réversible (**Haslam, 1996**). Cette réaction avec les protéines est à l'origine de nombreux effets biologiques des tannins. Les enzymes complexées de cette façon montrent une réduction marquée de leur activité. La taille des tannins influe sur leur interaction avec les protéines : une taille minimum de 350 Da est nécessaire pour que la molécule de tannin précipite une protéine. Pour les tannins condensés, cela correspond à des dimères de flavan-3-ols, et pour les tannins hydrolysables un minimum de deux acides galliques, ou un acide ellagique. Jusqu'à un certain seuil, les tannins les plus réactifs sont généralement les plus grands, les polyphénols de faible poids moléculaire étant moins réactifs (**Schanderl, 1970 ; Rossi et Singleton, 1966** cités par **Chung et al., 1998**). Une molécule de tannin peut se lier à deux ou plusieurs groupes peptidiques, probablement grâce à la formation de liaisons entre les chaînes protéiques (**Zitko et Rosik, 1962** cités par **Chung et al., 1998**).

Les liaisons que forment les tannins avec les protéines peuvent être de plusieurs types : liaisons hydrogène réversibles (**Gustavson, 1954** cité par **Butler et al., 1986**), interaction hydrophobique (**Oh et al., 1980** cités par **Butler et al., 1986**), oxydation suivie par une condensation covalente, qui est une réaction réversible (**Loomis et Battaile, 1966** cités par **Chung et al., 1998**).

Les tannins peuvent également former des complexes avec d'autres polymères naturels comme les acides nucléiques et les polysaccharides (**Swain, 1979**). Les tannins ont d'autres utilisations commerciales que le tannage des peaux : ils forment des complexes noirs avec les sels ferreux, propriété

utilisée pour la production d'encre, ils sont utilisés comme antidotes des alcaloïdes, des glycosides et des ions de métaux lourds grâce à leur affinité chimique. ils apportent également une part importante du goût de nombreux aliments et boissons **(Bernays et al., 1989)**.

b- Inhibiteurs de la digestion: Foley a passé en revue les expériences menées sur l'effet des tannins sur l'alimentation, il montre que les tannins ont des effets toxiques et/ou réduisent (souvent, mais pas toujours) la digestion en réduisant la digestibilité de la matière sèche, de l'azote et des fibres **(Foley et al., 1999)**. Les tannins hydrolysables peuvent être hydrolysés *in vivo* puis absorbés, l'acide gallique produit est excrété dans les urines. Dans ce cas, ils n'affectent pas la digestibilité des protéines **(Hagerman et al., 1998)**.

Les tannins condensés, par contre, diminuent la digestibilité des protéines chez le mouton et le cerf, ils sont excrétés (respectivement 100 % et 60 %) dans les urines sous forme de complexes avec des protéines **(Robbins et al., 1991)**. Les tannins condensés ne peuvent pas être dégradés dans les conditions anaérobies de l'intestin des mammifères, leur dégradation nécessiterait des microorganismes spécifiques **(Foley et al., 1999)**.

La diminution de la digestibilité des protéines est proportionnelle aux capacités de précipitation des protéines des tannins **(Robbins et al., 1987)**. Cependant, Robbins souligne que ce ne sont pas les propriétés d'inhibiteurs de digestion des tannins qui en font un moyen de défense contre les ruminants, mais plutôt leur toxicité **(Robbins et al., 1987)**.

c- Effets sur l'organisme: les composés secondaires peuvent agir de deux manières, comme inhibiteurs de la digestion ou comme toxines. Les toxines agissent de manière spécifique après avoir traversé les membranes, ce qui permet une toxicité importante pour des quantités ingérées très faible. Les inhibiteurs de digestion agissent directement dans l'intestin et perturbent les processus digestifs de différentes manières **(Waterman, 1984)**.

Pourtant dans la majorité des cas, les tannins entrent dans la catégorie des inhibiteurs de digestion. Ils sont peu toxiques mais abondants efficaces à forte dose, ils se lient aux protéines et en diminuent la digestibilité en formant des complexes insolubles. La très grande variété des tannins ne permet pas une

description exhaustive et synthétique de leurs modes d'action et de leurs effets sur l'organisme.

T L'impact est modulé entre autres par le type de tannins (condensé, hydrolysable..), sa concentration, l'espèce animale, l'état physiologique de l'animal, son sexe, son état sanitaire, son statut nutritionnel (particulièrement s'il est adapté ou non à la consommation de tannins) et les conditions environnementales (**Dawson et al., 1999** ; **Waghorn et McNabb, 2003**). La structure des tannins condensés, notamment, est un important déterminant de leur activité biologique (**Clansen et al., 1990**).

L'activité des tannins inclut entre autres la réduction de la palatabilité, l'interférence avec les processus digestifs, la toxicité envers les champignons et les bactéries, l'inhibition d'enzymes digestives et l'inhibition spécifique de la cellulase (**Waterman, 1984**).

Chez les animaux d'élevage, on a montré que de faibles concentrations de tannins condensés (10 g/kg MS) causent des dommages sur l'intestin de poulets et une diminution de l'absorption des acides aminés et des performances chez les cochons (**Waghorn, 1996**). Du tannin de quebracho (tannin condensé) donné à hauteur de 50g/kg MS dans le régime de moutons a entraîné une diminution de l'utilisation de nutriments et une diminution des performances (**Dawson et al., 1999**). Une consommation excessive de fourrages contenant des tannins hydrolysables a entraîné des lésions du foie et des reins, puis la mort de vaches et de moutons, en général cinq à dix jours après la consommation initiale excessive. Cependant le composé toxique n'est pas connu avec certitude (**Waghorn et McNabb, 2003**). Chez les rongeurs, la consommation de tannins entraîne une croissance plus faible, voire une diminution du poids, une diminution de la prise alimentaire, de la prise de poids journalière et de la rétention d'azote (**Asguith et al., 1985** ; **Mehausho et al., 1985** ; **Dawson et al., 1999** ; **Downs et al., 2003**).

d- L'astringence des tannins: c'est la capacité qu'ont les tannins à former des complexes stables avec les protéines et les sucres qui leur confère leurs propriétés gustatives et notamment leur astringence, car ils précipitent les protéines salivaires (**Bravo, 1998**). Le goût astringent, décrit parfois plus comme une sensation tactile due à la précipitation des protéines salivaires (et qui crée une sensation d'assèchement dans la bouche), a été étudié en termes de neurophysiologie pour la première fois en 1969, puis en 1993 (**Hellekant et al., 1993a,b** ; **Kawamura et al., 1969**). Les fibres sensibles spécifiques du goût répondent à une application d'acide tannique sur la langue, ce qui montre que ce goût des tannins n'est pas qu'une sensation tactile (Kawamura et al., 1969). L'acide tannique se combine fortement avec les

mucoprotéines de la surface de la langue, ce qui produit la sensation ressentie sur une longue durée lors de la consommation de tannins (**Kawamura et al., 1969**),

L'astringence est liée à la polymérisation des tannins puisque la diminution de l'astringence dans les fruits lors de leur maturation est due à une augmentation de la polymérisation des tannins (**Goldstein et Swain, 1963**). Une nouvelle étude neurophysiologique a révélé en 1996 que, parmi 74 neurones répondant au goût dans le cortex orbitofrontal, certains répondaient à l'acide tannique à une concentration de 1 mM, et que ces neurones formaient une sous population particulière, différente des neurones répondant aux goûts connus (acide, amer, salé, sucré). Cette étude montre que le goût astringent de l'acide tannique se situe en dehors des quatre goûts jusque là décrits, et en représente un cinquième (**Critchley et Rolls, 1996**).

e- Limitent l'absorption de fer: les tannins inhibent également l'absorption du fer en agissant comme des « chélateurs naturels » dans le tube digestif. La consommation de tannins réduit très fortement (plus de 50 % de diminution) l'absorption du fer chez le rat (**Afsana et al., 2004**). Le fer existe principalement dans les aliments sous sa forme oxydée (Fe^{3+}), mais seule la forme réduite (Fe^{2+}) peut être absorbée par l'organisme. La conversion du fer oxydé en fer réduit est améliorée en présence d'acide ascorbique (vitamine C), alors que les tannins se fixent au fer par leurs groupements hydroxyle et réduisent ainsi sa biodisponibilité (**Haslam, 1966**).

1.1.1.3. Effets positifs des tannins:

a- Antioxydants: les tannins ont de grandes capacités antioxydantes dues à leurs noyaux phénol. L'efficacité antioxydative des polyphénols dépend de leur structure chimique : les tannins hydrolysables et condensés sont 15 à 30 fois plus efficaces que les phénols simples (**Hagerman et al., 1998**). Des essais *in vitro* sur différents tannins extraits de thé montrent que les activités anti-oxydantes varient selon les composés, le plus efficace parmi les tannins extraits étant un tannin hydrolysable (**Hashimoto et al., 2003**). Les activités anti-oxydantes des tannins et leur rôle dans la prévention de certains cancers ont été passés en revue dans beaucoup d'articles (**Almazan et Begum, 1996** ; **Vijayakumari et al., 1997** ; **Bravo, 1998** ; **Chung et al., 1998** ; **Gupta et al., 2005** ; **Odhav et al., 2007**).

b- Antiarasitaires: dans les années 90, le développement de résistances aux traitements contre les parasites intestinaux des moutons et des chèvres a conduit à la recherche de méthodes alternatives (**Jackson et Coop, 2000** cités par Paolini et al., 2003a). L'utilisation de plantes à tannins a été envisagée et les premières études menées en Nouvelle-Zélande ont montré que la consommation de plantes à tannins pouvait affecter la biologie de certaines espèces de parasites intestinaux en diminuant la production d'oeufs (**Niezen et cL, 2002a,b ; Niezen et aL, 1998a,b** cités par **Paolini et al., 2003h**). Cet effet immédiat et direct se prolonge au-delà de l'arrêt de l'absorption de tannins car ils agissent sur l'établissement des populations de parasites comme sur ceux déjà installés (**Athanasiadou et cL, 2000a Paolini et al., 2003a**). Ainsi le comportement alimentaire à travers la consommation de plantes tannins peut influencer le parasitisme intestinal (**Hoste et al., 2001**).

c- Antibactériens: de nombreuses études ont montré l'effet antimicrobien des tannins sur différents bactéries, virus et champignons, elles sont décrites en détail ainsi que les différentes espèces de microbes sensibles (**Chung et al., 1998**). Parmi les tannins hydrolysables, qui ont tous une activité antibactérienne contre *Helicobacter pylori* (bactérie responsable de nombreux troubles intestinaux), les monomères sont particulièrement efficaces, et leur activité bactéricide est directement liée au temps et à leur concentration (**Funatogawa et al., 2004**). Les polyphénols peuvent également limiter la croissance de certaines bactéries, grâce à leurs propriétés de chélateurs du fer (**Mila et al., 1996**).

1.1.2. Flavonoïdes:

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. Ils sont considérés comme les pigments quasiment universels des végétaux. A ce jour, plus de 4000 flavonoïdes naturels ont été décrits. On estime que 2 % environ du carbone organique photosynthétisé par les plantes, soit quelques 10^9 tonnes par an, est converti en flavonoïdes (**Agrawal et Markham, 1989**).

Flavonoïdes (de *Jiavus*, «jaune» en latin) est le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 carbones, qui à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A

et B, connectés par un pont à *trois* carbones (structure en C6-C3-C6). Le pont en C3 entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C (Figure Lii.).

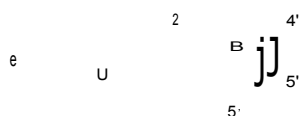


Figure 1.11. Structure de base des flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Les flavonoïdes possèdent tous le même élément structural de base car ils dérivent d'une origine biosynthétique commune. Le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA), issues du métabolisme du glucose. Les cycles B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose mais par la voie du shikimate via la phénylalanine qui est convertie en p-coumarate puis en p-coumaroyl-CoA (**Figure 1.12.**).

Le p-coumaroyl-CoA et les 3 malonyls-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique *du* cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone la naringénine. Ce cycle s'hydrate ensuite pour former les différentes classes de flavonoïdes (**Heller et Forkmann, 1993**).

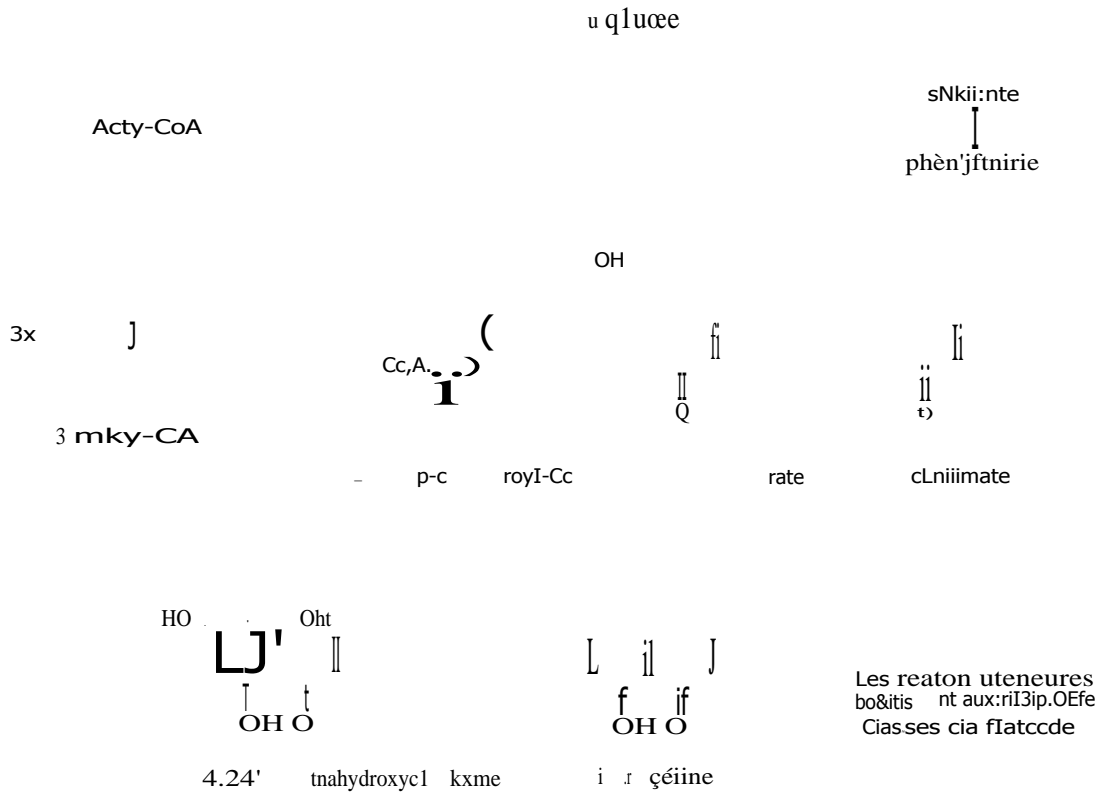


Figure 1.12. Schéma de la biosynthèse des flavonoïdes illustrant les voies de l'acétyle CoA et de la phénylalanine (Heller et Forkmann, 1993).

Les diverses classes de flavonoïdes diffèrent en fonction de la cyclisation et du degré d'insaturation et d'oxydation du cycle C alors que les composés individuels au sein d'une classe diffèrent par la substitution des cycles A et B. Parmi les nombreuses classes de flavonoïdes présentées (Figure 1.13.), nous citerons les principales anthocyanes, flavanols, flavones, flavanories, isoflavones et proanthocyanidols (**Harborne, 1988**).

Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés, acétylés, prénylés ou sulfatés. Dans les plantes, les flavonoïdes sont souvent présents sous forme C- ou O-glycosylés ; les formes libres, sans sucres attachés, sont appelées génines. Les O-glycosides, de loin les plus fréquents, portent leurs substituants sur les groupements hydroxyles de la génine, alors que pour les C-glycosides, la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, les C-6 et/ou C-8. En effet, la formation de la (ou des)

liaison(s) hétérosidique(s) est sous la dépendance de transférases très spécifiques quant au substrat et à la position d'osylation (Bruneton, 1999).

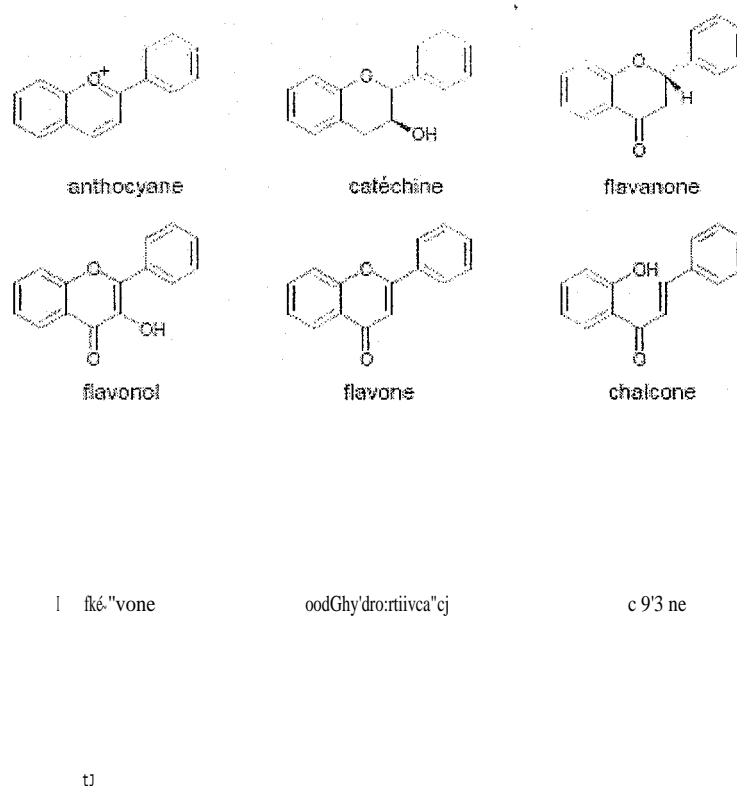


Figure 1.13. Les diverses classes de flavonoïdes (Bruneton, 1999).

Plus de 80 sucres différents ont été trouvés liés aux flavonoïdes des plantes. Parmi eux, le D= glucose est de loin le monosaccharide le plus courant, d'autres hexoses, le D-galactose et le D-mannose, ainsi que des pentoses, le D-xylose, le L-arabinose et le D-apiose sont fréquents avec le L-rhamnose (seul désoxyhexose) et des acides uroniques (le plus souvent l'acide D-glucuronique). On trouve également des disaccharides (une quarantaine dont les plus courants : le rutinose et le néohespéridose), des trisaccharides (environ 30 espèces) et quelques rares tétrasaccharides. Les sucres peuvent à leur tour être substitués par des groupements acyles tels que le malonate ou l'acétate (Hollman et Arts, 2000).

inhibiteurs d'enzymes, des agents chélatants des métaux nocifs aux plantes. De plus ils sont impliqués dans la photosensibilisation et les transferts d'énergie, la morphogenèse et la détermination sexuelle, la photosynthèse et la régulation des hormones de croissance des plantes (Di Carlo et al., 1999; Pietta, 2000).

Tableau 1.9, Teneur en flavonoïdes de quelques légumes et fruits en mg/kg de MF (Lugasi et al., 2003).

<i>I unies</i>	
Brocol.t	462
Chou blanc	17.7
Oignon rcge	12:4.1
Oignon pourpre	195.6
poivre	20.1
.épin..rd.s	
PersiLfeeiIles	80.2
Celeri feuilles	41D2.:3
céki	
<i>frn/t.s</i>	
pas èqIle	18.4
<i>Cassis:</i>	
<i>fraises</i>	1.003
<i>raisin</i>	S7
<i>noix</i>	4565
<i>Kiwi</i>	22.3
Banane	22..8
poniine	65.3
poire.	24.7
prune	233
Abricot	11-5

Dans l'alimentation, les quantités consommées quotidiennement seraient de l'ordre d'un gramme par jour, essentiellement sous forme de quercétine. Sources principales thé, oignons et pommes. Ils sont absorbés en quantités nettement supérieures à la vitamine E et au B carotène. En réalité, les quantités ingérées varient beaucoup selon les types d'alimentation et de culture. Les régimes méditerranéens, riches en huile d'olive, agrumes et légumes verts, en sont gorgés (Gibault, 2001).

La contribution au régime alimentaire humain des flavonoïdes est très importante : de 50 à 800 mg/jour en fonction de la consommation de fruits et légumes mais aussi de boissons comme le thé ou le vin rouge (environ 200 mg par verre ou tasse) (Pietta, 2000). On trouve également des flavonoïdes dans de nombreuses plantes médicinales et des préparations à base de plantes contenant de flavonoïdes sont utilisées en médecine traditionnelle partout dans le monde (Holiman et Arts, 2000).

Tableau 1.10. Sources alimentaires des flavonoïdes (Marfak, 2003).

Flavonoïdes	Aliments
Flavones naringéne	Fruits du genre citrins
Flavonols quercétine rutéoline	Ces fruits Persil, thym, romarin, céleri Persil, céleri
Flavonols quercétine rutéoline	Radis, brocoli, chou noir chou, pomme, olive, vin rouge, tomate raisin, vin rouge
Flavonols quercétine rutéoline	Thé vert, thé noir Thé vert, thé noir Vin rouge
Anthocyanidols cyanidin malvidin delphinidin	Cassis, mûres Raisin, fraises, framboises Mûres, fraises

Les flavonoïdes montrent plusieurs effets biologiques tels que des effets anti-ulcéreux, anti-inflammatoire, anti-hépatotoxique et antimicrobien. Ils sont également des inhibiteurs d'enzymes telles que l'aldose réductase et la xanthine oxydase. Cependant la propriété fondamentale des flavonoïdes est leur caractère antioxydant. A ce titre, ils agissent à plusieurs niveaux

Outre leur pouvoir antioxydant, certaines classes possèdent des potentialités oestrogéniques (isoflavones) et, plus généralement, les flavonoïdes sont utilisés pour toute une gamme d'activités pharmacologiques : pour préserver l'intégrité vasculaire, pour leurs propriétés immunomodulatrices, – anti-hépatotoxiques, anti-ostéoporotiques, pour leur actions aitimicrobiennes et contre les allergies (**Sannomiya et al.**, 2005 ; **de Rijke et al.**, 2006) ; les flavonoïdes sont aussi connus pour leur action sur le tractus gastro-intestinal en tant qu'agents antiulcéreux, antispasmodiques, anti-sécréteurs et antidiarrhéiques (**Di Carlo et al.**, 1999).

Des articles de synthèse concernant leur mécanisme d'action (la relation structure-activité liée à la fonction antioxydante, notamment, a été établie (**Pietta, 2000**)) et leurs utilisations thérapeutiques potentielles ont été publiées ces dernières années (**Di Carlo et al.**, 1999 ; **Hollman, 2001**). De nombreuses preuves ont été apportées sur l'importance des effets *in vitro* des flavonoïdes sur différents modèles biologiques et, en particulier, enzymatiques (**Hollman et Katan, 1997**). Cependant, le potentiel thérapeutique des flavonoïdes n'est pas encore établi à cause de la connaissance limitée de leur absorption chez l'homme (**Hollman et Katan, 1997**). La biodisponibilité des flavonoïdes étant en T général assez faible chez l'homme (**Bruneton, 1999**), il est nécessaire d'être prudent quant à l'extrapolation des données *in vitro*. A l'heure actuelle, le lien entre consommation de flavonoïdes et prévention de cancer est encore faible. Aucune étude épidémiologique n'a encore apporté la preuve que ce sont les flavonoïdes contenus dans les fruits, les légumes et les boissons comme le thé ou le vin rouge qui sont responsables de l'effet protecteur de ces aliments. A l'inverse, plusieurs études ont démontré que la consommation d'aliments riches en flavonoïdes est inversement corrélée au risque de développer des maladies cardio-vasculaires (**Pietta, 2000 ; Hollman, 2001**).

En raison de leur abondance dans les plantes consommées par l'homme et de leurs bénéfices potentiels pour la santé humaine, les flavonoïdes sont l'objet d'une attention croissante. Que ce soit pour l'étude des relations structure-activité, le contrôle de la qualité alimentaire ou le suivi de l'absorption et de la métabolisation de ces composés phénoliques naturels, il est nécessaire de disposer d'une méthode rapide et fiable d'analyse et d'identification de ces molécules dans les plantes et les systèmes biologiques.

1.2. Alcaloïdes:

Le nombre des produits décrits, leur diversité structurale et l'éventail de leurs activités pharmacologiques font des alcaloïdes l'un des groupes les plus importants de substances d'origine naturelle d'intérêt thérapeutique.

Le terme d'alcaloïde a été introduit par Meisner au début du ^{XIX} siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases, comme des *alcalis* (de l'arabe *al kaly*, la soude et du grec *eidos*, l'aspect). Il n'existe pas de définition simple et précise des alcaloïdes et il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes des autres métabolites azotés naturels. Les alcaloïdes sont généralement extraits de plantes et appartiennent à quatre familles botaniques *Papavéraceae*, *Papilionaceae*, *Renonculaceae* et *Solanaceae*. Les plantes dont sont issus les alcaloïdes les plus utilisés sont la belladone (atropine), le pavot (morphine) et la pervenche (**Bruneton, 1993**).

On peut donc dire qu'un alcaloïde est un composé organique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué, à faible dose, de propriétés pharmacologiques marquées (**Bruneton, 1999**).

1.2.1. Différents types d'alcaloïdes:

Les alcaloïdes vrais sont initialement définis comme des substances azotées, basiques, d'origine naturelle et de distribution restreinte, les alcaloïdes ont une structure complexe. Leur atome d'azote est inclus dans un système hétérocyclique et ils possèdent une activité pharmacologique significative; pour certains auteurs, ils sont issus du seul règne végétal. Ils existent à l'état de sel et l'on peut ajouter qu'ils sont biosynthétiquement formés à partir d'un acide aminé.

Les pseudoalcaloïdes présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais mais ne sont pas des dérivés des acides aminés, il s'agit dans la majorité des cas connus d'isoprénoïdes et l'on parle alors d'alcaloïdes terpéniques les monoterpéniques, diterpéniques (aconitine), sesquiterpéniques et également les substances azotées hétérocycliques issues du métabolisme de l'acétate (Coniine).

Les protoalcaloïdes sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique, ils ont une réaction basique et sont élaborés *in vivo* à partir d'acides aminés. Diverses substances répondent à cette définition : des amines simples (Sérotonine), mais aussi les bétaines et les bêta laïnes (Bétanine) (**Bruneton, 1999**).

1.22. Historique:

Si la notion d'alcaloïde est assez récente, la connaissance de la toxicité et des propriétés des plantes et des drogues à alcaloïdes est très ancienne : opium, coca, aconit, belladone, colchique, aussi bien que quinquina, ipéca ou curares sont employés depuis plusieurs siècles voire pour certains depuis plusieurs millénaires. C'est vraisemblablement **Derosne** qui, en 1803, extrayant un mélange de narcotine et de morphine de l'opium, fut le premier à isoler un alcali végétal. En **1806, Serturner** reconnaît la nature alcaline du principe somnifère de l'opium, principe qu'il dénommera morphine une dizaine d'années plus tard. Peu après, deux pharmaciens français, Pelletier et Caventou, découvrent une impressionnante série de composés actifs : entre 1817 et 1820 caféine mais aussi émétine de l'ipéca, strychnine de la noix vomique, quinine et cinchonine de l'écorce de quinquina seront isolées. Un peu plus tard il en sera de même pour la conine. Les chimistes tentent très tôt d'élucider la structure de ces molécules : ils y parviendront dans les cas les plus simples (coniine, Schiff, 1870), mais pour d'autres il faudra attendre la seconde moitié du ^{XX^e} siècle : l'édifice polycyclique de la strychnine a résisté près de 130 ans aux investigations des chimistes. Aujourd'hui les techniques avancées de résonance magnétique nucléaire (R.M.N.) et la spectrométrie de diffraction des rayons X permettent de venir à bout des structures les plus complexes. La synthèse de ces composés a également constitué très tôt un défi pour les chimistes de la synthèse de la coniine à la fin du ^{XIX^e} siècle à celle de la morphine (1952). L'isolement, au début des années cinquante, de la réserpine et le succès thérapeutique de celle-ci ont incité les phytochimistes à explorer systématiquement ce vaste domaine des alcaloïdes : le nombre des structures décrites ne cesse de progresser et les données structurales, biosynthétiques, synthétiques ou pharmacologiques sont maintenant tout à fait considérables (**Bruneton, 1999**).

1.2.3. Distribution dans le règne végétal:

Les alcaloïdes, sont exceptionnels chez les bactéries, assez rare chez les champignons et les ptéridophytes sont rarement alcaloïdifières et la même remarque s'applique aux Gymnospermes. Les alcaloïdes sont donc des composés essentiellement présents chez les Angiospermes, certains auteurs estiment que 10 à 15 % d'entre elles synthétisent des alcaloïdes. Certaines familles (Mono et Dicotylédones) ont une tendance marquée à élaborer des alcaloïdes, chez ces familles certains genres contiennent des alcaloïdes, d'autres en sont dépourvues. Certains alcaloïdes existent dans • plusieurs genres appartenant à des familles différentes, parfois très éloignées taxonomiquement (caféine), le plus souvent assez proche (réticuline, yohimbine). D'autres sont caractéristiques d'un nombre limité de genres à l'intérieur d'une famille (hyoscyamine) ou d'un groupe d'espèces à l'intérieur d'un genre (thébaïne) ; certains sont étroitement spécifiques (morphine). La teneur en alcaloïdes varie dans de larges limites de quelques ppm comme dans le cas des alcaloïdes antitumoraux de la pervenche de Madagascar (*Catharanthus roseus*) à plus de 15 % pour les écorces de tronc du quinquina (*Cinchona ledgeriana*). Les plantes à alcaloïdes ne renferment que très rarement un seul alcaloïde certes, elles peuvent parfois contenir un composé très majoritaire mais le plus souvent, elles livrent un mélange complexe, éventuellement dominé par un composé majoritaire. Il n'est pas rare que plusieurs dizaines d'alcaloïdes soient présents dans une même drogue (presque une centaine chez la pervenche de Madagascar (**Figure 1.14.**)). En règle générale tous les alcaloïdes d'une même plante ont une origine T biogénétique commune, même si leurs structures peuvent paraître assez différentes. Pour une plante donnée, la teneur en alcaloïdes peut être très inégale selon les organes, certains pouvant en être dépourvus. On remarquera des variations qualitatives fréquentes il n'est pas rare que les différents organes d'une plante renferment des alcaloïdes dissemblables (**Croteau et al., 2000**).

1.2.4. Localisation et rôle:

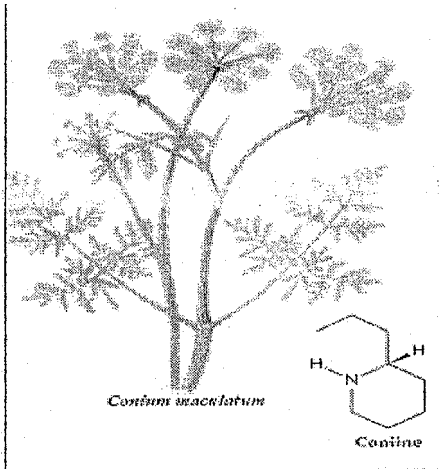
Chez le végétal, les alcaloïdes existent sous la forme, soluble, de sels (citrates, malates, tartrates, méconates, isobutyrate, henzoates ...) ou sous celle d'une combinaison avec les tannins. La microchimie permet de montrer que les alcaloïdes sont le plus souvent localisés dans les tissus périphériques : assises externes des écorces de tige et de racine, téguments des graines... La basicité et les actions antimétabolites de la plupart de ces molécules imposent leur compartimentation : elles sont

normalement stockées dans les vacuoles cellulaires. Le plus souvent la synthèse de ces alcaloïdes s'effectue au niveau de sites précis comme les racines en croissance ou les chloroplastes ; ils sont ensuite transportés dans leur site de stockage.

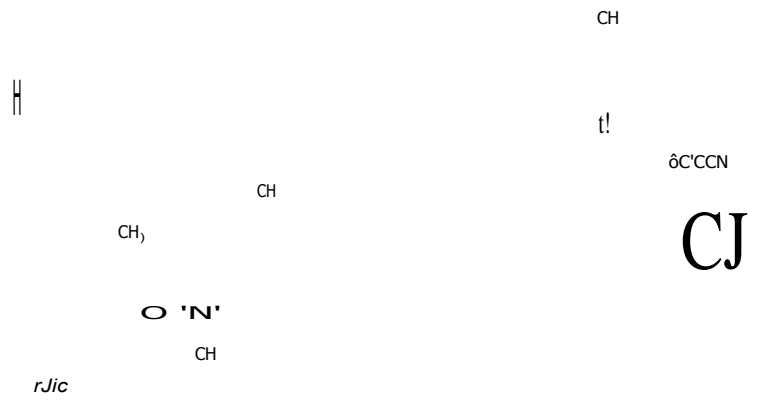
Comme beaucoup d'autres métabolites secondaires, on ne sait pratiquement rien du rôle des alcaloïdes dans les végétaux. Certains pourraient intervenir dans les relations plantes-prédateurs en protégeant les premières contre l'agression des seconds : si l'on admet que la diversité structurale est le reflet d'une adaptation constante, cette hypothèse s'en trouve confortée. Si certains auteurs estiment que ce sont des métabolites terminaux, des déchets inutilisables, c'est très peu probable : dans plusieurs cas il a été montré qu'ils se comportent comme des métabolites intermédiaires. Substance de réserve ? Régulation de croissance ? La question reste sans réponse (**Croteau et al., 2000**).

1.2.5. Propriétés physico-chimiques:

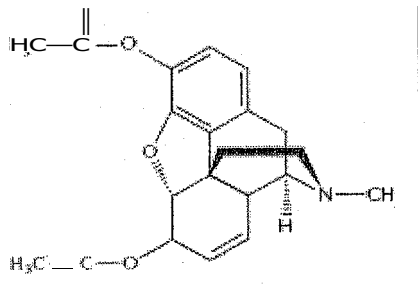
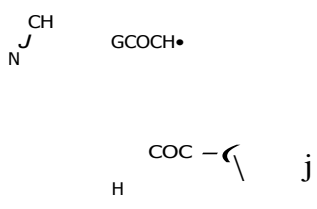
Les alcaloïdes ont des PM variant de 100 à 900 Da. En règle générale, les alcaloïdes bases sont insolubles ou très peu solubles dans l'eau, solubles dans les solvants organiques apolaires ou peu polaires. La basicité des alcaloïdes est très variable, cette propriété étant étroitement fonction de la disponibilité du doublet libre de l'azote. Elle permet de former des sels avec des acides minéraux (chlorhydrates, sulfates, nitrates...) ou organiques (tartrates, sulfamates, maléates ...). Les sels d'alcaloïdes sont généralement solubles dans l'eau et les alcools dilués, ils sont insolubles dans les solvants organiques. Les sels cristallisés se conservent plutôt bien, ils constituent la forme commerciale de ces molécules (**Bruneton, 1993**).



f



L
t



R

Hernin

ian

L

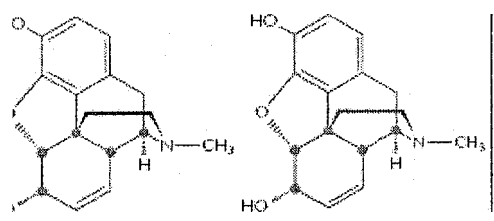


Figure 1.14. Structures et espèces végétales associées aux différents alcaloïdes (Croteau et al., 2000).

1.2.6. Biosynthèse:

La biosynthèse des alcaloïdes est très complexe de part leurs variations structurales justifiées par des oxydations allyliques, des estérifications, des etherifications, des couplages oxydatifs, des oxydations des noyaux aromatiques, et elle ne saurait être traitée en termes généraux. Notons simplement ici que le précurseur pour la synthèse des alcaloïdes vrais est un acide aminé tel que l'ornithine, la lysine, la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane, l'histidine, l'acide anthranilique... La formation du système hétérocyclique passe généralement par un processus inter- ou intramoléculaire simple : formation d'une base de **Schiff** ou, fréquemment, réaction de **Mannich**. On remarquera que la formation d'un alcaloïde peut nécessiter l'intervention d'une seule molécule d'acide aminé (hygrine, cathine), de deux molécules d'un même acide aminé (quinolizidines), plus rarement de deux acides aminés différents (tubulosine) – ou de plusieurs molécules du même acide aminé (spartéine). Quand la molécule comporte des carbones supplémentaires, ils sont apportés par des éléments impliqués dans d'autres métabolismes comme l'acétate pour les tropanes ou le diméthylallylpyrophosphate pour les ergolines et furoquinoléines (**Bruneton., 1993**).

1.2.7 Activités biologiques:

Les alcaloïdes sont des substances particulièrement intéressantes pour leurs activités surtout pharmacologiques qu'exercent dans les domaines les plus variés:

- sous forme de dépresseurs (morphine, scopolamine...) ou de stimulants (caféine, strychnine...) au niveau du système nerveux central;
- sous forme sympathomimétiques (éphédrine), ou sympatholytiques (yohimbine), ou parasympathomimétiques (ésérine, pilocarpine), ou anticholinergiques (atropine), ou ganglioplégiques (spartéine, nicotine...).

On notera aussi l'existence de curarisants, d'anesthésiques locaux (cocaïne), d'antifibrillants (quinidine), d'antitumoraux, (vinblastine, ellipticine ...), d'antipaludiques (quinine) et d'amoebicides (émétine)... Ces différentes activités conduisent à une utilisation accrue des drogues à alcaloïdes. Si certaines ne sont employées que sous la forme de préparations galéniques (belladone), beaucoup ne sont que des

matières premières pour l'extraction industrielle des alcaloïdes qu'elles renferment comme la morphine, la scopolamine et la quinine. Une partie des alcaloïdes extraits peut être transformée : la codéine par méthylation de la morphine et la quinidine par conversion de la quinine (**Crotean et al., 2000**).

1.3. Inhibiteurs de trypsine:

L'activité protéolytique a été mesurée comme la capacité à hydrolyser les protéines d'origine animale (caséine ou hémoglobine) et végétale (globine) se produisant dans un organisme. La découverte de substances inhibant la protéolyse de la trypsine remonte au début du siècle. En effet, c'est en 1917 que **Osborne** et **Mendel** observent, que des rats nourris avec un régime incorporant de la farine de soja autoclavée ont une meilleure croissance que ceux dont le régime comportait de la farine de soja cru.

En 1936 Kunitz et **Northrop** procédèrent, pour la première fois à l'isolement dans le pancréas de bovins la substance responsable de l'inactivation de la trypsine sous la forme d'un polypeptide cristallisé auquel on a attribué le nom d'inhibiteur de **Kunitz**. Les inhibiteurs protéiques identifiés sont des protéases à sérine, cystéine, métallo ou aspartyl (**Ramasarma et al., 1994**). Ils appartiennent à deux groupes d'inhibiteurs : inhibiteur de **Kunitz** et celui de **Bowman-Birk** (**Kunitz, 1945 ; Birk et al., 1963**).

Les inhibiteurs de trypsines largement distribués dans la nature, se présentent dans une large variété de constituants végétaux et animaux du régime alimentaire humain. Ces inhibiteurs, on les trouve dans les graines, les feuilles, les racines, les tubercules et même dans les tissus végétatifs des légumes, des légumineuses, *Solanaceae* et *Graminaceae*. Cependant leur qualité, leur thermorésistance et leurs propriétés physico-chimiques sont différentes d'une plante à une autre (**Arabe et Sohonie, 1956 ; Ryan, 1973 ; Walker-Simmons et Ryan, 1977 ; Humphries, 1980 ; Menegatti et al., 1985 ; Broadway, 1989**).

Parmi les substances anti nutritionnelles, on considère les inhibiteurs de trypsines comme étant ceux qui sont le plus largement distribués dans le règne végétal. En outre, leur importance quantitative ainsi que leurs effets ont attiré l'attention des scientifiques, plus particulièrement, ces inhibiteurs de trypsines qui

participent entre 30 à 60 % dans la diminution de la croissance et presque à la totalité de la réponse hypertrophique du pancréas (**Rackis, 1974**).

Les inhibiteurs de trypsines sont placés parmi les substances antiprotéinogénétiques, c'est-à-dire parmi les substances qui inhibent l'utilisation métabolique des protéines. Parmi ces substances on peut aussi inclure les tannins, surtout les formes les plus condensées, car ceux sont celles qui exercent une puissante inhibition sur la trypsine (Kossa, 1974), du fait, de la nature polyphénolique des tannins et de la connaissance que plusieurs polyphénols peuvent former des complexes avec les protéines et donc inhiber l'action des enzymes (**Pridham, 1963 ; Davies, 1981 ; Tan et al., 1983**). D'autres substances antinutritionnelles comme les hémagglutinines, les phytates et certains glucosides fermentescibles, n'ayant pas d'effet inhibiteur sur les protéines mais ayant pour résultat un ralentissement de la croissance.

1.3.1. Rôles des inhibiteurs de trypsines:

Ils peuvent intervenir dans:

- la régulation du métabolisme protéique des tissus végétaux jeunes en croissance (**Ambe et Sohonie, 1956**),
- la protection de l'embryon puisqu'ils sont situés essentiellement dans les couches périphériques de la graine et opposent ainsi une barrière à toute tentative de protéolyse enzymatique (**Birk et al., 1963**),
- la défense chimique des plantes contre les herbivores, la blessure mécanique des feuilles, la pathogénie et le stress biologique des plantes (**Green et Ryan, 1972 et 1973 ; Steffens et al., 1978 ; Rosenthal et Janzen, 1979 ; Ross et Delting, 1983 ; Brown et Ryan, 1984 ; Kraemer et al., 1987 ; Ramsarma et al., 1994**). Cependant, si ces inhibiteurs sont des agents de défense chimique, ils doivent être présents au site d'attaque à des concentrations efficaces. Ainsi il est important de déterminer la phénologie de ces inhibiteurs chez la plante, leur activité et le mécanisme qui régule leur synthèse (**Broadway et Missurelli, 1990**),

- la qualité nutritionnelle des plantes, en vertu de leur teneur relativement élevée en acides aminés indispensables surtout en cystéine par rapport à quelques protéines foliaires (**Tan-Wilson et al., 1987**),
- les traitements chemopreventifs des cancers puisqu'il a été reconnu qu'ils ont une forte activité anticarcinogène que se soit *in vivo* ou *in vitro* (**Birk, 1976**),
- les études relatives à la compréhension des maladies auto immunes et Alzheimer (**Brown, 1992**).

1.3.2. Propriétés et structure:

a- Propriétés: **Kunitz** en 1947 a été le premier à montrer que l'inhibition de la trypsine par un inhibiteur cristallisé, isolé du soja, était directement proportionnelle à la quantité d'inhibiteur ajouté et que l'inhibiteur neutralisé approximativement un poids égal de trypsine cristallisée.

En 1971 **Zelter** a pu montrer dans le tourteau de soja que les inhibiteurs de trypsines, très résistants à l'action de la pepsine, réduisent le taux et la vitesse de libération de certains acides aminés indispensables, notamment la méthionine, qui est un facteur limitant de la qualité des protéines de la plupart des végétaux.

La forte diminution de la croissance chez l'animal, résultant de l'ingestion de graines ou de tourteau de soja cru, paraît en partie liée à la présence dans le contenu intestinal d'une importante fraction protéique soluble (inhibiteur de trypsine) mais précipitable à l'acide trichloroacétique et résistante à l'action des enzymes. Cette accumulation de protéines solubilisées résulterait d'un accroissement des dépenses endogènes.

b- Structure et composition: la structure tridimensionnelle par cristallographie aux rayons X de quelques inhibiteurs de trypsines de type Bowman-Birk à aider à comprendre la relation *structure-fonction* de ces inhibiteurs.

Les inhibiteurs de trypsines sont généralement des polypeptides ou des protéines à faible poids moléculaire (PM compris entre 4 et 80 KDa). Ils possèdent une ou plusieurs liaisons disulfures

permettant leur stabilité contre la dénaturation thermique, les attaques protéolytiques et le pi-I (**Menegatti et al., 1985**).

En effet, les liaisons ou ponts disulfures (S-S) stabilisent les conformations natives des protéines. Le clivage des liaisons disulfures peut rendre les inhibiteurs de trypsines plus susceptibles aux différentes dénaturations chimiques et physiques. Il a été constaté que les inhibiteurs de trypsines étaient de deux types principaux ceux d'un poids moléculaire compris entre 20 et 25 KDa, portant deux liaisons disulfures et ayant une activité spécifique sur la trypsine, appelés inhibiteurs de **Kunitz**, et ceux d'un poids moléculaire plus faible compris entre 5 et 10 KDa, présentant sept liaisons disulfures, une faible teneur en acides aminés aromatiques et exerçant une action inhibitrice à la fois sur la trypsine et la chymotrypsine, appelés inhibiteurs de **Bowman-Birk (Ramasarma et al., 1994)**. De nombreux inhibiteurs de trypsines, correspondants aux deux types cités ci-dessus, ont été trouvés chez de nombreuses plantes. Cependant jusqu'à présent, il n'est pas encore possible d'apprécier totalement l'importance de ces inhibiteurs de trypsines dans l'alimentation humaine (**Brown et Ryan, 1984 Broadway, 1989**).

Il existe deux formes de trypsine humaine, une trypsine majeure et une trypsine mineure (10 à 20 % de l'activité). Alors que la trypsine mineure est totalement inhibée par l'inhibiteur, l'autre ne l'est que faiblement (**Liener, 1979**).

La composition en acides aminés de l'inhibiteur de trypsine du haricot (*Phaseolus vulgaris*) et de celui de la luzerne (*Medicago sativa*) est importante dans la mesure qu'elle fait ressortir dans les deux cas l'absence de tryptophane, la présence de teneurs particulièrement importantes de cystéine. L'absence de 7 groupes sulfhydryles libres indiquant probablement que tous les résidus de cystéine participent à la constitution des ponts disulfures pour former la molécule protéique de l'inhibiteur, donnant une structure compacte qui doit demeurer intacte pour que la combinaison inhibiteur-trypsine puisse avoir lieu. **Porath et Bellew (1975)** ont extrait l'inhibiteur de trypsine du pois chiche (*Cicer arietinum*) avec 22 % de résidus cystine et un PM de 10 KDa. L'inhibiteur de trypsine de la moutarde blanche (*Sinapis alba*) est une protéine de 18 KDa et possédant 142 résidus d'acides aminés avec des teneurs T relativement élevées de résidus sérine, lysine, glycine et acide aspartique (**Menegatti et al., 1985**).

Celui de *Dolichos biflorus* a un PM de 15.5 KDa et contient 2 résidus tyrosine, 2 résidus phénylalanine, 7 ponts disulfures mais pas de tryptophane (**Ramasarma et Rajagopal, 1991**).

1.3.3. Effets antinutritionnels:

Plusieurs travaux en bibliographie ont été réalisés sur la caractérisation des inhibiteurs de trypsines ainsi que leurs effets biologiques et physiologiques chez l'homme et l'animal (**Charpentier et Lemmel, 1984**).

L'utilisation des régimes alimentaires riches en protéines à base de soja sont inefficaces à cause de la présence des substances antinutritionnelles qui entraînent des effets physiologiques nuisibles chez la plupart des espèces animales. Les inhibiteurs protéiques du soja ont fait l'objet de nombreuses études en bibliographie (**Rackis, 1965; Odani et Ikenaka, 1972; Blow et al., 1974 ; Kakade et al., 1974; Steffens et al., 1978 ; Satterlee et al., 1979 ; Collins et Beaty, 1980 ; Krogdahl et Hoim, 1981 Soestrino et al., 1982; Struthers et al., 1982 ; Kwok et al., 1993**).

à- Mécanisme d'interaction avec la trypsine et répercussions nutritionnelles: c'est à **Laskowski (1966)** que l'on doit l'explication du mécanisme de l'interaction de la trypsine et de l'inhibiteur de Kunitz. Ils indiquent que la première étape de l'interaction implique un clivage spécifique de la liaison arginine-isoleucine qui se trouve dans l'espace d'un pont disulfure de l'inhibiteur. Cet inhibiteur modifié est encore actif mais l'éloignement du résidu C-terminal, par traitement chimique qui coupe les ponts disulfures, donne deux dérivés inactifs. La nature du complexe trypsine - inhibiteur n'est pas définitive, mais on pense qu'elle doit impliquer la formation d'un pont ester entre le site actif sérine de la trypsine et le carbone terminal du résidu arginine de l'inhibiteur. La présence des inhibiteurs de trypsines à l'état natif dans les aliments provoque chez les animaux un retard de croissance, une hypertrophie du pancréas et une carence anormalement élevée en acides aminés soufrés (**Liener, 1980**).

b- Effets biologiques et physiologiques: **Liener (1980)** a signalé que les substances antiprotéasiques abaissent le taux et la vitesse de libération de certains acides aminés essentiels. Elles influencent la disponibilité de la méthionine (facteur limitant des produits végétaux) et stimulent la fonction exocrine du pancréas, d'où l'hypertrophie observée chez certaines espèces monogastriques et chez le poulet

(**Struthers et al., 1982**). Chez le poulet l'hypertrophie du pancréas serait surtout due à une hyperplasie (**Kakacle et al., 1969**). Cependant d'autres études montrent que les inhibiteurs protéiques n'ont aucun effet pancréatique sur le chien, le veau, le porc et le singe (**Kakade et al., 1976**). Ainsi comme le fait remarquer **Besançon (1978)** les inhibiteurs de protéase ne seraient pas les seuls responsables de l'hypertrophie pancréatique. Selon **Kakade et al (1974)**, les inhibiteurs de trypsines participaient à un taux de 40% dans les troubles de croissance et dans la réponse hypertrophique du pancréas. Ce taux peut varier entre 30 et 40% selon **Rackis (1974)**. Les effets de ces composés ne sont pas toujours connus avec précision, plus particulièrement chez l'homme. Le plus souvent, les données disponibles concernent l'alimentation animale et on observe généralement des différences notables entre les espèces. En outre, il est important d'estimer les risques d'actions toxiques ou indésirables de ces substances en fonction des quantités ingérées.

RE

Les antioxydants dans les légumes

1. Introduction:

La connaissance des activités biologiques et des constituants chimiques des plantes commence par l'identification très précise du matériel végétal suivie d'une recherche chimique approfondie concernant la détermination de structures des différents constituants. Depuis de nombreuses années l'un des soucis majeurs de l'homme est porté sur son vieillissement et sa santé. Les spécialistes de la santé promulguent une hygiène de vie à suivre afin de protéger son corps contre les agressions extérieures qu'il rencontre incessamment. L'oxygène, notre principale source de vie, peut devenir notre principal ennemi. En effet celui-ci provoque un phénomène d'oxydation, processus qui est impliqué dans le vieillissement de nos cellules et dans certaines maladies comme les maladies cardiovasculaires ou certains cancers. La nature est dotée de composés très utiles à notre bien être, c'est le cas des antioxydants. Présent en grande quantité dans les fruits et les légumes essentiellement, ils nous permettent de ralentir un temps soit peu la dégénérescence de nos cellules. Appelés également anti-radicaux libres, ils s'opposent à la formation de radicaux libres issus de l'oxydation due au dioxygène et acquiert donc une activité protectrice de notre organisme.

2. Le stress oxydatif et les radicaux libres:

Il correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire (**Morel et Barouki, 1999**). D'une autre manière c'est une situation de dommage causé par les radicaux libres lors de l'oxydation comme une dégénérescence cellulaire (vieillesse) ou une tumeur (la plupart du temps cancéreuse). Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques car ils sont utiles pour l'organisme à dose raisonnable. Cette production physiologique est parfaitement maîtrisée par des systèmes de défense. Dans les circonstances normales, on dit que la balance antioxydants / prooxydants est en équilibre. Si tel n'est pas le cas, que ce soit par déficit en antioxydants ou par suite d'une surproduction énorme de radicaux, l'excès de ces radicaux est appelé «stress oxydant» (**Favier, 2003**).

Ces radicaux libres peuvent réagir avec certaines molécules qui circulent aux alentours. Ils n'attendent qu'une seule chose, c'est de devenir stable en se liant à d'autres molécules stables soit en leur volant un électron soit en leur donnant leur électron. La molécule atteinte devient à son tour un radical libre. Par

cette suite de « réaction en chaîne » s'en suit l'apparition d'un grand nombre de radicaux libres qui peuvent interagir avec des molécules primordiales comme l'ADN ou les membranes cellulaires.

2.1. Les radicaux libres:

Un radical libre est une molécule ou un atome ayant un ou plusieurs électrons non appariés, ce qui le rend extrêmement réactif (**Vansant, 2004**). L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène (**Figure 1.15.**). Ils apparaissent soit au moment d'une fission homolytique où chaque atome garde l'électron qu'il a mis en commun dans une liaison covalente soit au cours de réaction d'oxydoréduction avec des composés non radicalaire. L'appellation dérivés réactifs de l'oxygène " n'est pas restrictive. Elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit, mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante tel le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et le peroxydinitrite (ONOO⁻) (**Novelli, 1997**).

2.2. Principaux radicaux libres:

- L'anion superoxyde : c'est un anion qui intervient comme facteur oxydant dans de nombreuses réactions. La molécule d'oxygène, mise en présence d'une quantité d'énergie suffisante, peut acquérir un électron supplémentaire et former ainsi l'anion superoxyde selon la réaction:



- Le radical hydroxyle : OH[•]. Il est très réactif vis-à-vis des structures organiques et joue un rôle initiateur dans l'auto oxydation lipidique.
- Le radical peroxyde: ROO[•].
- L'oxygène singulet : ¹O₂, forme «excitée» de l'oxygène moléculaire, est souvent assimilé à un radical libre en raison de sa forte réactivité. (**Hadi, 2004**).

2.3. Origine et des radicaux libres:

Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire les bactéries à l'intérieur des cellules immunitaires (macrophages, polynucléaires), d'inactiver les virus ou pour réguler

des fonctions cellulaires létales comme l'apoptose (Favier, 2003). La production de radicaux libres par le système immunitaire constitue un outil de protection puissant, mais se révèle dangereuse si elle est non maîtrisée.

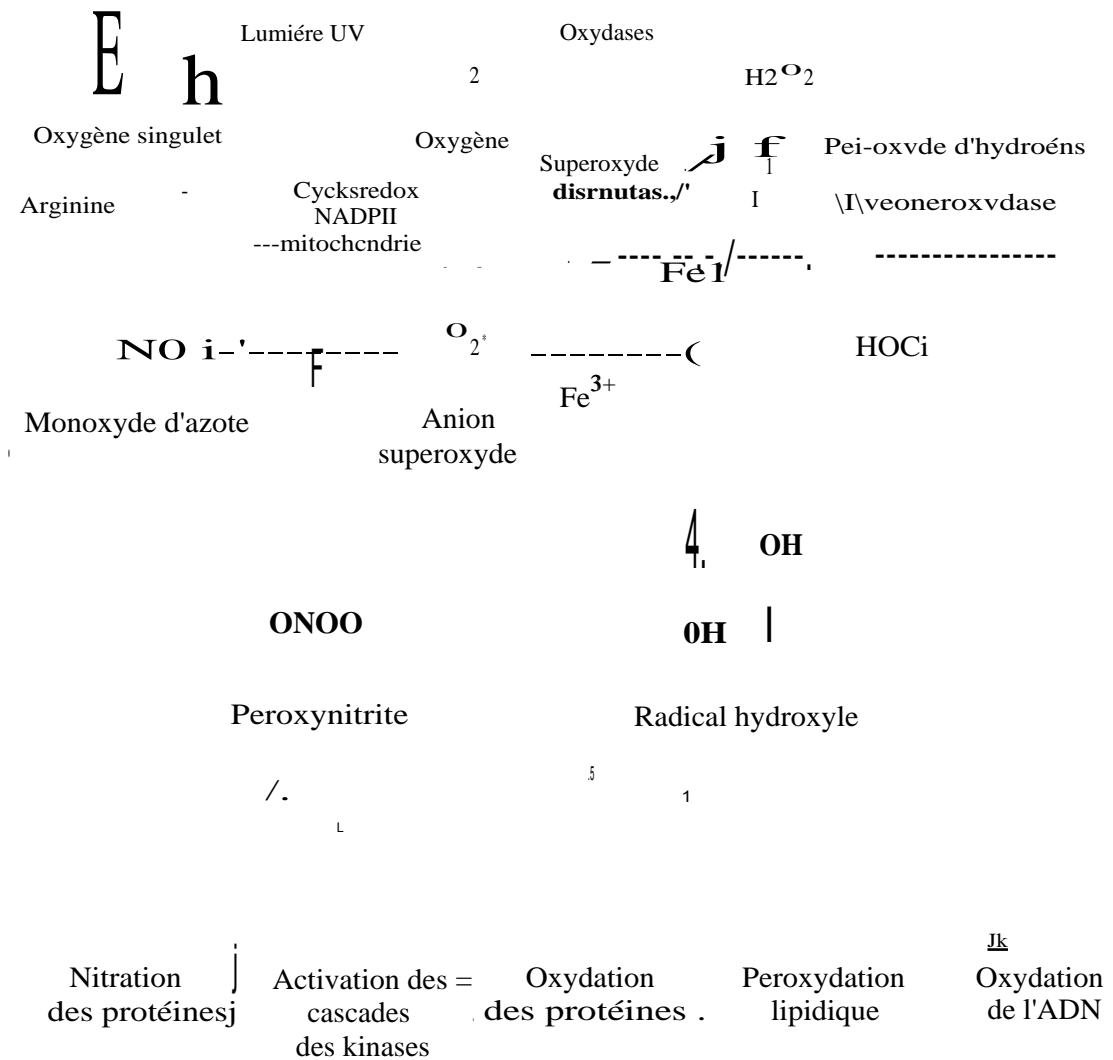


Figure 1.15. Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqué en biologie (Favier, 2003).

(Hadi, 2004). Ils inhibent la sécrétion d'insuline **(Krippeit-Drews et al., 1994)**, modifient les structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines **(Pincemail et al., 1999)**.

Par ailleurs, le glucose peut s'oxyder dans des conditions physiologiques, en présence de traces métalliques, en libérant des cétoaldéhydes, H₂O₂ et OH, qui entraîneront la coupure de protéines ou leur glycation par attachement du cétoaldéhyde. Ce phénomène de glycosoxydation est très important chez les diabétiques et contribue à la fragilité de leurs parois vasculaires et de leur rétine **(Favier, 2003)**.

Le stress oxydant, principale cause initiale de plusieurs maladies : cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, le diabète, la maladie d'Alzheimer (MA), les rhumatismes et les maladies cardiovasculaires (MCV) **(Favier, 2003)**, maladie de Parkinson, les inflammations gastro-intestinale, ulcères **(Atawodi, 2005)**, les oedèmes et vieillissement prématuré de la peau **(Georgetti et al., 2003)**.

3. Les antioxydants:

Un antioxydant est défini comme étant toute substance qui peut retarder ou empêcher l'oxydation des substrats biologiques **(Boyd et al., 2003)**, se sont des composés qui réagissent avec les radicaux libres et les rendent ainsi inoffensifs **(Vansant, 2004)**

La raison pour laquelle les antioxydants sont importants vient du fait que l'oxygène est un élément potentiellement toxique puisqu'il peut être transformé en formes plus réactives telles que le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyle, collectivement connu sous le nom d'oxygène actif **(Boyd et al., 2003)**. Certains antioxydants agissent en formant des produits finis non radicaux, d'autres en interrompant la réaction en chaîne de peroxydation, en réagissant rapidement avec un radical d'acide gras avant que celui-ci ne puisse réagir avec un nouvel acide gras, tandis que d'autres antioxydants absorbent l'énergie excédentaire de l'oxygène singulet pour la transformer en chaleur. D'une manière générale, un antioxydant peut empêcher l'oxydation d'un autre substrat en s'oxydant lui-même plus rapidement que celui-ci. En même temps, les antioxydants arrêtent la

réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable (Vansant, 2004).

D'un point de vue biologique les composés antioxydants peuvent protéger les systèmes cellulaires des effets des processus potentiellement nocifs qui causent l'oxydation excessive (Hale, 2003). On peut citer deux types d'antioxydants:

3.1. Les antioxydants endogènes:

Les antioxydants endogènes sont composés de système de défense primaire et secondaire:

- Un système de défense primaire : composé d'enzymes et de substances antioxydantes, telles que la superoxyde dismutase (SOD) qui diminue la durée de vie de l'anion superoxyde O_2^- , la catalase qui transforme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en simple molécule d'eau, la glutathion peroxydase (GPx) qui détruit le peroxyde d'hydrogène et les peroxydes lipidiques et les molécules piègeurs comme le glutathion (GSH), l'acide urique, les protéines à groupement thiols, ubiquinone,
- Un système de défense secondaire : composé d'enzymes protéolytiques, des phospholipases, des ADN endonuclease et ligase et des macroxyprotéinases (Pincemail et al., 1999).

3.2. Les antioxydants naturels:

Plusieurs substances peuvent agir en tant qu'antioxydants in vivo. Elles incluent le bêta carotène, l'albumine, l'acide urique, les oestrogènes, les polyamines, les flavonoïdes, l'acide ascorbique, les composés phénoliques, la vitamine E... Elles peuvent stabiliser les membranes en diminuant leur perméabilité et elles ont également une capacité de lier les acides gras libres (Svoboda et Hampson, 1999).

La vitamine E (Figure 1.16.) est un antioxydant important qui protège les cellules contre les dommages associés aux radicaux libres et par conséquent, prolonge la vie cellulaire tout en ralentissant le processus de vieillissement (Maydani, 2000a) et la diminution de l'athérosclérose (Maydani, 2000b). La vitamine E joue un rôle important dans l'agrégation de la f3-amyloïde (Af3), d'ailleurs les

données cliniques ont prouvé que les patients d'Alzheimer obtiennent des avantages remarquables au traitement par la vitamine E (**Pieroni et al., 2002**).

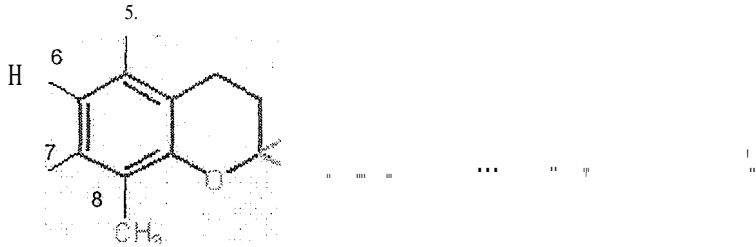


Figure 1.16. Formule brute de a tocophérol ou vitamine E (5-7-8 triméthyl tocol) (Maydani, 2000a).

Il a été déterminé que la vitamine E naturelle, semble être deux fois plus biodisponible que la vitamine E synthétique (**Burton et al., 1998**). La vitamine E est rencontrée surtout dans les huiles végétales, les noix et les germes de diverses graines (**Vansant, 2004**).

Les Caroténoïdes sont une classe de composés phytochimiques très importante, trouvés dans les légumes et fruits, également dans le lait, empêchent les dommages génétiques, protègent contre les dommages oxydants en augmentant le métabolisme de désintoxication, empêchent l'expression des oncogènes, augmentent l'activité de communication des gap junctions. Les exemples de caroténoïdes, incluent l'alpha carotène, bêta carotène (**Figure 1.17.**), lycopène, phytofluène, phytoène, lutéine, neoxanthine, viloxanthine, anthéroxanthine, alpha cryptoxanthine et bêta cryptoxanthine. Leur structure polyène leur permet d'absorber la lumière et de neutraliser l'oxygène singulet. Cette chaîne polyène, par mécanisme d'addition, permet l'incorporation des espèces réactives ou radicaux libres et de ce fait ralentir leur propagation. Les caroténoïdes sont impliqués dans la prévention de nombreux types de cancer ; cancer de la prostate ; cancer du poumon (**Hale, 2003**).

Figure 1.17. Formule brute du E1-carotène (Hale, 2003).

La vitamine C (Figure 1.18.) est largement répandue dans les fruits (Vansant, 2004), L'influence sur les dégâts protéiques a été examinée dans des études d'apports de suppléments, principalement sur des modèles de rats et il y a eu quelques essais chez l'homme. De façon intéressante, de supplémenter des volontaires sains pendant 5 semaines avec de la vitamine C n'a aucun effet. Cependant, après 10 et 15 semaines de traitement, les taux de carbonyles ont été significativement abaissés (Carty et al., 2000). Ceci suggère que les autres études, qui n'ont pas réussi à trouver une influence de l'apport de suppléments antioxydants, devraient être prolongées sur une plus longue durée. L'apport de suppléments de vitamine C prévient également des dégâts oxydatifs sur les protéines induits par la fumée de cigarettes (Panda et al., 1999).

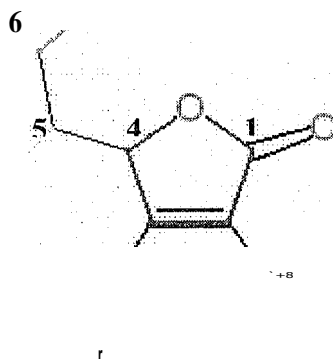


Figure I.18. Formule brute de 1 acide ascorbique ou vitamine C (Vansant, 2004).

7 Sa structure ressemble aux oses en C6. Cette molécule est très facilement oxydable et cette oxydation est réversible du au fait de la présence des deux fonctions alcools conjugué à la double liaison (Figure 1.19.). Elle peut facilement donner ses protons et donc se décharger de ses électrons mais elle peut aussi capter des électrons, un atout majeur pour stabiliser les radicaux libre comme le montre le schéma réactionnel ci-dessous:

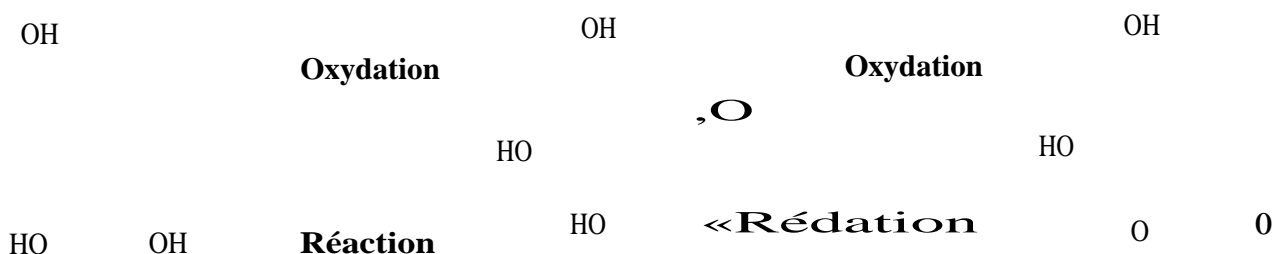


Figure I.19. Réaction d'oxydation et de réduction de l'acide ascorbique (Vansant, 2004).

n

n

L'acide ascorbique est la forme réduite instable, un radical libre appelé radical ascorbique composé avec deux fonctions cétones. Il redonne l'acide ascorbique par réduction

en perdant un électron ou un proton, il passe par une forme oxydée ascorbique qui peut facilement s'oxyder pour donner un radical. À la place des alcools appelés diols, on trouve l'acide déshydroascorbique, ou

La vitamine A est un composé huileux liposoluble et se trouve sous deux formes : le rétinol (**Figure 1.20.**) est métabolisé par des enzymes (l'estérase pancréatique et une estérase intestinale) en esters de rétinol qui sont déversés par la lymphe dans le système circulatoire.

jaune tout comme les tocophérols. Cette vitamine est métabolisée en une forme active directement utilisable par le corps. Les esters de rétinol qui sont déversés par la lymphe dans le système circulatoire

CH

Figure 1.20. Formule brute du rétinol ou vitamine A (Amiot et al., 2007).

L'autre forme de la vitamine A n'est pas utilisable directement. Son précurseur est le 13-carotène appelé également provitamine A (Voir ci-dessus). Du fait de la présence d'un grand nombre de double liaisons sur la chaîne isoprénique du rétinol, il est très facilement oxydable d'où son rôle d'antioxydant.

L'acide alpha-lipoïque (Figure 1.21.), lorsqu'il fut isolé il y a cinquante ans, l'acide alpha-lipoïque fut identifié comme vitamine. Il a depuis été reclassé comme antioxydant et peut piéger les radicaux libres aux niveaux intracellulaire et extracellulaire. Du fait qu'il est aussi bien liposoluble qu'hydrosoluble, il peut accéder à toutes les parties de nos cellules (**Packer, 1995**). L'acide lipoïque réduit la glycation et favorise le transfert du glucose sanguin aux cellules en stimulant l'activité insulinaire (**Kahler, 1993**).

Figure 1.21. Forme oxydée de l'acide alpha-lipoïque (Packer, 1995).

La prise de composés phénoliques (**fig cf. Chapitre II**) a été largement rapportée pour protéger contre le développement de maladies coronariennes. De nombreuses preuves existent montrant que les composés phénoliques peuvent prévenir l'oxydation des LDL (**Meyer et al., 1997**).

Des études en laboratoire présentées à une réunion de l'American Chemical Society en septembre 1997 ont démontré que le gallate d'épigallocatechine était 100 fois plus efficace que la vitamine C et 25 fois plus efficace que la vitamine E pour neutraliser les radicaux libres. La recherche semble indiquer que cette puissance antioxydante pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'immunité humaine. Dans le cadre d'études menées sur des animaux au Japon au début des années 1990, ont constaté que les polyphénols du thé vert augmentent l'activité des macrophages, des lymphocytes B, des lymphocytes T et des cellules tueuses naturelles. (**Ilegarty, 2000**). **Serafini et al. (2000)** ont trouvé qu'à la fois le thé noir et le thé vert étaient capables d'inhiber l'oxydation des LDL, **Mcanlis et al. (1998)** ont échoué à trouver un effet significatif.

Ohran et al. (1999) ont examiné plusieurs composés naturels et synthétiques sur des cataractes induites par du sélénite chez le rat, et ont montré que du dicloferae (60 %), de la vitamine C (58 %) et de la quercétine (40 %) sont protecteurs. Il semble que la capacité antioxydante d'un flavonoïde dépend de son affinité pour les radicaux libres et donc de sa structure la présence de deux hydroxyles en ortho sur le noyau B, la conjugaison du noyau B au groupe oxo en 4 via la double liaison en 2,3 sont des éléments favorables (**Bruneton, 1993**).

4.1. Fruits et légumes et maladies cardiovasculaires (MCV):

Les cardiopathies ischémiques et les accidents vasculaires cérébraux sont la principale cause de décès dans le monde. L'alimentation et les habitudes de vie ont un rôle important dans l'étiologie des MCV. Plusieurs nutriments comme les acides gras saturés, les acides gras *trans* et le sel affectent les niveaux des principaux facteurs de risque et la survenue des accidents vasculaires. Ces dernières décennies, la mise en évidence biologique de possibles effets protecteurs de nombreux constituants, notamment des antioxydants, a stimulé un intérêt particulier pour l'étude des propriétés des fruits et des légumes. A la fin des années 80, la cohérence des données expérimentales, cliniques et épidémiologiques qui montraient des effets favorables des fruits et légumes et de leurs composés sur l'athérosclérose a conduit les autorités de santé publique, à promouvoir la consommation de fruits et légumes de la population (**Committee on Diet and Health and National Research Council, 1989; National Cancer Institute, 2001; Ministère de la Santé et des Solidarités, 2006**).

De nombreux travaux suggèrent que les polyphénols des F&L participent à la prévention des maladies cardio-vasculaires. Leur consommation se traduit par une augmentation transitoire de la capacité antioxydante du plasma dans les heures qui suivent le repas. Parvenus au niveau des artères, ils préviennent l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL), qui est l'un des facteurs clé du processus physiopathologique de l'athérosclérose. En inhibant l'oxydation des LDLs, ils limitent leur incrustation dans les parois des artères qui contribuent à l'épaississement des parois et à réduire le flux de sang qui parvient au niveau des tissus. Les polyphénols agiraient aussi en inhibant l'agrégation plaquettaire impliquée dans le phénomène de thrombose qui peut conduire à l'occlusion des artères. Deux études cliniques récentes réalisées aux Etats-Unis et au Chili ont montré que les polyphénols améliorent le fonctionnement de l'endothélium. Ces cellules qui tapissent les parois des artères jouent un rôle clé dans l'homéostasie des artères et la prévention de l'athérosclérose. Les polyphénols en prévenant l'athérosclérose et les risques de thrombose limiteraient les risques d'infarctus du myocarde, ce que tend à confirmer les nombreuses études épidémiologiques déjà publiées (**Lin et al., 2001; Bazzano et al., 2002; Mozaffarian et al., 2003; Dauchet et al., 2004; Genkinger et al., 2004; Ness et al., 2005; Tucker et al., 2005**).

4.2. Fruits et légumes et cancers:

Les polyphénols des F&L seraient impliqués dans la prévention des cancers. Ajoutés au régime de divers animaux de laboratoire, ils limitent le développement de tumeurs induites expérimentalement par exposition à des agents carcinogènes, ils sont actifs contre de nombreux cancers (colon, estomac, foie, sein, prostate, poumon, peau, vessie ...) à tous les stades de la cancérogenèse. Au stade d'initiation, ils agissent comme agents bloquants en empêchant l'activation de procarcinogènes, en piégeant les mutagènes électrophiles ou en stimulant la réparation des ADNs mutés. Au stade de promotion et de progression, ils agissent comme agents suppresseurs de tumeurs. Les mécanismes impliqués peuvent là encore être très variés: prévention du stress oxydant, inhibition du métabolisme de l'acide arachidonique et des réactions inflammatoires associées, inhibition de la protéine kinase C et de la prolifération cellulaire, induction de l'apoptose, inhibition de l'angiogenèse. Les preuves de leurs effets chez l'homme restent cependant encore insuffisantes. Plusieurs méta-analyses ont été effectués concernant la relation entre la consommation des F&L et le risque de cancer (**Jansen et al., 2001; Giovannucci et al., 2003; Riboli et Norat, 2003; Etminan et al., 2004; Lunet et al., 2005; Willett, 2005; Pavia et al., 2006; Vainio et Weiderpass, 2006**). Les principales conclusions du panel d'experts sont:

- L'affaiblissement des arguments en faveur d'un effet protecteur des F&L par les résultats des études de cohorte conduites depuis le milieu des années 1990. Dans aucune relation entre F&L et cancer les arguments ne sont suffisants pour être jugés convaincants, seules des relations probables sont évoquées;

la diminution probable du risque des cancers de la bouche, du pharynx, du larynx, de l'oesophage et de l'estomac pour les F&L ; la diminution probable du risque de cancer du poumon pour les fruits seulement;

- la protection probable par les F&L à l'égard de la prise de poids du fait de leur faible densité énergétique ; l'augmentation convaincante par le surpoids/obésité du risque de cancer pour de nombreuses localisations : oesophage (adénocarcinome), pancréas, côlon-rectum, sein (en post ménopause), endomètre, rein;

- l'objectif de santé publique d'atteindre une consommation moyenne en population de 600 g/j de F&L
la recommandation pour les individus de consommer au moins 5 portions/j (au moins 400g/j) de F&L.

Presque tout les légumes utilisés traditionnellement dans la cuisine algérienne tels que le cardon, la mauve, le chou vert, etc... ne sont pas bien étudiés ni de point de vue composition chimique ni de point de vue estimation de leur valeur nutritionnelle. La plupart des travaux réalisés dans ce domaine en Algérie sont traités sur les légumineuses comme les haricots, les lentilles et les pois chiche (**Laumont, 1960 ; Antheim et al., 1975 ; Azout et al., 1978 ; Bencijama et Zeghonane, 1993 Hamadache et Ait-Abdellah, 1998; Amir et al., 2007**).

En général le problème de la composition chimique et la qualité protéique des légumes à feuilles est lié au problème de trouver une nouvelle source naturelle renouvelable pour combler le déficit en protéines dans l'alimentation causé par la démographie galopante (**Costes, 1981 ; Gastineau, 1981**). Il existe beaucoup d'étude sur la potentialité des différents organes des plantes pour les utilisés comme source alimentaire et fourrage (**Nagy et al., 1978; Carlsson, 1984; Gupta et Wag)e, 1988; Almazan et Begum, 1996 ; Vijayakumari et al., 1997; Almazan et al., 1997; Guil-Guerrero et al., 1998; Mosha et Gaga, 1999 ; Trichopoulou et al., 2000; Singh et al., 2001 ; Gupta et al., 2005 Dm1 et al., 2008**).

C'est dans ce but que nous avons choisi trois espèces de légumes très consommés en Algérie à savoir *Malva sylvestris* (mauve), *Cynara cardunculus* var. *cardunculus* (cardon) et *Brassica oleracea* var. *acephala* (chou vert). Afin d'étudier leur composition chimique, leur valeur nutritionnelle, la valeur biologique de leurs protéines et éventuellement identifier leurs métabolites secondaires tels que les polyphénols, les alcaloïdes et l'inhibiteur trypsique. Les caractéristiques botaniques et la valorisation de ces trois plantes sont toutes d'abord présentées, puis les protocoles opératoires de la composition chimique des trois légumes sont décrits. Enfin une étude comparative quantitative et qualitative de leur composition chimique est menée.

Chapitre I

Synthèse bibliographique :

Présentation des légumes étudiés

1. *Malva sylvestris* (mauve) (Figure 11.1):

1.1. Position systématique:

Parmi les classifications basées essentiellement sur des critères morphologiques et anatomiques, celle de Cronquist est la plus utilisée (Cronquist, 1988). En 1998, un groupe de chercheur élabore un nouveau système de classification basé sur des critères phylogénétiques. Il prend en compte tous les caractères héréditaires, depuis ce qui est visible (base des classifications traditionnelles) jusqu'aux séquences d'ADN, en passant par les protéines et les données de la paléontologie. Le séquençage de certaines parties du génome comme l'ADN des mitochondries ou l'ARN des ribosomes a permis au cours des dernières années de faire des progrès importants (Spichiger, 2000). Aujourd'hui, il s'agit de la classification la plus utilisée. Cependant cette classification a été révisée en 2003 (Password, 2003). Cela traduit les efforts faits en systématique pour tenir compte des dernières avancées en matière de biologie moléculaire. Dans notre travail, on s'est basé sur cette classification pour positionner nos trois espèces de légumes à savoir *Malva sylvestris*, *Cynara cardunculus* et *Brassica oleracea*.

Figure 11.1. a Mauve (*Malva sylvestris* L.).

En ce qui concerne la mauve:

Ordre. Malvales

Famille : Malvaceae

Genre : Malva

Malva sylvestris

1.2. Caractères botaniques et écologiques:

Appeler autrefois en latin *omnimorbia* en raison de ses propriétés adoucissantes pour les voies respiratoires utiles pour le traitement de nombre de symptômes. C'est une plante bisannuelle vivace, herbacée de la famille des *Malvaceae*. Elle a une racine pivotante et pulpeuse. Les feuilles sont pentalobées, crénelées et dentelées sur les bords à pétiole souvent plus court ressemblant un peu à celles du lierre avec une couleur vert foncée. La tige est étalée de 30 à 60 cm de long et le fruit est une capsule de graines réniformes avec un mode de dissémination barochore. La répartition des sexes des organes reproducteurs est hermaphrodite avec d'une part un type d'inflorescence racème de cymes unipares hélicoïdes et d'autre part un type de pollinisation entomogame et autogame (Quezel et Sauta, 1963 ; Greuter et al., 1989). Cette espèce se présente partout à l'état sauvage dans les prairies, les pâturages, les lisières des forêts et dans les clairières (Kolev, 1976 ; Ozenda, 1983). La mauve se développe dans les régions humides, par contre elle redoute la chaleur de l'été, en général elle se développe dans les climats tempérés et dans les terres de consistance moyenne légèrement argileuse avec un habitat de type friches vivaces xérophiles (Quezel et Sauta, 1963 ; Anonyme, 1977).

1.3. Travaux scientifiques antérieurs sur la mauve:

La mauve est une plante très connue dans la région du bassin méditerranéen, elle est consommée comme hors d'oeuvre, cuite avec des légumes et des olives. De point de vue thérapeutique, les principaux effets de la mauve sont émoullient et désinfectant. On l'utilise pour apaiser la toux et pour soigner les inflammations internes et externes comme les maux de gorge, aphtes, bronchite, enrrouement, et laryngite. Ses feuilles sont, utilisées surtout pour le mucilage (substance active de la plante) qu'elles contiennent, comme substance de base pour la fabrication des dentifrices, des acides et de la vitamine C. La mauve est employée aussi comme un excellent laxatif pour les enfants et comme un anti-poison en cas d'absorption d'acide ou de base (Quezel et Sauta, 1963 ; Kolev, 1976; Ozenda, 1983 ; Greuter et al., 1989). Il existe très peu d'étude phytochimique (voir même inexistante) réalisée sur la mauve, non seulement de point de vue estimation de sa valeur nutritionnelle et alimentaire et aussi de point de vue identification de ses métabolites secondaires avec éventuellement des essais d'utilisation thérapeutiques. 'Pour cette raison nous l'avons choisi comme matériel biologique de ce modeste travail.

2. *Gynara cardunculus* (cardon) (Figure 11.2.):

TT

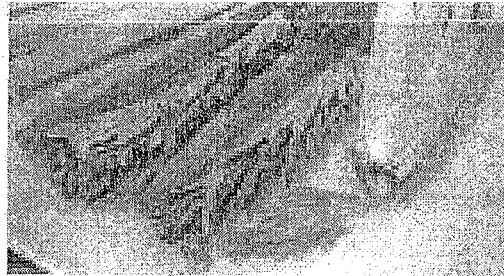


Figure II.2. Photographie du Cardon (*Cynara cardunculus*).

2.1. Position systématique

Ordre : *Asterales*

Famille *Asteraceae*

Genre: *Cynara*

Cynara cardunculus

2.2. Caractères botaniques et écologiques:

Le terme «cardon» a été emprunté au provençal, du latin *cardo -onis*, chardon. C'est une forme très voisine de l'artichaut, qui fut parfois classé dans une espèce différente (*Cynara scolymus*), mais qui est désormais considéré comme une forme de *Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*. On dit même que du genre *Cynara* on connaît deux espèces la cardurculus (cardon) et la scolymus (artichaut). Certains botanistes prétendent que c'est un croisement des deux espèces qui a produit l'artichaut alors que d'autres parlent de domestication (Koubaa et Damak, 2003).

Sans aucun doute on peut affirmer que le cardon est originaire du bassin méditerranéen : Afrique du nord (du Maroc à la Libye), Europe méridionale (de la Grèce au Portugal) et Asie mineure (Turquie et Chypre).

Le cardon est une plante herbacée bisannuelle de la famille des Astéracées, cultivée comme plante potagère pour ses «côtes» charnues (pétiole et nervure principale développée des feuilles) consommées comme légume, vivace par ses rejets, qui se développe d'abord en rosette, puis émet une tige principale épaisse et rameuse qui peut atteindre 2 m de haut portant à leurs extrémités des capitules terminales.

Les feuilles très grandes, longues, profondément divisées en lobes aigus, de couleur grise argentée, sont longuement pétiolées. Le pétiole qui se prolonge en nervure principale est large et charnu, et constitue la partie comestible des côtes de cardons. Les fleurs, bleu violacé, sont réunies en capitules qui apparaissent à partir de la deuxième année. Ces capitules, entourés d'un involucre de bractées pointues, mais plus petits que ceux de l'artichaut, sont également comestibles.

Le cardon présente un système racinaire pivotant très profond, lui confère une bonne résistance à la sécheresse et sans doute à des froids pas trop intenses. Les graines sont des akènes oblongs surmontés d'une aigrette plumeuse qui se séparent facilement. Dans le commerce des graines, il existe deux variétés de cardon : l'une inerme et l'autre épineuse, seule la variété à épine est cultivée car elle dégage ce bon goût typique du cardon (**Gubb, 1913 ; Trabut, 1935 ; Kolev, 1976 ; Ozenda, 1983**).

Le cardon qui est une espèce à caractère méditerranéen pousse à l'état naturel dans des milieux relativement secs. Cependant, il préfère un sol frais, profond, bien travaillé, fumé et riche en matière organique et une exposition ensoleillée. Sa multiplication se fait au printemps, par semis en pépinière abritée ou en place après les gelées, en avril-mai. En cas de semis en pépinière, les plants sont repiqués au stade 3 à 4 feuilles lorsque la température ambiante dépasse les 12 °C.

Avant la récolte, on procède au "blanchiment", destiné à attendrir les côtes, qui consiste à étioiler les plants en les attachant après les avoir enveloppé d'un film opaque, et éventuellement à butter sur une hauteur d'environ 25 cm. La récolte des côtes intervient à l'automne, 5 à 6 mois après le semis (**Anonyme, 1977; Ozenda, 1983**).

2.3. Travaux scientifiques antérieurs sur le cardon:

Les applications culinaires traditionnelles du cardon utilisent les feuilles blanchies et les réceptacles dans les soupes, cuits en vapeur ou en salades (**Grieve, 1971** ; **d Amaral Franco, 1976** ; **Fernandez et al., 2006**).

En bibliographie presque toutes les études réalisées sur le cardon porte sur l'identification de ses métabolites secondaires et éventuellement tester leurs utilisations biopharmaceutiques comme l'activité antioxydante, antimicrobienne et antiviral, etc... (**Paris et Moyse, 1971** ; **Convoitise, 1983** ; **Koubaa et al., 1999**; **Slanina et al., 2001** ; **Valentao et al. 2002**).

D'après la bibliographie (**Adzet et Puigmacia, 1985**; **Slanina et al., 2001** ; **Sevcikova et al, 2002**; **Valentao et al. 2002**; **Koubaa et Damak, 2003**; **Wang et al, 2003**; **Pinelli et al, 2007**) cette espèce renferme dans ses feuilles et ses graines:

- des polyphénols : les dérivés caféïques (cynarine et acide chlorogénique), des flavonoïdes (surtout des flavones), des stéroïdes (stérols, sesquiterpénoïdes et des saponines), un principe amer (cynaropicrine) et un sucre (inuline),
- des acides organiques surtout des acides alcools,
- des tanins,
- des anthocyanes,
- des coumarines,
- des lignanes.

Les fleurs du cardon sont riches en protéases telles que les cardosins A et B, dans la péninsule ibérique et depuis longtemps on a utilisé les extraits aqueux des fleurs pour la fabrication du fromage (**Silva et Malcata, 2005** ; **Fernandez et al., 2006**), les fleurs séchées sont un produit de remplacement de la présure utilisées pour cailler le lait (**Tanaka, 1976**; **Faciola, 1990**).

De nos jours, le cardon est devenu une plante médicinale importante par la découverte de la cynarine (Figure 11.3.). Ce composé amer, présent dans les feuilles est utilisé comme médicament pour

améliorer la fonction du foie et de la vésicule biliaire. Il stimule aussi la sécrétion des sucs digestifs et diminue le taux de cholestérolémie. Le cardon est aussi traditionnellement utilisé comme diurétique, cholérétique, tonocardiaque et comme agent antihémorroïdaire (**Convoitise, 1983 ; Koubaa et al., 1999**).

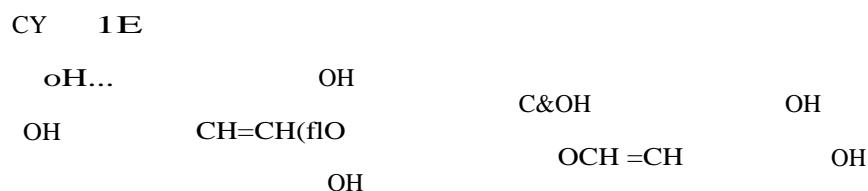


Figure 11.3. Structure de la cynarine (Koubaa et al., 1999).

Les extraits des feuilles du cardon sont utilisés pour leurs actions cholagogue et cholérétique dans les traitements de dyspepsie et du diabète (**Paris et Moysse, 1971 ; Koubaa et al., 1999**). Dans ces extraits, il a été signalé une activité antioxydante contre le radical superoxyde (**Valentao et ai., 2002**) et une activité intégrase anti-VIH (**Sianina et al., 2001**).

L'huile du cardon s'obtient par pression à froid des graines. Cette huile a des propriétés particulières liées d'une part à sa richesse en acides gras essentiels insaturés (85 %) (**Figure 11.4.**) et d'autre part à la présence d'un composé appelé silymarine (30 mg/100g). Elle possède une fonction vitaminique ainsi qu'une fonction plus spécifique à savoir détoxification des cellules hépatiques.

Acide Myristique	0,12%
Acide Palmitique	11.12%
Acide stéarique	2.75%
Acide oléique	21.15%
Acide linoléique	63.10%
Acide arachidique	0.30%
Acide linoléique	0.05%

Figure 11.4. Composition des acides gras de l'huile des graines du cardon (Slanina et al., 2001).

Les acides gras essentiels insaturés confèrent aussi à l'huile des graines du cardon une fonction T vitaminique F qui intervient dans la formation des prostaglandines. Par ailleurs l'huile contient de la vitamine E (27 mg/100g) et de la provitamine A (0.4 mg/100g). Cette fonction vitaminique joue un rôle métabolique considérable et elle a des répercussions sur la plupart des fonctions neurophysiologiques de l'organisme (Koubaa et Damak, 2003).

En résumé *Cynara cardunculus*, ancêtre botanique du *Cynara Scolymus* ou Artichaut est connu et apprécié d'un point de vue culinaire (Cardon) ; il est également une source de principes actifs faisant l'objet de diverses applications médicales, notamment dans le traitement d'affections hépatobiliaires.

Parmi les molécules d'intérêt thérapeutique contenues dans la plante, les dérivés caféïques et les flavonoïdes sont les plus actifs. Ces molécules ont des structures chimiques polyphénoliques, plus ou moins complexes. La composition chimique des deux molécules recherchées en priorité: la cynarine et l'acide chlorogénique.

3. *Brassica oleracea* (chou vert) (Figure II.5.):



Figure 113. Photographie du Chou vert (*Brassica oleracea*).

3.1. Position systématique

Ordre: Capparales

Famille : *Brassicaceae*

Genre : Brassica

Brassica oleracea

3.2. Caractères botaniques et écologiques:

Le terme «chou », qui vient du latin *caulis*, est apparu dans la langue française au ^{XII^e} siècle. On désigne le chou pommé de «caboche», puis de «cabus », mots empruntés à l'italien *capoccia* ou *cappuccio*, qui veulent dire «à grosse tête ». Le chou de Bruxelles, qui est, somme toute, un petit chou pommé poussant à l'aisselle des feuilles, tire son nom du fait qu'on l'aurait créé dans cette ville

T vers 1650 dans le but de rentabiliser la superficie cultivable, qui se raréfiait sous la poussée de l'augmentation de la population urbaine.

Le nom latin de l'espèce *Brassica* serait dérivé d'un mot celte, *bresic*, qui voulait justement dire «chou », alors que *oleracea* veut dire potager. Une *Brassica oleracea* est un chou du potager (**Maire, 1965; Laumonnier, 1978**).

Les choux appartiennent à la vaste famille des brassicacées, qui comprend quelques centaines de genres botaniques et quelques milliers d'espèces. Dans cette famille figurent bon nombre de plantes comestibles d'importance commerciale : radis, navet, rutabaga, moutarde, cresson,...

Toutes ces plantes se caractérisent par la présence d'une fleur à quatre pétales disposés en forme de croix (d'où le nom de «crucifères» d'abord employé pour désigner cette famille) et, selon le légume, par une saveur plus ou moins piquante qui est attribuable à une substance soufrée appelée communément «essence de moutarde ». Malgré leur apparente diversité, le chou pommé, le chou-fleur, le brocoli, le chou-rave et les choux de Bruxelles viennent tous d'un ancêtre commun (**Laumonnier, 1978**).

Les types de choux que l'on consomme habituellement viennent tous d'un ancêtre sauvage unique, *Brassica oleracea* var. *oleracea*, dont certains font remonter la domestication à 2000 ans dans les pays de l'est du bassin méditerranéen ou en Anatolie, au sud de la mer Noire; d'autres pensent qu'il y aurait eu un ancêtre beaucoup plus ancien, aujourd'hui disparu, qui était déjà cultivé il y a 8000 ans sur les côtes du nord de l'Europe. Cet ancêtre sauvage aurait été introduit dans les pays du bassin méditerranéen, en Europe de l'Est, et même au Proche-Orient et en Orient. Une chose est avérée: l'espèce sauvage *Brassica oleracea oleracea* pousse encore aujourd'hui sur les côtes rocailleuses de la Méditerranée, du nord de l'Espagne, du sud-ouest de la France, du sud et du sud-ouest de la Grande-Bretagne. Au fil des siècles, *Brasica oleracea* a donné naissance à des sous-espèces présentant des

caractéristiques extrêmement diverses selon qu'on a voulu développer les feuilles (borécole, chou vert ou chou cavalier, chou à grosses côtes), les feuilles formant la pomme (chou de Milan ou chou de Savoie, chou blanc, chou rouge, choux de Bruxelles), les fleurs (brocoli, chou-fleur) ou la tige (chou-rave).

Les premiers choux cultivés étaient probablement des borécoles (*kale* en anglais), des choux cavaliers (*couards*) ou des choux à grosses côtes (chou du Portugal), espèces qu'on a sélectionnées au cours des siècles pour leurs feuilles, nettement plus grosses que celles de leur ancêtre sauvage. Ces choux ne pommaient pas, comme en témoigne le nom latin du borécole, *Brassica oleracea* var. *acephala*, qui signifie littéralement «chou sans tête du potager ». Ce serait vers le ^{Ve} siècle avant notre ère que cette première variante du chou sauvage aurait pris sa forme définitive. Puis, les goûts changeants, on se prit d'intérêt pour le bouquet de jeunes feuilles tendres se trouvant au coeur du plant de chou et on se mit à choisir de préférence les sujets chez qui cette caractéristique était bien développée. Cette sélection aidant, le chou pommé apparaîtra autour du T^{er} siècle de notre ère, et on lui donnera le nom de *Brassica oleracea* var. *capitata*, soit, littéralement, «chou avec tête du potager ». Au fil du temps, on créera des variétés à pommes pointues, coniques, plates ou rondes, dont la couleur ira du blanc crème au rouge pourpre, chacune donnant lieu à l'apparition de spécialités culinaires locales (Laumonier, 1978).

Le chou vert (*Brassica oleracea*) est une plante comestible de la famille des Brassicacées originaire du sud-ouest de l'Europe. Il s'agit d'une crucifère bisannuelle dont les feuilles forment une tête compacte ou «pomme ». Cependant elle est cultivée le plus souvent comme annuelle dans les exploitations maraîchères, sa pomme ronde est ferme, bien serrée et entourée de peu de feuilles extérieures moyennes. L'ensemble de la plante est de couleur vert jaune, porté sur un pied court (Gubb, 1913 ; Trabut, 1935 ; Maire, 1965 ; Ozenda, 1983; Greuter et al., 1989).

Facile à cultiver en raison de sa grande capacité d'adaptation au froid, Le chou vert se développe sous les climats frais et humides. Il redoute énormément la sécheresse alors que l'humidité représente le facteur marquant de son développement. Le chou vert présente la particularité de réussir presque dans tous les terrains. Cependant, dans l'ensemble, ce sont les terres argileuses qui sont considérées comme les plus favorables. Il redoute les sols acides qui sont à l'origine des baisses importantes dans ses rendements (Maire, 1965; Laumonier, 1978; Greuter et al., 1989).

3.3. Travaux scientifiques antérieurs du chou vert:

Très polyvalent, le chou se déguste aussi bien râpé en salade que cuit en ragoût, sans oublier la célèbre choucroute préparée à partir de chou fermenté souvent utilisé comme accompagnement. Il se conserve bien et constitue ainsi un légume d'hiver de choix. En raison même du caractère d'extrême variabilité que nous venons de signaler (on en connaît 237 variétés dont seulement 80 sont inscrites au catalogue officiel des variétés), le chou présente beaucoup d'avantages potentiels sur la santé humaine (pharmacologiques et thérapeutiques).

Comme nous l'avons si bien expliqué dans le chapitre précédent, Plusieurs études épidémiologiques ont démontré qu'une consommation élevée de légumes et de fruits diminuait le risque de maladies cardiovasculaires, de certains cancers et d'autres maladies chroniques (**Lampe, 1999 ; Bazzano et al., 2003**). Quelques mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer cet effet protecteur; la présence d'antioxydants dans les légumes et les fruits pourrait y jouer un rôle.

En ce qui concerne les légumes de la famille des crucifères tels que le chou, le brocoli et le chou-fleur, des études épidémiologiques laissent penser que leur consommation régulière pourrait contribuer à prévenir certains cancers comme ceux du poumon, des ovaires et des reins (dans ce dernier cas chez la femme) (**Pan et al., 2004 ; Brennan et al., 2005**), et les maladies cardiovasculaires ainsi que des propriétés antimicrobiennes (**Hermann, 1989 ; Beecher, 1994; F.ashey et Stephenson, 1999**).

Par ailleurs, une étude a démontré qu'une consommation fréquente de crucifères (plus de 30 fois par mois) était associée à une plus faible concentration sanguine d'homocystéine dans le sang (**Ganji et Kafai, 2004**), un acide aminé constituant un facteur de risque de maladie cardiovasculaire lorsque sa concentration est trop élevée (**Guthikonda et Haynes, 2006**). Enfin, une étude explorant la fonction cognitive (par exemple, divers aspects de la mémoire) chez les femmes âgées a démontré que celles qui consommaient le plus souvent des crucifères présentaient un déclin cognitif plus faible que celles qui en consommaient le moins souvent, un résultat pour l'instant encore préliminaire (**Kang et al., 2005**).

Une revue de la littérature scientifique ainsi qu'une étude d'observation chez l'humain démontrent une association entre une consommation régulière de chou (au moins une portion par semaine) et une diminution du risque global de cancer, tous types confondus (**Verhoeven et al., 1996**), ainsi qu'un plus faible risque de cancer du poumon (**Verhoeven et al., 1996**) et du pancréas (**Larsson et al., 2006**).

D'autres chercheurs se sont penchés sur des composés spécifiques du chou, décrits ci-dessous, qui pourraient contribuer à expliquer les bienfaits potentiels de ce légume sur la santé.

Des chercheurs ont étudié *in vitro* l'effet des composés phénoliques de dix légumes sur la croissance de cellules cancéreuses humaines. Le mélange de composés phénoliques extraits du chou a démontré l'une des plus fortes capacités à diminuer la croissance de ces cellules cancéreuses (**Chu et al., 2002**). Cet effet a été surpassé seulement par les composés phénoliques de l'épinard. D'autres chercheurs ont comparé le contenu total en composés phénoliques de plusieurs variétés de chou. Le chou rouge s'est avéré celui qui en contenait le plus, soit au moins le double comparativement aux autres variétés de chou (**Chun et al., 2004 ; Singh et al., 2006**). Chez l'animal, un extrait de chou rouge s'est également montré efficace pour protéger le cerveau contre le stress oxydatif, cette protection constituant un effet antioxydant (**Lee et al., 2002**). En outre, des extraits de plusieurs espèces de la famille des *Brassicaceae* ont montré qu'ils peuvent avoir des activités contre divers organismes pathogènes particulièrement les bactéries pathogènes (**de Saraviaa et Gaylardeb, 1998**).

Les substances fréquemment citées qui contribuent aux propriétés thérapeutiques des *Brassicaceae* comprennent les glucosinolates, les flavonoïdes, les composés phénoliques et les analogues apparentés (**Herald et Davidson, 1983 ; de Saraviaa et Gaylardeb, 1998 ; Fasbey et Stephenson, 1999 Mithen et al., 2000**).

Glucosinolates, ce terme regroupe un ensemble de composés principalement retrouvés dans les légumes crucifères, dont le chou (**Kushad et al., 1999**). Les glucosinolates sont biologiquement inactifs. Toutefois, lorsque l'aliment subit des transformations physiques (par exemple haché ou mastiqué), les glucosinolates entrent en contact avec un enzyme présent dans l'aliment, appelé myrosinase. Les glucosinolates se transforment alors en molécules actives appelées isothiocyanates, plusieurs de ces molécules contribueraient à limiter le développement du cancer (**Conaway et al., 2002 Zhang, 2004**). La cuisson du chou réduit l'activité de la myrosinase, diminuant la possibilité de transformer les glucosinolates en composés actifs dans l'organisme (**Rouzand et al., 2004 Rungaparnestry et al., 2006**). Toutefois, la flore bactérienne intestinale peut également transformer les glucosinolates en isothiocyanates (Johnson, 2002 ; Lund, 2003), ce qui pourrait compenser partiellement la perte d'activité de la myrosinase des aliments cuits. Le fait de bouillir le chou peut également entraîner une perte importante de glucosinolates à travers l'eau de cuisson (Song et Thornalley, 2006). L'idéal serait donc de le consommer cru ou légèrement cuit, dans peu d'eau. Le

Chapitre II

Protocoles Opératoires et Méthodes d'analyse

La mauve (*M sylvestris L.*), le cardon (*Cynara cardunculus L.*) et le chou vert (*Brassica oleracea L.*) sont soumises aux lois de la sélection naturelle, ce qui rend leur composition chimique dépendante et variée suivant le milieu, le degré de maturité, le climat ainsi que d'autres différents facteurs écologiques. Les trois espèces de légumes ont été achetées du marché local des fruits et légumes de Tlemcen durant l'hiver 2006-2007. Au laboratoire, elles ont été tout d'abord lavées, séchées, coupées en morceaux d'environ 1cm, étuvées à 60°C pendant au moins 24h puis stockées dans des bocaux en verre à température ambiante et à l'abri de la lumière et de l'humidité jusqu'à utilisation ultérieure. Pour nos différentes analyses chimiques, chaque manipulation est effectuée cinq fois et les résultats obtenus sont des moyennes exprimées en pourcentage de matière sèche.

1. Détermination de la teneur de la matière sèche (Twidwell et al., 2002 ; Simpson, 1999):

La détermination de la teneur de la MS est effectuée par une dessiccation de la biomasse dans une étuve isotherme au voisinage de 105°C jusqu'à une masse pratiquement constante.

1. Détermination de la teneur en matière grasse (ISO 659, 1988):

L'extraction par solvant organique spécifique pour la détermination du taux de la matière grasse (*n*-hexane) est réalisée dans un appareil de type Soxhlet. Cette technique assure une extraction à chaud des matières grasses contenues dans un échantillon végétal solide placé dans une cartouche de cellulose et imbibé continuellement par les vapeurs d'un solvant choisi en fonction de la polarité des principes actifs lipidiques à extraire. Elle a été effectuée selon la méthode **ISO 659-1988**,

Environ 10 g d'échantillon broyé de granulométrie inférieure à 0.5mm sont pesés dans le tube en cellulose fermé par du coton cardé, et introduit dans un Soxhlet. L'extraction est réalisée par du *n*-hexane (300 ml) porté à reflux pendant 8h (réparties en 4h + 2h + 2h). Le solvant est ensuite éliminé sous pression réduite à 45 °C. Le taux de la matière grasse est calculé par la formule suivante:

$$MG(\%) = \frac{P_1 - P_2}{ME} \times 100$$

P_2 est le poids du ballon vide.

P_1 : est le poids du ballon après évaporation.

ME: masse de la prise d'essai.

MG : taux de la matière grasse.

3. *Analyse* de la composition **chimique des huiles par Chromatographie en Phase Gazeuse couplée au Spectre de Masse (CPG/MS) (AOCS, Official Method Cc 2-66,1989):**

En chromatographie en phase gazeuse (CPG), l'échantillon est vaporisé et injecté au sommet de la colonne, l'élution est assurée par un flux de gaz inerte qui sert de phase mobile (**Laverdière et al., 1999**).

Le principe de séparation repose sur une différence de répartition des composés d'un mélange entre deux phases, la phase mobile et la phase stationnaire (imprégné dans la colonne). Les composants du mélange injecté dans la colonne sont poussés dans celle-ci par le gaz vecteur interagissent différemment avec la phase stationnaire et de ce fait leur progression ne se fera pas à la même vitesse. Ce phénomène d'interaction provoque ainsi la séparation des constituants du mélange. Un système de détection adéquate en sortie de colonne permet de créer un signal qui est enregistré sous forme de "pics chromatographiques".

La teneur des acides gras des huiles des trois espèces de légumes étudiées a été déterminée selon **AOCS Official Method Ce 2-66 (1989)**. La méthode d'analyse des acides gras repose sur une réaction de saponification de la fraction lipidique permettant de libérer des esters de glycérol. Les acides gras sont ensuite substitués par un groupement méthyle ($-CH_3$), ce qui les rend plus volatils.

3.1. Préparation des methyl-esters des acides gras: 150 mg d'échantillon sont mélangés avec 5 ml du réactif BF_3 -méthanol (125 g de BF_3 dans un litre de méthanol) et agiter le mélange pendant 2 min. On agite encore 1 min après avoir ajouté 3 ml d'heptane et 15 s vigoureusement après avoir ajouté 15 ml d'une solution saturée de chlorure de sodium (NaCl). A la fin, une quantité suffisante de NaCl saturé est additionnée afin que la solution d'heptane contenant les methyl-esters des acides gras vient flotter à la surface, et facilitera par la suite pour transférer 1 ml de la solution obtenue dans un tube avec une petite quantité de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) Maintenant, cette solution est prête pour être injecté directement dans le chromatographe.

3.2. Analyse par la CPG/MS: les méthyl-esters des acides gras ont été séparés et identifiés par CPG/MS. Les échantillons ont tout d'abord été filtrés (filtre de cellulose de 0.2 m) ensuite injectés dans un chromatographe Shimadzu QP2010 équipé d'un injecteur diviseur, de colonne capillaire de type CP-Wax (30 m \times 0.32 mm \times 0.5 μ m).

3.3. Conditions opératoires de la CPGIMS: gaz vecteur: Hélium (vitesse de 47 cm/s) ; température de l'injecteur: 250°C ; programmation de température: de 60 à 180°C à 20°C/min, de 180 à 230°C à 4°C/min et maintenu à 230°C pendant 15min ; injection: 21. μ l mode split (1 : 15) ; enregistrement du spectre de masse: de 50 à 400 amu à 3 scan/s ; mode d'ionisation: impact électrique (FI) à 70 eV. L'identification des acides gras a été réalisée en utilisant le NIST'98 (US National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA).

4. Détermination de la teneur en fibres alimentaires (Bruneton, 1999):

Le principe du dosage est basé sur la solubilisation des composés de fibres non cellulosiques par des solutions d'acide sulfurique (H_2SO_4) et d'hydroxyde de potassium (KOH). C'est une méthode qui utilise un extracteur des fibres brutes **FIWE-VELP SCIENTIFICA** (Fig 11.6.).

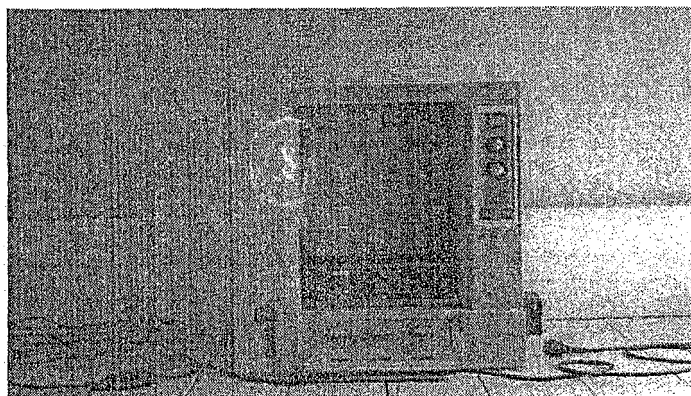


Figure 11.6. Extracteur des fibres brutes (FIWE-VELP SCIENTIFICA).

5. Détermination **de la teneur en** cendres (Audigie et **Dupont**, 1982):

La teneur en cendres est conventionnellement le résidu de l'échantillon après destruction de la matière organique par incinération. Le principe consiste en une calcination au bec benzène de l'échantillon jusqu'à apparition d'une fumée noire, puis en son incinération dans un four à moufle à une température de 600C° jusqu'à ce que les résidus deviennent blancs au refroidissement.

6. Détermination **des sucres** totaux (Dubois **et al.**, 1956):

Le dosage des sucres totaux est effectué par la méthode de phénol / acide sulfurique. Cette dernière nécessite une hydrolyse acide qui permet la rupture de toutes les liaisons glucidique dans le polyside.

Le principe du dosage se base sur la condensation des produits de déshydratation des oses (dérivés sulfuriques) avec un chromogène qui est le phénol. A ce moment, ils se forment des chromophores de couleurs jaunes- orange, leur apparition est suivie en mesurant l'augmentation de la densité optique à 490 nm. La teneur des sucres est exprimée en 1g/ ml (converti en g/l) de c D (+) glucose à partir d'une courbe d'étalonnage (Voir annexe).

7. Dosage **des protéines** totales (Kjeldahl, 1883):

Pour déterminer la quantité des protéines contenue dans notre échantillon, on a procédé par un dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl. Cette dernière s'effectue en trois phases: minéralisation, distillation et titration.

La minéralisation se réalise dans un minéralisateur (Fig **11.7.b**) et consiste à la transformation à chaud de l'azote organique contenu dans le matériel biologique en sulfate d'ammonium sous l'action de l'acide sulfurique. Il est recommandé d'ajouter d'une part des adjuvants de nature forte tels que les oxydants et les réducteurs métalliques afin d'accélérer cette opération, et d'autre part un catalyseur qui est un mélange de sélénium, de sulfate de cuivre et de potassium (15 g de K₂SO₄ + 5 g de CuSO₄ + 5 g de sélénium)

La distillation est une libération de l'ammoniac retenu dans l'acide sulfurique par l'action de la soude concentrée à 35 %. Le distillat est ensuite recueilli dans de l'acide sulfurique à 0.1 N avec quelques gouttes d'un indicateur coloré (indicateur de **Tashiro**). Cette phase est réalisée dans un distillateur de type **BUCHI K-314 (Fig II.7.a)**. Enfin après la distillation, la solution obtenue est titrée avec de la soude à 0.1 N jusqu'à obtention de la couleur initiale de l'indicateur de **Tashiro**;

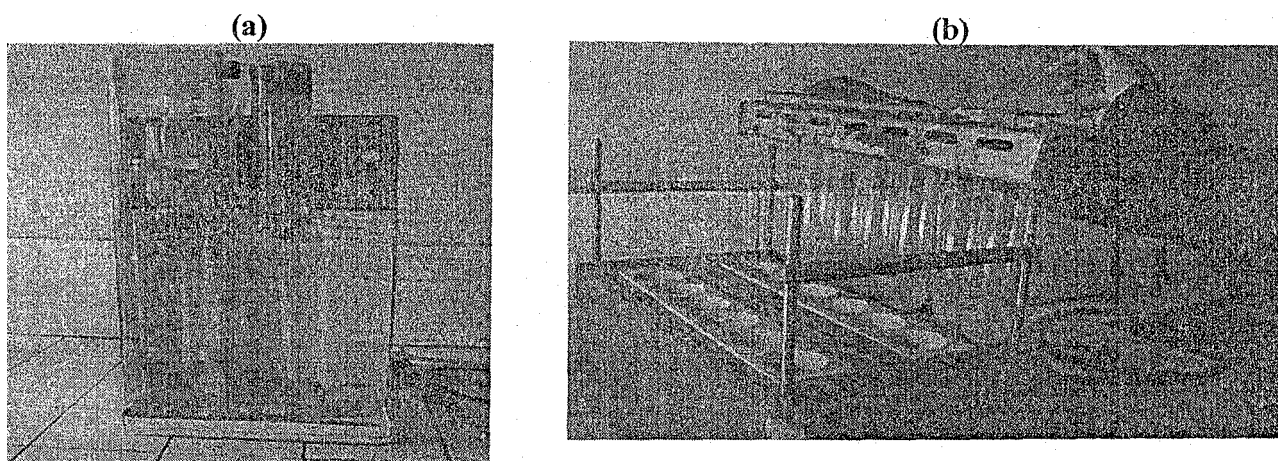


Figure 11.7. Distillateur BUCHI K-314 (a), Minéralisateur (b).

Dans la majorité des cas, à 100 g de protéines correspondent 16 g d'azote, pour cela, on utilise un facteur de conversion ($F = 100/16 = 6.25$) pour convertir le résultat du taux d'azote total en taux de protéines totales ou brutes.

$$\% \text{ Protéines totales} = \% \text{Azote total (NT)} \times 100/16 = \% \text{ NT} \times 6.25$$

8. Dosage de l'azote protéique (Manolkidis et al., 1970):

La détermination de l'azote protéique est effectuée par la méthode de précipitation des protéines par une solution d'acide trichloroacétique (TCA). La farine de l'échantillon est traitée par le TCA, le mélange est filtré. Le culot obtenu est constitué uniquement de l'azote protéique. Il est dosé par la méthode de **Kjeldhal**. La quantité d'azote protéique trouvée (N_p %) est soustraite de l'azote total (NT %) afin de quantifier l'azote non protéique (NNP %).

$$\text{NNP}(\%) = \text{NT}(\%) - N_p(\%)$$

9. Dosage des acides aminés totaux (Moore et al., 1958):

Les acides aminés individuels sont obtenus par hydrolyse acide (HCL). Après injection de l'échantillon sur colonne échangeuse de cations, les acides aminés libres sont séparés et élus par passage successif de tampon à pH croissants. Les acides aminés réagissent alors avec de la ninhydrine pour former des composés colorés dont la détection est faite en 2 longueurs d'onde différentes: $L_1 = 570 \text{ nm}$ et $L_2 = 440 \text{ nm}$. Les acides aminés sont déterminés par un analyseur automatique type **Mikrotechna AAA 881** (Model 118/119 CL, Czech Republic) (**Figure 11.8.**).

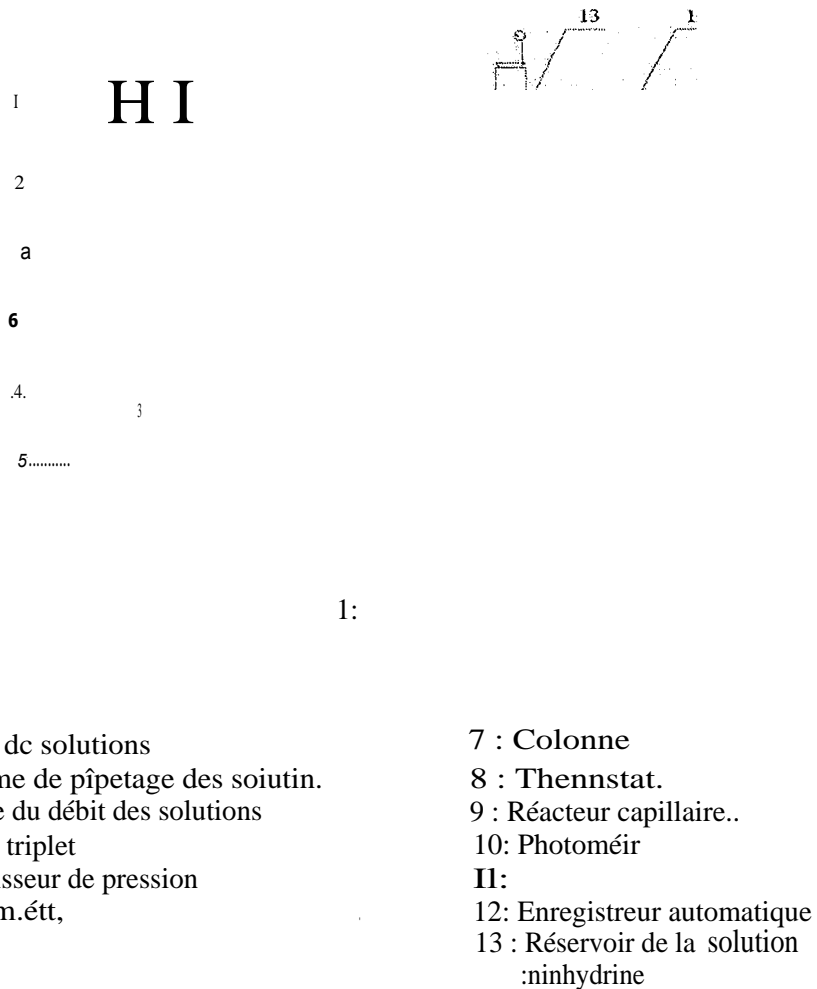


Figure 11.8. Schéma d'un analyseur automatique type Mikrotechna AAA 881.

L'identification des acides aminés est effectuée à l'aide d'un acide aminé témoin. La mesure de la quantité de chaque acide aminé est réalisée en comparant la surface du pic de chaque acide aminé avec celle du pic de l'acide aminé témoin (**Voir annexe: aminogramme des étalons**).

10. Estimation de la valeur nutritionnelle des protéines:

De nombreuses méthodes biologiques et biochimiques ont été proposées pour estimer la valeur nutritionnelle des protéines végétales. Elles ont été discutées par plusieurs auteurs en bibliographie (**Bodwell, 1977 ; Satterlee et al. 1979 ; Vijayakumari et al., 1997 ; Charrondiere et al., 2004 ; Gupta et al., 2005; Odhav et al., 2007**).

Les méthodes biologiques sont coûteuses, longues à mettre en oeuvre, demandent des quantités importantes d'échantillons et leurs résultats sont rarement transposables d'un produit à un autre. Or, l'industrie alimentaire a besoin de méthodes simples, reproductibles, peu coûteuses, rapides et qui peuvent être appliquées à une grande variété de produits. C'est pour cette raison que de nombreux travaux ont été effectués pour essayer d'apprécier cette valeur nutritionnelle au moyen de méthodes plus adaptables aux analyses de routine.

La composition globale en acides aminés est assez constante d'une espèce à une autre malgré des variations considérables de teneur en protéines. Ceci reflète vraisemblablement le fait que les protéines végétales constituent l'appareil photosynthétique et que leurs fonctions mais aussi leurs structures varient peu d'une espèce végétale à une autre.

Puisqu'il est bien établi que la valeur nutritionnelle d'une protéine végétale dépend essentiellement de sa composition en acides aminés et notamment en acides aminés indispensables, il est normal que plusieurs méthodes se soient basées sur ce critère.

10.1. Indice basé sur l'acide aminé limitant: l'indice chimique (chemical score) de Mitchell et Block (1946) repose sur l'idée que l'absence totale d'un acide aminé indispensable a pour conséquence l'indisponibilité complète de la protéine alimentaire pour la synthèse des protéines corporelles.

La composition de la protéine en acides aminés exprimés en gramme pour 16 g d'azote est comparée à celle d'une protéine de référence (protéine de l'oeuf entier), dont d'une part les acides aminés indispensables sont entièrement disponibles et d'autre part les autres acides aminés ont prouvés la capacité d'assurer la croissance optimale du rat.

On calcule la teneur de chaque acide aminé indispensable de notre protéine par rapport à celle de l'acide aminé correspondant de la protéine de référence. La plus faible de ces teneurs est retenue comme indice chimique. Cet indice dépend uniquement de la teneur en acide aminé indispensable limitant et ne prend en compte ni la disponibilité des acides aminés ni les éventuels excès par rapport aux besoins.

Comme il a été indiqué précédemment, la valeur nutritionnelle des protéines dépend aussi de l'équilibre des acides aminés indispensables. Il existe un autre mode de calcul de l'indice chimique tenant compte de la participation de chaque acide aminé indispensable à l'apport total des acides aminés indispensables. L'indice est définie, pour l'acide aminé limitant (exprimé en % de la somme des acides aminés indispensables) comme le rapport de la valeur trouvée dans la protéine étudiée à la valeur correspondante pour la protéine de l'oeuf (protéine de référence) (**Viroben et Bertrand, 1985**).

10.2. Indice prenant compte tous les acides aminés indispensables: pour améliorer l'exactitude des méthodes de prévision de la valeur nutritionnelle, il faut considérer d'une part que les acides aminés indispensables sont utilisés dans des processus métaboliques autres que la synthèse des protéines, et d'autre part, que tous les acides aminés nécessaires doivent être disponibles à l'endroit et au moment précis où s'effectue la synthèse des protéines. Il s'ensuit que l'utilisation d'une protéine n'est pas restreinte par la seule déficience d'un acide aminé particulier et que tous les acides aminés indispensables doivent être pris en compte.

L'indice **d'Oser (1959)** est basé sur l'idée que la probabilité pour tous les acides aminés indispensables d'être disponibles au niveau du site de synthèse des protéines est une fonction de leur produit et non de leur somme. La protéine de référence est ici l'oeuf comme dans le "chemical score" de Mitchell et Block. L'indice est la moyenne géométrique des rapports de chaque acide aminé indispensable dans la

protéine à sa valeur correspondante dans celle de l'oeuf. Chaque rapport étant au minimum égal à 1 et au maximum égal à ∞ . Le nombre d'acides aminés indispensables à prendre en considération peut varier selon l'espèce à laquelle la protéine est destinée (**Viroben et Bertrand, 1985**).

$$\text{E.A.A. indice} = \frac{\% \text{ Acide aminé étudié}}{\% \text{ Acide aminé référence}} \times \dots \times \frac{\% \text{ Acide aminé étudié}}{\% \text{ Acide aminé référence}} \times 10$$

Pour une étude plus approfondie, il existe aujourd'hui d'autres critères pour estimer la qualité nutritionnelle des protéines notamment le degré d'hydrophobicité ou de polarité des protéines (**Dinev et al., 1995**). Dans ce cas les résultats du degré d'hydrophobicité des protéines sont exprimés par la formule suivante:

$$\text{hydrophobicité des protéines (HPS)} = \frac{\text{Aa hydrophobes}}{\text{Aa totaux}}$$

11. Dosage de l'activité de l'inhibiteur trypsique (**Kakade et al., 1969**):

La méthode la plus largement utilisée pour déterminer l'activité de l'inhibiteur trypsique a été développée à partir de la méthode de **Kunitz (1947)** dans laquelle l'hydrolyse de la caséine par la trypsine est mesurée par spectrophotométrie en présence et en absence de l'inhibiteur trypsique (**Charpentier et Lemmel, 1984**).

Erlanger et al., (1961) ont introduit l'utilisation d'un substrat synthétique, *benzoyl arginine-p-
notroanilide* (B A P N A) à la place de la caséine. Un travail de **Kakade et al., (1969)** a montré que la méthode utilisant le B A P N A s'avérait intéressante à cause de sa simplicité et de sa précision (**Charpentier et Lemmel, 1984**). Une étude collégiale réalisée par le Comité d'Analyse de l'inhibiteur Trypsique de Soja (**Kakade et al., 1974**, **Rackis, 1974**) a abouti à plusieurs modifications de la technique, visant à améliorer à la fois sa précision et sa reproductibilité (**Charpentier et Lemmel, 1984**).

Hamerstrand et al., (1981) ont ajoutés d'autres modifications qui produisent une teneur d'inhibition trypsique dans une marge d'inhibition de 40 à 60 %, alors que **Lehnardt et Dills (1982)** ont montré que

12. Tests phytochimiques (Mode opératoire voir annexe):

Nos échantillons ont été soumis aux tests phytochimiques. Au cours de ces derniers, trois solvants d'extraction de polarités différents (eau, éther diéthylique et l'éthanol) sont employés. La méthode d'extraction consiste à porter l'échantillon de la plante au reflux de l'un des solvants cités ci-dessus pendant 1h. Cette technique permet d'extraire toutes les familles de composés chimiques présentes dans la plante étudiée (Figure 11.9).

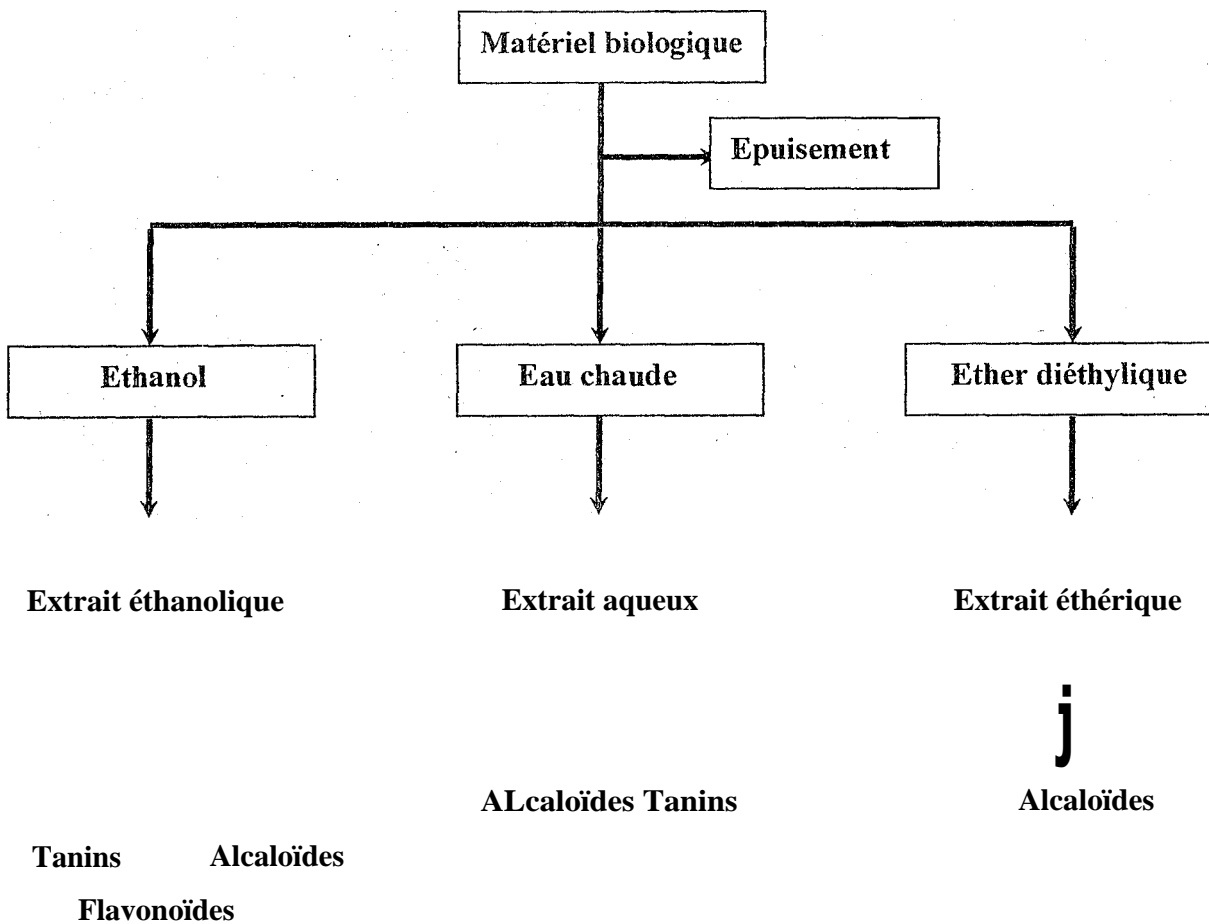


Figure 11.9 Diagramme des tests phytochimiques réalisés sur le cardon, la mauve et le chou vert.

13. Dosage des phénols totaux (Singleton et *al.*, 1999):

Les phénols totaux ont été déterminés par spectrophotométrie UV-Vis, par la méthode **Folin Ciocalteu**. Brièvement, on a additionné à 1 ml de l'extrait dilué avec de l'eau distillée 10 ml de la solution de Na_2CO_3 , incubés à 38°C dans un bain marie pendant 10 mm, ensuite 1 ml du réactif de **Folin Ciocalteu** a été ajouté à l'ensemble, après 30 mm, l'absorbance a été mesurée 660 nm contre un blanc sans extrait. La quantification des phénols totaux a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisée par un extrait d'étalon d'acide gallique à différents concentrations dans les mêmes conditions que l'échantillon. Les résultats sont exprimés en g équivalent acide gallique par 100 g du poids sec de l'échantillon (**Voir annexe**).

14. Rendement massique:

14.1. Rendement massique des tanins (Bruneton, 1999): 10 g de matériel végétal broyé en présence de 180 ml d'eau distillée et 100 ml d'acétone; l'ensemble est porté à une macération à froid (4°C) pendant 4 jours. Filtrer et extraire la solution deux fois avec 50 ml de dichlorométhane afin d'éliminer les pigments et les lipides. Décanter et extraire la phase aqueuse quatre fois avec 50 ml d'acétate d'éthyle (AcOEt). Sécher la phase organique avec MgSO_4 ensuite évaporer le solvant à sec.

14.2. Rendement massique des flavonoïdes (Dauguet et Foucher, 1982): 20 g de matériel végétal dans 200 ml de méthanol (MeOH) bouillant en présence de 10 g de CaCO_3 . L'ébullition est maintenue sous réfrigérant à reflux pendant 1 heure. Après filtration, le dépôt est traité à nouveau pendant 1 heure à ébullition dans la même quantité d'alcool. Les deux solutions alcooliques sont réunies, les résidus sont éliminés par distillation sous pression réduite et le résidu sirupeux est repris par 100 ml d'eau distillée bouillante. La solution aqueuse est filtrée à chaud et le filtrat épuisé successivement par l'éther diéthylique, l'AcOEt, et le n-butanol (BuOH) tous les composés flavoniques se retrouvent dans l'extrait AcOEt.

14.3. Rendement massique des alcaloïdes (Bruneton, 1999): 10 g de matériel végétal en présence de 250 ml d'HCl à 2 % et 110 ml AcOEt. L'ensemble est porté à une macération à froid (4°C) pendant

10h. Filtrer le mélange et basifier la phase aqueuse acide avec NH_4OH . La phase aqueuse basique est ensuite extraite plusieurs fois avec l'AcOEt. L'opération est répétée deux fois avec l'AcOEt. Jusqu'à ce que la phase aqueuse ne contient plus d'alcaloïdes (ce qui peut se vérifier aisément par la négativité de la réaction de Mayer effectuée sur la phase aqueuse). Le solvant organique contenant les alcaloïdes est décompté, débarrassé des traces d'eau qu'il peut renfermer par déshydratation sur MgSO_4 . Evaporer le solvant et il reste alors un résidu sec des alcaloïdes totaux.

14.4. Calcul du rendement: le poids de l'extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du ballon plein et le poids du ballon vide (rendement massique).

15. Dosage des tannins condensés (test de la vanilline avec H_2SO_4) (Swain et Hillis, 1959):

La détermination du taux de tannins condensés est basée sur la condensation des monomères catéchiques avec la vanilline en milieu acide. Il est réalisé par le test de vanilline avec H_2SO_4 . Cette méthode a été proposée par **Swain et huis** (1959).

16. Dosage des tannins hydrolysables (Chlorure ferrique) (Mole et Waterman, 1987):

Cette méthode est basée sur une réaction avec le chlorure ferrique. Le mélange de l'extrait tannique avec le réactif chlorure ferrique FeCl_3/HCl provoque la coloration rouge violette du complexe, d'où la formation, des ions Fe^{3+} .

17. Dosage des flavonoïdes (Jia et al, 1998):

Prendre 10g de matériel végétal en présence de 200 ml de MeOH, l'ensemble est passé dans l'appareil de Soxhiet pendant 24h, ensuite on procède à une filtration. 0.25 ml de l'extrait méthanolique à 80 % est dilué dans 1.25 ml d'eau distillée puis 75 μl de NaNO_2 à 5 % sont ajoutés. Le mélange est laissé à température ambiante pendant 6 min, puis on ajoute 150 μl d' AlCl_3 à 10 %. Le mélange est laissé pendant 5 min à température ambiante. Ensuite 0.5 ml de NaOH 1M est additionné et ajuste le volume avec de l'eau distillée jusqu'à 3 ml. Enfin la solution est bien mélangée et l'absorbance est mesurée immédiatement contre un blanc à 510 nm en comparaison avec la préparation standard de

concentrations connues de catéchine. Le résultat est exprimé par mg de catéchine équivalent/100 g poids sec de l'échantillon (**Voir annexe**).

18. Identification par chromatographie sur couche mince:

Après la mise en évidence des différentes familles de composés, dans les parties étudiées de la plante (tiges et feuilles), nous avons ciblé les familles qui sont prépondérantes dans cette dernière. Cette étape consiste à extraire les quelques familles de composés selon des méthodes d'extractions sélectives et à calculer leur rendement massique. Cette opération est suivie d'une purification des extraits par une méthode chromatographique (Chromatographie sur couche mince C.C.M.).

L'extraction est un procédé chimique qui permet de séparer un composé d'un mélange ou d'une solution. Le meilleur solvant a utilisé est celui dans lequel le composé à extraire est très soluble. Une succession d'opérations peut être nécessaire avant que le composé ne puisse être isolé par distillation ou par évaporation du solvant.

H L'isolement d'une substance naturelle ou synthétique nécessite souvent une extraction avec un solvant organique ou minéral. Il y a en général deux types d'extraction:

- L'extraction liquide-liquide continue et discontinue.
- L'extraction solide-liquide continue et discontinue.

L'extraction solide-liquide discontinue est l'extraction qu'on a utilisée dans nos différentes analyses. C'est une macération (procédé discontinu) qui consiste à laisser tremper le solide dans un solvant à froid ou à température ambiante, pour en extraire les constituants solubles. Après filtration, le résidu peut être remis dans le récipient d'extraction avec une nouvelle portion de solvant. Au besoin, le processus est répété plusieurs fois.

La chromatographie sur couche mince est utilisée à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis. La C.C.M. est essentiellement une chromatographie liquide exécutée sur une couche de particules d'une substance polymérisée immobilisée sur un support planaire (Yrjönen,

2004). Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées avec des plaques de Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck) ; 0.25 mm, sur support rigide en verre; 20/20 cm.

Dans notre cas, les systèmes de solvants pour Les différentes classes de composés sont les suivants (les proportions sont données en volume et ils sont classés par polarité croissante):

Toi / AcOEt / MeOH (80: 18 :2)

HCC13 / MeOH (90: 10)

AcOEt / MeOH / I-120 (100: 13.5: 10)

Après développement dans une cuve en verre et séchage, L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 356 nm), avant et, dans certains cas, après révélation par les réactifs appropriés. L'utilisation de différents réactifs permet de rassembler judicieusement les fractions récoltées suites aux différentes chromatographies. Les réactifs utilisés pour le présent travail sont décrits en annexe.

Protocole d'extraction (Macheix *et al.*, 2005) : elle se fait selon les étapes suivantes:

Matériel biologique

Filtration

Extraits réunis

Extrait aqueux

Acétate d'éthyle

Phase aqueuse

Phase acétate d'éthyle

n. butanol

Repris avec 3ml
de méthanol

(r: 3ml)

n.b

19. Estimation du pouvoir antioxydant par la méthode du 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Brand-Williams *et al.*, 1995) :

Le pouvoir antioxydant de nos extraits a été testé par la méthode du DPPH avec quelques modifications. Le DPPH est un radical coloré commercial très commode pour une première estimation de la capacité d'un antioxydant à transférer des atomes H labiles vers une espèce radicalaire. Un antioxydant peut être caractérisé par sa stoechiométrie n c'est-à-dire le nombre de radicaux DPPH piégés (réduits en diphenylpicrylhydrazine) par molécule d'antioxydant. Ainsi l'antioxydant peut être considéré comme une source de n atomes H labiles (**Figure 11.10**).



Figure 11.10. Forme Libre et réduite du DPPH (Molyneux, 2004).

Quand la réaction de transfert d'atomes H d'un antioxydant polyphénolique vers le DPPH est suivie par spectroscopie UV-visible, deux étapes peuvent être généralement distinguées:

- une première étape durant laquelle le déclin de l'absorbance visible du DPPH ($\lambda_{\text{max}} = 515 \text{ nm}$ dans MeOH) est rapide (1 à 3 mm) du fait du transfert des atomes H les plus labiles (ex: OH d'un noyau catéchol ou 1,2 dihydroxybenzène)
- une deuxième étape durant laquelle l'absorbance visible du DPPH décroît lentement jusqu'à une valeur constante (10 à 30 mm), ce qui reflète l'activité résiduelle des produits d'oxydation-dégradation formés lors de l'étape rapide.

19.1. Préparation de la solution de DPPH: le DPPH ($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$; Mr : 394.33) est solubilisé dans du MeOH absolu pour en avoir une solution de 0.2 mM.

19.2. Solution d'extrait: pour le test les échantillons ont été préparés par dissolution dans du MeOH absolu. Pour tous les extraits, on prépare des solutions dans du MeOH absolu à raison de 1 mg/ml. Ces solutions dites solutions mères, subiront ensuite des dilutions pour en avoir différentes concentrations de l'ordre de pg/ml.

19.3. Essai au DPPH: dans des tubes secs et stériles, on introduit 2.5 ml de la solution à tester, on ajoute 1 ml de la solution de DPPH fraîchement préparée (du jour même). Après agitation au vortex, les tubes sont placés à l'obscurité et à la température ambiante pendant 30 min. Pour chaque concentration, le test est répété trois fois. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 518 nm par un spectrophotomètre UV-visible. Pour chaque dilution, on prépare un blanc, constitué de 2.5-ml de la solution à tester additionné de 1 ml de MeOH.

Le contrôle négatif est composé de 1 ml de la solution méthanolique au DPPH (0.2 mM) et de 2.5 ml de MeOH. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard, l'acide ascorbique et le Trolox (6 hydroxy-2, 5, 7, 8 tétraméthylchroman2carboxylic acid "C₁₄H₁₈O₄").

19.4. Expression des résultats: pour obtenir la concentration efficace (EC₅₀) qui réduit la concentration initiale de DPPH de 50 % aussi bien que la puissance antiradicalaire (ARP égale à 1/EC₅₀) (Heilerova et al., 2003), les résultats sont exprimés en activité antioxydante. L'activité antioxydante, qui exprime les capacités de piéger le radical libre est estimée par le pourcentage de décoloration du DPPH en solution dans le MeOH. L'activité antioxydante est "AA%" est donnée par la formule suivante:

$$AA\% = 100 - \frac{tE(AbS_{test} - AbS_{bl_{anc}})}{1001} \times 100 / AbS_{contrôl} \text{ (Leitao et al., 2002).}$$

Ou encore:

$$\text{Inhibition \%} = \frac{(AbS_{contrôl} - AbS_{test})}{t AbS_{contrôl}} \times 100 \text{ (Wang et al., 2002).}$$

Avec: AA: Activité Antioxydante et Abs: Absorbance à la longueur d'onde de 518 nm.

La valeur EC₅₀ appelée aussi 10₅₀ a été déterminée pour chaque extrait. Elle est définie comme étant la concentration du substrat qui cause la perte de 50 % de l'activité de DPPH, c'est aussi la concentration de l'échantillon exigé pour donner une diminution de 50 % de l'absorbance de la solution contrôle constituée de MeOH et de DPPH. Les valeurs de l'EC₅₀ moyennes ont été calculées par les régressions linéaires des trois essais séparés où l'abscisse est représentée par la concentration des composés testés et l'ordonnée par l'activité antioxydante en pourcentage (Mensor et al., 2001).

Chapitre III

Résultats et Discussion

1. Teneur en eau:

L'humidité est un indice *très* important, il donne une idée sur la qualité du produit végétal. Les légumes sont connus pour leur richesse en eau et l'analyse de la teneur en eau de la mauve, du cardon et du chou vert a confirmé cette affirmation, elles sont estimées à environ 82.5 %, 85% et 92.3% respectivement, ce qui représente plus des deux tiers (2/3) du poids total chez les trois légumes.

Cette richesse en eau entraîne deux conséquences : d'une part, ceci permet aux trois légumes d'utiliser au maximum leurs composés chimiques solubles, et d'autre part, elle ne leur permet pas d'être stockés à long terme à cause du risque de développement de certains microorganismes qui peuvent altérer leur qualité organoleptique et nutritionnelle. De ce fait, ils doivent être comme tout les légumes conservés au froid et consommés dans les plus brefs délais.

En comparant ces trois teneurs avec celles de quelques légumes étudiés par **Fachmann et Kraut (1995)** et illustrées dans la **figure 11.11**, on remarque que nos trois légumes présentent des valeurs comprises entre celle de la pomme de terre (77%) et celle du concombre (96.3%).

Les résultats de **Fachmann et Kraut (1995)** confirment nos résultats surtout pour le cardon et le chou vert. Puisque l'artichaut (*Cynara scolymus*) qui appartient à la même espèce que le cardon, et le chou fleur (*Brassica oleracea Var. botrytis*) appartenant à la même espèce que le chou vert ont des teneurs en eau de **85%** et 91% respectivement, ces dernières sont comparables voir même égales à celles de nos échantillons.

2. Composition chimique:

Les végétaux en général et les légumes en particulier, qui poussent spontanément aux endroits qui leur conviennent le mieux, permettent de disposer d'un éventail considérable de composants alimentaires à savoir les constituants énergétiques (protéines, lipides, glucides) et les constituants non énergétiques (fibres alimentaires, minéraux, micronutriments) (**Croteau et al., 2000**).

Comme pour les métabolites primaires et pour les métabolites secondaires, la liste de ces substances est très longue. Pour cette raison on s'est limité à détailler les différents nutriments étudiés dans notre présent travail.

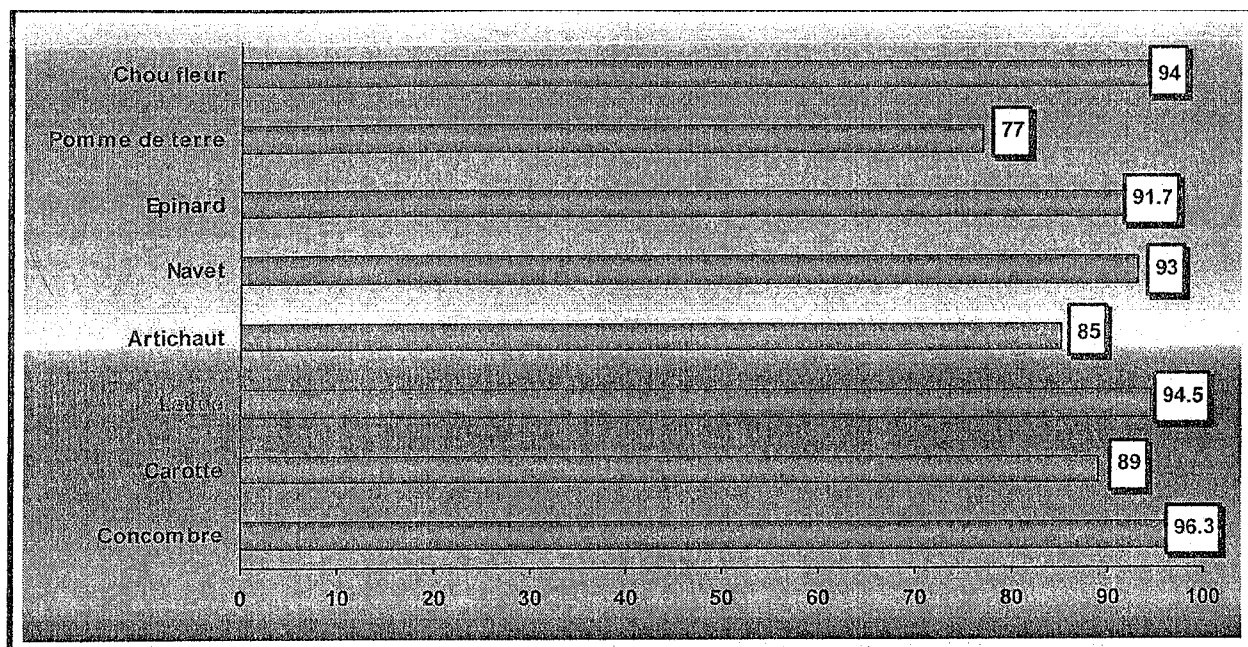


Figure 11.11. Teneurs en eau de quelques légumes (Fachmann et Kraut, 1995).

Les éléments qui caractérisent la valeur alimentaire d'un produit et qui sont nécessaires pour le calcul de la valeur nutritive tels que les protéines, les fibres alimentaires, la matière grasse, les sucres totaux et la matière minérale ont été analysés. Le **tableau III.** présente les résultats de ces composés chimiques exprimés en % de MF.

Tableau 11.1. Composition chimique en (%) de matière fraîche (MF).

Composés chimiques	Cardon	Mauve	Chou vert
Protéines totales	2.83	5.70	1.62
Protéines pures	2.42	4.31	0.94
Fibres alimentaires	1.67	1.62	0.82
Matière grasse	0.36	0.53	0.20
Sucres totaux	1.99	1.26	3.05
Matière minérale	1.73	2.10	0.71

Les variations dans la composition chimique de nos trois légumes sont plus marquées quand on extrapole les résultats de la composition chimique de la MF à la MS. La composition chimique du cardon, de la mauve et du chou vert exprimée en % de la MS est représentée dans le **tableau 11.2**.

Tableau 11.2. Composition chimique en (%) de matière sèche (MS).

Composés chimiques	Cardon	Mauve	Chou vert
Protéines totales	22.66	31.35	18.15
Protéines pures	19.13	23.94	10.45
Fibres alimentaires	11.62	10.86	09.13
Matière grasse	01.25	02.63	01.30
Sucres totaux	14.28	24.98	33.95
Matière minérale	12.40	15.52	07.90
Substances extractibles non azotées	46.28	57.18	35.13

A partir du **tableau 11.2**, on peut tirer une constatation concernant la valeur alimentaire de nos trois légumes en se basant sur leur taux de substances extractibles non azotées. Ce taux est un indice ou un critère qui nous permet d'avoir une idée sur la qualité alimentaire d'un produit végétal, puisque celui du cardon et de la mauve est supérieur à **45%** et **56%** respectivement. Par ces résultats on peut dire que la mauve et le cardon ont une valeur alimentaire moyenne mais qui reste convenable par rapport à celle du chou vert (35.13%). Cependant pour être plus conscript dans l'estimation de la valeur alimentaire de nos trois espèces de légumes, il est recommandé de compléter ce travail par une analyse complémentaire de leurs vitamines et de leurs différents minéraux. Pour une meilleure compréhension de ces résultats illustrés dans les **tableaux 11.1** et **11.2**, nous avons préféré analyser et détailler chaque

Composé chimique à part

2.1 Teneur en matières azotées (protéines):

Parmi les différents nutriments, les protéines tiennent une place particulièrement importante dans notre alimentation. En effet, pour toutes les espèces animales ainsi que l'homme, le besoin en protéines est élevé il représente 12 à 15 % de la matière sèche du régime alimentaire suivant l'espèce et l'état physiologique. Ces protéines sont de valeur biologique très variable. Elles sont fournies essentiellement par les graines de céréales et des légumineuses et, à un moindre degré, par les organes de réserves (racines et tubercules) et par l'appareil végétatif des plantes (protéines foliaires) (Tableau 11.3.).

Tableau 11.3. Teneurs en protéines de différentes espèces végétales en % de la matière sèche (Nagy et al., 1978).

Nom latin	Nom français	Teneur en protéines (%)
<i>Coriandrum sativum</i>	Coriandre	61
<i>Amaranthus gangeticus</i>	Amaranthe	58
<i>Cucurbita maxima</i>	Potiron	35
<i>Manihot esculenta</i>	Manioc	24— 32
<i>Ipomoea batatas</i>	Patate douce	27
<i>Brassica chinensis</i>	Chou chinois	26
<i>Brassica oleracea</i>	Chou fleur	24
<i>Glycine max</i>	Soja	24
<i>Musa pardisiaca</i>	Banane	19-21
<i>Lactuca sativa</i>	Laitue	21
<i>Medicago sativa</i>	Luzerne	16 - 22

Depuis que les savants du siècle dernier se sont penchés sur la nutrition, tout le monde en est venu à penser: protéine = viande ou à la limite = oeufs ou fromage. Aujourd'hui, les choses prennent une autre tournure, les protéines végétales font l'objet d'une nouvelle discipline, non seulement parce qu'elles sont plus rentables mais parce qu'il s'agit de protéines qui peuvent compléter et équilibrer, en acides aminés, les protéines animales (**Rémesy, 1996**).

En outre lorsqu'on parle de ces métabolites que contient un aliment, on en considère d'abord leur teneur, c'est-à-dire la quantité par rapport à un poids donné de l'aliment (en générale 100 g) (Couplan, 1992) ensuite, leur qualité. Cette dernière se décompose en deux paramètres:

- La digestibilité de la protéine, qui donne un indice de la biodisponibilité des acides aminés;
- et la valeur biologique (*in vivo*) qui reflète l'efficacité d'utilisation de ces acides aminés absorbés (**Kies, 1981, Mariotti et Tomé, 1999**).

Parallèlement, les progrès conceptuels amènent à définir la qualité d'une protéine comme son aptitude à couvrir les besoins en azote et en acides aminés. (Young et al., 1984, Harper et Yoshimura, 1993). L'accent est mis sur l'importance critique du besoin en acides aminés indispensables pour assurer un

renouvellement des protéines corporelles **Mariotti et Tomé, 1999**). Les protéines végétales dont il est question sont, pour la plupart, carencées en un ou plusieurs acides aminés essentiels dits facteur limitant, et sa concentration relative détermine la valeur de l'indice chimique.

Selon **Viroben et Bertrand (1985)**, cet indice *esi* définie, pour l'acide aminé limitant, comme étant le rapport de la valeur trouvée dans la protéine étudiée à la valeur correspondante pour celle de référence qui a été proposé par la comité d'expert de la FAO et de l'OMS: il s'agit de la protéine de l'oeuf (albumine).

Néanmoins, la capacité de ces macromolécules à couvrir notre besoin en acides aminés indispensables n'empêche pas d'apprécier leur impact sur la santé. Certains auteurs suggèrent qu'une restriction protéique qui limite les divisions cellulaires, serait favorable pour éviter la mutagenèse et par la même certains risques de cancer (**Youngman, 1993**). Par ailleurs, il a aussi été indiqué qu'un excès de protéines pouvait être à l'origine d'une acidose légère mais chronique qui pourrait favoriser les phénomènes dégénératifs (**Frassetto et ai, 1998**). De nombreuses études confirment, sans équivoque, que l'excès de protéines dans le corps favorise l'ostéoporose, car l'organisme est alors obligé de prendre du calcium pour éviter une suracidification du corps. De plus, la capacité du rein à éliminer les protéines alimentaires est très limitée. Il est donc clair que la qualité des protéines que reçoivent nos cellules a non seulement des répercussions sur le bon fonctionnement de notre organisme, mais aussi sur son éventuel dérèglement.

a- Teneur en azote total, protéique et non protéique:

La mauve peut être considérée comme une véritable source de protéines. Puisque les résultats obtenus lors du dosage l'ont bien confirmé (**Figure 11.12.**).

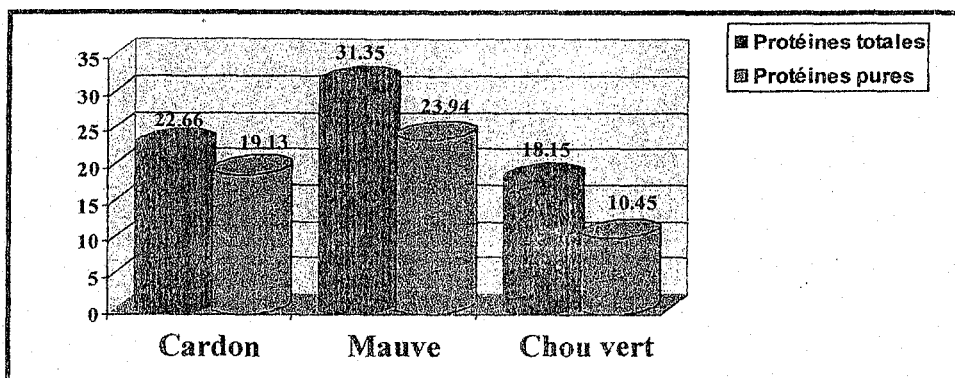


Figure 11.12. Teneurs en (%) des protéines totales et des protéines pures.

La mauve détient la teneur la plus élevée avec 31.35% MS pour les protéines totales et 23.94% MS pour les protéines pures. Lorsqu'on compare ces résultats et ceux du cardon avec ceux de la bibliographie (Gupta et Wagle, 1988 ; Mosha et Gaga, 1999 ; Singh et al., 2001), on peut affirmer que la mauve et le cardon peuvent être classés parmi les légumes riches en protéines comme le coriandre (22.2% MS), le navet (22.3 % MS), la patate douce (25.6% MS), l'épinard (26.5% MS) et le chou fleur (29.9% MS).

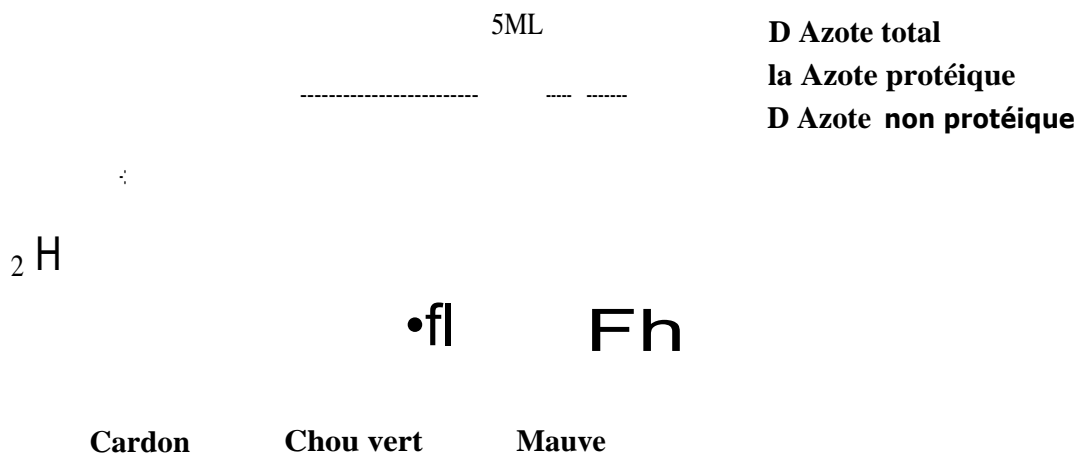


Figure 11.13. Teneurs en (%) d'azote total, protéique et non protéique.

Dans la **figure 11.13.** sont regroupées les teneurs en azote total, protéique et non protéique dans le cardon, la mauve et le chou vert.

La remarque essentielle qui ressort de ces résultats concerne la comparaison entre les protéines totales et les protéines pures des trois légumes. La différence entre les protéines totales et protéines pures est très faible chez le cardon par rapport aux deux autres légumes. En effet le rapport entre l'azote protéique et l'azote total est de 0.95 pour le cardon et il est de 0.25 et 0.42 pour la mauve et le chou vert respectivement. Donc on peut dire que l'azote total du cardon est presque entièrement constitué d'azote protéique. Cette affirmation est très intéressante de point de vue qualité des protéines du cardon, puisque ce paramètre peut être un indicateur préliminaire de la valeur nutritionnelle du produit végétal.

b- Composition en acides aminés:

La teneur en acides aminés est exprimée en fonction des protéines totales et de la matière sèche. Leurs numérotations dans le tableau respectent leur ordre d'élution. La **figure 11.14.** présente le profil des teneurs des acides aminés totaux du cardon, de la mauve et du chou vert. Dix-sept acides aminés ont été détectés chez nos trois espèces de légumes dont sept acides aminés essentiels à savoir méthionine, isoleucine, leucine, lysine, thréonine, phénylalanine et valine.

Lorsqu'on analyse les résultats de la figure 11.14. on remarque tout d'abord qu'il n'y a pas de différence notable dans les profils de la composition en acides aminés totaux non seulement entre nos trois espèces de légumes mais aussi avec les différentes espèces végétales étudiées en littérature (Nagy *et al.*, 1978; Pirie, 1980; Gupta et Wagle, 1988 ; Vijayakumari *et al.*, 1997 ; Dini *et al.*, 2008).

Cette similitude des profils de la composition en acides aminés dans le règne végétal s'explique par, d'une part, la présence d'une grande quantité de protéines généralement fonctionnelles qui se ressemblent structurellement, et d'autre part, par la présence de faibles quantités d'enzymes spécifiques à ces protéines végétales et donc influencent peu la composition en acides aminés. Il existe un autre élément qui peut intervenir dans cette ressemblance, il est purement technique puisqu'il s'agit de la méthode utilisée dans la détermination des acides aminés qui est toujours la même et utilisant un analyseur automatique.

L'analyse des résultats de la **figure 11.14.** permet de faire les remarques suivantes, à savoir que l'acide aspartique et l'acide glutamique sont prépondérants alors que la cystine et la méthionine sont minoritaires chez les trois espèces. En effet, l'acide aspartique et l'acide glutamique constituent à eux seuls les 38.77%, 40.23% et 35.03 % des acides aminés totaux du cardon, de la mauve et du chou vert respectivement.

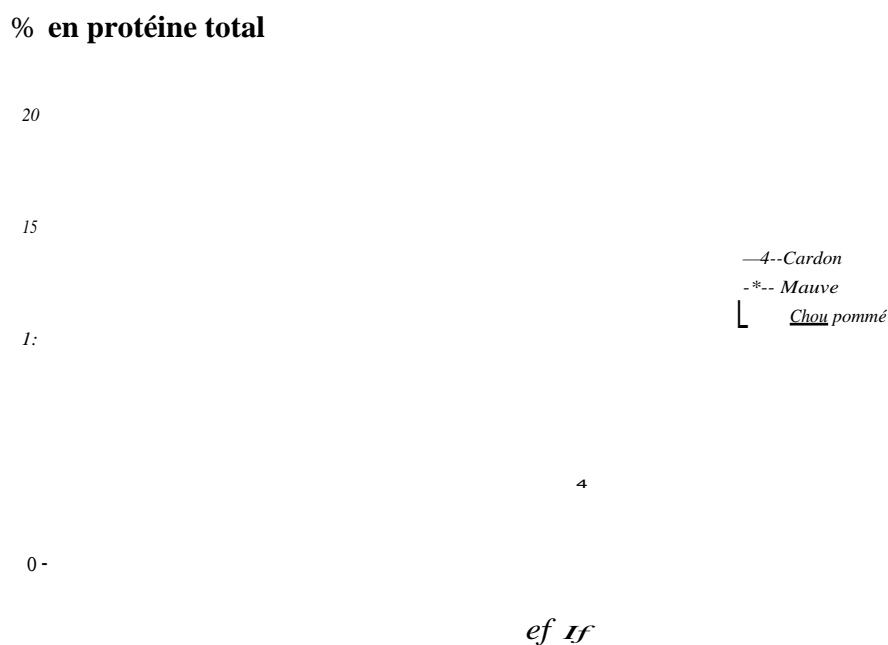


Figure 11.14. Profil des teneurs des acides aminés totaux.

La répartition des teneurs des acides aminés selon leurs groupes chimiques permet de bien visualiser les fluctuations et les variations existants entre les différents acides aminés. La **figure 11.15.** représente les teneurs des acides aminés par rroupes chimiques du cardon, de la mauve et du chou vert.

Le groupe le plus présent chez les trois espèces de légumes est celui des acides dicarboniques (acide glutamique et acide aspartique), ceci s'explique par le rôle important joué par ces deux acides aminés dans le métabolisme des cellules végétales surtout dans les processus liés à la biosynthèse des différents acides aminés, dans le transport et le stockage de l'ammoniaque et aussi dans le cycle de Krebs par leur liaison avec les acides u-cetglutarate et oxaloacétique. Le groupe chimique le moins représenté chez les trois espèces est celui des acides aminés soufrés (méthionine et cystéine).

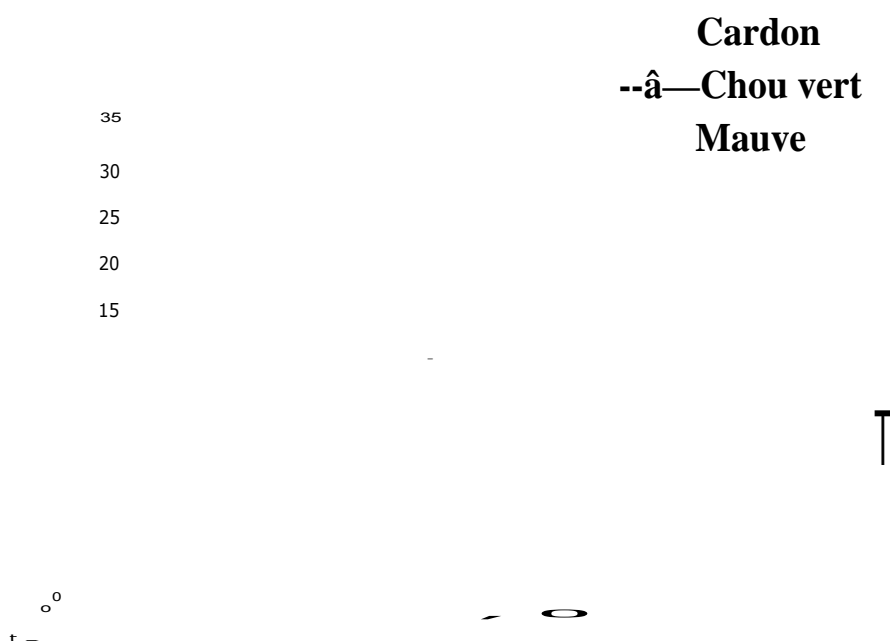


Figure 11.15. Teneurs en % de protéine totale des acides aminés par groupes chimiques.

c- Evaluation de la valeur biologique des protéines du cardon, de la mauve et du chou vert:

Si l'on établit une comparaison entre la composition des acides aminés essentiels du cardon, de la mauve et du chou vert et celle des protéines d'origine animale d'une part et celle des protéines d'origine végétale d'autre part, il est possible de tirer des conclusions intéressantes (**Tableau 11.4.**).

Ainsi du point de vue qualitatif, les protéines du cardon et de la mauve ont une composition en acides aminés essentiels très satisfaisante, par contre celle du chou vert est très moyenne. Ces compositions sont caractérisées par un déficit en isoleucine et en méthionine, et par un taux très intéressant chez le cardon et la mauve en thréonine et en phénylalanine dépassant même celui des céréales et des farines animales.

D'une façon générale, le taux des acides aminés essentiels du cardon et de la mauve se rapproche de celui des céréales mais il est inférieur à celui des farines animales et des légumineuses. Quand on sait que les céréales fournissent 60% des protéines de la ration alimentaire algérienne (**Autret. 1978**), on mesure tout l'impact que peut représenter cette constatation.

Tableau 11.4. Analyse comparée de la composition en acides aminés essentiels du cardon, de la mauve et du chou vert avec celle des farines animales et végétales.

Acides aminés essentiels	Cardon	Mauve	Chou vert	Mais (2)	Blé (3)	Soja (3)	Poisson (1)	Références
Lysine	3.34	5.00	2.27	2.53	2.50	6.20	7.50	(1) Varela (1969)
Méthionine	1.09	1.05	0.72	1.01	1.15	1.00	3.16	
Isoleucine	3.64	3.64	2.98	3.30	6.54	4.70	4.75	
Leucine	6.84	6.54	3.36	11.03	4.75	8.30	7.33	(2) Mhallal (1986)
Thréonine	3.49	4.09	2.17	2.46	2.70	3.90	4.08	(3) Ammour (1984)
Phénylalanine	5.24	4.24	2.12	3.63	4.81	5.30	3.68	
Valine	4.13	4.27	3.47	4.35	3.91	5.50	4.72	

L'estimation de la valeur biologique des protéines de nos trois espèces de légumes, nous permettra de vérifier les constatations réalisées à partir du **tableau 11.4**. Cette estimation est faite selon **Mitchell et Block (1946) et Oser (1959)**. Il s'agit en effet de la détermination de la valeur biologique des protéines de l'échantillon étudié par leur composition en acides aminés essentiels et par comparaison à la protéine de l'oeuf considérée comme protéine de référence.

Selon les résultats obtenus (**Tableau 11,5.**) on peut déduire que la mauve (53.97) et le cardon (53.06) ont une valeur biologique égale. Les trois types de légumes sont déficients en méthionine et en isoleucine. Concernant seulement le cardon et la mauve, la thréonine et la phénylalanine sont représentées par des teneurs acceptables comparées à celles des protéines de l'oeuf. La même interprétation peut être faite pour la leucine et la valine.

Les protéines du cardon et de la mauve ont un taux intermédiaire d'acides aminés essentiels comparé à celui des protéines végétales notamment le soja (**Taleb Bendiab et al, 1989**), le blé (Taj 1989), et l'orge (**Autret, 1978**), traduisant ainsi une valeur biologique assez élevée (Tableau 11.5.). Selon **Mitchell et Block (1946)** le facteur limitant pour les trois espèces est la méthionine, il faut préciser que la méthionine est aussi le facteur limitant de nombreuses espèces végétales (**Taleb Bendiab et al., 1990**).

Lorsqu'on calcule le taux des acides aminés essentiels par rapport aux acides aminés totaux et celui des acides aminés essentiels par rapport aux acides aminés non essentiels, on obtient pour les deux taux **0.31** et **0.46** respectivement chez le cardon, **0,29** et **0.41** respectivement chez la mauve et **0.24** et **0.32** chez le chou vert. À partir de ces résultats, on remarque le cardon et la mauve possèdent des taux très proches du taux idéal (**0.4** et **0.6** respectivement) suggéré par FAO/WHO (1990).

Tableau 11.5. Valeur biologique des protéines du cardon, de la mauve et du chou vert comparée à celle des farines végétales.

Acides aminés essentiels	Œuf	Cardon		Mauve		Chou vert		Soja		Blé		Orge	
	A	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Lys	7.20	3.34	46.38	5.00	69.44	2.27	31.52	6.2	86.1.	2.50	34.7	3.50	48.6
Thr	4.10	3.49	51.22	4.09	63.46	2.17	29.28	3.9	95.1	2.70	65.8	2.90	70.7
Val	7.30	4.13	56.57	4.27	64.49	3.47	47.53	5.5	75,3	3.91	53,5	4.40	40.2
Met	4.10	1.09	26.58	1.05	25.60	0.72	17.56	1.0	24,3	1.15	28.0	1.40	34.1
Iso	8.00	3.64	54.50	3.64	45.50	2.98	37.25	4.7	58.7	6.54	81.7	6.50	81.2
Leu	9.20	6.84	74.34	6.54	71.08	3.36	45.52	8.3	90.2	4.75	51.6	2.80	28.2
Phe	6.30	5.24	63.17	4.24	63.30	2.12	28.65	5.3	84.1	4.81	76,3	4.70	74.6
Facteur limitant		Méthionine 26.58		Méthionine 25.60		Méthionine 17.56		Méthionine 24.39		Méthionine 28.04		Leucine 28.04	
E.A.A Index		53.06		53.97		32.69		69.18		60.25		58.88	

(a): Teneur d'acides aminés en pourcentage en protéines totales

(b): Teneur d'acides aminés en pourcentage en protéines de l'œuf(a!A).

E.A.A index: acides aminés essentiels index ou indice de Oser.

Pour une étude plus approfondie, il existe aujourd'hui d'autres critères pour estimer la qualité des protéines d'un produit. Parmi ces critères, il y a l'indice d'hydrophobicité (HPS) des protéines (Dinev et al., 1995). L'HPS des protéines du cardon, de la mauve et du chou vert est présenté dans la figure 11.16.

Dinev et al. (1995) a étudié les protéines de 16 variétés de blé (*Triticaceae*) de point de vue structural et rôle des acides aminés hydrophobes dans la stabilité de la structure de ces protéines. Il en a déduit que les protéines ont une conformation stable lorsque leur HPS varie dans un intervalle compris entre 0.30 et 0.40. De ce fait, quand on analyse les données des protéines du cardon, de la mauve et du chou vert concernant leur HPS, qui est de 0.30, 0.34 et 0.35 respectivement, on peut dire que ces protéines sont parfaitement stables de point de vue structure.

En définitive, à part le chou vert, le cardon et la mauve ont une bonne qualité protéique qui peut rivaliser avec les plantes dites riches en protéines et sont une référence pour leur qualité protéique comme le soja, les céréales et les légumineuses. Pour cette raison, le cardon et la mauve peuvent être proposés dans les différents régimes alimentaires, afin de contribuer dans la qualité protéique en

particulier et la valeur alimentaire en général de ces régimes, moyennant une supplémentation en méthionine.



Figure 11.16. Indice d'hydrophobicité (HPS) des protéines.

2.2. Teneur de la fraction lipidique (matière grasse):

Les lipides forment une classe de constituants biologiques nutritionnellement importants pour la part calorifique et l'apport indispensable d'acides gras essentiels et de vitamines liposolubles qu'ils présentent dans la ration alimentaire. Les graisses et les huiles, qui ne se distinguent que par leur point de fusion, constituent les matières grasses ou corps gras. Ces corps gras sont des matières organiques insolubles dans l'eau, et plus ou moins hydrophobes. Ils peuvent être solubilisés par les solvants organiques peu ou non polaires (éthanol, isopropanol, acétone, éther éthylique,...).

a. Calcul du rendement massique des huiles du cardon, de la mauve et du chou vert:

Divers paramètres influent sur le taux de matière grasse comme la granulométrie, l'humidité et la nature du solvant et la méthode d'extraction utilisée. Beaucoup de travaux confirment que l'extraction réalisée par l'hexane permet d'obtenir un meilleur rendement d'huile par rapport à d'autres solvants comme l'éther de pétrole ou le chloroforme. Dans la **figure 11.17.** sont illustrés les rendements massiques des huiles du cardon, de la mauve et du chou vert.



Figure 11.17. Rendement massique en % des huiles.

Comme tous les végétaux verts en général et les légumes en particulier, nos trois espèces renferment une quantité de matière grasse qui n'a aucune incidence significative sur l'apport énergétique. Elle est de 1.25 ‰, 2.63% et 1.30 ‰ dans le cardon, la mauve et le chou vert respectivement. Ces résultats sont conformes à ceux trouvés dans d'autres légumes étudiés (Gupta et Wagle, 1988 ; Almazan et al., 1997; Mosha et Gaga, 1999; Odhav et al., 2007), tout en respectant le concept qui dit que la teneur en huile est inversement proportionnelle à celle de l'eau.

b. composition en acides gras de l'huile du cardon, de la mauve et du chou vert:

La composition des acides gras de l'huile du cardon est représentée dans la **figure 11.18.**, celle de la mauve dans la figure 11.19. et celle du chou vert dans la **figure 11.20.** L'observation de ces données montre que l'huile de nos trois espèces se caractérise par la présence des acides gras $C_{16}:0$, $C_{16}:1$, $C_{18}:0$, $C_{18}:1$, $C_{18}:2$, $C_{18}:3$ et $C_{20}:0$ correspondant respectivement à l'acide palmitique, palmitoléique, stéarique, oléique, linoléique, linoléique et arachidique. La longueur de chaîne des acides gras de nos échantillons est de taille moyenne, c'est à dire qu'elle est comprise entre C_{16} et C_{18} . Cette caractéristique va influencer la nature de l'huile, lui conférant une viscosité et une bonne fluidité, facilitant les manipulations dans les laboratoires des matières grasses.

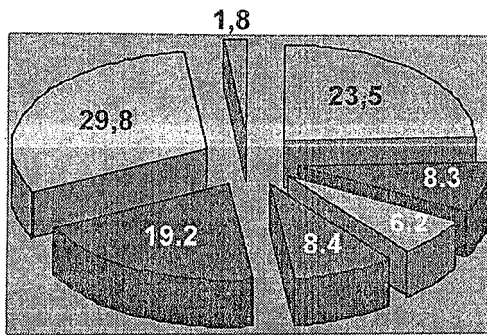


Figure 11.18. Composition en acides gras des huiles du cardon (%).

l0 Acide Palmitique

nAcide
pamitoléique

D Acide stéarique

n Acide oléique

Im Acide linoléique

D Acide linoléénique

D Acide arachidique

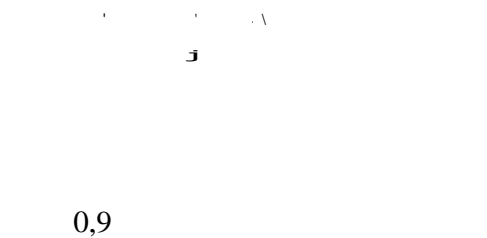


Figure 11.19. Composition en acides gras des huiles du chou vert (%)

D Acide Palmitique

D Acide palmitoléique

D Acide stéarique

D Acide oléique

DAcide linoléique

D Acide linoléénique

D Acide arachidique

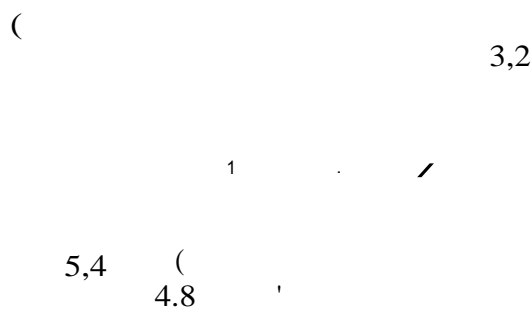


Figure 11.20. Composition en acides gras des huiles de la mauve (%)

DAcide Palmitique

DAcide palmitoléique

El Acide stéarique

D Acide oléique

D Acide linoléique

El Acide linoléénique

D Acide arachidique

L'huile de nos trois espèces de légumes est riche en acides gras essentiels comme acide linoléique et acide linolénique à savoir 29.8 ‰ et 19.2% respectivement pour le cardon, 53.5 ‰ et 13.5% respectivement pour la mauve et 49.5% et 25.1 ‰ respectivement pour le chou vert.

Nous constatons aussi l'absence totale d'acide gras à nombre de carbone inférieur à 14 et supérieur à 18 ainsi que l'inexistence de l'acide érucique qui fait de l'huile de nos trois échantillons, une huile non toxique.

Lorsqu'on fait une analyse quantitative des résultats de la composition en acides gras des trois espèces, on en déduit les deux remarques suivantes:

les trois acides gras essentiels (acide oléique, linoléique et linolénique) représentent les 59%, 73.5% et 81.6 ‰ des acides gras totaux du cardon, de la mauve et du chou vert respectivement, les acides gras mono insaturés et poly insaturés représentent par rapport aux acides gras totaux 17.1 ‰ et 50.5 ‰ respectivement pour le cardon, 7.3% et 68 ‰ respectivement pour la mauve et 8.1 ‰ et 74.3 ‰ respectivement pour le chou vert (**Tableau 11.6.**).

Tableau 11.6. Composition en % des groupes d'acides gras.

	Acides gras saturés	Acides gras mono insaturés	Acides gras poly insaturés
Cardon	31.5	16.7	49
Mauve	24.3	7.2	67
Chou vert	17.5	8.2	74.6

Quand on compare la composition de l'huile de nos trois échantillons avec celle de l'huile d'olive (**Harwood et Ramon, 2000; Mauro, 2003; Virot et al., 2007**) on constate qu'elle est mieux pourvue en acide linoléique et linolénique mais déficitaire en acide oléique. De plus, il est intéressant de noter la valeur très élevée de l'acide linolénique (*omega 3*) dans les trois huiles, ce qui est un bon argument pour la santé humaine surtout les maladies cardiovasculaires.

Toutes ces caractéristiques constituent à notre avis des critères valables pour identifier avec précision l'huile de ces trois espèces de légumes, et lui confère d'excellentes qualités diététiques acceptables pour la nutrition humaine et animale.

2.3. Teneur des sucres totaux:

Ce qui caractérise les oses chez les légumes, c'est leur grande diversité : pentoses, désoxypentoses, hexoses, désoxy-hexoses, didésoxy-hexoses, acides uroniques, polyols, esters, éthers...

Plusieurs centaines de composés, certains universels, d'autres étroitement spécifiques d'un groupe végétal, ont été décrits. Certains peuvent exister à l'état libre d'autres ne sont connus qu'engagés dans des combinaisons hétérosidiques, très souvent ils sont inclus dans des polymères. Nous citerons, à titre d'exemple, quelques oses et dérivés d'oses parmi les plus courants chez les légumes (**Colonna et Elöbler, 1991**).

Il y a les tétroses représentés par les thréoses et les érythroses et qui n'existent pas à l'état libre. Par exemple l'érythrose-4-phosphate joue un rôle essentiel dans l'aromatisation. Chez les pentoses le ribose est universel et ses esters phosphoriques ont une importance métabolique fondamentale. L'arabinose et le xylose sont des constituants habituels des polysaccharides comme les hémicelluloses, polysaccharides pectiques et polymères des sécrétions végétales (gommes, mucilages). On les rencontrera également dans divers hétérosides, notamment phénoliques.

La plupart des hexoses ont une répartition quasi universelle : c'est le cas du glucose ou du mannose et aussi du galactose. Si le glucose est fréquent à l'état libre et aussi bien que combiné dans des structures polysaccharidiques (amidon et cellulose), le mannose et le galactose sont presque exclusivement connus qu'à l'état de polymères comme les mannanes ou les galactomannanes chez les *Fabaceae*.

Le cétose correspondant au glucose est le fructose. Abondant à l'état libre dans les fruits, il est tout aussi fréquent à l'état de disaccharide (saccharose). Ce cétose peut aussi constituer des polymères de réserve, les fructanes comme la phléine et les inulines, ces derniers très présents chez les *Asteraceae* comme le cardon (Pollock et Chatterton, 1988).

Parmi les produits d'oxydation des hexoses par déshydrogénases spécifiques, il y a les acides uroniques. La fonction alcool primaire est oxydée en acide carboxylique. Les acides glucuronique et galacturonique sont des constituants habituels des polysaccharides pariétaux (pectine) et de la plupart des sécrétions polysaccharidiques comme le mucilage des *Malvaceae* (Bruneton, 1999).

Dans notre présent travail, les résultats des sucres totaux montrent que le chou vert a une teneur deux fois plus élevée que celle de la mauve et une fois plus élevée que celle du cardon. Lorsque nous analysons les données de sucres totaux des différents légumes cités en littérature (GuihGuerrero *et al.*, 1998; Mosha et Gaga, 1999 ; Trichopoulou *et al.* 2000; Odhav *et al.*, 2007) nous remarquons que les valeurs obtenues sont du même ordre que ceux trouvés chez nos trois échantillons à quelques exceptions près (Figure 11.21).

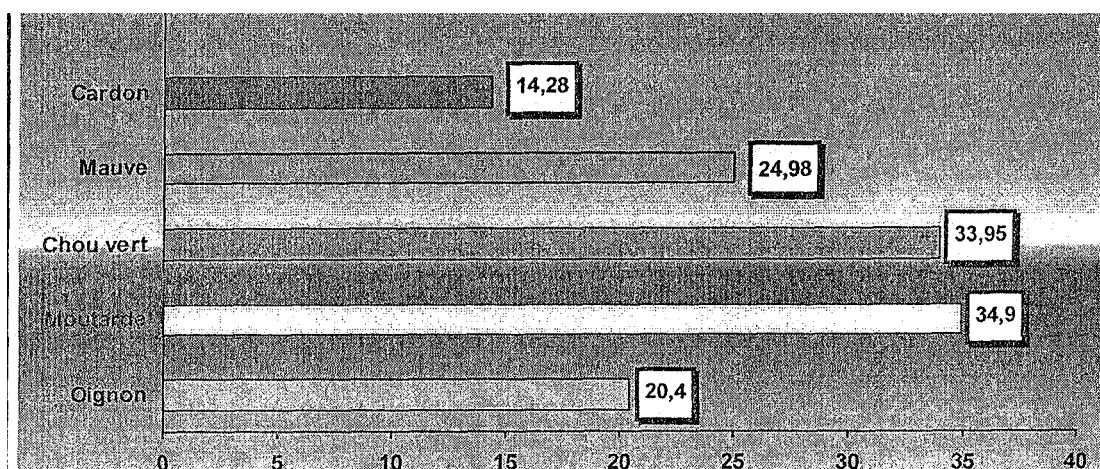


Figure 11.21. Taux des sucres totaux en (% MS) du cardon, de la mauve et du chou vert comparé à celui d'autres légumes.

Analyse des sucres et des acides organiques chez la mauve: cette analyse n'a été réalisée que chez la mauve à cause de manque de données dans ce domaine concernant la mauve. Deux sucres ont été identifiés chez la mauve, il s'agit du saccharose ou sucrose (2.68 mg/100g MF) et du glucose (0.66 mg/100g MF), cependant, le fructose n'a pas été détecté. Les sucres sont responsables du goût sucré

des aliments, ils possèdent un pouvoir sucrant relativement différent en effet, il a été rapporté que le fructose possède le pouvoir sucrant le plus élevé (**1.1 - 1.8**), suivi du sucrose (1.0) et du glucose (**0.5 - 0.8**) (**Alexander, 1998**). Les acides organiques déterminés dans la mauve sont l'acide malique (1.02 meq/100g ME) et l'acide citrique (0.26 meq/100g MF) Avec l'acide oxalique, ces deux acides organiques sont largement distribués dans le règne végétal. Les acides organiques sont connus comme des constituants phytochimiques à pouvoir antioxydant (**Lin, 2003 ; Silva et al., 2004**) et contribuent aussi aux propriétés organoleptiques des fruits et légumes (**Vaughan et Geissler, 1997**).

2.4. Teneur des fibres alimentaires:

L'expression fibre alimentaire universellement adoptée par les nutritionnistes et les diététiciens est difficile à définir car elle représente un concept nutritionnel et physiologique qu'une catégorie définie de substances chimiques. La notion de fibre, d'abord appliquée à la cellulose, devenue par la suite fibre brute (résidu végétal résistant aux traitements chimiques acides et alcalins) a évolué vers le concept, physiologique, de fibres alimentaires (résidu végétal résistant à la digestion par les enzymes du tractus digestif de l'homme).

L'apport en fibres dans un régime normal provient majoritairement des végétaux qui constituent notre alimentation : fruits, légumes, graines diverses et produits céréaliers (**Bruneton, 1999**). On peut distinguer deux groupes d'effets pour les fibres alimentaires

- *Action sur le transit intestinal:* l'effet est double. D'abord un effet sur la masse des selles qui est augmentée dans des proportions souvent importante, et un effet sur la durée du transit qui est normalisé autour de 48h : raccourcissement des transits longs et allongement des transits courts.
- *Action métabolique:* la consommation régulière de fibres diminue la cholestérolémie et les LDL plasmatiques. Les travaux publiés concernent essentiellement les interactions entre les fibres et la cholestérolémie et entre les fibres et la glycémie. Plusieurs études épidémiologiques font ressortir que la mortalité par maladies cardiovasculaires est plus faible chez les consommateurs réguliers de fibres alimentaires (**Corpet, 1989 ; Easbwood, 1990 ; Lairon, 2001**).

Concernant les résultats de nos trois légumes, nous remarquons qu'ils sont sensiblement égaux, par rapport à ceux de la bibliographie, ils sont en adéquation (Gupta et Wagle, 1988 ; Almazan et al., 1997 ; Vijayakumari et al., 1997 ; Mosha et Gaga, 1999). Les résultats des fibres alimentaires des trois légumes sont illustrés dans la figure 11.22.

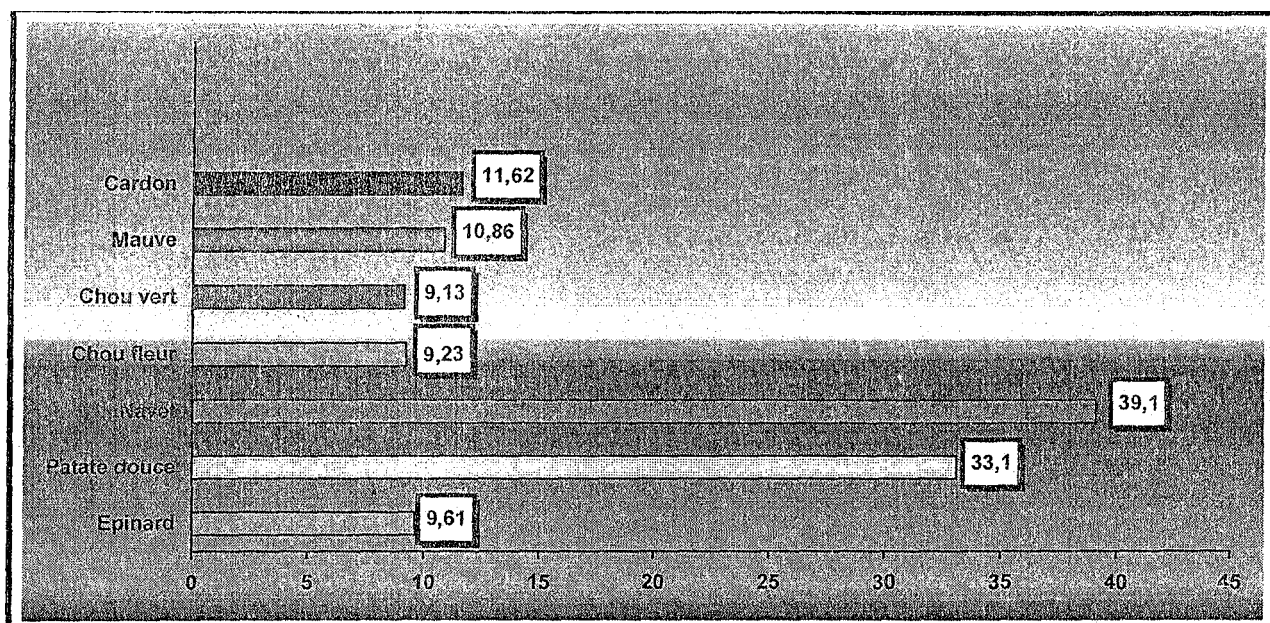


Figure 11.22. Taux des fibres alimentaires en % MS du cardon, de la mauve et du chou vert comparé à d'autres légumes.

2.5. Teneur de la matière minérale (cendres):

La composition minérale des légumes est importante à connaître pour de multiples raisons: alimentaires et toxicologiques. De nombreux travaux sur la composition minérale des légumes ont été réalisés (Gupta et Wagle, 1988 ; Vijayakumari et al., 1997; Mosha et Gaga, 1999 ; Gupta et al., 2005).

Les résultats de la matière minérale des trois légumes présentés dans la figure 11.23. montrent qu'ils sont conformes avec les résultats des différents légumes étudiés en littérature. En comparant nos trois échantillons, nous remarquons que le taux de matière minérale chez le chou vert est de deux fois moins

que celui chez le cardon et la mauve, même si ce taux reste acceptable par rapport à ceux des autres légumes cités en bibliographie.

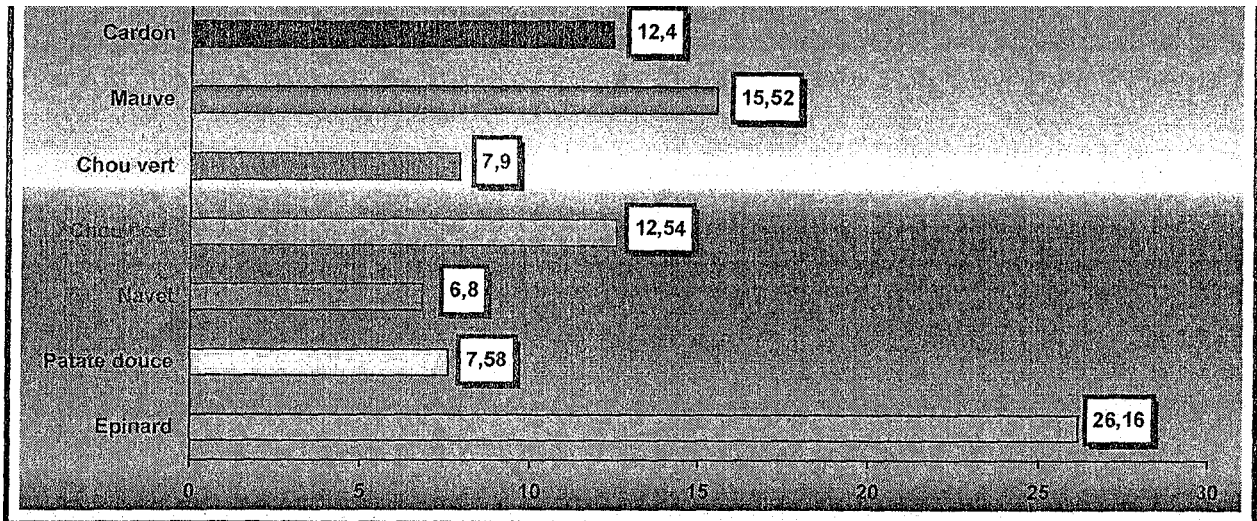


Figure 11.23. Taux de la matière minérale en % de MS du cardon, de la mauve et du chou vert comparé à d'autres légumes.

3. Extractions sélectives des métabolites secondaires du cardon, de la mauve et du chou vert:

Avant de calculer les rendements des métabolites secondaires (tannins, flavonoïdes et alcaloïdes), on doit tout d'abord vérifier leur présence au sein de nos échantillons. Pour cela, nous avons utilisés des tests phytochimiques simples, utilisant trois solvants de polarité différente. C'est l'apparition d'une coloration, d'une précipitation ou encore d'une floculation par l'intermédiaire de certains réactifs spécifiques qui va affirmer la présence et/ou l'absence des différentes familles de métabolites secondaires existants dans la plante. Le **tableau 11.7.** montre les résultats obtenus pour les tannins, les flavonoïdes et les alcaloïdes du cardon, de la mauve et du chou vert lors de ces analyses.

Tableau 11.7. Tests phytochimiques réalisés sur le cardon, la mauve et le chou vert.

	Epuisement par l'eau chaude			Epuisement par l'éthanol			Epuisement par l'étherdiéthylique		
	Tannins	Flavonoïdes	Alcaloïdes	Tannins	Flavonoïdes	Alcaloïdes	Tannins	Flavonoïdes	Alcaloïdes
Cardon	+++	++			++	++	NI)		++
Mauve	++		-	++	NI)	+	NI)	NI)	-
Chou vert	+	+	+	++	1-	+++	NI)	ND	+

Légende: (+++) ———* test fortement positif

(++) D **test positif**

(+) **test faiblement positif**

(-) -I **test négatif**

(ND) > **test non déterminé**

Après l'analyse des résultats, ces tests nous ont confirmés la forte présence chez nos trois espèces de légumes de tannins et de flavonoïdes. Par contre les alcaloïdes sont très faiblement représentés chez la mauve, ce qui n'est pas le cas pour le cardon et le chou vert.

La mise en évidence des tannins, des flavonoïdes et des alcaloïdes dans nos trois espèces grâce à ces tests phytochimiques, nous a poussé à effectuer l'estimation de leur rendement massique. Les extraits des tannins, des flavonoïdes et des alcaloïdes récupérés après évaporation à sec et sous pression réduite ont été pesés pour déterminer le poids sec résultant (Rendement massique). Le rendement a été déterminé par rapport à 100 g du matériel végétal sec et les résultats sont exprimés en pourcentage (Figure 11.24.).

Ces résultats viennent confirmer les résultats des tests phytochimiques réalisés précédemment. En effet, nous remarquons les rendements appréciables et élevés des tannins et des flavonoïdes chez les trois légumes, alors que pour les alcaloïdes, leur rendement chez la mauve est faible (0.24%) par rapport à ceux du cardon (2.80%) et du chou vert (1.97%). Ces résultats ainsi que ceux des tests phytochimiques peuvent de prime abord nous amener à dire que nos trois échantillons contiennent des quantités remarquables en tannins, flavonoïdes et alcaloïdes, mise à part la mauve en alcaloïdes.

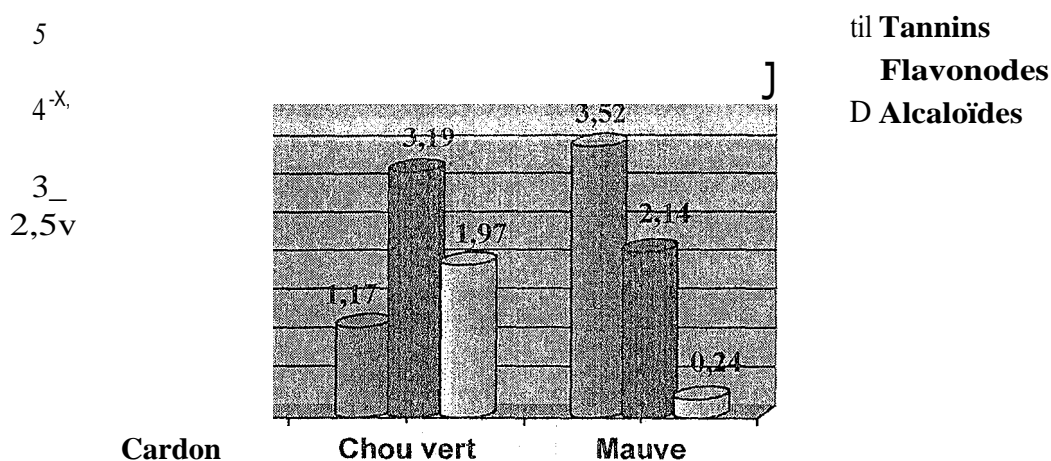


Figure 11.24. Rendement massique en % des tannins, des flavonoïdes et des alcaloïdes.

En examinant la **figure 11.24.**, une remarque nous interpelle et qui peut être complètement fortuite: nos trois espèces de légumes détiennent chacune le meilleur rendement pour chaque métabolite, à savoir le cardon en alcaloïdes (2.80%), la mauve en tannins (3.52%) et le chou vert en flavonoïdes (3.19%). La même remarque peut être faite si nous nous basons sur le plus faible rendement à savoir le cardon en flavonoïdes (1.81 %), la mauve en alcaloïdes (0.24%) et le chou vert en tannins (1.17%).

4. Teneurs en tannins condensés et tannins hydrolysables:

La **figure 11.25.** rassemble les résultats des tannins condensés et hydrolysables chez le cardon, la mauve et le chou vert. Il ressort de notre analyse que tout d'abord les tannins condensés constituent la majorité des tannins chez nos trois espèces. Ensuite, de point de vue tannins totaux, le cardon possède le taux le plus élevé avec 0.178 %. Ces taux chez nos trois espèces de légumes prouvent qu'elles ne sont pas toxiques et ne présentent aucun danger pour la santé humaine, c'est une des raisons que ces espèces végétales sont non seulement comestibles mais aussi appréciés. A ce propos, plusieurs travaux en bibliographie ont montré que généralement les plantes deviennent toxiques s'ils contiennent un taux de tannin aux alentours de 1 % (Belarbi., 2004).

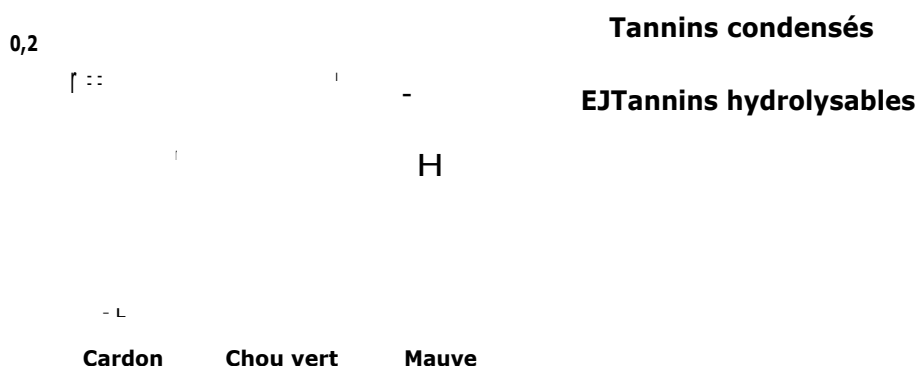


Figure 11.25. Teneurs en (%) des tannins condensés et des tannins hydrolysables.

5. Teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes:

L'étude quantitative des extraits bruts au moyen de dosages spectrophotométriques avait pour objectif la détermination de la teneur totale des polyphénols et les flavonoïdes. Dans ce cas, deux courbes d'étalonnage ont été tracées et réalisées avec un extrait de catéchine et un extrait d'acide gallique à différentes concentrations. Des mesures de densités pour chaque extrait ont été réalisées à 660 nm pour les polyphénols et à 510 nm pour les flavonoïdes.

Les quantités de polyphénols et de flavonoïdes correspondantes ont été rapportées en équivalent gramme de l'étalon utilisé et déterminés par l'équation de type $y=ax\%$. La **figure 11.26.** présente les teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes du cardon, de la mauve et du chou vert.

Le chou vert présente la densité polyphénolique la plus élevée (**58 mg/100g**) par rapport au cardon (45 mg/100g) et la mauve (**48 mg/100g**). Comparer aux travaux cités en bibliographie (Figure 11.27.), les taux de nos trois légumes restent moyens par rapport aux autres légumes puisqu'ils sont inférieurs à ceux de l'oignon et de l'épinard, et supérieurs à ceux de la laitue et le poireau (Proteggenta et *al.*, 2002 Schaffer, 2005).

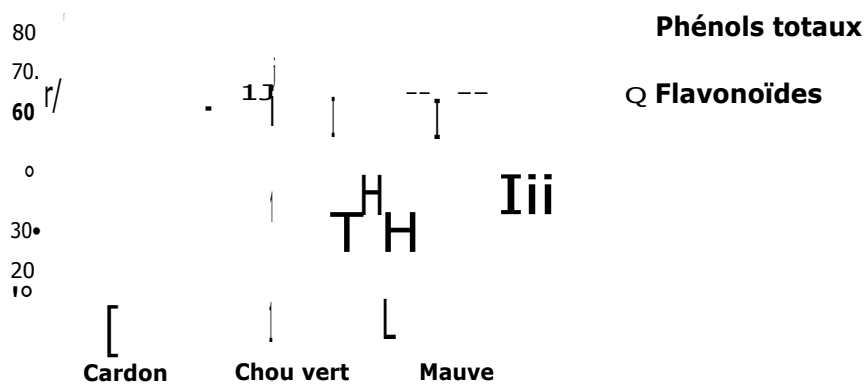


Figure 11.26. Teneurs en phénols totaux (mg/100g) et flavonoïdes (mg/kg).

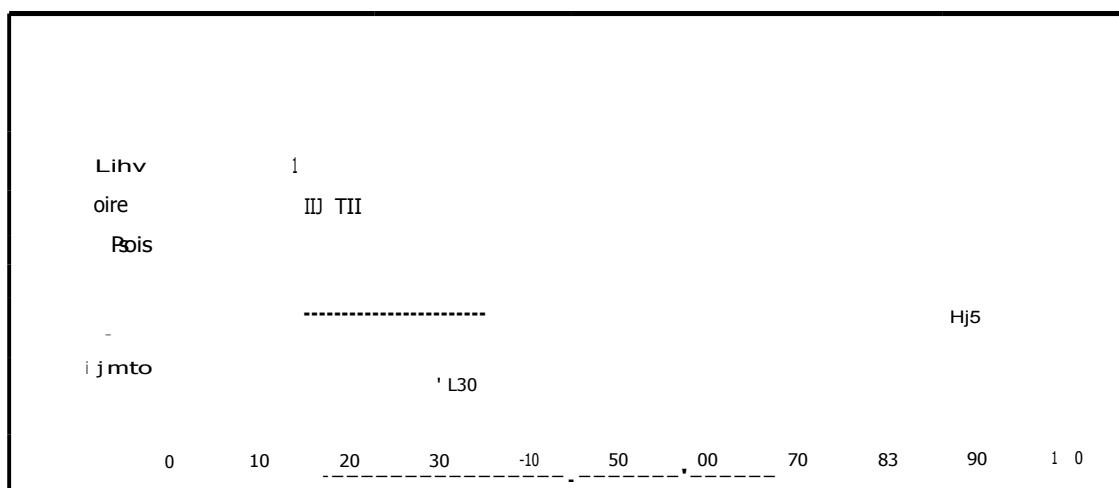


Figure 11.27. Variation du taux de phénols totaux (mg/100g) chez quelques légumes.

Concernant la teneur en flavonoïdes, c'est encore le chou vert qui détient la teneur la plus élevée (74.6 mg/kg) par rapport au cardon (43.50 mg/kg) et la mauve (60.72 mg/kg). **Lugasi et al.** (2003) ont travaillé sur un grand nombre de fruits et légumes, dans le but de déterminer leurs teneurs en flavonoïdes (**Tableau 1.9.**). En comparant nos résultats avec ceux de **Lugasi et al.**, nous constatons que nos trois échantillons possèdent des teneurs en flavonoïdes acceptables par rapport à ceux du brocoli, du chou blanc et du poivron. Cependant, comparé à ceux de l'épinard, des deux variétés de l'oignon et

du céleri, nous pouvons classés nos trois espèces de légumes parmi les espèces végétales pauvres en flavonoïdes.

6. Composés antinutritionnels:

Parmi les composés antinutritionnels, notons que seuls les tannins et l'inhibiteur de trypsine ont été analysés chez les trois légumes étudiés. La teneur de ces deux composés antinutritionnels et la teneur des phénols totaux du cardon, de la mauve et du chou vert sont résumées dans le **tableau 11.8**.

Tableau 11.8. Teneurs en phénols totaux, en tannins totaux et en inhibiteurs de trypsine.

	Phénols totaux (mg/100g)	Tannins totaux (%)	Inhibiteurs de trypsine (TUI/mg de protéine)
[Cardon	45	0.178	1.43
Mauve	48	0.	3.15
Chou vert	58	0.136	2.60

Ici, nous allons discuter seulement les résultats de l'inhibiteur de trypsine, ceux des phénols totaux et des tannins totaux ont etc discutés précédemment (**Voir ci-dessus**) En bibliographie l'inhibiteur de trypsine est largement étudié surtout chez les légumineuses et dans les graines des végétaux (Menegatti et *al*, 1985 , Kraemer et *ai*, 1987 , Ramasarma et *ai*, 1994 , Vijayakumari et *ai*, 1997) où il se trouve en quantité importante et induisant de ce fait des effets antinutritionnels chez les animaux a savoir un retard de croissance, une hypertrophie du pancréas et une carence anormalement élevée en acides aminés soufrés (**Liener, 1980**). Par contre, du fait que chez les légumes l'inhibiteur de trypsine n'est pas très représenté, il n'existe que très peu de travaux a ce sujet

En analysant les résultats de l'inhibiteur de trypsine chez nos trois espèces de légumes, nous pouvons affirmer que la mauve est la mieux pourvue en inhibiteur de trypsine (3.15 TUI/mg de protéines) que

le chou vert (2.60 TUI/mg **de protéines**) et le cardon (**1.43 TUI/mg de protéines**). Comparer avec le peu de travaux réalisés chez les plantes vertes (**Gupta et Wagle, 1988; Mosha et Gaga, 1999**), nous pouvons dire que les résultats des trois légumes sont en adéquation avec ceux en bibliographie comme l'épinard (2.46 **TUI/mg de protéines**), le chou fleur (3.61 **TUI/mg de protéines**) ainsi que la moutarde (**2.06 TUI/mg de protéines**).

L'étude comparative de ces trois composés considérés comme antinutritionnels à savoir les phénols T totaux, les tannins et l'inhibiteur de trypsine de nos trois espèces de légumes a montré qu'ils ne présentent aucune menace contre la santé humaine. Il est à signaler que le degré d'accumulation de ces facteurs antinutritionnels est lié à l'espèce végétale et surtout à l'âge de cette espèce.

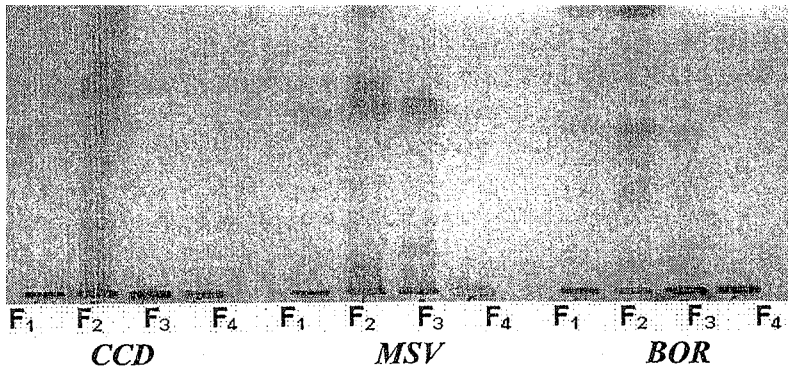
7. Screening chimique général par CCM:

Pour chacun des légumes de cette étude, cardon (*CCD*), mauve (*MSV*) et chou vert (*BOR*), nous disposons de quatre extraits nommés **Fi à F4**. **Fi** est l'extrait hydrométhanolique (80/20 ; V/V) du matériel végétal et les trois autres fractions sont des extraits liquide/liquide successifs de la fraction aqueuse de Fi par, respectivement, de l'AcOEt (**F2**) et du BuOH (**F3**), (**F4**) étant la fraction aqueuse épuisée(cf **chapitre précédent**).

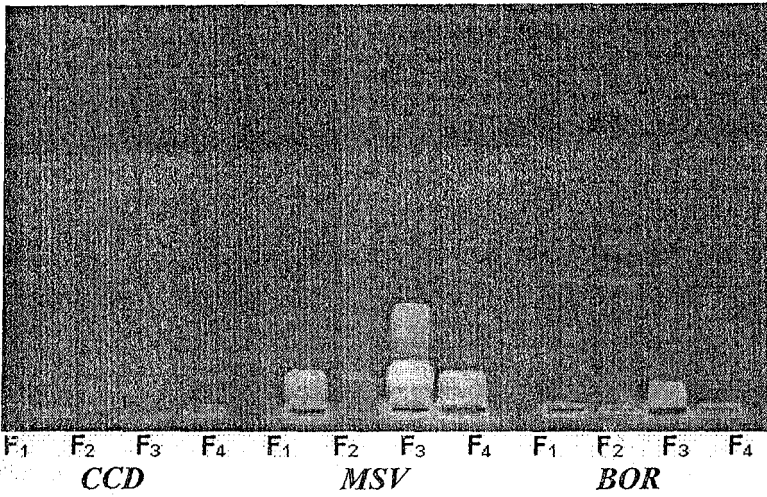
T Des chromatographies sur couche mince (CCM) préliminaires ont été menées sur les fractions Fi à F4 des trois légumes pour avoir un aperçu de la nature des constituants que l'on peut rencontrer chez ces espèces. Pour cela, une partie des extraits **Fn** ont été solubilisés dans du méthanol pur et déposés sur plaques de CCM qui ont ensuite été éluées dans les systèmes de solvants décrits précédemment et T révélés avec divers réactifs pour permettre une première orientation sur les classes de composés présentes dans les échantillons à analyser (**Figure I1.28a., 28h. et 28c.**). Les informations recueillies ont été confrontées aux données bibliographiques collectées sur les familles et les genres de ces plantes.

Solvant de mkraeton: $\text{tol} / \text{AcOEt} / \text{MeOH} (80 : 18 : 2)$

Rêvêiator,



Réactif à la vanilline
sulfurique.



Réactif de Neu
(observation 366 nm)

Figure II.28a. CCM préliminaires des fractions F_n , développement $\text{Tol} / \text{AcOEt} / \text{MeOH} (80 : 18 : 2)$.

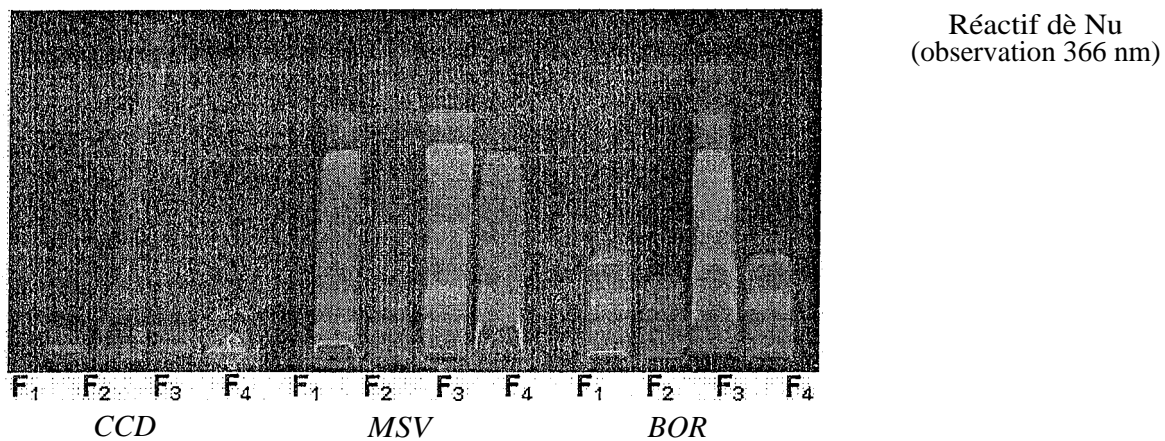
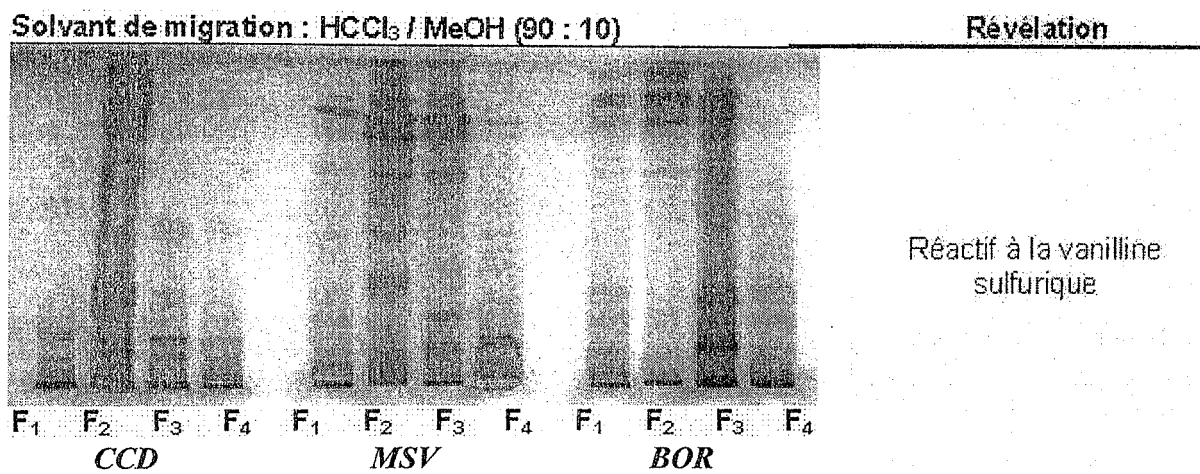


Figure IL28b. CCM préliminaires des fractions F_n , développement $\text{HCCl}_3 / \text{MeOH}$ (90: 10).

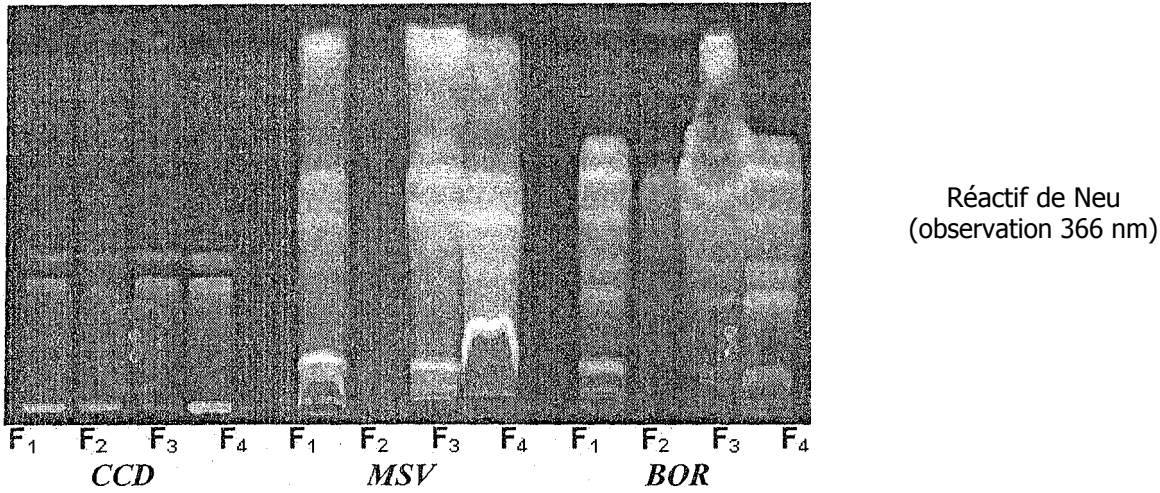
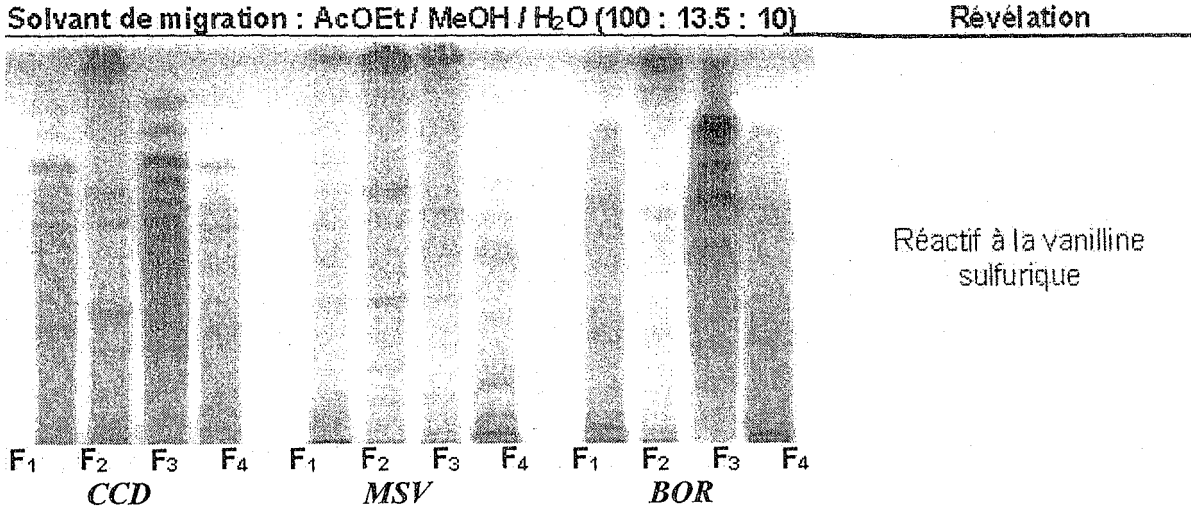


Figure 11.28e, CCM préliminaires des fractions F_n, développement AcOEt / MeOH / H₂O (100: 13.5: 10).

7.1. Interprétation des CCM du chou vert (*BOR*):

Le criblage chimique en CCM a permis de mettre en évidence la présence de flavonoïdes (réactif de Neu, fluorescence jaune-orange sous lumière UV) dans les fractions polaires de *BOR*.

On peut aussi émettre l'hypothèse que les composés polaires, qui apparaissent en rouge révélés à la vanilline sulfurique, sont des tanins (composés fréquents dans les *Brassicaceae*). Pour valider cette hypothèse, nous avons utilisé un révélateur propre aux tanins. La coloration en rouge orange obtenue avec le réactif au sel de Bleu solide B de ces composés confirme que ce sont des tanins.

7.2. Interprétation des CCM du cardon (*CCD*):

L'étude des différentes CCM de *CCD* nous a montré que, à l'instar des extraits de *MSV* et *BOR*, *CCD* semble contenir des tanins (révélés en rouge à la vanilline sulfurique) (**Figure II.28b**). Cela a été confirmé par la révélation au réactif au sel de Bleu solide B. Les extraits polaires de *CCD* (*Fi* et *F3*) semblent également contenir quelques flavonoïdes assez polaires. Deux d'entre eux semblent majoritaires. En outre, bien que le cardon a été trouvé riche alcaloïdes d'après les résultats des tests phytochimiques (**Voir tableau 11.7**), les extraits de *CCD* ne semblent contenir d'alcaloïdes puisqu'on n'observe pas de réaction sur CCM avec le réactif de Dragendorff (f d'alcaloïdes).

7.3. Interprétation des CCM de la mauve

L'étude par CCM des fractions *Fn* de *MSV* (**Figure II.28b**) montre la présence marquée de flavonoïdes dans les fractions *Fi* et *F3* (fluorescence en vert ou jaune-orangé avec le réactif de Neu observée sous lumière UV). Les composés apolaires des fractions *Fi* à *F3* présentent des colorations violettes après révélation à la vanilline sulfurique à l'exception d'un composé majoritaire qui présente une teinte rougeâtre. Les Loïses espèces de légumes semblent avoir des composés en commun et des profils similaires pour certains extraits mais diffèrent par la concentration notamment en tanins et flavonoïdes.

Parmi les perspectives de ce travail sera d'isoler les composés majoritaires de *MSV* et certaines molécules de *CCD* afin de dégager des profils spécifiques pour chaque légume et de pouvoir les distinguer.

Lors de l'interprétation des résultats obtenus par réactions chimiques effectuées sur CCM, il faut garder à l'esprit qu'elles ne sont qu'indicatives, et que la présence de résultats faux positifs ou faux négatifs est fréquente.

8. Estimation du pouvoir antioxydant des polyphénols:

En raison de l'implication des flavonoïdes dans le pouvoir antioxydant de nombreuses plantes en général et légumes en particulier, nous avons choisi dans notre travail d'estimer ce pouvoir antioxydant de nos trois espèces de légumes par le biais de leurs extraits de flavonoïdes (EF).

L'activité antioxydante exprime la capacité de réduction des radicaux libres. Pour nos extraits, nous avons employé la méthode au DPPI-I, ce radical libre présente une coloration violet sombre, lorsqu'il est piégé par des substances antioxydantes, la forme réduite confère à la solution une coloration jaune pâle, le virage vers cette coloration et l'intensité de la décoloration de la couleur de la forme libre en solution dépend de la nature, la concentration et la puissance de la substance antiradicalaire.

Les extraits de nos trois échantillons ont présenté un très bon pouvoir antioxydant, ce sont les extraits de flavonoïdes obtenu après une extraction sélective, et ce qui est confirmé par les bibliographies que les flavonoïdes d'origine naturel sont des capteurs puissants de radicaux (**Bartoiková et al., 2003** ; **Heilerová et al., 2003** ; **Lahouel et Fillastre, 2004**; **Panichayupakaranant et Kaewsuan, 2004**; **Panovska et al., 2005**). L'absorbance du DPPH mesuré à 518 nm, montre une chute rapide de cette dernière dans un intervalle très réduit de la dose de l'extrait brut. Ce qui est observé dans les figures ci-dessous (**figures II.29a,, b. et c.**).

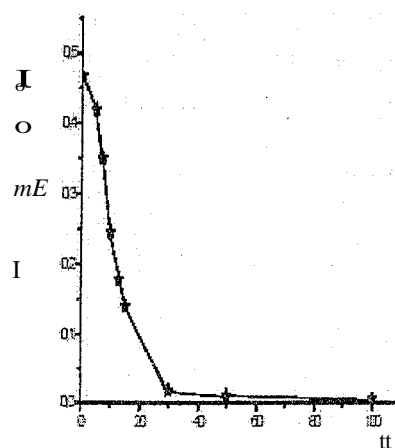
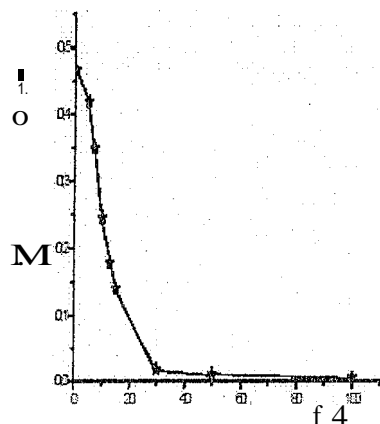


Figure 11.29a. Pouvoir antioxydant des EF de la mauve. Figure 11.29b. Pouvoir antioxydant des EF du chou vert.

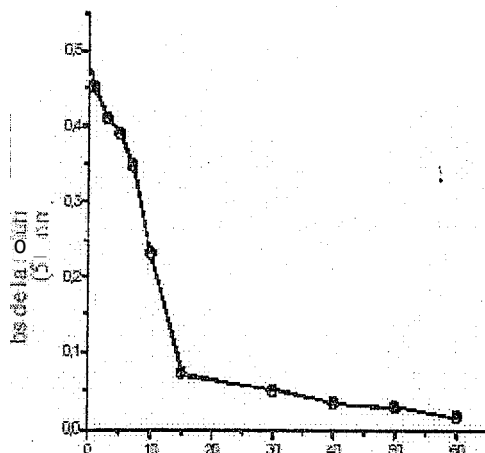


Figure 11.29e. Pouvoir antioxydant des EF du carbon

EL



CL

D

ril



t₅₀ dur-

Figure 29d. Activité antioxydante du Trolox Figure 29e. Activité antioxyclante de l'acide ascorbique.

Les figures ci-dessus représentent les absorbances du DPPH résiduel en fonction de la concentration de l'activité antioxydante de nos trois légumes (Figures 29a., **b. et e.**) elles montrent une diminution importante de l'absorbance à des doses très faibles comparée)aux courbes de réduction de l'absorbance des antioxydants standards (Figures 29d. **et e.**).

L'activité antioxydante de nos extraits exprimée en EC₅₀ (**Tableau 11.9**), ce paramètre à été apparemment introduit par Brand-Williams et ses collaborateurs et a été ensuite employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte 50 % de l'activité de DPPH (couleur) (**Molyneux, 2004**). Ces EC₅₀ sont déterminés

graphiquement des trois tests séparés dont l'abscisse représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage. La valeur de chaque EC_{50} exprime la concentration de l'extrait flavonoïdique exigée pour réduire le DPPH en solution de 50 %.

Tableau 11.9. EC_{50} et puissance antioxydante (ARP) du cardon, de la mauve et du chou vert comparé aux antioxydants standards (Acide ascorbique et Trolox).

	Cardon	Mauve	Chou vert	Acide ascorbique	Trolox
EC50	19.80	21.52	21.20	1.04	2.06
ARP	0.05	0.046	0.047	0.96	0.48

Comme il est indiqué dans le **tableau ii.B.** les flavonoïdes sont des excellents, antioxydants naturels, nos extraits des flavonoïdes possèdent des capacités de neutralisation du radical libre DPPH puissantes, puisqu'ils agissent à de faibles doses. Tous les EC_{50} sont très basses, comprises entre 19 et 21.5 **tg/ml**. Suivant ce paramètre, les capacités de balayage du radical sont classées dans l'ordre:

EF. Cardon > EF. Chou vert > EF. Mauve

Nous n'avons pas trouvé des études sur le pouvoir antioxydant de la mauve. Par contre, il existe quelques travaux récents traitant le pouvoir antioxydant du cardon et de quelques variétés de chou, (**Fernandes et al., 2007; Ayaz et al., 2008; Kukic et al., 2008**).

En comparant nos résultats (cardon et chou vert) avec ceux de la bibliographie nous remarquons qu'ils sont conformes, le cardon avec une EC_{50} de 21.5 **tg/ml** (**Kukic et al., 2008**) et le chou noir avec une EC_{50} de 24.6 **iiiig/ml** (**Ayaz et al., 2008**).

Troisième Partie

**Innovation dans l'extraction de la matière
grasse des légumes verts : Soxhlet
assisté par micro-ondes**

Introduction

De manière générale, la préparation d'échantillon préalable à l'analyse chimique se compose de deux étapes : extraction et analyse. Alors que l'étape analytique requiert en général quelques minutes, l'étape d'extraction nécessite plusieurs heures. C'est le cas de la méthode de Soxhiet, inventée en 1879, qui est la procédure d'extraction solide-liquide de référence.

Rapidement, les micro-ondes ont été utilisées comme source d'énergie pour l'extraction de molécules d'intérêt. Différents procédés d'extraction assistés par micro-ondes ont été développés dans le but de contrecarrer les limites des techniques d'extraction conventionnelles. Nous avons appliqué à nos matrices (légumes) un nouveau dispositif d'extraction des matières grasses pour les matrices solides alimentaires : le Soxhiet assisté par micro-ondes. Ce système récemment breveté a servi pour la première fois à cette application et publié par nos soins.

Chapitre I

Extraction par micro-ondes

L Introduction:

Comme ce fut le cas des siècles plus tôt pour les techniques de distillation, l'avènement des micro-ondes durant la fin du XX^e siècle, représente une nouvelle grande étape dans le domaine de l'extraction. Ce moyen de chauffage radicalement différent a révolutionné l'extraction grâce à des propriétés qui lui sont totalement exclusives: rapidité, chauffage sans inertie et sélectivité.

Le pouvoir énergétique des micro-ondes a été mis en évidence à la fin de la seconde guerre mondiale, fin 1945, d'une façon anecdotique par un physicien, le Dr Spencer, suite à l'oubli de son sandwich sur un émetteur d'ondes ! Alors que jusqu'ici, les micro-ondes ou hyperfréquences étaient uniquement utilisées comme vecteur d'information, elles investirent les foyers puis les laboratoires de chimie dans les années 80.

Depuis 1986 avec les travaux de **Ganzler et al.**, l'extraction assistée par micro-ondes a connu de profonds changements. A l'heure où «rapidité », «efficacité », et «sélectivité» sont devenus les caractéristiques principales d'une bonne technique d'extraction, les travaux sur l'extraction assistée par micro-ondes ne cessent de croître et les nouvelles techniques de fleurir. La chimie analytique a permis ces dernières années de réduire considérablement les temps d'analyse grâce au développement des techniques chromatographiques en partie. La chimie préparative, telle que l'extraction solide-liquide à laquelle nous nous intéressons dans le cadre de l'extraction de molécules aromatiques volatiles issues de matières végétales, se devait de réduire elle aussi ses durées, tout en conservant son efficacité et sa sélectivité. Les micro-ondes ont apporté une solution de choix. Grâce à un chauffage sélectif, sans inertie et rapide, les micro-ondes combinées à des techniques d'extraction classique ont permis de remédier aux problèmes des temps d'extraction souvent trop longs. L'extraction végétale assistée par micro-ondes a été le fruit de nombreuses recherches et de brevets. L'extraction par micro-ondes regroupe différents procédés parmi lesquels

- l'extraction par solvant assistée par micro-ondes ou «MAE : microwave assisted extraction » breveté par Paré (Paré, 1992),
- le «VMHD : vacuum microwave hydrodistillation » ou hydrodistillation par micro-ondes sous vide, breveté par Archimex (**Mengal et Mompon, 1994**).

2. Les techniques conventionnelles d'extraction par solvant:

La technique d'extraction « classique » par solvant, consiste à placer dans un extracteur un solvant volatil et la matière végétale à traiter. Grâce à des lavages successifs, le solvant va se charger en molécules huileuses, avant d'être envoyé au concentrateur pour y être distillé à pression atmosphérique. Le produit ainsi obtenu est appelé « concrète ». Cette concrète pourra être par la suite brassée avec de l'alcool absolu, filtrée et glacée pour en extraire les cires végétales. Après une dernière concentration, on obtient une « absolue ». Les rendements sont généralement plus importants par rapport à la distillation et cette technique évite l'action hydrolysante de l'eau ou de la vapeur d'eau. Du fait de l'utilisation de solvants organiques, cette technique présente toutefois des inconvénients qu'il est important de noter. En effet, l'intervention de solvants organiques peut entraîner des risques d'artéfacts et des possibilités de contamination de l'échantillon par des impuretés parfois difficile à éliminer. Le choix du solvant d'extraction va s'avérer très délicat, d'autant que la législation sur les produits à destination de l'industrie agro-alimentaire est extrêmement rigoureuse. Le solvant choisi, en plus d'être autorisé devra posséder une certaine stabilité face à la chaleur, la lumière ou l'oxygène, sa température d'ébullition sera de préférence basse afin de faciliter son élimination, et il ne devra pas réagir chimiquement avec l'extrait. Parmi les solvants les plus utilisés, on recense : le méthanol, l'éthanol, l'éther de pétrole ou encore le dichlorométhane. Cependant, depuis quelques décennies, l'extraction par solvant a connu d'intéressantes améliorations. L'hydrodistillation-extraction simultanée et l'extraction par Soxhlet en sont les principales (Figure

L'hydrodistillation-extraction simultanée (Simultaneous Distillation Extraction : SDE) a été décrite en 1964 pour la première fois par Lickens et **Nickerson (Nickerson et Lickens, 1966)**. Le nom des concepteurs de la technique sera par la suite donné à l'appareillage utilisé pour ce type d'extraction. L'originalité et le principe de cette technique résident dans la rencontre de la vapeur d'eau chargée de molécules aromatiques provenant de l'hydrodistillation et des vapeurs de solvant, entraînant l'extraction des composés aromatiques de la phase aqueuse vers la phase organique. Le passage des deux phases dans la partie réfrigérante va permettre la condensation et la séparation des deux phases dans la partie en U de l'appareil. La conception du procédé assure le recyclage des deux phases. La SDE est une technique actuellement très utilisée dans l'extraction de molécules aromatiques d'origines

végétales (**Peng et al.**, 2004) mais aussi dans l'agro-alimentaire pour la détermination qualitative et quantitative de molécules aromatiques présentes dans certains produits alimentaires (Siano et *al.*, 2003). Plus récemment, la SDE a été réalisée sous pression réduite, ce qui permet de réduire les phénomènes d'artéfact comme cela a été mis en évidence en étudiant l'acétate de linalyle (Maignal et *al.*, 1992).

L'extraction par l'appareil de Soxhlet consiste à faire passer à travers la matière à traiter contenue dans une cartouche de cellulose, un flux descendant de solvant toujours neuf puisque distillé à chaque cycle. Cette technique est loin d'être exclusive aux molécules aromatiques d'origine végétale (Vagi **et al.**, 2005). Elle est fréquemment utilisée pour l'extraction de lipides (**Zarnowski et Suzuki**, 2004), ou de divers autres catégories de molécules. De plus, cette technique d'extraction a été récemment combinée aux micro-ondes (**Luque-Garcia et Luque de Castro**, 2004a) et aux ultrasons (**Luque-Garcia et Luque de Castro**, 2004b).

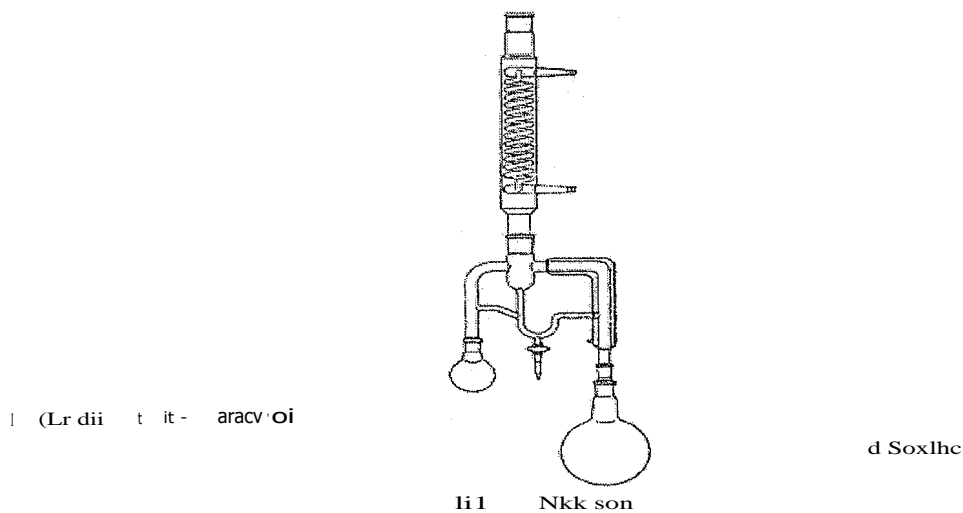


Figure 111.1. Les différents types d'extraction par solvants volatils.

3. Extraction par micro-ondes:

3.1. Principe:

Les micro-ondes ou hyperfréquences sont des ondes électromagnétiques qui occupent une bande de fréquence de trois décades de 300 GHz à 300 MHz (Figure 111.2.). La fréquence la plus utilisée est de 2450 MHz, ce qui correspond à une longueur d'onde dans l'air de 12,2 cm.

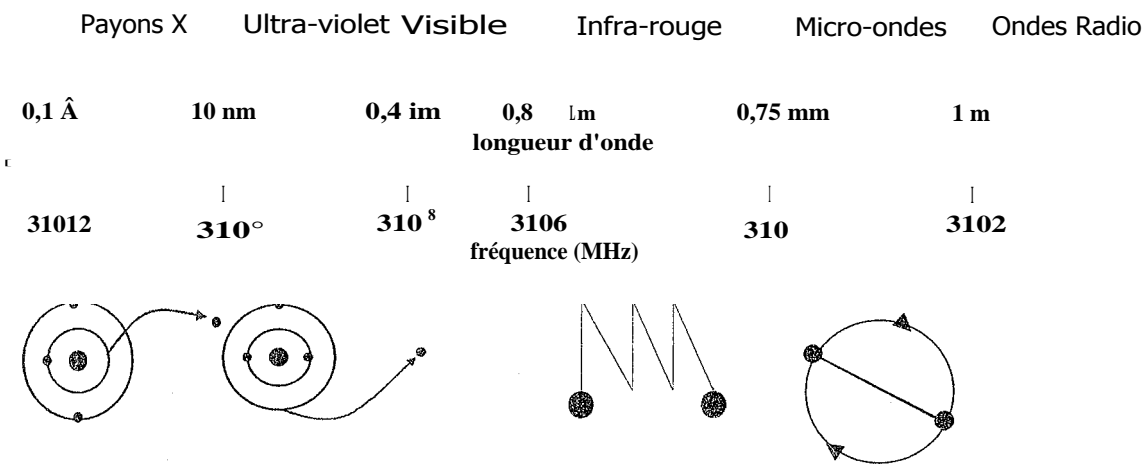


Figure III.2. Le spectre électromagnétique.

L'onde électromagnétique résulte d'un champ électrique E et d'un champ magnétique B se propageant dans l'espace et variant dans le temps. La propagation de cette onde obéit, quel que soit la nature du milieu, aux équations de Maxwell. Les applications de ces ondes sont nombreuses et très diverses : la détection électromagnétique ou radar, la poursuite des satellites, la mesure des dimensions d'un objet en cavités résonnantes, l'évaluation de la température par radiométrie, la mesure de l'humidité d'un matériau par le biais de ses caractéristiques, la télévision et les télécommunications par liaisons hertziennes et spatiales. Les applications énergétiques reposent sur le fait que l'onde est utilisée comme vecteur de puissance électromagnétique. Cette dernière catégorie est rencontrée aussi bien dans les foyers domestiques (chauffage, cuisson, décongélation) que dans l'industrie (séchage, réticulations, extraction).

3.2. Technologie du four à micro-ondes-

Un four à micro-ondes est constitué de trois éléments principaux (Figure III.1):

- le générateur micro-ondes,
- le guide d'onde,
- la cavité micro-ondes.

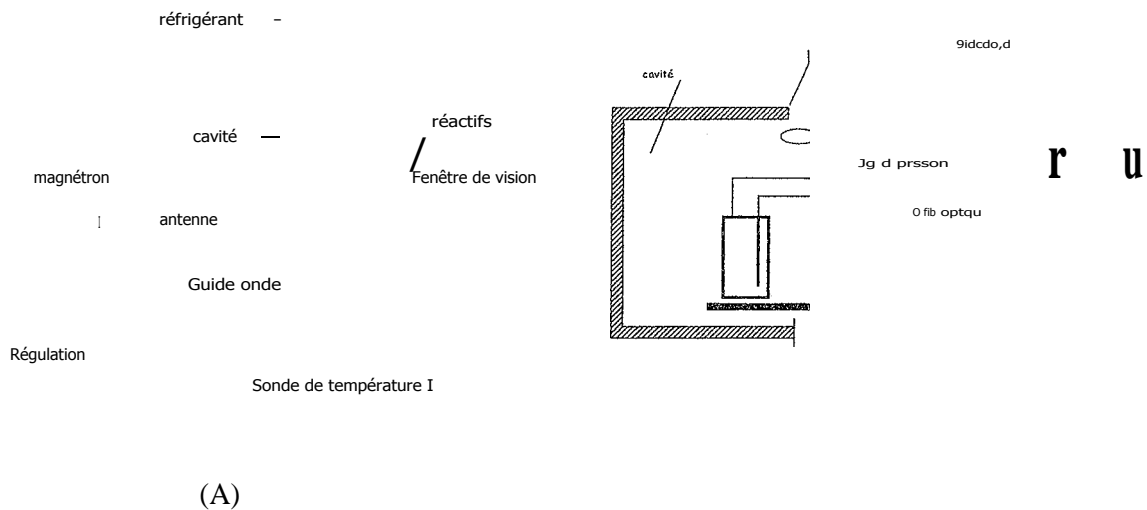


Figure 111.3. Schéma d'un four micro-ondes monomode (A) et multimode (B).

Les micro-ondes de forte puissance sont produites par des tubes à vide dont le plus habituel est le magnétron : il s'agit d'une diode thermoïonique composée d'une cathode chauffée qui émet des électrons et d'une anode polarisée positivement par rapport à la cathode pour attirer les électrons par le champ électrique continu E . Ce champ à haute tension est produit par une alimentation électrique à 50 Hz à partir du secteur redressé.

Le guide d'onde permet de convoier et de guider les ondes émises par le magnétron. Le guide est généralement un tube métallique ou un conducteur cylindrique dont la section droite est limitée par un contour fermé pouvant contenir d'autres contours. Sa génératrice sera choisie comme axe de

propagation. Deux modes de propagation peuvent exister : le mode TM (transverse magnétique), ou bien, le mode TE (transverse électrique).

L'applicateur est une cavité fermée qui doit assurer le transfert au matériau à traiter de l'énergie électromagnétique provenant du magnétron. Deux grandes catégories d'applicateurs existent : les applicateurs monomodes et les applicateurs multimodes. Un applicateur est dit monomode lorsque ses dimensions géométriques sont choisies de telle sorte qu'à la fréquence de travail, il n'existe qu'une configuration de champ. L'énergie électromagnétique emprisonnée se réfléchit sur les parois et donne lieu à des ondes stationnaires. Ce type d'applicateur permet ainsi le contrôle précis du champ électrique, il est cependant réservé aux matériaux de petit volume. L'applicateur multimode consiste en une cavité suffisamment grande afin qu'il existe plusieurs types de configurations de champ. Le champ électrique n'y est pas stable comme dans une cavité monomode et sa distribution varie. On préfère donc utiliser des applicateurs multimodes pour le traitement des volumes importants, et des matériaux dont les paramètres électriques et magnétiques varient peu

3.3. Principe du chauffage micro-ondes:

Le mécanisme du chauffage micro-ondes repose sur le fait que les molécules polaires, telles que l'eau, ont des extrémités négatives et positives : ce sont des dipôles. En l'absence de champ électrique, les dipôles se trouvent orientés au hasard. Sous l'effet d'un champ électrique continu, les molécules tendent à s'orienter dans la direction du champ électrique. Sous l'effet d'un champ électrique alternatif de fréquence f les dipôles s'orientent dans la direction du champ sur une demi alternance, se désorientent lorsque le champ s'annule et se réorientent dans l'autre sens pendant la seconde demi alternance : c'est la rotation dipolaire.

L'énergie électrique est convertie en énergie cinétique par cette rotation dipolaire. L'énergie cinétique est ensuite transformée partiellement en chaleur. L'alignement des dipôles par rapport au champ électrique est contrarié par les forces d'interactions entre molécules (les forces de liaison par pont hydrogène et les forces de liaisons de Van der Waals) pouvant être assimilées à des forces de frottement internes qui existent dans les contacts solide-solide. Ces forces vont s'opposer à la libre rotation des molécules et de la friction produite, naît le dégagement de chaleur (Metaxas et Meredith,

1983; Roussy et Pearce, 1995) Dans ce cas, une grande partie des molécules soumises à l'action du champ micro-ondes ne tourne pas avec le changement alternatif du champ mais frissonne comme le montre la **Figure 111.4**,

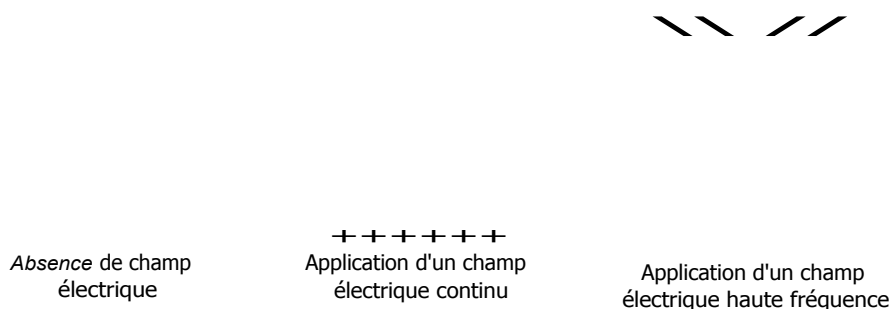
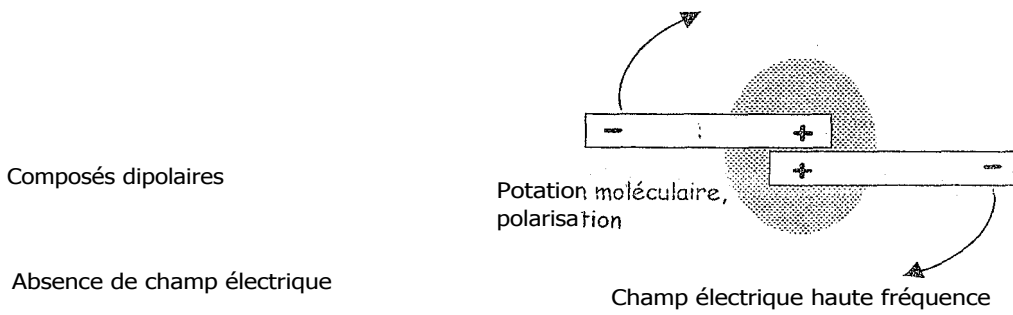
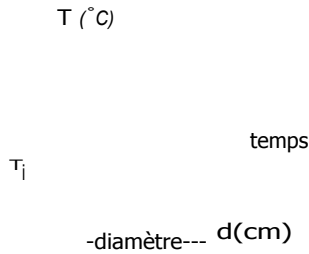


Figure 111.4. Frissonnement des dipôles soumis à une irradiation micro-ondes.

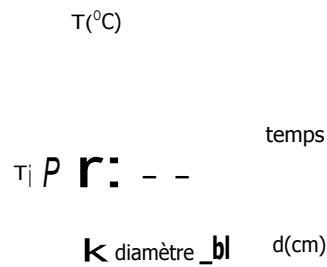
Le transfert de chaleur sous chauffage micro-ondes est complètement inversé par rapport au chauffage conventionnel. Alors que le transfert de chaleur classique se transmet de l'extérieur vers l'intérieur du récipient, sous chauffage micro-ondes, le volume traité devient lui même source de chaleur: on parle de dégagement de la chaleur de l'intérieur vers l'extérieur du récipient. La paroi externe du réacteur est plus froide que le milieu du réacteur dans le cas du chauffage micro-ondes, et inversement pour le cas du chauffage conventionnel par double enveloppe, plaque chauffante et flamme. C'est un mode de chauffage instantané en volume et non en surface. Les phénomènes thermiques de conduction et de convection ne jouent plus qu'un rôle secondaire d'équilibrage de la température. La **Figure 111.5** illustre ces deux modes de chauffage et présente le mécanisme du chauffage par micro-ondes et l'inversion des phénomènes de transfert de chaleur induit.



r'



Chauffage cori vent. ionne



(houffage mlcro-oQdes

Figure 111.5. Transferts thermiques sous chauffage conventionnel et micro-ondes.

3.4. Les procédés d'extraction assistés par micro-ondes-

3.4.1. L'extraction par solvant assistée par micro-ondes (ESMO):

Ganzler et ai, en 1986, en Hongrie, furent les premiers à présenter une technique d'extraction par solvant assistée par micro-ondes en vue d'une analyse chromatographique. Ce procédé consistait à irradier par micro-ondes de la matière, végétale ou non, broyée au préalable en présence d'un solvant absorbant fortement les micro-ondes (le méthanol) pour l'extraction de composés polaires ou bien en présence d'un solvant n'absorbant pas les micro-ondes (hexane) pour l'extraction de composés

apolaires. Cette technique se présentait, pour beaucoup, plus efficace qu'une méthode conventionnelle et permettait de réduire les temps d'extraction et donc les dépenses en énergie. Les travaux sur l'extraction par solvant assistée par micro-ondes ont continué d'avancer, et c'est en 1990 que l'équipe canadienne de Paré (**Paré et al., 1990**) a déposé le premier brevet européen sur « l'extraction de produits naturels assistée par micro-ondes ». Ils proposaient d'irradier le matériel végétal en présence d'un solvant transparent aux micro-ondes de type hexane et où les micro-ondes atteindraient directement les systèmes glandulaires et vasculaires du végétal.

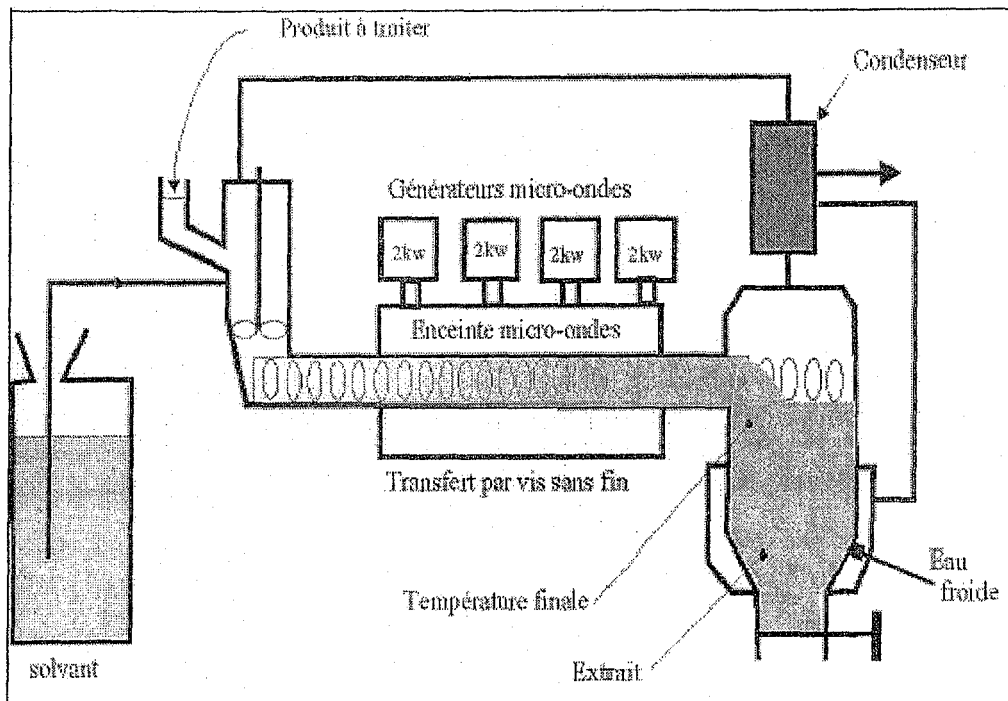


Figure I11.6. L'extraction par solvant assistée par micro-ondes (ESMO).

Des essais effectués par cette nouvelle technique notamment sur la menthe, soulignent à nouveau le gain de temps ainsi qu'une qualité similaire des produits à celle obtenue par entraînement à la vapeur classique. Par la suite, de nombreux brevets seront déposés par Paré et son équipe tant au niveau américain qu'au niveau européen (**Paré et al., 1990; Paré, 1994; Paré et al., 1991**). Le procédé original sera par la suite quelque peu modifié et enrichi et sera dénommé : MAPTM (Microwave Assisted Process). Il a pour vocation d'être une méthode d'extraction utilisable pour un grand nombre de matrices solides ou liquides telles que les végétaux mais aussi les tissus animaux, les sols, les

cosmétiques ou les eaux polluées. Actuellement l'extraction assistée par micro-ondes (MAE: Microwave Assisted Extraction) est plus généralement citée dans les travaux publiés. En réalité, la MAE et MAPTM sont toutes deux des techniques d'extraction par solvant assistée par micro-ondes. Un pilote d'extraction des épices et aromates par la technique MAPTM est présenté dans la Figure 111.6.

3.4.2. L'hydrodistillation par micro-ondes sous pression réduite (VMHD):

Le procédé VMHD ou Vacuum Microwave 1-hydroDistillation a été élaboré et breveté par la société Archimex dans les années 90, avant d'être racheté par l'équipementier Pierre Guérin (Mengal et Mompon, 1994). Cette technique d'extraction, dont l'origine est l'hydrodistillation classique, est basée sur l'utilisation conjointe des micro-ondes et d'un vide pulsé. Le matériel végétal traité, frais ou sec (auquel cas on lui rajoute la quantité d'eau requise) est soumis aux micro-ondes dont le rôle est d'assurer le transfert de matière, puis à un vide pulsé qui permet l'entraînement azéotrope des substances volatiles à une température inférieure à 100°C. Cette opération peut être répétée plusieurs fois selon le rendement souhaité. D'après les concepteurs du VMHD (Figure 111.7.), l'extraction serait dix fois plus rapide que l'hydrodistillation pour un rendement équivalent et un extrait de composition identique. Les notes «cruées», les plus thermosensibles, semblent être conservées après une extraction par VMHD contrairement à une hydrodistillation classique (Mengal et al., 1993; Toursell, 1997),

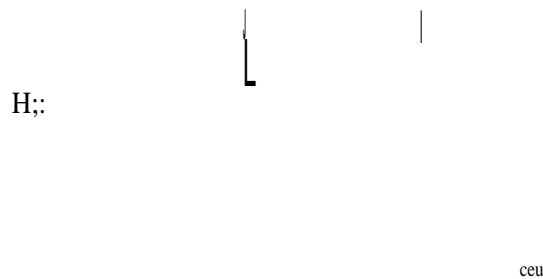


Figure 111.7. Hydrodistillation assistée par micro-ondes sous pression réduite (VMHD).

3.4.3. L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM):

En 2004, une méthode originale d'extraction des produits naturels assistée par micro-ondes sans solvant et sans eau à pression atmosphérique a été développée et brevetée (**Chemat et al., 2004a et b**). Basée sur un principe relativement simple cette méthode décrit une distillation sèche assistée par micro-ondes qui consiste à placer le matériel végétal dans un réacteur micro-ondes sans ajouter ni eau ni solvant organique. Le chauffage de l'eau interne à la plante permet la rupture des glandes contenant l'huile essentielle. Cette étape libère l'huile essentielle qui est ensuite entraînée par la vapeur d'eau produite à partir de l'eau de la matière végétale. Un système de refroidissement à l'extérieur du four micro-ondes permet la condensation du distillat, composé d'eau et d'huile essentielle, de façon continue et le retour de l'excès d'eau à l'intérieur du ballon afin de maintenir le taux d'humidité propre au matériel végétal (**Figure 111.8**). La distillation sèche assistée par micro-ondes, a été appliquée à deux types de plantes, les épices (**Lucchesi et al., 2004a**) et les herbes aromatiques (**Lucchesi et al., 2004b**). Pour les plantes aromatiques, les rendements en huiles essentielles obtenus par ESSAM après seulement 30 minutes d'extraction sont identiques à ceux obtenus après 6 heures d'hydrodistillation. D'un point de vue qualitatif, on retrouve dans les huiles essentielles obtenues par ESSAM une proportion plus importante de composés oxygénés, les plus valorisables sur le plan olfactif.

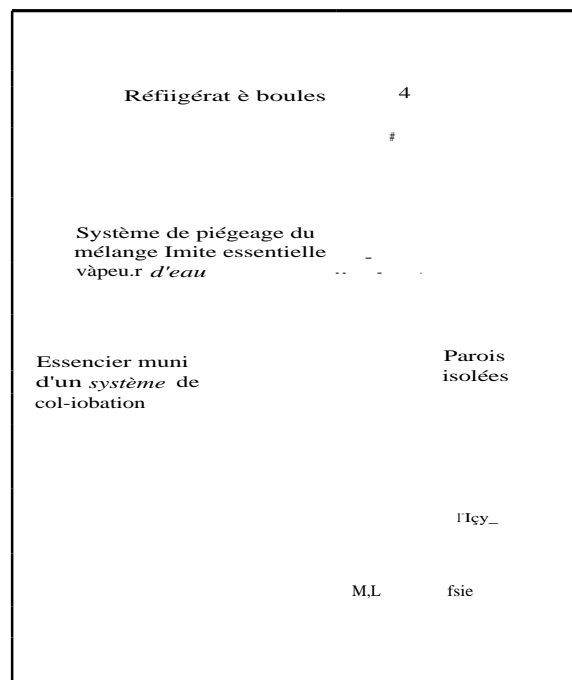


Figure 111.8. **Extraction sans solvant assistée par micro-ondes (ESSAM).**

4. Recensement des brevets déposés concernant l'extraction par micro-ondes de produits naturels d'origine végétale:

L'extraction assistée par micro-ondes de produits naturels d'origine végétale a fait l'objet de nombreux travaux publiés dans des revues scientifiques mais *aussi* du dépôt d'un certain nombre de brevets à des niveaux nationaux, européens *ou* mondiaux (**Tableau 111.II**). Dans cette partie, un tableau répertoriant les brevets concernant exclusivement l'extraction assistée par micro-onde de substances naturelles d'origine végétale est dressé.

Tableau 111.1. Brevets sur l'extraction assistée par micro-ondes de produits naturels.

Référence du brevet	Date d'enregistrement	Date de publication	Nom des inventeurs	Titre original du brevet
CA 2055390	13/11/1991	16/05/1992	J.R.J. Paré	Microwave assisted process for extraction and apparatus <i>therefor</i>
US 5338 557	10/03/1993	16/08/1994	J.R.J. Paré	Microwave extraction of volatile oils
WO 94/26853	11/05/1993	24/11/1994	P. Mengal, B. Mompon	Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes
US 5 377 426	02/02/1993	03/01/1995	J.R.J. Paré	Microwave-assisted generation of volatiles, ofsupercritical, and apparatus therefor
EI" 698 076 BI	10/05/1994	28/02/1996	P. Mengal, B. Mompon	Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes
CA2161 127	10/05/1994	24/11/1994	P. Mengal, B. Mompon	Method and plant for solventfree microwave extraction ofnatural products
US 5 458 897	12/08/1994	17/10/1995	J.R.J. Paré	Microwave-assisted extraction from materials containing organic matter
US 5 519 947	24/10/1994	28/05/1996	J.R.J. Paré	Microwave-assisted generation Of volatiles, ofsupercritical, and apparatus therefor

5. Recensement des plantes soumises à une extraction assistée par micro-ondes:

Depuis 1986, de nombreuses matrices, dont la matière végétale, ont été soumises à une extraction assistée par micro-ondes et ont fait l'objet de plusieurs expériences. En effet, le monde végétal nous offre une multitude de plantes à valoriser d'un point de vue alimentaire, certes, mais aussi d'un point de vue thérapeutique, cosmétique et dans le domaine de la parfumerie. Une grande partie des plantes extraites par les techniques assistées par micro-ondes appartiennent à la famille des Lamiacées. La menthe, le romarin, le basilic ou le thym sont vraisemblablement les plus souvent cités. De grandes familles au caractère aromatique comme les Ombellifères, les Cupressacées ou encore les Magnoliacées ont été étudiées. De la même façon, diverses parties de plantes susceptibles de contenir – des glandes à huile essentielle, ont fait l'objet d'une extraction : les rhizomes du gingembre, les feuilles ou feuillages de Lamiacées et le bois de cèdre. La composition des parties aériennes des végétaux reste toutefois la plus étudiée. Le **Tableau 111.2.** recense les plantes ayant fait l'objet d'une extraction de leurs huiles essentielles ou des extraits aromatiques par extraction micro-ondes.

6 Paramètres régissant les extractions assistées par micro-ondes:

La synthèse des travaux effectués montre que plusieurs paramètres doivent être pris en considération lors d'extractions assistées par micro-ondes.

Actuellement, la technique d'extraction par micro-ondes la plus utilisée est incontestablement l'extraction par solvant assistée par micro-ondes (« MAE », ou « MAP »). Si sa rapidité de mise en oeuvre en fait une technique de choix pour l'extraction et plus particulièrement pour celle de composés aromatiques d'origine végétale, le produit obtenu n'est en aucun cas une huile essentielle. De plus, – l'utilisation de solvant organique, présente certains inconvénients : contamination du produit fini, problème pour son élimination totale et sa valorisation future. Rappelons que l'industrie agro-alimentaire applique des lois très strictes sur l'origine des produits utilisés.

6.1. Rapidité de l'extraction:

Pour la majorité des plantes étudiées (Tableau 111.2), le paramètre le plus valorisable est incontestablement le temps d'extraction. Alors que l'ordre de grandeur temporel des extractions classiques réalisées (hydrodistillation, hydrodiffusion, ou entraînement à la vapeur d'eau) est l'heure, celui des extractions assistées par micro-ondes est en général la minute.

Tableau 111.2. Recensement des plantes soumises à une extraction par micro-ondes.

Famille - Espèces végétales	Type d'extraction	Résultats de l'extraction	Réf.
Alliacées			
Ail (<i>Allium sativum</i> L.)	ESMO	2-vinyl-1,3-dithi-4-ène: 49,4% (11D :0%, Hdiff: 1,84%)	Paré, 1994
Annonacées			
<i>Xylopiarorncitica</i> Lam.	HDMO	Rdmt: 1,5% en 30 min (1-ID: 1,5% en 2h)	Stashenko <i>et al.</i> , 2004 a
Composées			
<i>Estragon</i> (<i>Artemisia dracunculus</i> L.)	ESMO		Jean <i>et al.</i> , 1992
Tanaisie (<i>Tanacetum vulgare</i> L.)	ESMO		Collin <i>et al.</i> , 1993
Cupressacées			
<i>Cèdre</i> (<i>Thuja occidentalis</i> L.)	ESMO		Paré <i>et al.</i> , 1991
Lamiacées			
<i>Basilic</i> (<i>Occimum americanum</i> L.)	EAMO	Rdmt :2,1% (EV :2,1%)	DeVaconcelos Silva <i>et al.</i> , 2003
<i>Basilic</i> (<i>Occimumuni basilicum</i> L.)	ESSAM	Rdmt équivalent, ESSAM: 30 min et 1-ID 4h30	Lucchesi <i>et al.</i> , 2004 a
<i>Basilic</i> (<i>Occimnutn gratissirnum</i> L.)	EAMO		De Vaconcelos Silva <i>et al.</i> , 1999
<i>Hysope</i> (<i>Hyssopus of cinalis</i> L.)	ESMO	Rdmt: 0,4% en 50s (Hdiff: 0,5% en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992
<i>Marjolaine</i> (<i>Origanum marjorana</i> L.)	ESMO	Rdmt: 1,17% en 50s (Hdiff: 1,00% en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992
	VMHD	Rdmt :1,01% en 15 min. (1-ID: 1,04 % en 2h)	Mengal <i>et al.</i> , 1993
<i>Menthe poivrée</i> (<i>Menha pi/erita</i> L.)		Rdmt : 0,296% à 0,474% (IV: 0,3% en 2h)	Paré <i>et al.</i> , 1991
	ESMO		Spiro et Chen, 1995
<i>Menthe des jardins</i> (<i>Menthei crispa</i> L.)	ESSAM	Rdmt équivalent, ESSAM :30 min et HD 4h30	Lucchesi <i>et al.</i> , 2004 a

Monarde (<i>Monarda fistulosa</i> L.)	ESMO	Rdmt : 1,49% (EV: 0,94%)	Paré, 1994
Origan (<i>Origanum vulgare</i> L.)	ESMO	Rdmt : 0,3% en 50s (1-ldiff. 0,5% en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992
Romarin (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	ESMO		Chen et Spiro, 1995
Sariette (<i>Satureja hortiensis</i> Fiort.)	ESMO	Rdmt : 0,5% en SOs (1-ldiff 0,410 en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992
	ESMO	Rdmt: 1,05% en 50s (Hdiff: 1,5% en 211)	Jean <i>et al.</i> , 1992
Sauge (<i>Salvia officinalis</i> L.)	VMFID	Rdmt : 2,55mL d'HEIIOG mat. sèche (2,77mL d'FOE/100g mat. sèche)	Mengal <i>et al.</i> , 1993
Thym (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	ESSAM	Rdmt équivalent, ESSAM : 30 min et 1-ID 4h30	Lucchesi <i>et al.</i> , 2004a
Magnoliacées			
Anis étoilé (<i>Illicium anisatum</i> Hf.)	ESSAM	Rdmt : 1,38% en 1h (HD : 4,16% en 811)	Lucchesi <i>et al.</i> , 2004 b
Myricacées			
Myrte des marais (<i>Myrica gale</i> L.)	ESMO	Nanocosarje: 71,2% (ITD : 0%)	Bélanger <i>et al.</i> , 1997
Gingembre (<i>Zingiber officinale</i> Rose.)	ESMO	Rdmt : 1,97% (Soxhlet 2h: 1,00%)	Alfaro <i>et al.</i> , 2003
Ombellifères			
Ajowan (<i>Carum ajowan</i> L.)	ESSAM	Rdmt : 1,41% en 1h (HD : 3,34% en 8h)	Lucchesi <i>et al.</i> , 2004 b
Aneth (<i>Anethum graveolens</i> L.)	ESMO	Rdmt : 0,25% en 50s (Hdiffi 0,75% en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992
Carvi (<i>Carum carvi</i> L.)	ESMO	Rdmt : 0,22% en 50s (Hdiffi 0,23% en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992
Coriandre (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	ESMO		
Cumin (<i>Cuminum cyrinum</i> L.)	ESMO	Rdmt : 0,63% en 1h (HD : 4,3% en 8h)	Lucchesi <i>et al.</i> , 2004 b
Fenouil (<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.)	ESMO	Rdmt : 0,25% en 50s (Hdiff. 0,60% en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992
		Rdmt : 0,25% en 50s (Hdiffi 0,50% en 2h)	Jean <i>et al.</i> , 1992
Persil (<i>Petroselinum crispum</i> Mill.)	ESMO	Rdmt : 0,18% en 60s (EV: 0,225% en 2h)	Paré <i>et al.</i> , 1991
Verbenacés			
Lippia (<i>Lippia alata</i> Mill.)	HDMO	Rdmt : 0,69% en 30 min. (HD : 0,7% en 2h)	Stashenko <i>et al.</i> , 2004 b
Lippia (<i>Lippia alata</i> Mill.)	EAMO	Extraction totale: 5 min (EV :90 min.)	Craveiro <i>et al.</i> , 1989
Zingibéracées			
Gingembre (<i>Zingiber officinale</i> Rose.)	ESMO	Rdmt : 1,97% (Soxhlet 2h: 1,00%)	Alfaro <i>et al.</i> , 2003

6.2. Choix du solvant:

Les solvants les plus utilisés dans l'extraction par solvants sous micro-ondes sont l'hexane, le toluène, le tétrachlorure de carbone, le dicFluorométhane et l'éthanol, Si le solvant est transparent aux micro-ondes, c'est-à-dire s'il possède une permittivité faible, c'est le matériel *végétal* qui captera directement le rayonnement micro-ondes. En revanche, si le solvant absorbe les micro-ondes, le chauffage sera plutôt un chauffage de type conductif: les micro-ondes vont permettre le chauffage du solvant et ce dernier par conduction chauffera le matériel végétal. Le choix du solvant va donc déterminer le type de chauffage et par conséquent le mécanisme d'extraction et la composition du produit final.

D'après Spiro et **Chen (1995)**, lors de l'extraction des constituants aromatiques des feuilles de menthe poivrée, l'utilisation de l'hexane (solvant apolaire et transparent aux micro-ondes) donne des résultats exceptionnellement élevés pour les concentrations en 1,8-cinéole et en menthol. L'observation au Microscope Electronique à Balayage (MEB), a révélé la rupture d'un grand nombre de glandes sécrétrices contrairement aux autres extractions où les glandes sont déformées ou endommagées mais où aucune rupture n'est notée.

6.3. Puissance micro-ondes appliquée:

A quelques exceptions près, les puissances appliquées sont relativement élevées (supérieures à 500 W) par rapport à la quantité de végétal à traiter (inférieure à 100 g). Cependant la quantité de puissance appliquée est étroitement liée au temps d'extraction ainsi qu'à celle de la température de la matrice. Au cours de l'extraction par solvant assistée par micro-ondes, les puissances appliquées sont jusqu'à 45 fois supérieures à la masse de végétal à traiter, mais les temps d'extraction varient entre 10 secondes et une minute. L'hydrodistillation assistée par micro-ondes sous vide pulsé (VMHD) nécessite des puissances sensiblement plus élevées (1200 W) pour des temps d'extraction de 15 minutes.

L'extraction sans solvant assistée par micro-ondes applique des puissances en rapport direct avec la quantité de matière végétale à traiter d'où la notion plus appropriée de «densité de puissance ». Cette valeur est généralement de 1 à 2 Watts par gramme de matière végétale traitée en fonction de son degré d'humidité.

6.4. Composition chimique:

D'un point de vue quantitatif, l'extraction assistée par micro-ondes dans son ensemble, apporte des résultats extrêmement intéressants par rapport aux méthodes classiques utilisées comme références. Dans les travaux cités dans le Tableau 111.2. ces méthodes de référence sont l'hydrodiffusion, l'entraînement à la vapeur d'eau ou bien l'hydrodistillation. Dans tous les cas, les temps d'extraction des techniques de référence sont supérieurs à 90 minutes. Les rendements en huiles essentielles ou en extraits aromatiques obtenus par les techniques assistées par micro-ondes sont généralement du même ordre de grandeur ou supérieurs à ceux obtenus par des méthodes de références pour des temps 7 d'extraction beaucoup plus faibles (10 s à 15 minutes). D'un point de vue qualitatif, les différences interviennent surtout au niveau des pourcentages de certains composés aromatiques. Lors de l'extraction des feuilles de myrte des marais, le pourcentage de nonacosane dans l'extrait micro-ondes s'élève à 71,2 %, alors qu'il est nul dans l'huile essentielle obtenue par hydrodistillation. Au contraire, le pourcentage de myrcène très faible dans l'extrait micro-ondes (0,4 %), passe à 17,4 % dans l'huile essentielle (**Bélanger et al., 1997**).

6.5. Effet des micro-ondes sur le matériel végétal:

Des photographies au Microscope Electronique à Balayage de graines de cardamome soumises aux deux techniques d'extraction ESSAM et HD ont été réalisées. Cette étude a permis d'observer l'état des canaux avant et après l'extraction (**Paré et Bélanger, 1997**). Les changements relevant de 7 l'extraction assistée par micro-ondes après 60 minutes, sont spectaculaires. Ils montrent des parois cellulaires endommagées. Ceci confirme l'explosion signalée par Paré et Bélanger (Lucchesi, 2005), 7 produite au niveau de la paroi cellulaire consécutive à l'augmentation soudaine de la température. Ceci concorde avec le mécanisme proposé par Paré et **Bélanger (Lucchesi, 2005)** et Chen et Spiro (**Chen et Spiro, 1995**) pour l'extraction assistée par les micro-ondes des extraits de feuilles de romarin en présence d'hexane. Par ailleurs, la micrographie de l'hydrodistillation signale que quelques parois cellulaires sont toujours uniformes et que leurs contenus sont toujours inchangés.

Chapitre II:

Extraction par le Soxhlet assistée par micro-ondes : concept, optimisation et application

1. Introduction:

Dans ce chapitre, nous présentons la technique d'extraction par Soxhiet assistée par micro-ondes (M.I.S.) qui a fait l'objet d'une étude publiée (**Beghdad et al., 2008**) dont le thème est: "Rapid, clean and eco-friendly microwave extraction process for the determination of fat and oil: application to green vegetables". Cette technique combine les avantages de l'extraction par Soxhiet (l'extraction renouvelée par un solvant pur) et le chauffage micro-onde (réduction du temps d'extraction). L'ensemble des paramètres des deux méthodes ont été établis selon la méthode ISO 659-1988 (**ISO 659-1988**).

L'énergie des micro-ondes semble être la clef qui permet d'atteindre les objectifs émis et soutenus par une certaine chimie verte écologique. A l'échelle moléculaire, le processus relevant de l'extraction aux micro-ondes n'a pas encore atteint en chimie la maturité de la compréhension comme dans les autres thèmes. Un tel challenge est quelque peu ambitieux et exige une approche bien particulière. Le concept de l'extraction aux micro-ondes est déjà devenu une issue importante dans la chimie des produits naturels.

Il a été montré clairement que les conditions opératoires du M.I.S. sont parfaitement adaptées à la synthèse organique assistée par micro-ondes, car les réactions peuvent être effectuées sans danger sous pression atmosphérique en présence de quantités importantes de produits (**Perreux et Loupy, 2001**).

Le MIS a été conçu suivant le concept du solvant libre par synthèse micro-ondes. Quand la méthode de Soxhlet a été couplée aux radiations micro-ondes, elle s'est avérée être très efficace comme technique écologique et économique. Les principales améliorations et simplifications apportées à la méthode conventionnelle sont la rapidité d'exécution, et l'augmentation du rendement et de la pureté du produit. A partir de là, la méthode MIS s'est vue être appliquée à l'échelle industrielle.

Plusieurs travaux ont été réalisés afin d'améliorer l'extraction par Soxhlet (**Luque de Castro et Garcia-Ayuso, 1998**). En 1974, **Randall** a développé un nouveau dispositif de l'extraction par Soxhlet, en proposant trois étapes: ébullition, rinçage et élimination du solvant (**Randail, 1974**). Ultérieurement, ce dispositif a été labellisé sous le nom de Soxtec System HT (Gerhardt, Bonn, Allemagne) ou Soxtherm (Foss, Eden Prairie, MN, USA) par différentes compagnies avec une automatisation totale. La méthode de Randail était moins longue que la méthode de Soxhiet classique, car l'échantillon a été

immergé dans du solvant chaud, ce qui a entraîné un accroissement du transfert de masse, une augmentation du taux de solubilité et de diffusion et une meilleure cinétique de solubilisation (Majors, 2006).

En 1998, **Laque de Castro et al** ont présentés une nouvelle technique d'extraction appelée "focused microwave-assisted Soxhiet extraction" (FMASE), utilisant deux sources d'énergie à savoir les micro-ondes appliqués dans la chambre d'extraction du Soxhiet modifié et qui est une énergie auxiliaire accélérant le processus, et le chauffage électrique appliqué dans le flacon de distillation (**Luque-Garcia et Luque de Castro, 2004a**). Différentes améliorations ont été apportées à cette technique, comme l'automatisation, la possibilité d'une part de récupérer toute la quantité du solvant utilisée et d'autre part d'utiliser l'eau comme solvant et aussi le choix du volume de solvant à chaque cycle d'extraction. Ce système a été utilisé pour la détermination de la teneur d'huile et sa composition en acides gras des graines des oléagineuses (**Garcia-Ayuso et Luque de Castro, 1999** ; Garcia-Aynso et al., 2000), des lipides de produits carnés (**Priego-Lopez et al., 2003**), de la matière grasse des fromages (**Garcia-Ayuso et al., 1999**) et des produits de boulangerie (**Priego-Capote et al., 2007**).

2. M.I.S: Dispositif et Mode Opérateur (selon le brevet EP et PCT de Chemat *et al*, 2007):

Le principe du nouveau processus de M.I.S. est illustré dans la figure 11.9. Cette nouvelle technique d'extraction utilisant l'énergie micro-ondes a été développée et brevetée en collaboration avec la firme Milestone ETHOS des fours micro-ondes. Le dispositif M.I.S. est une combinaison originale entre un chauffage micro-onde et une distillation à pression atmosphérique. Ce dispositif a été conçu à l'échelle d'application au laboratoire dans l'extraction des huiles qu'elles soient essentielles ou fixes des différentes espèces végétales.

2.1. Description du dispositif M.I.S.:

Le réacteur micro-onde est multimode et possède deux magnétrons (2×800 W, 2.45 GHz) avec un maximum de puissance délivrée de 1000 W. La température est contrôlée par d'une part un thermocouple (ATC-300) inséré directement à l'intérieur du récipient à échantillon et par d'autre part un détecteur infrarouge externe. Le récipient (1) est en réalité un ballon traditionnel en verre à fond

rond, contient le matériel solide (échantillon) et il est approprié aux réactions micro-ondes. Dans ce ballon et au-dessous de l'échantillon, il y a un barreau d'agitation en polytétrafluoroéthylène/graphite (PTFE) qui est capable d'absorber les micro-ondes au fond du ballon. L'utilisation de ce barreau T d'agitation permet la diffusion de la chaleur par convection créée par les micro-ondes autour du ballon. Il est particulièrement utile surtout dans le cas où le solvant est transparent aux radiations micro-ondes c'est-à-dire que le solvant n'est pas capable d'absorber les micro-ondes. Le ballon contient un support (3) interne pour permettre la disposition du matériel solide (2), ce support qui en fait poreux est constitué d'un matériel (PTFE) qui peut ou pas absorber les radiations micro-ondes. De préférence, le support doit être placé à une distance bien déterminée au-dessus du fond du ballon. Ceci présente l'avantage que le matériel solide (2) placé susdit sur le support peut être facilement retiré du solvant résiduel récupéré au fond du ballon à la fin de l'expérience.

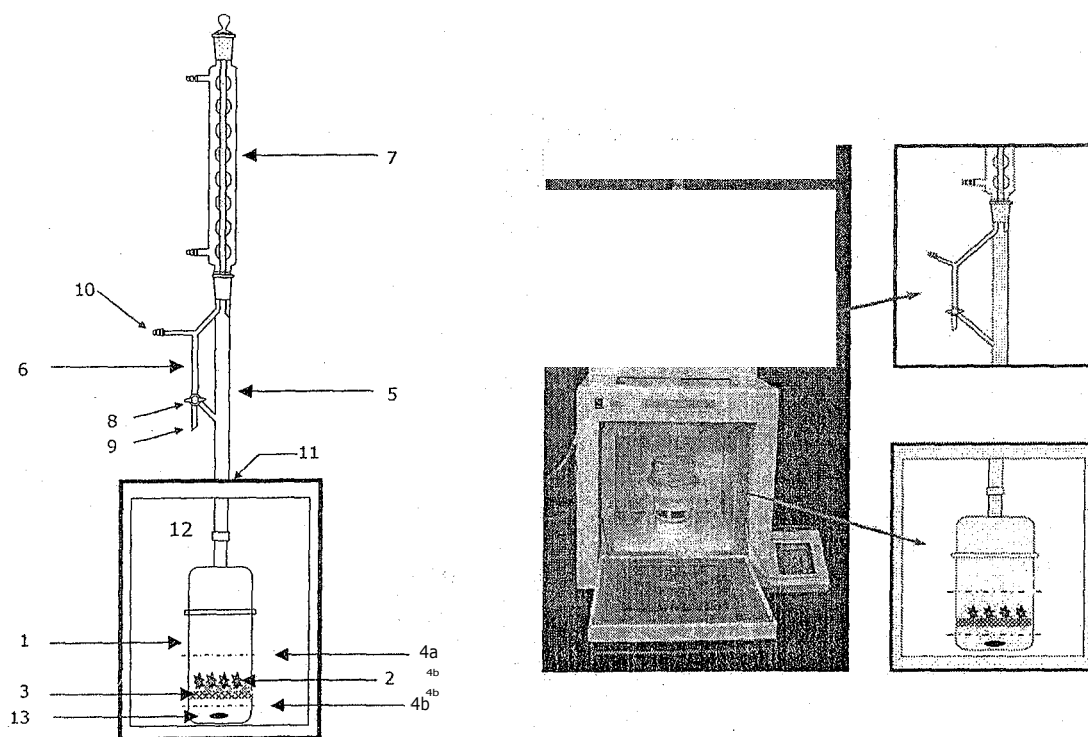


Figure 111.9. a) Principe du nouveau dispositif MIS. 1: ballon; 2: matériel solide; 3: support; 4a: niveau du n-hexane avec échantillon immergé; 4b: niveau du n-hexane au-dessous de l'échantillon; 5: tube d'extraction; 6: bras latéral; 7: réfrigérant; 8: valve à 3-voies; 9: ouverture du bras latéral pour collecter le n-hexane; 10: ouverture du bras latéral pour créer le vide dans le système; 11: ouverture sur la face supérieure du four micro-onde; 12: four micro-onde; 13: barreau d'agitation magnétique Weflon. b) Dispositif M.I.S.

Ce dispositif comporte aussi un tube d'extraction (5) en verre placé au-dessus du ballon. Ainsi, le four micro-onde (12) est muni d'une ouverture au niveau de sa face supérieure (11) pour permettre au tube d'extraction qui se raccorde à la partie supérieure du ballon de s'étendre de l'intérieur du four micro-onde jusqu'à l'extérieur.

Le tube d'extraction (5) présente un bras latéral (6) contenant au moins une valve et une ouverture (9) qui selon l'ajustement de la valve, le solvant peut être reflué vers le bas du bras latéral (6), puis à l'intérieur du tube d'extraction (5) et éventuellement dans le ballon (1). Cependant, quand la valve est ajustée conformément, le solvant reflué peut être collecté à partir de l'ouverture (9). En outre, le bras latéral est doté d'une autre ouverture (10) qui, selon l'application, peut être utilisée pour créer le vide dans le système.

Un réfrigérant (7) est placé au-dessus du tube d'extraction (5) afin de permettre au solvant présent dans le ballon d'être reflué sur les irradiations micro-ondes. Le reflux du solvant permet la percolation itérative de l'échantillon ainsi que l'accroissement du rendement de l'extraction.

2.2. Mode opératoire du M.I.S.:

Le matériel solide est extrait par immersion de l'échantillon dans le ballon contenant le solvant sous reflux et percolation répétée avec le même solvant organique. Les quatre étapes du processus sont précédées par la préparation du matériel.

2.2.1. Préparation du matériel:

Un barreau d'agitation magnétique Weflon est placé dans le ballon (1) et un support (3) filtre à PTFE est ajouté. Une quantité d'échantillon (2) est chargée sur le support (3) et 300ml de solvant (n-hexane) est ajouté afin d'immerger l'échantillon (4a). Ensuite, le ballon est placé dans le four micro-onde (12) et vissé avec le tube d'extraction (5). Le réfrigérant (7) est placé au-dessus du tube d'extraction et le système est amorcé.

2.2.2. Processus:

Les quatre étapes du processus sont comme suit:

- le solvant est chauffé jusqu'au point d'ébullition par les micro-ondes et remué avec un barreau d'agitation magnétique Weflon (13). Les vapeurs du solvant pénètrent à travers l'échantillon et la condensation a lieu dans le réfrigérant. Ensuite, les vapeurs du solvant condensées se s'écoulent goutte à goutte sur l'échantillon en ajustant la valve à trois voies (8). L'extraction est réalisée en 13 min,
- le niveau du solvant dans le ballon a diminué au-dessous de l'échantillon (4b) en ajustant la valve à trois voies conformément pendant 2 min,
- la lixiviation est répétée avec seulement du solvant neuf et propre pendant 17 min en ajustant la valve de telle sorte que les vapeurs du solvant condensées sont dirigées à l'intérieur du tube d'extraction,
- enfin, le niveau du solvant sera diminué afin de concentrer l'extrait.

2.1 Optimisation du M.L.S.:

Toutes les surfaces de réponse présentées dans la **figure HLIOa-c**, ont des points maxima. Par conséquent, l'optimisation de la surface de réponse se trouve dépendante de trois variables, à savoir, le temps d'extraction, le temps de lixiviation et la puissance d'irradiation. Les conditions optimales obtenues à partir des premières dérivées des équations polynomiales de second ordre sont dérivées une seconde fois. Les dérivées sont alors rendues nulles et résolues en un système d'équation. Les valeurs codées obtenues à partir de ces équations sont ainsi décodées et arrondies afin d'être appliqué au dispositif. Les valeurs obtenues correspondantes aux conditions optimales sont comme suit: 13 min pour le temps d'extraction, 17 min pour le temps de lixiviation et 720 W pour la puissance d'irradiation.

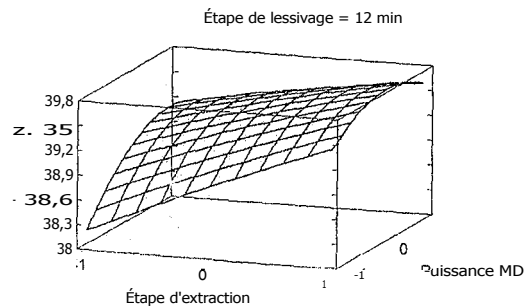
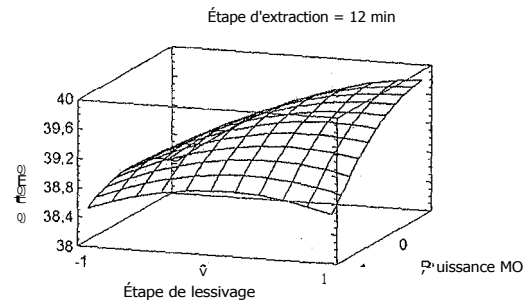
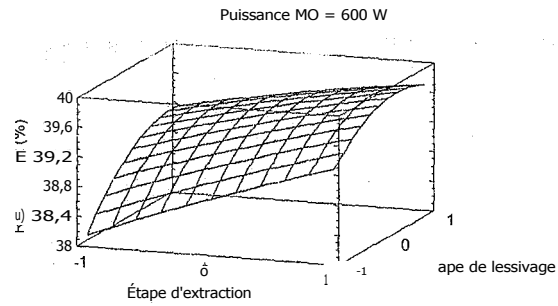


Figure 111.10. Surfaces obtenues par une étude avec multivariation: (a) estimation du rendement, du temps d'extraction, de la puissance (surface de réponse), (b) estimation du rendement, du temps de lixiviation, de la puissance (surface de réponse) et (c) estimation du rendement, du temps d'extraction, du temps de lixiviation (surface de réponse).

3. M.I.S. Coût, Energie et Ecologie:

MIS. est proposée comme une méthode d'extraction écologique et propre, appropriée pour la préparation de l'échantillon avant l'analyse des huiles et des lipides et évite l'utilisation de grandes quantités d'eau et de volumineux récipients d'extraction.

Tableau 111.3. Comparaison du temps d'extraction, d'énergie, de quantité de CO₂ émise et de récupération du solvant pour l'extraction Soxhiet et M.I.S.

Méthodes d'extraction	Temps d'extraction	Energie (kWh)	Quantité de CO ₂ émise (g CO ₂ /g d'huile)	Récupération du solvant(%)
Soxhlet	8h	8	600	<50
M.I.S.	0.5h	0.5	40	90

La réduction du coût de l'extraction est clairement avantageuse et en faveur de la méthode M.I.S. en terme d'énergie, de temps et de solvant utilisé. Si on analyse les données du tableau 111.3., on peut émettre quelques observations importantes.

On remarque tout d'abord, concernant le temps d'extraction que la méthode conventionnelle (Soxhiet) nécessite 8h, alors que la méthode M.T.S. nécessite un chauffage de 32 min seulement. L'énergie nécessaire pour la réalisation d'une extraction est de 8 kWh pour le Soxhiet (Energie électrique pour le chauffage et l'évaporation) et elle est seulement de 0.5 kWh pour MIS. (Energie électrique pour alimenter le micro-onde), dans ce cas précis la puissance de consommation a été mesurée grâce à un Wattmètre alimentant le générateur de micro-onde et l'appareil de chauffage électrique. Quant à l'impact environnemental, déterminé par la quantité de CO₂ émise..dans l'atmosphère, la quantité calculée est plus élevée pour Soxhlet (600 g CO₂.g' d'huile) que pour M.I.S. (40 g CO₂.g' d'huile). Ces calculs sont basés sur l'hypothèse émise dans la littérature qui dit qu'on obtient 1 kWh à partir de combustible ou de charbon, 800 g de CO₂ sera émis dans l'atmosphère durant la combustion du carburant fossile (**Bernard, 2001**).

Plusieurs expériences ont été réalisées dans le but de mesurer la capacité de chacune de ces techniques à permettre la récupération du solvant. L'extraction M.I.S. permet une récupération de presque 90 % du solvant utilisé, alors que plus de 50 % du solvant est perdu au cours des études réalisées par le Soxhiet. Aujourd'hui, dans le monde il est estimé que 100.000.000 L de solvant sont consommés par an dans les analyses de laboratoire. M.I.S. apparaît donc comme un processus d'extraction écologique économisant l'énergie et limitant les pertes de solvant, ce qui est en ce moment, la clef du défi de la planète pour préserver l'environnement.

4. Légumes:

Une comparaison des résultats obtenus par Soxhiet micro-ondes et par Soxhiet classique nous permettrait d'évaluer les possibilités d'extraction du Soxhiet assisté par micro-ondes pour l'extraction de matrices contenant de petites proportions d'huile. Les acides gras issus des légumes verts, sont réputés pour contenir majoritairement de l'acide α -linoléique (C18:3 A⁹ ou C18:3 molécule réputée pour son action de protection cardiovasculaire (effets anti-thrombotiques, anti-arythmiques, etc.). Les essais ont été réalisés sur du cardon (*Cynara cardunculus*), du chou (*Brassica oleracea*) et de la mauve sylvestre (*Malva sylvestris* L.) à l'aide des conditions optimisées déterminées précédemment. Les résultats obtenus sont présentés dans le **tableau 111.4.** ci-dessous:

Tableau 111.4. Rendements d'extraction et composition en acides gras obtenus par Soxhlet assisté par micro-ondes et Soxhlet conventionnel pour les extraits de cardon, chou et mauve.

Na.	Acides gras	Cardon (%)		chou (%)		Mauve (%)	
		Soxiziet	SAM	Soxhiet	SAM	Soxhiet	SAM
1	Palmitique C16:0	23,5	23,2	14,8	14,5	16,3	16,4
2	Palmitoléique C16:1	8,3	8,1	0,9	0,9	1,8	1,9
3	Stéarique C18:0	6,2	6,3	1,8	1,9	4,8	4,9
4	Oléique C18:1	8,4	8,1	7,3	7,2	5,4	5,3
5	Linoléique C18:2	19,2	19,3	23,9	24,6	13,5	13,6
6	Linoléique C18:3	29,8	29,7	49,5	49,6	53,5	53,8
7	Arachidique C20:0	1,8	1,9	0,6	0,6	3,2	3,2
-	Autres	2,8	—	3,4	1,2	0,7	1,5
Rendement (%)		1,25 ± 0,05	1,24 ± 0,04	1,30:F 0,04	1,25 + 0,06	2,63 ± 0,05	2,65 ± 0,05
Temps d'extraction (mm)		480	32	480	32	480	32

SAM: Soxhiet assisté par micro-ondes

Généralement, il peut être constaté des rendements d'extraction relativement équivalents entre les deux méthodes employées; en prenant pour référence les rendements obtenus par Soxhlet, la méthode de Soxhlet assisté par micro-ondes nous permet d'obtenir des rendements oscillant entre 96 % et 101 % de recouvrement en fonction de la matrice étudiée. Le nombre et la proportion relative d'acides gras identifiés dans ces différentes plantes est en accord avec la littérature réalisée sur ce sujet. Comme envisagé, l'acide gras majoritaire est l'acide linoléique (C18:3) avec une proportion relative d'environ 29 %, 49 % et 53 % pour le cardon, le chou et la mauve respectivement. Les autres acides gras majoritaires dans ces différentes plantes sont les acides palmitique (C16:0) et linoléique (C18:2). Les acides palmitoléique (C16:1), stéarique (C18:0), oléique (C18:1), et arachidique (C20:0) sont également présents, mais ont été identifiés avec une aire de pic chromatographique moins prédominante. Dans cette application, la méthode de Soxhlet assisté par micro-ondes permet d'accélérer de façon significative les rendements d'extraction tout en offrant des résultats quantitatifs et qualitatifs satisfaisants. La technique semble être adaptée à la détermination de matières grasses dans les matrices végétales contenant peu d'acides gras.

5. Mécanisme d'extraction:

L'extraction des acides gras par Soxhlet assisté par micro-ondes peut avoir lieu grâce à l'un des deux mécanismes proposés ci-dessous ou probablement à l'aide d'une combinaison des deux:

1^e mécanisme: Pour une matrice possédant une forte constante diélectrique, une extraction efficace peut être réalisée en utilisant uniquement l'énergie micro-onde. L'irradiation micro-ondes engendre une expansion importante de la matrice provoquant une rupture des tissus et *de facto*, une diffusion de l'huile au travers de la couche détruite.

- *2^e mécanisme.* Les huiles et matières grasses contiennent des composés organiques supposés pouvoir absorber fortement l'énergie micro-ondes. Des composés ayant un fort ou bien faible moment dipolaire pourront être extraits dans différentes proportions à l'aide du Soxhlet assisté par micro-ondes. Une partie de l'énergie apportée par l'irradiation micro-ondes peut être utilisée pour le chauffage du solvant à l'aide de l'agitateur magnétique en Weflon, et une autre partie est utilisée pour extraire les matières grasses à l'intérieur de l'échantillon.

Conclusion Générale

D'après les données des bilans alimentaires établis par la FAO, les consommations totales dans le monde en 2005, atteignaient 145 kg par personne pour les légumes et 84 kg pour les fruits. Cette consommation par personne pour l'ensemble des fruits et des légumes croît régulièrement depuis la fin des années 70, et tend à être stable pour les années à venir. Cette consommation croissante de fruits et légumes est due à une consommation croissante de fruits et légumes.

7

L'alimentation et les habitudes de vie ont un rôle important dans la prévention des maladies. La mise en évidence de possibles effets protecteurs de nombreux constituants des fruits et légumes a stimulé un intérêt particulier pour l'étude de leurs propriétés cliniques et pour préciser la nature de la relation entre la consommation de F&L et les principales maladies chroniques. La relation entre la consommation des fruits et légumes et la santé peut être résumée en

- apport en micronutriments;
- réductions des apports énergétiques;
- protection contre les maladies chroniques.

La flore méditerranéenne est l'une des plus riches au monde et possède de nombreuses plantes utilisées en alimentation. Nous avons entrepris une étude phytochimique sur trois légumes cardon : *Cynara cardunculus*, de la mauve *Malva sylvestris* et du chou vert *Brassica oleracea*.

Le cardon *Cynara cardunculus* est un légume qui est caractérisé par une teneur élevée en protéines avec une composition en acides aminés essentiels très satisfaisante dont la méthionine est le facteur limitant. Il possède une quantité de matière grasse qui n'a aucune incidence significative sur l'apport énergétique. La présence seulement des acides gras de taille moyenne (compris entre C₁₆ et C₁₈) dans l'huile du cardon lui confère une certaine viscosité et fluidité qui influencent sa nature et son utilisation au laboratoire. Nos tests phytochimiques ont confirmés la forte présence de tannins, de flavonoïdes et d'alcaloïdes dans le cardon. La CCM nous a permis de mettre en évidence la présence des tannins et des flavonoïdes et l'absence des alcaloïdes. L'étude du pouvoir antioxydant des extraits des flavonoïdes du cardon a montré une diminution importante de l'absorbance à des doses très faibles comparée aux courbes de réduction de l'absorbance des antioxydants standards.

Mauve *Malva sylvestris* est une véritable source de protéines avec une bonne valeur biologique comparée à celle du soja et du blé, déficiente seulement en méthionine et en isoleucine. L'huile de la mauve est très riche en acides gras essentiels tels que l'acide linoléique et l'acide linoléique, ce qui est un bon argument pour la santé. La présence des trypsinolytiques et des inhibiteurs de trypsine dans les extraits de mauve est sans danger sur la santé humaine. L'étude de la CCM des fractions de mauve a montré la présence marquée de flavonoïdes,

(Chou vert *Brassica oleracea* présente une similitude dans son profil en acides aminés avec celui des autres légumes étudiés en bibliographie, nous remarquons la forte présence des acides dicarboxyliques et la déficience des acides aminés soufrés. Son huile est très riche en acides gras essentiels et la présence de composés antinutritionnels n'influe pas sur sa valeur alimentaire. La CCM nous a permis de confirmer la présence des tannins et des flavonoïdes. Ces derniers possèdent un pouvoir antioxydant similaire à ceux des différentes espèces de choux étudiés en littérature.

Lorsque nous comparons nos trois espèces de légumes, elles semblent avoir des composés en commun et des profils similaires mais peuvent être différenciés soit par la quantité soit par la concentration d'un composé chimique.

Concernant la partie innovation de cette thèse, il a été montré que le Soxhlet assisté par microondes peut être une bonne alternative par rapport au Soxhlet traditionnel tout en offrant le même rendement mais avec un temps, une quantité de solvant et une consommation d'énergie réduites. Cette méthode est appropriée pour les analyses de contrôle de qualité de routine des lipides et des huiles à partir des plantes ou des produits alimentaires. L'efficacité de la méthode MALS est considérablement plus importante que celle de la méthode Soxhlet conventionnelle, si on tient compte de la rapidité de l'extraction, du recyclage du solvant au cours de la concentration de l'extrait, de l'économie de l'énergie utilisée et enfin de la propreté du processus puisqu'il réduit les émanations toxiques qui peuvent influencer, de point de vue écologique, sur le changement de climat entraînant le phénomène effet de serre.

Nos perspectives de recherche s'orientent vers l'utilisation de technologies innovantes d'extraction pour la valorisation de la flore locale. Cette voie de recherche est d'une part fondamentale mais elle est aussi appliquée vu les applications industrielles qui en découlent.

Références Bibliographiques

Adzet T., Puigmacia M. (1985). High-performance liquid chromatography of caffeoylquinic acid derivatives of *Cynara scolymus L.* leaves. *Journal of Chromatography A*, **348**, 447-452.

Aerts R.J., Barry T.N., McNabb W.C. (1999). Polyphenols and agriculture: beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **75**, 1-12.

Afsana K., Shiga K., ishizuka S., Hara H. (2004). Reducing effect of ingesting tannic acid on the absorption of iron, but not zinc, copper and manganese by rats. *Bioscience biotechnology and Biochemistry*, **68(3)**, 584-592.

AFSSA, INPES (2004). Comparaison de deux enquêtes nationales de consommation alimentaire auprès des adolescents et des adultes - Baromètre santé nutrition (2002) et INCA (1998-99). *Déments de méthode et résultats*. INPES.

Agrawal P.K., Markham K.R. (1989). Introduction. In: Carbon-13 NMR of flavonoids. Agrawal, P.K. Ed. *Elsevier*. Amsterdam, 1-31.

Agudo A., Siimani N., Ocke M. C., Naska A., Miller A. B., Kroke A., Bamia C., Karalis D., Vineis P. (2002.) Consumption of vegetables, fruit and other plant foods in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts from 10 European countries. *Public Health Nutrition*, **5(6b)**, 1179-1196.

Alexander R.J. (1998). Production and description. In: Sweeteners: Nutritive. Ed. Eagan Press, St. Paul, Minnesota, 24.

Alfaro MA., Bélanger J.M.R., Padilla F.C., Paré J.R.J. (2003). Influence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes (MAPTM) extraction of ginger (*Zingiber officinale*). *Food Res. Inte.*, **36**, 499-504.

Almazan A.M., Begum F. (1996). Nutrients and antinutrients in peanut greens. *Journal of Food Composition and Analysis*, **9**, 375-383.

Almazan A.M., Begum F., Johnsson C. (1997). Nutritional quality of sweet potato greens from greenhouse plants. *J of Food Composition and Analysis*, **10**, 246-253.

Ambe K.S., Sohoni K. (1956). Trypsin inhibitor in plant metabolism. *Experientia*, **12**, 302-303.

Amiot M. J., Babot-Laurent C., Touniaire F. (2007). Plant Pigments as bioactive substances. In: Food colorants: chemical and functional properties (Ed. Socaciu, C.), CRC Press.

Amir Y., Haenni A.L., Youyou A. (2007). Physical and biochemical differences in the composition of the seeds of Algerian leguminous crops. *J of Food Composition and Analysis*, **20**, 466-471.

Ammour A. (1984). Contribution à l'étude des protéines des espèces des légumineuses. Thèse d'ingénieur agronome. INA. Alger.

- Anonyme, (1977).** Plantes et climats méditerranéens. Bd. Gauthiers-Villars, Paris, 27-32.
- Antheim B., Benali S., Iorclache C. (1975).** Contribution à l'étude des légumes secs cultivés en Algérie. Rapport Juin 1975. *Annales de l'I.N.A., El Harrach.*
- AOCS Official Method Ce 2-66 (1989). *American Oil Chemists' Society, Champaign 11,*
- Arts I. C. W., Hoilman P. C. H. (2005).** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *American Journal of Clinical Nutrition, 81(1), 317-325.*
- Asguith T., Mehansho H., Rogier J.C., Butler L.G., Carlson D.M. (1985).** Induction of proline-rich protein biosynthesis in salivary glands by tannins. *Fédération Proceedings, 44, 1097.*
- Atawodi S.E. (2005).* Antioxidant potential of African medicinal plants. *African Journal of Biotechnology, 4(2), 128-133.*
- Athanasiadou S., Kyriazakis I., Jackson F., Coop R.L. (2000.a).** Consequences of long-term feeding with condensed tannins on sheep parasitized with *Trichostrongylus colubriformis*. *International Journal of Parasitology, 30, 1025-1033.*
- Audigie CL, Dupont G. (1982).** Principes des méthodes d'analyses biochimiques. Bd. Dom. Paris, 4-7.
- Aûtret A.M. (1978).** Analyse nutritionnelle de l'enquête nationale sur la consommation et les budgets de ménage en Algérie. F.A.O. Rome.
- Ayaz F.A., Ayaz S., Alpaya-Karaoglu S., Gruz J., Valentova K., Ulrichova J., Strnad M. (2008).** Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry, 107, 19-25.*
- Azout B., Antheim B., Benali S. (1978).** Technologie des légumes secs et valeur nutritionnelle des produits traités. *Annales de l'I.N.A., El Harrach, 3.*
- Baci L. (1992).** La vulgarisation de la culture de la tomate industrielle dans la région d'Annaba : une réussite ? In La Vulgarisation au Maghreb : Théorie et Pratique, Bédrani S. *et al.*, CIHEAM/FPH/INA/CREAD/CCE-DGI, *Gahiers Options Méditerranéennes, 2(1).*
- Baldwin I.T., Schultz J.C. (1983).** Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants. *Science, 83, 277-279.*
- Baldwin I.T., Schultz J.C., Ward D. (1987).** Patterns and sources of leaf tannin variation in yellow birch (*Betula allegheniensis*) and sugar maple (*Acer saccharum*). *Journal of Chemical Ecology, 13(5), 1069-1078.*
- Bartošková L., Nečas J., Suchá V., Kubínová R., Veselá D., Beneš L., Iliek J., Alplachta J., Florian T., Frydrych M., Klusáková J., Bartošík T., Franta P., Dzurová J. (2003).** Antioxidative Effects of Morine in ischemia-Reperfusion of Kidneys in the Laboratory. *Rat. Acta Vet. Brno, 72, 87-94.*

Bazzano L. A., 11e J., Ogden L. G., Loria C. M., Vupputuri S., Myers L., Whelton P. K. (2002). Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Am. J. of Clin. Nutr.*, **76(1)**, 93-99.

Bazzano L. A., Serdula M. K., Lin S. (2003). Dietary intake of fruits and vegetables and risk of cardiovascular disease. *Current Atherosclerosis Reports*, **5(6)**, 492-499.

Bédrani S. (1993). Le secteur agricole et ses perspectives à l'horizon 2000 : Algérie. Commission des Communautés Européennes/CIHEAM, Bruxelles.....

Beecher C.W.W. (1994). Cancer preventive properties of varieties of *Brassica oleracea*: A review. *American Journal of Clinical Nutrition*, **59**, 1166-1170.

Beghdad M.C., Belarbi M., Virot M., Mathe C., Tomao V., Chemat F. (2008). A rapid, clean and eco-friendly process for the determination of fats and oils in green vegetables. *Chemistry today*, **26(6)**, 47-50.

Belanger J.M.R., Dextraze L., Isnardi M.J., Chalchat J.C., Garry R., Colin G. (1997). Chemical composition of Essential Oil and Headspace of the Quebec « Myrica baumier » Wax Myrtle (*Myrica gale* L.). Influence of Extraction Process. *J.Essen. OilRes.*, **9**, 657-662.

Belarbi M. (2004). Etude des composés nutritionnels et antinutritionnels des glands de chêne et de l'efficacité nutritionnelle de leurs protéines chez les rats Wistar en croissance. Thèse de Doctorat. Université de Tlemcen.

Bendjama O., Zeghouane O. (1993), Etude de l'effet de la date de semis et de la densité du peuplement sur le rendement du pois chiche en zones semi-arides. *Céréaliculture*, **26**, 12-18.

Bernard J., (2001). Les centrales thermiques. *Sci. Vie*, **214**, 68.

Bérnays E.A., Cooper-Driver G., Bilgener M. (1989). Herbivores and plant tannins. *Advances in Ecological Research*, **19**, 263-302.

Besançon P. (1978). La valeur nutritionnelle des légumes secs et des protéines des légumineuses. *Rev. Fi-an. Diet.*, **22(5)**, 84-86.

Biessels G. J., Staekenborg S., Brunner E., Brayne C., Scheltens P. (2006). Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *Lancet neurology*, **5(1)**, 64-74.

Birk Y., Gertler A.L., Khalef S. (1963). A pure trypsin inhibitor from soybeans. *Biochemisty J*, **87**-281.

Birk Y. (1976). Proteinase inhibitors from plant sources. *Meth. Enzymol*, **45**, 695-739.

Blow D.M., Janin J., Sweet R.M. (1974). Mode of action of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) as a model for specific protein interactions. *Nature*, **249**, 54-57.

- Chun O.K., Smith N., Sakagawa A., Lee C.Y. (2004).** Antioxidant properties of raw and processed cabbages. *Int. J. Food Sei. Nutr.*, 55(3), 191-199.
- Chung K.-T., Wong T.Y., Wei C.-I., Huang T.-W., Lin Y. (1998).** Tannins and human health: review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(6), 421-464.
- Ciausen T.P., Proveuza F.D., Burritt E.A., Reichardt P.B., Bryant J.P. (1990).** Ecological implications of condensed tannin structure: a case study. *Journal of Chemical Ecology*, 16(8), 2381-2392.
- Close D.C., McArthur C. (2002).** Rethinking the role of many plant phenolics-protections from photodamage not herbivores? *Oikos*, 99(1), 166-172.
- Colin G.J., Deslauriers H., Pageau N., Gagnou M. (1993).** Essential oil of Tansy (*Tanacetum vulgare* L.) of Canadian Origin. *J. E ssent. Oil Res.*, 5, 629-638.
- Collins J.L., Beaty B.F. (1980).** Héat inactivation of trypsin inhibitor in fresh green soybeans and physiological responses of rats feed the beans. *J. FoodScL*, 45, 452-458.
- Colonna P., Hoebler C. (1991).** Dosage enzymatique des glucides. In: Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires. (Ed. Multon, J.), *Tec & Doc.Lavoisier*, Paris, 4(2), 145-156.
- Committee on Diet and Health, and National Research Council (1989).** Diet and Health: Implications for Reducing Chronic Disease Risk. *National Academy Press, Washington, D. C.*
- Conaway C.C., Yang Y.M., Chung F.L. (2002).** Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: their biological activities and me.tabolism in rodents and humans. *Curr. Drug Metab.*, 3(3), 233-255,
- Convoitise J. (1983).** Le livre d'herbe. Lecoq main réserve. IBSN, 553 -. 827.
- Cooke D., Steward W.P., Geseher A.J., Marczylo T. (2005).** Anthocyanins from fruits and vegetables--does bright colour signal cancer chemopreventive activity? *Eur. J. Cancer*, 41(13), 1931-1940.
- Cooper-Driver G.A., Bhattacharya M. (1998).** Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry*, 49(5), 1165-1174.
- Corpet D.E. (1989).** Alimentation et étiologie du cancer du côlon. *Cah. Nuir. Diét.*, 24,375-380,
- Costes Cl. (1981).** Protéines foliaires et alimentation. *Biochimie Appliquée*, Paris.
- Couplan F. (1992).** Retrouvez les légumes oubliés. Ed. La Maison rustique-Flammarion. Paris, 215.
- Craveiro A.A., Matos F.J.A., Alencar J.W., Plumel M.M. (1989).** Microwave oven extraction of an essential ou. *Flav. Fragr. J*, 4, 43-44.

Critchley H.D., Roils E.T. (1996). Responses of primate taste cortex neurons to the astringent tannic acid. *Chemical Senses*, 21, 135-145.

Cronquist A. (1988). The evolution and classification of flowering plants. Columbia University Press, New-York.

Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G. (2000). Natural (Secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250-1251.

Cuyckens F., Claeys M. (2004). Mass spectrometry in the analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(4), 1-15.

Danchet L., Ferrieres J., Arveiler D., Yarnell J. W., Gey, F., Dcimetiere P., Ruidavets J. B., Haas B., Evans A., Bingham A., Amouyel P., Dallongeville J. (2004). Frequency of fruit and vegetable consumption and coronary heart disease in France and Northern Ireland: the PRIME study. *British journal of nutrition*, 92(6), 963-972.

Dauget J.C., Foucher J.P. (1982). Les flavonoïdes de *Arbutus unedo* L. (*Ericacées*). *Plantes médicinales et phytothérapie*, 16 (3), 185-191.

Davies K.R. (1981). Effect of processing on composition and tetrahydroxyphenyl relative nutritive value on green and yellow peas, lentils and white pea beans. *Cereal Chem.*, 58, 454-460.

Daviron B. (1996). Quelques faits marquants de la dynamique récente des échanges de produits alimentaires. *Economie rurale*, 10(6), 234-235.

Dawson J.M., Buttery P.J., Jenkins D., Wood C.D., Gill M. (1999). Effects of dietary Quebracho tannin on nutrient utilization and tissue metabolism in sheep and rats. *J of the Sci. Of Food and Agric.*, 79, 1423-1430.

de Rijke E., Ont P., Niessen W.M., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U.A.T. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1112, 31-63.

de Saravia S.G., Gaylardeb C.C. (1998) The antimicrobial activity of an aqueous extract of *Bra.sica nigra* *International Biodeterioration and Biodegradation* 41, 145-148

de Vaconcelos Silva M.G., Craveiro A.A., Abreu Matos F.J., Machado M.I.L., Alencar J.W. (1999). Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia*, 70, 32-34.

de Vaconcelos Silva M.G., Dos Santos R.N., Abreu Matos F.J., Machado M.I.L. (2003). Volatile constituents from leaf, inflorescence and root oils of *Ocimum americanum* L. grown in north-eastern Brazil. *Flav. Fragr. J.*, 18, 303-304.

DFVF (2005). *Danskernes kostvaner 2000-2002*, Hovedresultater, Danmarks Fodevarerforskning, DFVF, publikation (11), Soborg, Danmark, 165.

Bodwell C.E. (1977). Problems in the development and application of rapid methods of assessing protein quality. *Food Technology*, **31(6)**, 73-77.

Bosetti C., Negri E., **Kolonel L.**, Ron E., Franceschi S., **Preston-Martin S.**, McTiernan A., **Dal Maso L.**, Mark S.D., Mabuchi K Land C, **Im F.**, Wingren G, Galant M R, Flallquist A, Glattre E., Lund E., Levi F., **Linus. D.**, **La Vecchia C.** (2002). A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer. VII. Cruciferous and other vegetables (International). *Cancer Causes Control*, **13(8)**, 765-775.

Boyd B., **Ford C.**, Koepke Michael C., Gary **K.**, **Horn E.**, McAnalley S., **McAnailey B.** (2003). Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'Ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *GlycoScience & Nutrition.*, **4 (6)**, 7.

Brand-Williams M., Cuvelier M.E., **Berset C.** (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss U-Technol.*, **28**, 25-30.

Brat P., **George S.**, Bellamy A., Chaffaut L. **D.**, Scalbert A., **Mennen L.**, **Arnanit N.**, Amiot M. J. (2006). Daily polyphenol Intake in France from fruit and vegetables. *Journal of Nutrition*, **136(9)**, 2368-2373.

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, **56(11)**, 317-333.

Brennan P., **Hsu CC.**, Moullan N., Szeszenia-Dabrowska N., **Lissowska J.**, **Zaridze D.**, **Rudnai E.**, **Fabianova P.**, **Mates D.**, **Bencko V.**, Foretova L., Janout V., **Gemignani F.**, **Chabrier A.**, **Hall J.**, **Hung R.J.**, **Boffetta P.**, **Cauzian F.** (2005). Effect of cruciferous vegetables on lung cancer in patients stratified by genetic status: a mendelian randomisation approach. *Lancet*, **29**, 366(9496), 1558-1560.

Broadway R.M. (1989). Tryptic inhibitory activity in wild and cultivated crucifers. *Phytochemistry*, **28(3)**, 755-758.

Broadway R.M., **Missurelli D.B.** (1990). Regulatory mechanisms of tryptic inhibitory activity in cabbage plants *Phytochemistry*, **29(2)**, 372 1-3725

Brown S.A. (1964). Lignin and tannin biosynthesis. *Biochemistry, of phenolic compounds* (Ed. Harborne J.B.), London and New York: Academic Press, 361-398

Brown W.E., **Ryan C.A.** (1984). Isolation and characterization of a wound-induced trypsin inhibitor from alfalfa leaves. *Biochemistry*, **23**, 3418-3422.

Brown P. (1992). AIDS: the challenge of the future. *New Sci.*, **54**, 1-4.

Bruneton J. (1993) Pharmacognosie et Phytochimie. Plantes médicinales. Paris, France : Lavoisier, 278-279.

Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F. (1999). Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Science*, 65(4), 337-353.

Dinev V., Stanislovova L., Stancheva I. (1995). Seed protein content and amino acid composition in species of the tribe *Trutzeae* *Bulgarian J of Agric Sci* 1, 95-99

Dini L., Tenore G.C., Dini A. (2008). Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of *Allium caepa* L. Var. *tropeana* (red onion) seeds. *Food Chemistry*, 107, 613-621.

de Amaral Franco J. (1976). *Cynara* L.. in T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentine, & S.M. Walters et al. (Eds). *Flora Europea (Vol. 4)*. Cambridge : Cambridge University Press.

Downs C.T., McDonald P.M., Brown K., Ward D. (2003). Effects of *Acacia* condensed tannins on urinary parameters, body mass, and diet choice of an *Acacia* specialist rodent, *Thallomys nigricauda*. *Journal of Chemical Ecology*, 29(4), 845-858.

Dubois M.K.A., Gilli Y.K., Hamilton P.A. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. and Chem. J*, 28, 350-356.

Eastwood M.A. (1990). Fibres alimentaires et lipoprotéines. *Cah. Nutr. Diét.*, 25, 25-29.

Erlanger B.F., Kowosky N., Cohen W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 98, 271.

Etminan M., Takkouche B., Caamano-Isorna F. (2004). The role of tomato products and lycopene in the prevention of prostate cancer a meta-analysis of observational studies *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 13(3), 340-345.

Faciola S. (1990). Source des usines comestibles. *Cornucopia. ISBN de publications de Kompong.*, pp. 962-1087.

Fachmann W., Kraut H. (1995). The composition of foods. Répertoire Général des aliments. *Technique & Documentation /Inra / Ciqual-REGAL*, 26, 897.

Fashey J., Stephenson K (1999) Cancer chemoprotective effects of cruciferous vegetables *Horticultural Science*, 34, 1159-1163.

FAO/WHO, (1990). *Protein quality evaluation in Report of Joint FAO/WHO expert consultation;* Food and Agricultural Organization of the United Nations: Rome, 23.

FAO, Bilans alimentaires (2003). *Food balance sheets and food consumption surveys a comparison of methodologies and results*, www.fao.org/es/ess/consweb.asp. accès le 19/7/07.

FAOSTAT (2005). Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation (FAO).

FAO, (2006). Food balance sheets and food consumption surveys a comparison of methodologies and results. A Hand book, Rome.

Favier A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108-115.

Feeny P.P. (1970). Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology*, 51(4), 565-581.

Fernandes F., Valentao P., Sousa C., Pereira JA., Seabra R.M., Andrade P.B. (2007). Chemical and antioxidative assessment of dietary turnip (*Brassica rapa* var. *rapa* L.). *Food Chemistry*, 105, 1003-1010.

Fernandez J., Curt M.D., Aguado P.L. (2006). Industrial application of *Cynara cardunculus* L. for energy and others uses. *Industrial Crops and Products*, 24, 222-229.

Fleck D.C., Layne J.N. (1990). Variation in tannin activity of acorns of seven species of Central Florida oaks. *Journal of Chemical Ecology*, 16(10), 2925-2934.

Foiey W.J., Iason G.R., McArthur C. (1999). Role of plant secondary metabolites in the nutritional ecology of mammalian herbivores: how far have we come in 25 years? *Nutritional Ecology of Herbivores* (Ed. par Jung H.J.G. et Fahey G.S.), 130-209. Savoy, Illinois, USA: American Society of Animal Science.

Frassetto L.A., Todd K.M., Morris R.C., Sebastian A. (1998). Estimation of net endogenous noncarbonic acid production in humans from diet potassium and protein content. *Am. J. of Clin. Nutr.*, 68, 576-583.

Frokner R.E, Marquis R.J., Lii J.T. (2004). Feeny revisited: condensed tannins as anti-herbivore defences in leaf-chewing herbivore communities of *Quercus*. *Ecology Entomology*, 29, 174-187.

T

Funatogawa K., Hayashi S., Shimomura H., Yoshida T., Hatano T., Ito H., Hirai Y. (2004). Antibacterial activity of hydrolysable tannins derived from medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol.*, 48(4), 251-261.

Ganji V., Kafai M.R. (2004). Frequent consumption of milk, yogurt, cold breakfast cereals, peppers, and cruciferous vegetables and intakes of dietary folate and riboflavin but not vitamins B-12 and B-6 are inversely associated with serum total homocysteine concentrations in the US population. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80(6), 1500-1507.

Ganzler K., Salgo A., Vaiko K.J. (1986). Microwave extraction: a novel sample preparation method for chromatography. *J Chromatography A*, 371, 229-306.

Garcia.-Ayuso L.E., Luque de Castro M.D. (1999). A multivariate study of the performance of a microwave-assisted Soxhlet extractor for olive seeds. *Anal. Chem. Acta.*, 382, 309-316.

- Garcia-Ayuso L.E., Velasco J., Dobarganes M.C., Laque de Castro M.D.** (1999). Double use of focused microwave irradiation for accelerated matrix hydrolysis and lipid extraction in milk samples. *J. Agric. Food Chem.*, *47*, 2308.
- Garcia-Ayuso L.E., Velasco J., Dobarganes M.C., Luque de Castro M.D.** (2000). Determination of the oil content of seeds by focused microwave-assisted Soxhlet extraction. *Ciornatographza* *52*, 103-108.
- Gastineau I.** (1981). La préparation industrielle de la protéine verte de Luzerne, In : Protéines foliaires et alimentation. Costes Cl., Ed., Gauthiers-Villars, Paris, 159-182.
- Genkinger J. M., Platz E. A., Hoffman S. C., Comstock G. W., Helzlsouer K. J.** (2004). Fruit, vegetable, and antioxidant intake and ail-cause, cancer, and cardiovascular disease mortality in a communitydwelling population in Washington County, Maryland. *American journal of epidemiology*, *160*(12),1223-1233.
- Gibault T.** (2001). Flavonoïdes et coeur: un couple bien assorti. *Equation-Nutrition*, *14* (APRIFEL).
- Georgetti S. R., Casagrande R., Di Mambro V. M., Azzoïni Ana E.C.S., Fonseca Maria. J.V.** (2003). Evaluation of the Antioxidant Activity of Différent Flavonoids by the Chemiluminescence Method. *AAPSP PharmSci.*, *5* (2), 5.
- Giovannucci E., Rimm E. B., Lin Y., Stampfer M. J., Willett W. C.** (2003). A prospective study of cruciferous vegetables and prostate cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, *12*(12), 1403-1409.
- Goldstein J.L., Swain T.** (1963). Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry*, *2*, 371-383.
- Grayer R.J., Chase M.W., Simmonds M.S.J.** (1999). A comparison between chemical and molecular characters for the determination of phylogenetic relationships among plant families An appreciation of Hegnauer's "Chemotaxonomie der Pflanzen". *Biochem. Systematics and Ecology*, *27*(4), 369-393.
- Green T.R., Ryan C.A.** (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense, mechanism against insects. *Science*, *175*, 773..777,
- Green T R, Ryan C A** (1973) Wound-induced proteinase inhibitor in tomato leaves some effects of light and temperature on the wound response. *Plant Physiol.*, *51*, 19-21.
- Greuter W., Burdet I-I.M., Long G.** (1989), Checkiist. Tome 3 et 4 : Dicotylédones. Ed. Conservatoire et Jardin Botanique, Genève, 71-239.
- Grieve M. (1971). A modern herbaI. New York: Dover Publications.
- Grundhifer P. Gross G.G.** (2001). Immunocytochemical studies on the origin and deposition sites of hydrolysable tannins. *Plant Science*, *160*, 987-995.

Grundhifer P. Niemetz R., Schilling G., Gross G.G. (2001), Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolysable tannins. *Phytochemistry*, 57, 915-927.

Gubb A.S. (1913). La flore algérienne naturelle et acquise. Ed. Jourdan A. Alger, 275,

Guil-Guerrero J.L., Gimenez-Gimenez A., Rodrigue,--Garcia I., Torija-Isasa M.E. (1998). Nutritional composition of *Sonchus* species (*S. asper* L, *S. oleraceus* L and *S. tenerrimus* L). *J. Sei. Food Agric.*, 76, 628-632.

Gupta S., Wag!e D.S. (1988). Nutritional and antinutritional factors of green leafy vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 36, 472-474.

Gupta S., Lakshmi A.J., Manjunath M.N., Prakash J. (2005). Analysis of nutrient and antinutrient content of underutilized green leafy vegetables. *LWT*, 38, 339-345.

Guthikonda S., Haynes W.G. (2006). Homocysteine: role and implications in atherosclerosis. *Curr. AtherosclerRep.*, 8(2), 100-106.

Hadi M. (2004). La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques. Thèse de Doctorat en Sciences Domaine Pharmacochimie, Université Louis Pasteur, 155.

Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A., Sovik K.N., Ritchard N.T., Hartzfeld P.W., Riechel T L (1998) High molecular weight plant phenolics (tannins) as biological antioxidants *J of Agric and Food Chem.*, 46, 1887-1892.

Hale A. L. (2003). Screening Potato Genotypes for Antioxidant Activity, Identification of the Responsible Compounds, and Differentiating Russet Norkotah Strains Using Aflp and Microsatellite Marker Analysis. *Office of Graduate Studies of Texas A&M Univeisity. Genetics.* 260.

Halliweil B., Rafter J., Jenner A. (2005). Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or pro? *Am. J. of Clin. Nutr.*, 81(1), 268S.. 276S.

Hamadache A., Ait-Abdellah F. (1998). La lutte contre les adventices du pois chiche d'hiver. Premier séminaire sur les légumineuses alimentaires en Algérie. Ain-Témouchent.

Hamerstrand G.E., Black L.T., Glover J.D. (1981). Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytic procedure. *Cereal. Chem.*, 58 (1), 42-45.

Harborne J.B. (1988). The flavonoids, Advances in research since 1980. Chapman & Hall. London.

Harper A.E., Yoshimura N.N. (1993). Protein quality, amino acid balance, utilization and evaluation of diets containing amino acids as therapeutic agents. *Nutrition*, 9, 460- 469.

Harwood J., Ramon A. (2000). Handbook of olive oil - Analysis and properties. An Aspen publication, Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, 1-513.

Hashinioto F., Ono M., Masuoka C., Ito Y., Chimizu K., Sakata Y., Nonaka G., Nishioka I., Nohara T. (2003). Evaluation of the anti-oxidative effect (*in vitro*) of tea polyphenols. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 67(2), 396-401.

Haslam E. (1966). Chemistry of Vegetable Tannins. London and New York: Academic Press.

Haslam E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannin) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59, 205-215.

Hebel P. (coord.) (2007). Comportements et consommations alimentaires en France (*Enquête CCAF* 2004), CREDOC, Tec & Doc, Lavoisier, Paris.

Hegarty V.M. (2000). "Tea Drinking and Bone Mineral Density in Older Women." *Am. J. Clin. Nutr.*, 71(41), 3-7.

Heilerova, L., Buckova, M., Tarapcik, P., Siihar, S., Labucia, J., (2003). Comparison of antioxidant activity data for aqueous extract of lemon balm (*Melissa officinalis L.*), oregano (*Oreganum vulgare L.*), thyme (*Thymus vulgaris L.*) and agrimony (*Agrimonia eupatoria L.*) obtained by conventional methods and the DNA-based biosensor. *Czech J. Food Sci.*, 21(2), 78-84.

Hellekant G., Hladik C.M., Dennys V., Simmen B., Roberts T.W., Glaser D. (1993.a). On the relationship between sweet taste and seasonal body weight changes in a primate (*Microcebus murinus*). *Chemical Senses*, 18(1), 27-33.

Hellekant G., Hladik C.M., Dennys V., Simmen B., Roberts T.W., Glaser D., DuBois G., Walters D.E., (1993.b). On the sense of taste in two Malagasy primates (*Microcebus murinus* and *Eulemur mongoz*). *Chemical Senses*, 18(3).

Heller W., Forkmann G (1993) Biosynthesis of flavonoids In The flavonoids, Advances in research since 1980. Harborne J.B. Ed. Chapman & Hall. London. 499.

Herald P.J., Davidson P.M., (1983). Antibacterial activity of selected hydroxycinnamic acids. *Journal of Food Science*, 48, 1378-1379.

Hermann K. (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 28, 315-347.

Hoilman P.C.H., Katan M.B. (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomèdecine and Pharmacotherapy*, 51(8), 305-310.

Hoilman P.C.H., Arts I.C.W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *J. of the Sci. of Food and Agric.*, 80(7), 1081-1093.

- Hoilman P.C.H. (2001).** Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *J of the Sci. of Food and Agric.*, **81(9)**, 842-852,
- Honig L. S., Tang M. X., Albert S., Costa R., Luchsinger J., Manly J., Stern Y., Mayeux R. (2003).** Stroke and the risk of Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, **60(12)**, 1707-1712.
- Horner J.D. (1988).** Astringency of Douglas-fir foliage in relation to phenology and xylem pressure potential. *Journal of Chemical Ecology*, **14(4)**, 1227-1237.
- Horner J.D. (1990).** Nonlinear effects of water deficits on foliar tannin concentration. *Biochemical Systematics and Ecology*, **18(4)**, 211-213.
- Hosein S. R., Lytle M. (2001).** Les Antioxydants. *Traducteur . Alain Boutilier. Catie Feuillet d'information*, **5**.
- Hoste H., Leveque H., Dorchies P. (2001).** Comparison of nematode infections of the gastrointestinal tract in Angora and dairy goats in a rangeland environment: relations with the feeding behaviour. *Veterinary Parasitology*, **101**, 127-135.
- Ilrazdina G., Wagner G.J. (1985).** Compartmentation of plant phenolic compounds; sites of synthesis and accumulation. *The Biochemistry of Plant Phenolics*. (Ed. par Van Sumere C.F. et Le P.J.). Oxford: Clarendon Press. **25**, 119-133.
- Humphries C. (1980).** Trypsin inhibitors in leaf protein concentrate. *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 1225-1230.
- INSEE (2007).** Annuaire Statistique de la France, Edition 2007, Insee Référence. Institut de Veille Sanitaire (2005) Situation et évolution des apports alimentaires de la population en France, 1997-2003, 96.
- ISO 659. (1988).** Graines oléagineuses - détermination de la teneur en huile. *International Organisation for Standardization (ISO)*. Geneva.
- Iwashiro T. (2000).** The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Of Plant Research*, **113(3)**, 287-299.
- James S. L., Muir J. G., Curtis S. L., Gibson P. R. (2003).** Dietary fibre: a roughage guide. *Internai Medicine Journal*, **33(7)**, 291-296.
- Jansen M. C., Bueno-de-Mesquita H. B., Rasanen L., Fidauza F., Nissinen A. M., Menotti A., Kok F J, Kromhout D (2001)** Cohort ^{analy} is of fruit and vegetable consumption and lung cancer mortality in European men. *international journal of cancer*, **92(6)**, 913-918.
- Jean F.!, Colin G.J., Lord D. (1992).** Huiles essentielles et extraits micro-ondes. *Parfumer & Flavorist*, **17**, 35-41.

- Jia Z., Tang M., Wu X. (1999).** The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.*, 64, 555-559.
- Johnson I.T. (2002).** Glucosinolates: bioavailability and importance to health. *Im'. J. Vitam. Nutr. Res.*, 72(1), 26-31.
- Kahler W. (1993).** 'Diabetes Mellitus—A Free Radical- Associated Disease. Results of Adjuvant Antioxidant Supplementation." *Z Gesamte mn Mcd.*, 48(5), 223-232.
- Kakade ML., Simons N., Liener I.E., (1969).** An evaluation of natural vs synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. *Cereal. Chem.*, 46, 518-526.
- Kakade Mi., Rackis J.J., McGee J.E., Ruski G. (1974).** Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: A collaborative analysis of an improved procedure. *Cereal Chem.*, 51, 376-381.
- Kakade ML., Thompson Ri.), Engelst W.E., Bebrus G.C., Yoder Ri.), Crane F.M. (1976).** Failure of soybean trypsin inhibitor to exert deleterious effects in calves. *J. Dairy Sei.*, 59, 1484.
- Kang J.H., Ascherio A., Grodstein F. (2005).** Fruit and vegetable consumption and cognitive decline in aging women. *Ann. Neurol.*, 57(5), 713-20.
- Kantor L.S., Lipton K., Manchester A., Oliveira V. (1997).** Estimating and Addressing America's Food Losses. *Food Review*, 20(1), 2-12.
- Kawamura Y., Funakoshi M., Kasahara Y., Yamamoto T. (1969).** A neurophysiological study on astringent taste. *The Japanese Journal of Physiology*, 19, 851-865.
- Kies C. (1981).** Bioavailability: a factor in protein quality. *J Agric. Food Chem.*, 29, 435-440.
- Kjeldahl J. (1883).** Determination of protein nitrogen in food products. *Encyclopedia of Food Science*, 439-441.
- Kolev M. (1976).** La culture maraîchère en Algérie. Légumes feuilles. Tome II. I.D.C.M.
- Kossa A. (1975).** Valeur alimentaire des fèves. *Mémoire de D.E.A., INRA.* Dijon.
- Koubaa L, Damak M., McKillop A., Simmonds M. (1999).** Constituents of *Cynara cardunculus*. *Fitoterapia*, 70, 212-213.
- Koubaa I, Damak M. (2003).** A new dilignan from *Cynara cardunculus*. *Fitoterapia*, 74, 18-22.
- 7 Krachler B., Eliasson M.C., Johansson I., Ilalimaui G., Lindahi B. (2005).** Trends in food intakes in Swedish adults 1986-1999: findings from the Northern Sweden MONICA (Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Study. *Public Health Nutrition*, 8(6), 628-35.

Kraemer M.E., Rangappa M., Crade W., Benepal P.S. (1987). Induction of trypsin inhibitors in soybean leaves by mexican bean beetle (*Coleoptera: Coccinellidae*) defoliation. *J. Econ. Entomol.*, **80**, 237-241.

Kranz S., Siega-Riz A. M., Herring A. H. (2004). Changes in diet quality of American preschoolers between 1977 and 1998. *American Journal of Public Health*, *94*(9), 1525-1530.

Krippeit-Drews P., Lang F., Haussinger D., Drews G. (1994). H2O2 induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. *Pfulgers Arch.*, *426*, 552-554.

Krogdahi A., HoIm H. (1981). Soybeans proteinase inhibitors and human proteolytic enzymes: selective inactivation of inhibitors by treatment with human gastric juice. *J. Nutr.*, **111**, 2045.

Kromhout D., Bosschieter E. B., de Lezenne Coulander C. (1982). Dietary fibre and 10-year mortality from coronary heart disease, cancer, and ail causes. The Zutphen study. *Lancet*, *2*(8297).

Kukic J., Popovic V., Petrovic S., Mucaji P., Ciric A., Stojkovic D., Sokovic M. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. *Food Chemistry*, **107**, 861-868.

Knnitz M. (1945). Crystallization soybean trypsin inhibitor from soybean. *Science*, **101**, 668-669.

Kunitz M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. *J Gen. Physiol.*, **30**, 291-310.

Kushad M.M., Brown A.F., Kurilich A.C., Juvik J.A., Klein B.P., Wallig M.A., Jeffery E.H. (1999). Variation of glucosinolates in vegetable crops of Brassica oleracea. *J Agric. Food Chem.*, *47*(4), 1541-1548.

Kwok K.C., Qui W.H., Tsang J.C. (1993). Heat inactivation of trypsin inhibitor in soymilk at ultra-high temperatures. *J. Food Sei.*, *58*(4), 859-862.

Lahouel M., Fillastre J-P. (2004). Role of flavonoids in the prevention of haematotoxicity due to chemotherapeutic agents. *Haema.*, *7*(3), 313-320.

Lairon D. (2001). Dietary Fibres and Dietary Lipids. In: Advanced dietary fibre technology (B. V. :McCleary, and L. Prosky, Eds.), 177-185. Blackwell Science Ltd.

Lairon D., Chanussot F. (2001). Modulations nutritionnelles du métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines. In: Aliments Fonctionnels (M. Roberfroid, Ed.), 167-192. Tec et Doc Lavoisier.

Lampe J.W. (1999). Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Am J Clin Nutr*, *70*(3 Suppl), 475-490,

Lasson S., Wiren A., Lundgren L., Ericsson T. (1986). Effects of light and nutrient stress on leaf phenolic chemistry in *Salix dasyclados* and susceptibility to *Galerucella lineola* (Coleoptera) *Oiko* *47*(2), 205-210.

Larsson S.C., Hakansson N., Naslund I., Bergkvist L., Wolk A. (2006). Fruit and vegetable consumption in relation to pancreatic cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 15(2), 301-305.

Laskowski M. (1966). Influence des traitements technologiques sur l'activité *in-vitro et in-vivo* des facteurs aminutritionnels de trois légumineuses. In: Thèse Magister de Science Agronomique et Alimentaire (Mansouri M.). INA, El Harrach.

Laverdière F., Holstein A., Thiebant L., Mal R., Gravejat G., Desclozeaux B. (1999). Les principales méthodes d'analyse. Dossier Coupk Centre Sciences des Processus industriels et Naturels (SPIN), 51.

Laumont P. (1960). Notes sur l'amélioration de lentille en Algérie. *Annales de l'Ecole Nationale d'Agriculture*, Alger.

Laumonier R. (1978). Cultures légumières et Tome 11. Légumes feuilles. Ed. C.N.R.S., Paris.

Lee K.J., Sok D.E., Kim Y.B., Kim M.R. (2002). Protective effect of vegetable extracts on oxidative stress in brain of mice administered with NMDA. *Food Research International*, 35, 55-63.

Lehnhardt W.F., Diils H.G. (1982). A.E. Staley manufacturing Co., personal communication. In: A rapid automated procedure for the determination of trypsin inhibitor activity in soy products and common foodstuffs. Charpentier B.A., Lemmel D.E., Eds., *J. Agric. Food Chem.*, 32, 908-911.

Leitao G.G., Leitao S.G., Vilgac W. (2002). Quick preparative separation of natural naphthopyranones with antioxidant activity by high-speed counter-current chromatography. *Z Naturforsch.*, 57e, 1051-1055.

Liener I.E. (1979). The nutritional significance of plant protease inhibitors. *Pi-oc. Nutr. Soc.*, 38, 159-169.

Liener LE. (1980). Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic Press, New York.

Lim C., Lee J., Choi J. (2005). Analysis of buying behavior and preference for fruits in Korea. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 23(3), 351-355.

Liu S., Lee L M., Ajani U., Cole S. R., Buring J. E., Manson J. E. (2001). Intake of vegetables rich in carotenoids and risk of coronary heart disease in men: The Physicians' Health Study. *International journal of epidemiology*, 30(1), 130-135.

Lin R.H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Ain. J. of Clinical Nutr.*, 78(Suppl), 517-520.

Loeuilhet D., Fajac F. (1998). La production et le commerce mondial des fruits et légumes. Dossier analyse économique. In : *Observatoire des marchés Fruitrop*. Montpellier: Cirad, 1-10.

Lucehesi M. E., Chemat F., Smadja J. (2004 a). Solvent-free microwave extraction of essential from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *J. Chromatography A*, **1043**, 323-327.

Lucchesi M. E., Chemat F., Smadja J. (2004 b). An original solvent free microwave extraction of essential oil from spices. *Flav. Fragr. J.*, **19**, 134-138.

Luechesi M. E. (2005). Extraction sans solvant assistée par micro-ondes conception et application à l'extraction des huiles essentielles. Thèse de Doctorat, Université de La Réunion, France, 2005.

Lugasi A., Hovari J., Sagi K.V., Biro L. (2003). The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis*, **47(1-4)**, 119-125.

Lund E. (2003). Non-nutritive bioactive constituents of plants: dietary sources and health benefits of glucosinolates. *Nutr. Res.*, **73(2)**, 135-143.

Lirnet N., Lacerda-Vieira A., Barros H. (2005). Fruit and vegetables consumption and gastric cancer: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Nutrition and Cancer*, **53(1)**, 1-10.

Luque de Castro M.D., Garcia-Ayuso L.E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Anal. Chem. Acta*, **369**, 1-10.

Luque-Garcia J.L., Luque de Castro M.D. (2004a). Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications. *Talanta*, **64**, 571-577.

Luque-Garcia J.L., Luque de Castro M.D. (2004b). Ultrasound-assisted Soxhlet extraction: an expeditive approach for solid sample treatment. Application to the extraction of total fat from oleaginous seeds. *Journal of Chromatography A*, **1034**, 237-242.

Macheix J.J., Flenriet A., Sarni-Manchado P. (2005). Les composés phénoliques dans la plante Structure, biosynthèse, répartition et rôles. In: Les polyphénols en agroalimentaire. Cheynier V., Sarni-Manchado P. Ed. *Tec. & Doc. Lavoisier*, Paris.

Maignal L., Pibarot P., Bonetti G., Chaintreau A., Marlou J.P. (1992). Simultaneous distillation-extraction under static vacuum: isolation of volatile compounds at room temperature. *Journal of Chromatography A*, **606**, 87-94.

Maire R. (1965). Flore de l'Afrique du nord. Ed. Le Chevalier P., Paris, 12, 160.

Manoikidis C., Polychronidou A., Alichanidis E. (1970). Observations suivies sur la protéolyse pendant la maturation du fromage "Thélémé". Thèse de Doctorat. Université de Thessaloniki. Grèce,

Majors R.E. (2006). Trends in sample preparation. *LC-GC N. Am.* **26**, 73.

Marfak A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools : formation des depsides. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges. 187.

Mariotti F., Tomé D. (1999). Les propriétés nutritionnelles des protéines végétales en alimentation humaine. *OCL*, 6, 487-493.

Markham K.R. (1988). Distribution of flavonoids in the lowr plants and evolutionary significance. In: *The flavonoids, Advances in research since 1980.* Harborne J.B. Ed. Chapman & i-tau. London. pp. 427-458.

Mauro A. (2003). Chemical-Physical characteristics of olive oils, Technical course for Olive ou testers. *Organizzazione Nazionale Assaggiatori Olio di Oliva*, 1-26.

Maydani M. (2000.a). Effect of functional food ingredients: vitamin E modulation of cardiovascular diseases and immune status in the elderly. *Am. J. Clin. Nutr.*, 71(suppl), 1665-1668.

Maydani M. (2000.b). Vitamin E and prevention of heart disease in high-risk patients. *Nutr. Rev.*, 58, 278-281.

Meanlis G. T., Mceneuy J., Pearse J., Young I.S. (1998). Black tea consumption does not protect low density lipoprotein from oxidative modification. *Eur. J. Clin Nutr.*, 52, 202-206.

Mediterra (2007). Identité et qualité des produits alimentaires méditerranéens, *Rapport annuel du CIHEAM, Paris, Les Presses de Sciences-Po*, 330.

Mehansho H., Rogler J.C., Butler L.G., Carlson D. (1985). An anusual growth inhibitory effect of tannins on hamsters. *Fédération Proceeding*, 44, 1960.

Mekhlef M. (1993). Le développement de la plasticulture et ses effets sur la production maraîchère cas de la wilaya de Tipaza. Mémoire d'ingénieur Agronome, INA El Harrach, Alger, p. 101.

Menegatti E., Palmieri S., Waide P., Luisi P.L. (1985). Isolation and characterisation of a trypsin inhibitor from white mustarde (*Sinapis alba* L.). *J. Agric. Food Chein.*, 33, 784-789.

Mengal P., Belin D., Bellido Gil M., Mompon B. (1993). VMHD : extraction d'huile essentielle par micro-ondes. *Parfums, Cosmétiques, Arômes*, 114, 66-67.

Mengal P., Mompon B. (1994). Procédé et installation d'extraction sans solvant de produits naturels par micro-ondes. *Brevet international*, WO 94/26853.

Mensor LL., .Menezes F.S., Leitao G.G., Reis A.S., Santos T.C., Coube C.S., Leitao S.G. (2001). Screening of brazilian plant extracts for antioxidant isoactivity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.*, 15, 127-130.

Merck E. (1975). Révélateurs pour la chromatographie en couches minces et sur papier. Merck. Darmstadt.

Merken I.M., Beecher G.R. (2000). Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: a review. *J. of Agric. and Food Chem.*, 48(3), 577-599.

Metaxas A.C., Meredith R.J. (1983). Industrial Microwave Heating. Peter Peregrinus Ltd, London.

Meyer A.S., Yi O.S., Person D.A., Waterhouse A. L., Frankel E. N. (1997). Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes. *J. Agricult Food U-iem.*, 45, 1638-1643.

L Mhallal S. (1986). Mémoire de certificat d'étude approfondie (CEA). Fac. Sei. Rabat.

Mita I., Scalbert A., Expert D., (1996). Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. *PJytochemistry*, 42(6), 1551-1555.

Ministère de l'Agriculture (1992a). Régulation économique en agriculture. Rapport de la Commission Régulation. *Consultation nationale sur l'agriculture*, Alger, 20-22 avril 1992. Document ronéotypé, 25.

Ministère de l'Agriculture, Direction des statistiques et des enquêtes économiques (1993). *Statistiques "série B": de 1980 à 1993.*

Ministère de la Santé et des Solidarités (2006). Deuxième Programme National Nutrition Santé. Ministère de la Santé et des Solidarités, 51.

Mitchell I.L.H., Block R.J. (1946). Some relationships between the amino acid contents of proteins and nutritive value for the rat. *J. Bioc. Chem.*, 163, 599.

Mithen R., Dekker M., Verkerk R., Rabot S., Johnson I. (2000). The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinates in human foods. *Journal of the Science of the Food and Agriculture*, 80, 967-984.

Mole S., Waterman P.G. (1987). Tannic acid proteolytic enzymes: enzyme inhibition substrate derivation. *Phytochemistry*, 26, 99-102.

Mole S., Rossi J A M, Waterman P G (1988) Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain-forest plants. I. Chemical changes. *Journal of Chemical Ecology*, 14(1), 1-21.

Mole S., Waterman P.G. (1988). Light-induced variation in phenolic levels in foliage of rain-forest plants. II. Potential significance to herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 14(1), 23-24.

Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sei. Technol.*, 26 (2), 211-219.

Moore S., Spackman D., Stein W. (1958). Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins *Analytical Chemistry*, 30, 1185-1190

Morel Y., Barouki R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J.*, 342 (3), 481-496.

Mosha T.C., Gaga H.E. (1999). Nutritive value and effect of blanching on the trypsin and chymotrypsin inhibitor activities of selected leafy vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*, 54, 271-283.

Mozaffarian D., Kumanyika S. K., Lemaitre R. N., Olson J. L., Burke G. L., Siscovick D. S. (2003). Cereal, fruit, and vegetable fiber intake and the risk of cardiovascular disease in elderly individuals. *Jama - Journal of the American Medical Association*, 289(13), 1659-1666.

Nagy S., Telek L., Hall N.T., Berry N.E. (1978). Potential food uses for protein from tropical and subtropical plant leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 26(5), 1016-1028.

Naska A. (2000). "Fruit and vegetable availability among ten European countries: how does it compare with the 'five-a-day' recommendation?". *British Journal of Nutrition*, 84(4), 549-556.

National Cancer Institute (2001). 5 a Day for Better Health Program. (G. Stables, and J. Heimendinger, Eds.) National Cancer Institute - National Institutes of Health 01-5019.

Ness A. R., Maynard M., Frankel S., Smith G. D., Frobisher C., Leary S. D., Emmett P. M., Gunnell D. (2005). Diet in childhood and adult cardiovascular and all cause mortality: the Boyd Orr cohort. *Heart*, 91(7), 894-898.

Nickerson G B, Lickens S T (1966) Gas Chromatographic evidence for the occurrence of hop oil in beer. *Journal of Chromatography*, 21, 1-3.

Niezen J.H., Charleston W.A.G., Robertson H.A., Shelton D., Waghorn G.C., Green R. (2002.a). The effect of feeding sulfa (*Hedysarum coronarium*) or lucerne (*Medicago sativa*) on lambs parasite burdens and development of immunity to gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 105, 229-245.

Niezen J.H., Waghorn G.C., Graham T., Carter J.L., Heathwick D.M. (2002.b). The effect of diet fed to lambs on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae *in vitro* and on pasture. *Veterinary Parasitology*, 105, 269-283.

Novelli G. P. (1997). Role of free radicals in septic shock. *J Physiol Pharmacol.*, 48, 517-527.

Odani S., Ikenaka T. (1972). Studies of soybean trypsin inhibitors, IV: Complete amino acid sequence and the anti-proteinase sites of Bowman-Birk soybean inhibitor. *J. Biochem.*, 71, 839-848.

Odhav B., Beekrum S., Akula U., Baijnath H. (2007). Preliminary assessment of nutritional value of traditional leafy vegetables in KwaZulu-Natal, South Africa. *J of Food Composition and Analysis*, 20, 430-435.

Ohran H., Marol S., Hepsen LF., Sahin G. (1999). Effects of some probable antioxidants on selenite-induced cataract formation and oxidative stress-related parameters in rats. *Toxicology*, 139, 219-232.

ONS (Office National des Statistiques) (1991.a et b). *Annuaire statistique de l'Algérie*, n° 15.

Oser B L (1959) An integrated essential amino acids index for predicting the biological value of proteins. in: Albanese, A.A. (Ed), *Protein and Amino Acid Nutrition*. Academic Press, New York, 295-311.

Ozenda P. (1983). Flore de sahara. Ed. C.N.R.S. Paris, 250, 356, 416.

Packer L. (1995). "Alpha-Lipoic Acid as a Biological Antioxidant." *Free Radicals Biol and Med.*, 19, 227-250.

Pan S.Y., Ugnat A.M., Mao Y., Wen S.W., Johnson K.C. (2004). A case-control study of diet and the risk of ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13(9), 1521-1527.

Panda K., Chattopadhyay R., Ghosh M. K. Chattopadhyay D.J., Chatterjee I. B. (1999). Vitamin C prevents cigarette smoke induced oxidative damage of proteins and increased proteolysis. *Free Radicals Biol and Med.*, 27, 1064-1079.

Panichayopakaranant P., Kaewsuwan S. (2004). Bioassay-guided isolation of the antioxidant constituent from *Cassia alata L.* leaves. *Songklanakarin J Sci. Technol.*, 26(1), 103-107.

Panovska K.T., Kulevanova S., Stefova M. (2005). *In vitro* antioxidant activity of some *Teucrium* species (*Lamiaceae*). *Acta Pharm.*, 55, 207-214.

Paolini V., Bergeand J.P., Grisez C., Prevot F., Dorchies' P., Hoste H. (2003.a). Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 113, 253-261.

Paolini V., Frayssines A., De La Farge F., Dorchies P., Hoste H. (2003.b). Effects of condensed tannins established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Veterinary Parasitology*, 34, 331-339.

Paré J.R.J., Sigouin M., Lapointe J. (1990). Extraction de produits naturels assistée par micro-ondes. *Brevet européen*, EP 398798.

Paré J.R.J., Sigouin M., Lapointe J. (1991). Microwave assisted natural product extraction. *Brevet américain*, US 5 002 784.

Paré J.R.J. (1992). Microwave assisted process for extraction and apparatus therefore. *Brevet canadien*, CA 2055390.

Paré J.R.J. (1994). Microwave extraction of volatile oils. *Brevet américain*, US 5 338 557.

Paré J.R.J., Bélanger J.M.R. (1997). Instrumental methods in food analysis. *Elsevier*, Amsterdam.

Paris R., Moyses H. (1971). Précis de matière médicale (tome III). Paris: Masson et Cie.

Password F. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IL *Botanical Journal of the Linnean Society*, **141**, 399-436,

Pavia M., Pileggi C., Nobile C. G., Angelillo I. F. (2006). Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *Am. J. of Clin. Nutr.*, **83**(5), 1126-1134.

Peng F., Sheng L., Lin B., Tong H., Lin S. (2004). Comparison of different extraction methods: steam distillation, simultaneous distillation and extraction and headspace co-distillation, used for the analysis the volatile components in aged flue-cured tobacco leaves. *Journal of Chromatography A*, **1040**,1-17.

T Perreux L., Loupy A. 2001), Microwaves in organic synthesis. *Tetrahedron*, **57** (2), 9199-9223.

Pieroni A., Janiak V., Dflrr C. M., Liideke S., Trachsel E., Heinrich M. (2002). In vitro Antioxidant Activity of Non-cultivated Vegetables of Ethnic Albanians in Southern Italy. *Phytother. Res.*, **16**, 467-473.

T Pietinen P., Rimm E. B., Korhonen P., Hartman A. M., Willett W. C., Albanes D., Virtamo J. (1996). Intake of dietary fiber and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study. *Circulation*, **94**(11), 2720-2727.

Pietta P. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. of Natural Products*, **63**(7), 1035-1042.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J.O. (1999). L'évaluation du stress oxydatif d'un individu: une réalité pour le médecin. *Vaisseaux, Coeur, Poumon*, **4**(5), 215-223.

T Pinelli P., Agostini F., Comino C., Lanteri S., Portis E., Romani A. (2007). Simultaneous quantification ofcaffeoyl esters and flavonoids in wild and cultivated cardoon leaves. *Food Chemistiy*, **105**(4), 1695-1701

Pirie N.W. (1980). Leafprotein and other aspects of fooder fractionation. London: Academic Press.

Pollock C.J., Chatterton N.J. (1988). Fructanes. In: The biochemistry of plants. Press, J. Ed. Academic Press, San Diego, **14**, 109-140.

Porath J., Belew P. (1975). The trypsin and chymotrypsin inhibitors in chick pea (*Cicer arietinuin*). *Eu. J Biochem.*, **60**, 247-258.

Prattala R. (2003). Dietary changes in Finland, *success* stories and future challenge. *Appetite*, **41**(3), 245-249.

Priego-Capote F., Ruiz-Jiménez J., Laque de Castro M.D. (2007). Identification and quantification of *trans* fatty acids in bakery products by gas chromatography-mass spectrometry after focused microwave Soxhiet extraction. *Food Chem.*, *100*, 859-867.

Priego-Lopez E., Velasco J., Doharganes M.C., Ramis-Ramos G., Laque de Castro M.D. (2003). Focused microwave-assisted Soxhiet extraction: an expeditive approach for the isolation of lipids from sausage products. *Food Chem.*, *83*, 143-149.

Pridham J.B. (1963). Enzyme chemistry of phenolic compounds. (Ed.) Mc Millan, New York.

Proteggenta A., Panna A.A., Pagnanga G., Van Burnel S., Wagner E., Wiseman S., Van de Put F., Dacom B.E.C., Rice-Evans C. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruits and vegetables, reflects their phenolic compounds and vitamin C composition. *Free Radic. Res.*, *36*, 217-233.

Quezel P., Santa S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome I et II. Ed. C.N.R.S., Paris, 1170.

Rackis J.J. (1965). Physiological properties of soybean trypsin inhibitors and their relationship to pancreatic hypertrophy and growth of rats. *Fed. Proceed.*, *24*, 1488-1493.

Rackis J.J. (1974). Biological and physiological factors in soybean. *J Am. OilChem. Soc.*, *51*, 164.

Ramasarma P.R., Rajagopal R.D. (1991). Nature of the tryptic/chymotryptic inhibitor from horse gram (*Dolichus biflorus*). *md. J Biochem. Biophys.*, *28*, 418-424.

Ramasarma P.R., Appu Rao A.G., Rajagopal R.D. (1994). Kinetic and structural studies on the interaction of proteinase inhibitor from *Dolichus biflorus* (Horse gram). *J. Agric. Food Chem.*, *42*, 2139-2146.

Randali E.L. (1974). Improved method for fat and oil analysis by a new process of extraction. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, *57*, 1165.

Remesy C. (1996). Intérêt nutritionnel des fibres et micronutriments apportés par les fruits & légumes. *Actualités en diététique*. Ed. Flammarion, Collection Dominos. Paris. 22, 883-895.

Remesy C., Manach C., Demingné C., Texier O., Régéat F. (1996). Intérêt des flavonoïdes. *Mcd. et Nutr.*, *22*, 247-258.

Remesy C. (2001). Polyphénols : effets biologiques et biodisponibilité. *Equation-Nutrition*, *12*.

Riholi E., Norat T. (200). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am. J. of Clin. Nutr.*, *78*(3), 59-569.

- Rimm E. B., Ascherio A., Giovannucci E., Spiegelman D., Stampfer M. J., Willett W. C. (1996). Vegetable, fruit, and cereal fiber intake and risk of coronary heart disease among men. *Jama - Journal of the American Medical Association*, 275(6), 447-451.
- Robbins C.T., Hanley T.A., Hagerman A.E., Hjeljord O., Baker D.L., Schwartz C.C., Mautz W W (1987) Role of tannins in defending plants against ruminants reduction in protein availability. *Ecology*, 68(1),98-107.
- Robbins C.T., Hagerman A.E., Austin P.J., McArthur C., Hanley T.A. (1991). Variation in mammals physiological responses to a condensed tannin and its ecological implications. *Journal of Mammalogy*, 72(3), 480-486.
- Rosenthal G.A., Janzen D.H. (1979). *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites*. Academic Press, New York.
- Ross C.W., Delting J.K. (1983). Investigation of trypsin inhibitors in leaves of four North American prairie grasses. *Journal of Chem. Ecology*, 9(2), 247-257.
- Ross J. A., Kasum C. M. (2002). Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*, 22, 19-34.
- Roussy G., Pearce J.A. (1995). *Foundations and Industrial Applications of Microwaves and Radio Frequency Fields*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
- Rouzand G., Young S.A., Duncan A.J. (2004). Hydrolysis of glucosinolates to isothiocyanates after ingestion of raw or microwaved cabbage by human volunteer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 13(1), 125-131.
- Rungapamestry V., Duncan A.J., Fuller Z., Ratcliff B. (2006). Changes in glucosinolate concentrations, myrosinase activity, and production of metabolites of glucosinolates in cabbage (*Brassica oleracea* Var. capitata) cooked for different durations. *J. Agric. Food Chem.*, 4;54(20), 7628-7634.
- Ryan C.A. (1973), Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 24, 173-196.
- Salunkhe D.K. (1990). *Dietary tannins: consequences and remedies*. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Sannomiya M., Montoro P., Piacente S., Pizza C., Brito A. Vilegas W. (2005). Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion *Byrsonima crassa* Nieden. *Rapid communication in J. Mass Spectrometry*, 19(16), 2244.
- Satterice L.D., Marshall H.F., Tennyson J.M. (1979). Measuring protein quality. *J Am. Oil Chem. Soc.*, 56 (3), 103-109.

- Scalbert A., Williamson, G. (2000).** Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, **130**, 2073-2085.
- Schaffer S. (2005),** Understanding local mediterranean diets: a multi disciplinary pharmacological and ethnobotanical approach. *The Local Food Nutraceuticals Consortium*, 358-360.
- Schanderi S.H. (1970).** *Methods in Food Analysis.* London: Academic Press.
- Schmidt E., Isvilanonda S. (2004).** Food consumption expenditure structure in Thailand 1998: the case of vegetables. *Acta Horticulturae*, (655), 99-106.
- Schultz J.C., Nothnagle P.J., Baldwin I.T. (1982).** Seasonal and individual variation in leaf quality of two northern hardwoods tree species. *American Journal of Botany*, 69(5), 753-759.
- Serafini M., Laranjinha J.A., Almeida L.M., Maiani G. (2000).** Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *J Nutr. Biochem.*, 11, 585-590.
- Sestrino V., Holmes Z.A., Miller L.T. (1982).** Effect of heating time on soybeans, vitamin B6, and folacin retention, trypsin inhibitor activity and micro-structure changes. *J. Food Sci.*, 47, 530-537.
- Sevcikova P., Glatz Z., Sianina J. (2002).** Analysis Of artichoke extracts (*Cynara cardunculus L.*) by means of micellar electrokinetics capillary chromatography. *Electrophoresis*, 23, 249-252.
- Siano F., Ghizzoni C., Giofriddo F., Colombo E., Servillo, D. Castaldo L. (2003).** Determination of estragole, safrole and eugenol methyl ether in food products. *Food Chemistry*, 81, 469-475.
- Silva B.M., Andrade P.B., Valentao P., Ferreres F., Seabra R.M., Ferreira M.A. (2004).** Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel and seed) and jam Antioxidant activity. *J Agric. Food Chem.*, 52, 4705-4712.
- Silva S.V., Malcata F.X. (2005).** Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. *Food Chemistry*, 89, 19-26.
- Simpson W.T. (1999).** Drying and Control of Moisture Content and Dimensional Changes. *Gen. Tech. Rep. FPL-GTR-113.* Madison, Forest Products Laboratory. 463.
- Singh G., Kawatra A., Sehgal S. (2001).** Nutritional composition of selected green leafy vegetables, herbs and carrots. *Plant Foods for Human Nutrition*, 56, 359-364.
- Singh J., Upadhyay A.K., Babadur A., Singh B., Singh K.P., Rai M. (2006).** *Antioxidant phytochemicals in cabbage.* Scientia Horticulturae, 108, 233-237.
- Singleton V.L., Ortofer R., Lamye!a-Raventos R.M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. in: Packer L. (Ed). *Methods in Enzymology.* Orlando. Academic Press, 152-178.

Sianina J., Taborska E., Bochorakowa H., Humpa O., Robinson W.E., Schram K.H. (2001). New and facile method of preparation of the anti-HIV agent 1,3-dicaffeoylquinic acid. *Tetrahedron Letters*, 42, 3383-3385.

Song L., Thornalley P.J. (2006). Effect of storage, processing and cooking on glucosinolate content of Brassica vegetables. *Food Chem. Toxicol.*, 30.

Spichiger R.-É., Savolainen V. V., Jeanmonod D. (2000). Botanique systématique des plantes à fleurs. Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne.

Spiro M., Chen S.S. (1995). Kinetics of isothermal and microwave extraction of essential oil constituents of peppermint leaves into several solvent systems. *Flav Fragr J.*, 10, 259-272.

Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martinez J.R. (2004 a). Analysis of volatile secondary metabolites from Colombian *Xylopiya aromatica* (Lamarck) by different extraction and headspace methods and gas chromatography. *J Chromatography A*, 1025, 105-113.

Stashenko E.E., Jaramillo B.E., Martinez J.R. (2004 b). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J. Chromatography A*, 1025, 93-103.

Steffens R., Fox F.R., Kassel B. (1978). Effect of trypsin inhibitors on growth and metamorphosis of corn borer larvae *Ostrinia nubilalis* (Hubner). *J Agric. Food Chem.*, 28(1), 170-174.

Struthers B.J., Mac Donald J.R., Dahlgren R.R., Hopkins D.T. (1982). Effects on the monkey, pig and rat pancreas of soy products with varying levels of trypsin inhibitor and comparison with the administration of cholecystokinin. *J Agric. Food Chem.*, 35, 971-973.

T Svoboda K.P., Hampson J.B. (1999). Bioactivity of essential oils of selected temperate aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. *Plant Biology Department, SAC Auchincruive, Ayr, Scotland, UK., KA6 5HW.*

Swain T., Hillis W.E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus doniastica* - I. the quantitative analysis of phenolic constituents. *J. of the Sci. of Food and Agric.*, 10, 13.

Swain T. (1977). Secondary compounds as protective agents. *Annual review of plant Physiology*, 28, 479-501.

Swain T. (1979). Tannins and lignins. *Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites* (Ed. Par Rosenthal G.A. et Janzen D.H.), 637-682. New York: Academic Press.

Tadj A. (1989). Contribution à l'étude des caractéristiques physico-chimiques du grain de quatre variétés de blé dur. Thèse d'ingénieur agronome, Technologie alimentaire. Université de Tlemcen.

Taleb Bendiab S.A., IVlashev N., Vassilev G.N. (1989). Studies into the chemical composition of the acorns of various species of mediterranean oak (*Quercus*). *Comptes rendus de l'Académie bulgare des sciences*, Tome 42, 4, 99 - 101.

Taleb Bendiab S.A., Benmandi M., Mashev N., Vassilev G.N. (1990). Contribution to the investigation of the chemical composition of the acorn of various *Quercus* species in Algeria; investigation the acorn of *Quercus ilex*. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des sciences*, Tome 43, 7, 83-85.

Tan N-H., Rahim Z. Hj. A., Khor H. T., Wong K.C. (1983). Winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) tannin level, phytate content and hemagglutinating activity. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 916-917.

Tan-Wilson A.L., Chen J.C., Duggan M.C., Chapman C., Obach R.S., Wilson K.A. (1987). Soybean Bowman-Birk trypsin isoinhibitors : classification and report of glycine-rich trypsin inhibitor class. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 974-981.

Tanaka T. (1976). *Cyclopedia de Tanaka des usines comestibles du monde. Le guide des usines comestibles.*

Toursel P. (1997). Extraction high-tech pour notes fraîches. *Process*, 1128, 38-41.

Trabut L. (1935). Flore du Nord de l'Afrique. Répertoire des noms indigènes des plantes spontanées, cultivées et utilisées dans le Nord de l'Afrique Bd. *Latypo-litho et Carbonelf.*, Alger. 355

Trichopoulou A., Vasilopoulou E., Holiman P., Chamalides Ch., Foufa E., Kaloudis Tr., Kromhout D., Miskaki Ph., Petrochulou I., Poulima E., Stafilakis K., Theophilou D. (2000). Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich sources of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. *Food Chemistry*, 70, 319-323.

Tucker K. L., Hallfrisch J., Qiao N., Muller D., Andres R., Fleg J. L. (2005). The combination of high fruit and vegetable and low saturated fat intakes is more protective against mortality in aging men than is either alone: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Journal of nutrition*, 135(3), 556-561,

Twidwell E.K., Wagner J.J., Thiex N.J. (2002). Use a Microwave Oven to Determine Moisture Content of Forages. *ExEx 8077*, 2.

Vagi E., Simandi B., Snhajda A., Hethelyi E. (2005). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum marjorana L.* Extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. *Food research international*, 38, 51-57.

Vainio 11., Weiderpass E. (2006). Fruit and vegetables in cancer prevention. *Nutrition and Cancer*, 54(1), 111-142.

Valentao P., Fernandes E., Carvalho F., Andrade P.B., Seabra R.M., Bastos, L.M. (2002). Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus L.*) infuzion against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 4989-4993,

Vansant G. (2004). Radicaux libres et antioxydants : principes de base. *Symposium «Antioxydants et alimentation »*. Institut Danone.

Varela C. (1969). Aminogram of prickly pear and acorn - Possibilities of improving the nutritive value of their proteins. *Rev. Nutr. Animal*, **7**, 53-66.

Vaughan J. G., Geissler C.A. (1997). The new oxford book of food plants. New York: Oxford University Press, 196.

Verhoeven D.T., Goldbohm RA., van Poppel G., Verhagen II., van den Brandt P.A. (1996). Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **5**(9), 733-48.

Vijayakumari K., Siddhuraju P., Janardhanan K. (1997). Chemical composition, amino acid content and protein quality of the little-known legume *Bauhinia purpurea L.* *J. Sei. Food Agric.*, **73**, 279-286.

Viroben G., Bertrand D. (1985). La valeur nutritionnelle des matières protéiques végétales. In *Proteines végétales*. Goden, B. Ed. Apria. Paris.

Viro M., Tomao V., Coluagni G., Visionsi F., Chemat F. (2007). New microwave-integrated Soxhlet extraction: An advantageous tool for the extraction of lipids from food products. *Journal of chromatography A*, **1174**(1-2), 138-144.

Voedingscentrum (1998). *Zo eet Nederland, resultaten van de Voedselconsumptiepeiling 1998*. Voedingscentrum, Den I-Iaag, 219.

Wagner H., Blatt S. (2001). Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer. New-York.

Waghorn G.C. (1996). Condensed tannins and nutrition absorption from the small intestine. *Book Conderised tannins and nutrition absorption from the small intestine* (Ed. Rode, L.M.), pp. 175-194. Lethbridge Research Center.

Waghorn G.C., McNabb W.C. (2003). Consequences of plant phenolic compounds for productivity and health of ruminants. *Proceeding of the Nutrition Society*, **62**, 383-392.

T Walker-Simmons M., Ryan C.A. (1977). Wound-induced accumulation of trypsin inhibitor activities in plant leaves survey of several plant genera. *Plant Physiol.*, **59**, 437-439.

T Wang H., Cao G., Prior R.L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 701-705.

Wang S-Y., Wu J-H., Shyur L-F., Kuo Y-H., Chang S-T. (2002). Antioxidant activity of abietane-type diterpenes from heartwood of *Taiwania cryptomerioides* hayata. *Holzforchung*, 56, (5).

Wang M., Simon J.E., Fabiola Aviles I., He, K., Zheng Q.-Y., Tadmor Y. (2003). Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.)—*T. of Agri and Food Chem* 51, 601-608.

Waterman P.G. (1984). Food acquisition and processing as a function of plant chemistry. *Food acquisition and processing in Primates* (Ed. par Chivers DI, Woods B.A., Bus, A.), pp. 177-211. New York and London: Plenum Press.

Waterman P.G., Ross J.A., McKey D.B. (1984). Factors affecting levels of some phenolic compounds, digestibility, and nitrogen content of the mature leaves of *Barteria fistulosa* (Passifloraceae). *Journal of Chemical Ecology*, 10(3), 387-401.

Whitmer R. A., Gunderson E. P., Barrett-Connor E., Quesenberry C. P., Jr, Yaffe K. (2005). Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *BMJ*, 330(7504), 1360.

Willett W. C. (2005). Diet and cancer: an evolving picture. *Jama - Journal of the American Medical Association*, 293(2), 233-234.

Wolk A., Manson J. E., Stampfer M. J., Colditz G. A., Hu F. B., Speizer F. E., Hennekens C. H., Willett W. C. (1999). Long-term intake of dietary fiber and decreased risk of coronary heart disease among women. *Jama-Journal of the American Médical Association*, 281(21), 1998-2004.

Woodhead S. (1981). Environmental and biotic factors affecting the phenolic content of different cultivars of *Sorghum bicolor*. *Journal of Chemical Ecology*, 7(6), 1035-1047.

Young V.R., Puig M., Queiroz E., Serimshaw N.S., Rand W.M. (1984). Evaluation of the protein quality of an isolated soy protein in young men: relative nitrogen requirements and effect of methionine supplementation. *Am. J. of Clin. Nutr.*, 39, 16-24.

Youngman L D (1993) Protein restriction (PR) and caloric restriction (CR) compared effects on DNA damage, carcinogenesis, and oxidative damage. *Mutation Research*, 295, 165-179.

Yrjonen T. (2004). Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Conference Room 513 ay Viikki Infocentre (Viikinkaari 11), Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki, 64.

Zarnowski R., Suzuki Y. (2004). Expedient Soxhlet extraction of resorcinolic lipids from wheat grains. *Journal of Food Composition and analysis*, 17, 649-663.

Zelter S.Z. (1971). Traitement thermique et qualité des protéines du soja. L Proportion du problème et introduction à une étude expérimentale. *Ann. Zootech.*, 20, 11-16.

Zang Y. (2004). Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat. Res.*, 2; 555(1-2), 173-190.

Zucker W.V. (1983). Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. *American Naturalist (the)*, 121(3), 335-365.

i Courbe d'étalonnage du dosage des sucres totaux: En parallèle le dosage des sucres totaux on doit tracer une courbe d'étalonnage d'un sucre de référence dans ce cas il s'agit du glucose. La gamme d'étalonnage est effectuée de La façon suivante:

Une solution mère de glucose est préparée à une concentration de 1 % (0.1 g/l). A partir de cette dernière, on prend 1 ml et on complète le volume par l'eau distillée jusqu'à 100 ml.

Ensuite, on prépare des dilutions de différentes concentrations: 0.01 g/l, 0.025 g/l, 0.04 g/l, 0.06 g/l, 0.075 g/l et 0.1 g/l (ou mg/ml).

De chaque concentration, on prend 1 ml auquel on ajoutera 1 ml de phénol à 5 % et 5 ml d'acide sulfurique à 98 %.

On maintient les tubes dans une étuve pendant 5 min à 105°C, ensuite on les laisse dans l'obscurité pendant 30 min.

Enfin, on lit la densité optique de chaque concentration à 490 nm et on trace la courbe d'étalonnage

$$DO = f(C)$$

Avec: C : concentration en mg/ml

DO : densité optique.

1,2

R = 0,9996

0 20 40 60 80 100 120
D (+) Glucose (mg/ml)

Courbe d'étalonnage du glucose pour le dosage des sucres totaux.

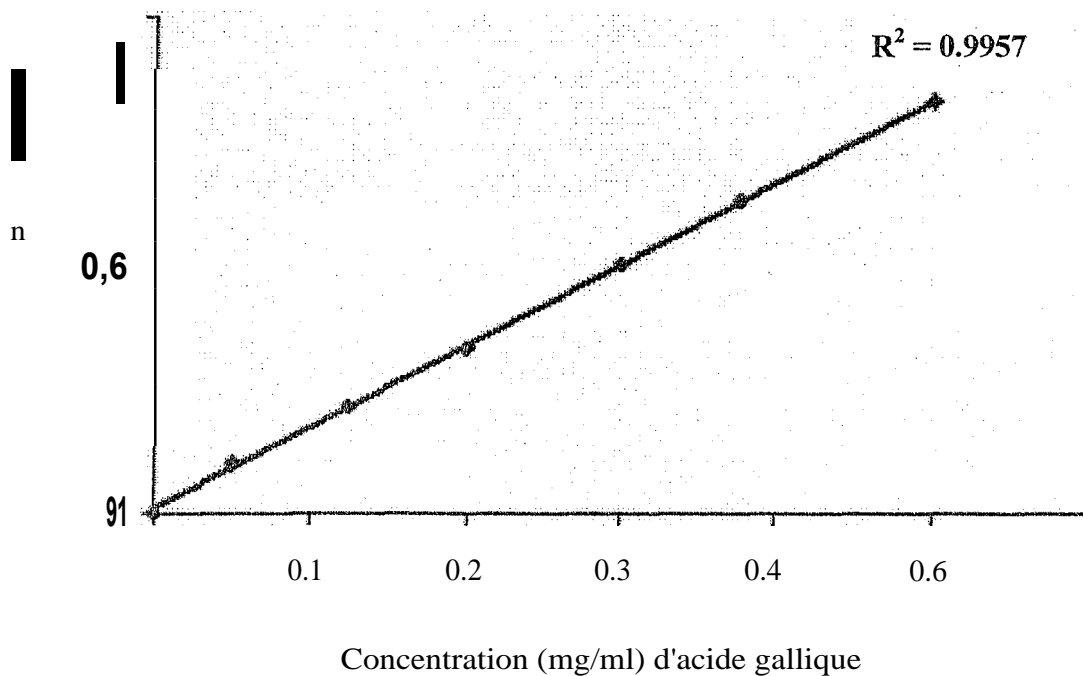
o **Courbe d'étalonnage du dosage des phénols totaux** : En parallèle le dosage des phénols totaux on doit tracer une courbe d'étalonnage d'un composé phénolique de référence dans ce cas il s'agit de l'acide gallique. La gamme d'étalonnage est effectuée de la façon suivante:

A partir d'une solution mère d'acide gallique de concentration massique 0.5 g/l des dilutions sont ainsi préparées de concentrations allant de 0.001 g/l jusqu'à 0.007 g/l.

1700 µl de chaque solution est introduite dans des tubes à essai suivi de 300 µl du réactif de Folin Ciocalteu (10 fois dilué dans l'eau).

Après 3 min, 0.5 ml de Na_2CO_3 à 7.5 % ont été ajoutés, puis ces solutions sont maintenues dans l'obscurité pendant 30 min à température ambiante.

La lecture de l'absorbance de chaque solution est effectuée à une longueur d'onde de 660 nm contre un blanc (sans l'acide gallique).



Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des phénols totaux.

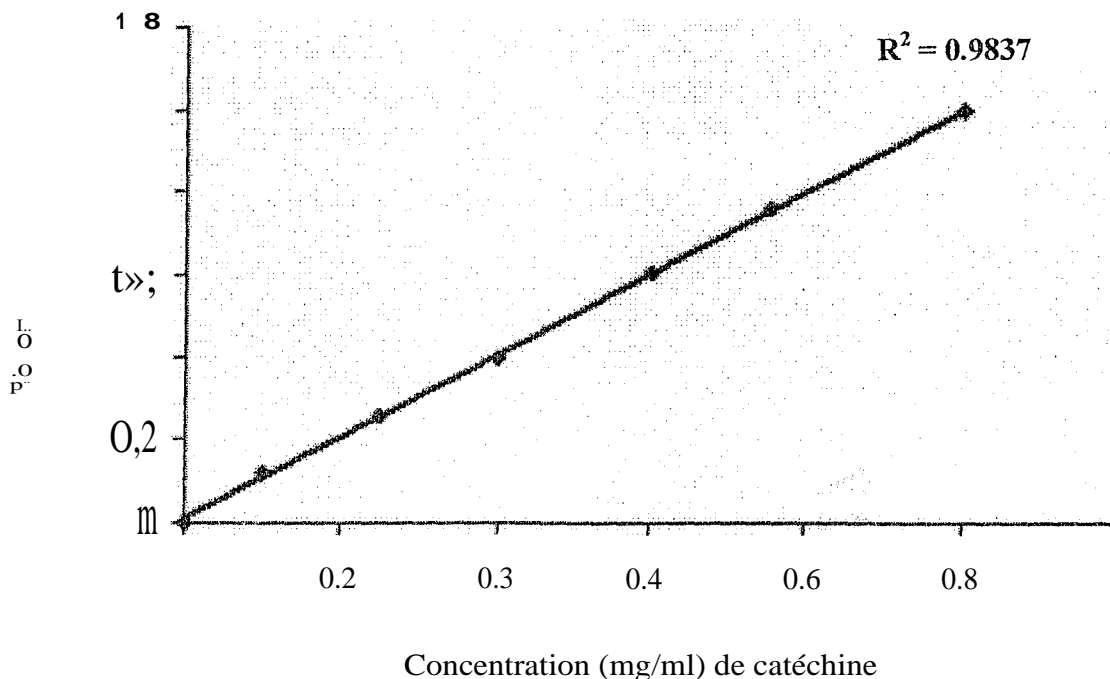
• **Courbe d'étalonnage du dosage des flavonoïdes** : En parallèle le dosage des phénols totaux on doit tracer une courbe d'étalonnage d'un flavonoïde de référence dans ce cas il s'agit de la catéchine. La gamme d'étalonnage est effectuée de la façon suivante

À partir de la solution mère de catéchine préparée dans du MeOH et de concentration massique de 1 g/l des dilutions sont ainsi préparées de concentrations allant de 0.1 g/l jusqu'à 0.8 g/l.

A 0.25 ml de chaque dilution on ajoute 1.25 ml d'eau distillée puis 75 µl de NaNO₂ à 5 %, Le mélange est laissé à température ambiante pendant 6 min, puis on ajoute 150 µl d'AlCl₃ à 10 %.

Le mélange est laissé pendant 5 min à température ambiante. Ensuite 0.5 ml de NaOH 1M est additionné et ajusté le volume avec de l'eau distillée jusqu'à 3 ml.

Enfin la solution est bien mélangée et l'absorbance est mesurée immédiatement contre un blanc à une longueur d'onde de 510 nm.



Courbe d'étalonnage de la catéchine pour le dosage des flavonoïdes.

A minognuime des acides aminés des étalons

MS MS

il (C

. Tests phytochimiques:

1- Matériel végétal épuisé avec l'eau chaude: Dans un ballon surmonté d'un réfrigérant, mettre 50 g de matériel végétal pulvérisé en présence de 300 ml d'eau. Porter l'ensemble à reflux pendant 1h. Filtrer le mélange afin d'obtenir l'extrait aqueux qui sera soumis à différents tests phytochimiques.

1.2 - Tanins: Traiter 10 ml de l'extrait aqueux avec 10 ml d'eau et 1 à 2 gouttes d'une solution diluée de FeCl_3 . L'apparition d'une coloration vert foncée ou bleu-vert indique la présence de tanins.

2 - Matériel végétal épuisé avec l'éthanol: Dans un ballon monocol, surmonté d'un réfrigérant, mettre 50 g de matériel végétal en présence de 300 ml d'éthanol. Porter l'ensemble à reflux pendant 1h. Filtrer le mélange, ensuite soumettre l'extrait éthanolique aux testes suivants

2.1 - Alcaloïdes: Evaporer 20 ml de la solution éthanolique à sec. Ajouter 5 ml d'HCl 2N au résidu et chauffer dans un bain marie. Filtrer le mélange puis diviser le filtrat en deux parties égales. Traiter la première avec quelques gouttes du réactif de Mayer et la seconde avec le réactif de Wagner.

2.2 - Flavonoïdes: Traiter 5 ml d'extrait alcoolique avec quelques gouttes d'HCl concentré et 0,5 g de tournures de magnésium. La présence de flavonoïdes est mise en évidence si une couleur rose ou rouge se développe en espace de 3 min.

2.3 - Tanins: A 10 ml de solution alcoolique, ajouter 2 ml d'eau et 2 à 3 gouttes de solution de FeCl_3 diluée. Un teste positif est révélé par l'apparition d'une coloration bleu noire, verte ou bleu verte et un précipité, selon que les tanins sont cathéchiques, galliques ou éllagiques.

3 - Matériel végétal épuisé avec l'éther diéthylique: Dans un ballon, surmonté d'un réfrigérant à reflux, mettre 50 g en présence de 300 ml d'éther diéthylique. Porter l'ensemble à reflux pendant h. Filtrer le mélange et le soumettre au test suivant:

3.1- *Alcaloïdes*: Evaporer l'omi de la solution éthérique. Dissoudre le résidu obtenu dans 1,5 ml de ICI à 2 %. Ajouter à la solution aqueuse alcaline I à 2 gouttes du réactif de Meyer. La formation d'un précipité blanc jaunâtre indique la présence des alcaloïdes bases.

o Préparation des réactifs nécessaires à la réalisation des tests phytochimiques:

- Réactif de Mayer: D'une part dissoudre 1.358 g de HgCl₂ dans 60 ml d'eau et d'autre part 5 g de IU dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml avec de l'eau distillée.

- Réactif de Wagner: Dissoudre 2 g de M et 1.27 g de I₂ dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total à 100 ml avec de l'eau distillée.

e Préparation des réactifs nécessaires à la chromatographie sur couche mince:

- Réactif à la Vanilline sulfurique (Révélateur polyvalent) : Préparer une solution composée de 1 g de vanilline, 2 ml d'acide sulfurique et de l'éthanol à 95 % q.s.p. 100 ml. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 5 min environ. Plusieurs colorations apparaissent en fonction du type de composés.

- Réactif de Neu ou NP/PEG (Révélateur des flavonoïdes) : Préparer une solution A composée de 1 g d'acide amino-2-éthylidiphénylborique et de 100 ml de méthanol et une solution B composée de 5 g de PEG 4000 et de 100 ml d'éthanol. Pulvériser un mélange de 10 ml de solution A et 8 ml de solution B. Chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 2 min environ (Wagner et Bladt, 2001). Observés en lumière UV à 366 nm, les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes jaunes, vertes ou orange.

- Réactif de Dragendorff (Révélateur des alcaloïdes) : Préparer une solution composée de 0,85 g de nitrate basique de bismuth et 10 g d'acide tartrique dans 40 ml d'eau (solution A) et une solution contenant 16 g de IU dans 40 ml d'eau (solution B). Mélanger extemporanément 5 ml de A, 5 ml de B, 100 ml d'eau et 20 g d'acide tartrique. Vaporiser le mélange sur la plaque (Merck, 1975). Les alcaloïdes apparaissent sous forme de taches orange.

Réactif au sel de Bleu solide B (pour la détection des phénols et des tanins): Vaporiser avec une solution de 0,5 g sel de bleu solide B (sel de diazonium du di-O-anisidine) dans un mélange acétone / eau (9:1, V/V), fraîchement préparé. Puis vaporiser avec 0,1 M d'une solution de soude caustique. Les tanins apparaissent sous forme de taches rouge vif.

**PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS
SCIENTIFIQUES**

Ce travail de thèse a été réalisé d'octobre 2004 à février 2008 au Laboratoire de Recherche de Produits Naturels de la Faculté des Sciences de (l'Université Abou-Bekr Belkaid de Tlemcen sous la direction de Madame le Professeur Belarbi Meriem, et à l'UMR A 408 INRA - UAPV de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse sous la direction de Monsieur le Professeur Chemot Fond. *Certains* aspects du présent travail ont été partiellement publiés ou présentés lors de congrès internationaux ou nationaux sous forme de communications orales ou affichées.

PUBLICATIONS:

Beghdad M.C., Virot M., Belarbi M., Mathe C., Tomao V. et Chemat F. (2008). Rapid, clean and ecofriendly microwave extraction process for the determination of fat and oil: application to green vegetables. *J Chemistry Today*. 26 (6), 8-11.

Belarbi M., Khaldi b., Beghdad M.C., Gouzi H. et Bendimerad N. (2009). Physicochemical and nutritional study of argan oil (*Arqanfa spinosa* L.) in south-western Algeria. *J Pigment and Resin Technology*. 38 (2), 96-99.

Beghdad M C, Belarbi M, Mathe C, Tomao V et Chemat F Chemical composition, nutritional value and phenolic composition of *Malva sylvestris* L. (matlow) leaves and stems. (en préparation).

COMMUNICATIONS:

Beghdad M.C. et Mashev N. (2003). Contribution à l'étude de la composition chimique de trois espèces de légumes: le cardon (*Cynara cardunculus*), la mauve (*Malva sylvestris*) et le chou pommé (*Brassica oleracea*) *Journées sur la protection de l'environnement Tlemcen(Algere)*

Beghdad M. C., Mashev N. et Bekirbi M. (2004). Contribution à l'étude de la valeur biologique des protéines et de l'inhibiteur trypsique de trois espèces de légumes : le cardon (*Cynara cardunculus*), la mauve (*Malva sylvestris*) et le chou pommé (*Brassica oleracea*). *Congrès Arabe de Biologie Clinique*. Monastir (Tunisie).

Hammoumi N. et Beghdad M.C. (2006). Contribution à l'étude des composés azotés et des facteurs antinutritionnels du cardon (*Cynara carcluncu/us*) de la région de Tlemcen. *forum scientifique international écologie-environnement* Tlemcen (Algérie).

Bensaïah F., Beghdad M.C. et Gaouar N. (2006) Rôle des polyphénols dans la résistance de l'olivier à la maladie de la fumagine. 6^{ème} journées Scientifiques et Techniques Phytosanitaires. El-Harrach (Algérie).

Bensaïah F., Beghdad M.C. et Gaouar N. (2006) Rôle des polyphénols dans la résistance de l'olivier à la maladie de la fumagine. *Forum scientifique international e'colcg/e-environnement*. Tlemcen (Algérie).

Beghdad M.C., Belarbi M., Bensaïah F. et Mesli L. (2007). Contribution à l'étude des polyphénols (tanins et flavono(des) et des alcaldfdes du cardon (*Cynara carclunculusL.*) de la région de Tlemcen (Algérie). *Congrès International sur les Plantes ,44éc/icina/es et Aromatiques*. Fès (Maroc).

Mesli L., boumandji S.A., Khelil M.A., Beghdad M.C., Hassani F. et Bouhraoua M. (2007). Position de *Thymus cilfatus*, *Eucalyptus botnbisus* et *Lavanclula dentata* dans le régime alimentaire des orthoptères dans la région littoral de l'extrême ouest algérien; &hazaouet-Tlemcen (Algérie). *Congrès International sur les Plantes Médicinales et Aromatiques*. Fès (Maroc).

Bensaïah F., Beghdad M.C., Abdelwahed A. et Belahcene M. (2008): Etude de la diversité génétique et du pouvoir pathogène de *Verticillium dahlia*s agent de la vert ici Il iose de l'olivier. *forum scientifique international éco/oqie-envfronnemenf*. Tlemcen (Algérie).

Beghdad M.C., Virot M., Belarbi M., Mathe C., Tomao V. et Chemat F. (2008). A rapid, clean and eco-friendly process for the determination of fats and oils in green vegetables. 4^{ème} journées franco-Italiennes de Chimie. Nice (France).

Sabri F.Z., Beghdad M.C., Khaldi b., Soualem Z., Sour S. et Belarbi M. (2008). Contribution a l'étude des propriétés nutritionnelles de *Malva sylvestris* L de la région

ouest d'Algérie (Tlemcen). ^{me} congrès International de nutrition de Tunisie. Hammamet (Tunisie).

Soualem Z., Sour S., Sabri F., Beghdad M.C. et Belarbi M. (2008). Etude des composés nutritionnels du son de seigle de l'ouest algérien. ^{2ème} Congrès International de nutrition de Tunisie. Hammamet (Tunisie).

^{Ra} Sour S., Soualem Z., Sabri F., Beghdad M.C., Merzouk H. et Belarbi M. (2008). Etude physicochimique de l'huile d'*Argania spinosa* extraite artisanalement de la région sud ouest algérien (Tindouf). 2^e Congrès International de nutrition de Tunisie. Hammamet (Tunisie)

Bensalah F., Beghdad M.C. et Gaouar N. (2008). Rôle des polyphénols dans la résistance de l'olivier à la verticilliose Congrès International sur l'amélioration de la production agricole. Settat (Maroc).

Beghdad M.C., Bensalah F. et Belarbi M. (2009). Fruits et légumes, importance économique et nutritionnelle, journée Internationale de Produits Naturels. Tlemcen (Algérie).

Soualem-Mami Z., Sour S., Sabri F., Beghdad M.C., Belarbi M. et Chabane Sari b. (2009). Etude de la composition chimique du son de seigle. journée Internationale de Produits Naturels. Tlemcen (Algérie).

^l Sour S., Soualem-Mami Z., Khaldi b., Beghdad M.C., Bekirbi M. et Chabane Sari D. (2009). Etude de la valeur nutritive de l'huile d'*Argania spinosa* extraite d'une manière traditionnelle, journée Internationale de Produits Naturels. Tlemcen (Algérie).

Résumé

D'après les données des bilans alimentaires établis par la FAO, les consommations totales dans le monde en 2005, atteignaient 145 kg par personne pour les légumes et 84 kg pour les fruits. Cette consommation par personne pour l'ensemble des fruits et des légumes croît régulièrement depuis la fin des années 70, et tend à être stable pour les légumes depuis le début du 21^{ème} siècle mais une consommation croissante pour les fruits. Dans ce présent travail nous avons choisi trois légumes méditerranéens pour une étude phytochimique à savoir le cardon *Cynara cardunculus*, la mauve *Malva sylvestris* et le chou vert *Brassica oleraceae*. Cardon *Cynara cardunculus* est un légume qui est caractérisé par une teneur élevée en protéines avec un pouvoir antioxydant de ses extraits de flavonoïdes satisfaisant. Mauve *Malva sylvestris* est une véritable source de protéines avec une huile très riche en acides gras essentiels tels que l'acide linoléique et l'acide linoléique. Chou vert *Brassica oleraceae* présente une similitude dans son profil en acides aminés avec celui des autres légumes étudiés en bibliographie. Il a été montré que le Soxhlet assisté par micro-ondes peut être une bonne alternative par rapport au Soxhlet traditionnel tout en offrant le même rendement mais avec un temps, une quantité de solvant et une consommation d'énergie réduites.
Mots clés: fruits et légumes, étude phytochimique, *Cynara cardunculus*, *Malva sylvestris*, *Brassica oleraceae*, Soxhlet, micro-ondes.

Abstract

According to the data of the food balances established by FAO, the overall consumptions in the world in 2005, reached 145 kg per person for vegetables and 84 kg for the fruits. This consumption by person for the whole of the fruits and vegetables believes regularly since the end of the Seventies, and tends to being stable for vegetables since the beginning of the 21st century but an increasing consumption for the fruits. In this present work we chose three Mediterranean vegetables for a phytochemistry study with knowing the cardoon *Cynara cardunculus*, the mallow *Malva sylvestris* and the curly kale *Brassica oleraceae*. Cardoon *Cynara cardunculus* is a vegetable which is characterized by a high percentage of proteins with an antioxydant capacity of its extracts of flavonoids satisfactory. Mauve *Malva sylvestris* is a true source of proteins with an oil very rich in essential fatty acids such as the linoleic acid and the linoleic acid. Curly kale *Brassica oleraceae* presents a similarity in its profile in amino acids with that of other vegetables studied in bibliography. It was shown that Soxhlet assisted by microwaves can be a good alternative compared to traditional Soxhlet while offering the same output but with a time, a quantity of solvent and a reduced consumption of energy.

Key words: fruit and vegetables, phytochemic study, *Cynara cardunculus*, *Malva sylvestris*, *Brassica oleraceae*, Soxhlet, microwaves.

2005 JÀ J
145 &
84 kg
(*Malva sylvestris*) (*Cynara cardunculus*) (*Brassica oleraceae*)
flavonoides
Soxhlet
micro-ondes