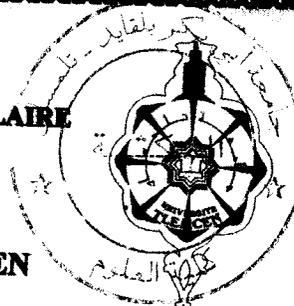


REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ ABOU BAKR BELKAID TLEMCCEN



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

Inscrit sous le N°
27 FEV. 2008
3043

THESE

Présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR D'ETAT

EN CHIMIE

Option

Chimie Organique Appliquée

Par

Mme BENDIMERAD Nassima née BOUKLI HACENE

Thème

Inscrit sous le N°
Date le: 09 MARS 2015
Code: 1027

Etude des huiles essentielles
de *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.) Rehder et *Sinapis arvensis* L.,
plantes crucifères de la région ouest d'Algérie.
Mise en évidence de composés et conséquences nutritives.

Soutenue : 13 novembre 2006 devant le jury composé de :

B. TABTI	Professeur (Université de Tlemcen)	Président
L. LIZZANI-CUVELLIER	Professeur Emérite (Université de Nice Sophia-Antipolis)	Examinatrice
M. H. GUERMOUCHE	Professeur (USTHB - Alger)	Examinateur
N. BENABADJI	Professeur (Université de Tlemcen)	Examinateur
X. FERNANDEZ	Maître de Conférences (Université de Nice Sophia-Antipolis)	Examinateur
J.J. SERRANO	Professeur Emérite (Université de Montpellier 1)	Invité
S. A. TALEB BENDIAB	Professeur (Université de Tlemcen)	Encadreur



RESUMES



دراسة الزيوت الأساسية لنباتات الفصيلة الصليبية (Crucifères) بمنطقة الغرب الجزائري. تشخيص مركبات و آثارها الغذائية

ملخص:

لقد أنصب إهتمامنا على دراسة تركيبة الزيوت الأساسية لنبات سهبي القدير *Pseudocytisus integrifolius* (ينمو في منطقة ملحة، نبع لا يجف مائه و يظهر و يتكاثر في بيئة مناخية معينة الشط الغربي) ونبات الخردل البري *Sinapis arvensis* والتي لم يتم أية دراسة بالإهتمام بهذه الزيوت الأساسية من قبل.

أجريت تحاليل كروماتوغرافية منها الغازية (CG) وغازية متجانسة مع منظار طيفي كتلي (CG-SM). ثلاثة و ثمانون مركبا تم فحصه في نبات *Pseudocytisus* ممثلا 96.5% من الزيت. خمسة و سبعون منها في الأزهار و تسعة و ثلاثة في الأوراق. أهم هذه المركبات هي : ثنائي ميثيل ثنائي السلفور (33.4%) و ثنائي ميثيل ثلاثي السلفور (24.2%) و نتريل غير مشبع (31.7%).

بينت تجزئة بعمود على جمد السيليس المطابقة بالأخص على مركبات قطبية مثل النتريلات و الأدهيدات و عزل ثنائي الميثيل ثنائي السلفور و ثنائي ميثيل ثلاثي السلفور و نتريل غير مشبع. التحليل التركيبي مستملا منظرا طيفي كتلي عالي الإتحلال (SMHR) و تقنيات (RMN ¹H, ¹³C) و صرحت بالمطابقة على pent-4-ènitrile.

تحاليل التغيرات في تركيبة الزيوت الأساسية و المرود قد أجريت على مدة الجني، زمن التشيف و جزء النبتة المدروسة.

أما بالنسبة للزيوت الأساسي للجزء الخارجي من الخردل فهو يتكوّن من مزيج من الأدهيدات، النتريلات، مركبات كبريتية و تريبنيت، مستملا التقنيات CG و CG-SM. 70 مركبا ممثلا 96.5% من الزيت الأساسي قد تم تمييزها مع تفوق ثنائي الميثيل ثلاثي السلفور (33.6%)، الهبتديكان (10.5%)، ميثيل البننتديكان (9.1%) و 14,10,6- ثلاثي الميثيل البننتديكان-2- أون (8.6%) و ثنائي الميثيل رباعي السلفون (7.3%).

سبعة غلوكوسينولات (glucosinolates) تم تشخيصها في *Pseudocytisus* أهمها الغلوكونبين (gluconapine) و ثلاثة في *Sinapis*.

إختبار الجراثيم لزيت الأساسي لـ *Pseudocytisus* و مركبات ثنائي الميثيل، ثنائي و ثلاثي السلفور و pent-4-ènitrile قد بينت حساسية جذل بكتيري و عفن لهذه المركبات.

في الأخير بيّننا أن النباتين المذكورين أعلاه، لها قيمة غذائية و علفية معتبرة (بروتين، دهون سكر) سبعة عشر حمض أميني تم قياسه. البرولين موجود بالأغلبية في *Sinapis* 3.44 غرام في 100 غ من المادة الجافة. لـ *Pseudocytisus* حمض الجلوتوميك هو الأهم (2.22%). القيمة البيولوجية للنباتين المدروستين معتبرة.

Pseudocytisus أكثر غني من *Sinapis* بالمواد المعدنية بخاصة الأملاح و على وجه أخص الصوديوم بدليل أرض الشط الغربي ملحة.

كلمات مفتاحية

Pseudocytisus integrifolius, الشط الغربي، *Sinapis arvensis*، التركيبة الكيميائية، الزيوت الأساسية، النشاط البكتيري و العفني، الغلوكوسينولات، القيمة الحيوية، ثنائي الميثيل و ثنائي و ثلاثي السلفور، النتريل، Pent-4-ènitrile.



**Etude des huiles essentielles de *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.) Rehder
et *Sinapis arvensis* L., plantes crucifères de la région ouest d'Algérie.
Mise en évidence de composés et conséquences nutritives.**

RESUME

L'étude d'une espèce, steppique, *Pseudocytisus integrifolius* (halophyte, pérenne et endémique du Chott El-Gharbi) et une autre, rurale, *Sinapis arvensis* a porté sur la composition de leurs huiles essentielles qui n'ont jamais fait l'objet de publication.

Les analyses ont été réalisées par chromatographie gazeuse (CG) et par couplage CG-spectrométrie de masse (SM). 83 composés représentant plus de 96,5% de l'huile ont été identifiés pour la partie aérienne de *Pseudocytisus* : 75 composés pour ses fleurs, 39 composés pour ses feuilles et, comme composés majoritaires, le disulfure de diméthyle (33,4%), le trisulfure de diméthyle (24,2%) et un nitrile insaturé (31,7%).

Le fractionnement ; par colonne, sur gel de silice ; a permis l'identification de composés à l'état de traces, particulièrement les composés polaires tels que les nitriles et les aldéhydes et l'isolement du disulfure de diméthyle, trisulfure de diméthyle et un nitrile insaturé. L'analyse structurale, utilisant la spectrométrie de masse haute résolution (SMHR) et les techniques de RMN ¹H, ¹³C, a permis l'identification du pent-4-ènenitrile.

L'étude des variations dans la composition de l'huile essentielle et des rendements a été réalisée en fonction de la période de récolte, de la durée de séchage et de la partie de la plante étudiée.

Cependant, l'huile essentielle de la partie aérienne de *Sinapis arvensis* est constituée d'un mélange d'aldéhydes, de nitriles, de composés soufrés et de mono et sesquiterpènes. Utilisant les techniques CG et CG-SM, 70 composés représentant 96,4% de l'huile essentielle ont pu être caractérisés avec la prédominance du trisulfure de diméthyle (33,6%), du n-heptadécane (10,5%), du méthylpentadécane (9,1%), du 6,10,14-triméthylpentadécane-2-one (8,6%) et du tétrasulfure de diméthyle (7,3%).

Sept glucosinolates ont été métabolisés par *Pseudocytisus*, la gluconapine en est le plus important, et trois par *Sinapis*.

Les tests microbiologiques de l'huile essentielle de *Pseudocytisus* des di- et trisulfure de diméthyle et du pent-4-ènenitrile ont montré une sensibilité des souches bactériennes et moisissures vis-à-vis de ces produits.

En dernier, nous avons montré que ces deux plantes ont un potentiel nutritif fourrager considérable (protéines, lipides et sucres) avec 17 acides aminés quantifiés. La proline est majoritaire dans *Sinapis* (3,44g pour 100g de matière sèche). Pour *Pseudocytisus*, l'acide glutamique est le plus important (2,22 %). La valeur biologique des deux espèces étudiées est conséquente.

Pseudocytisus integrifolius est plus riche que *Sinapis* en matières minérales et en sels, particulièrement le sodium ; et ceci en raison de la salinité du Chott.

Mots Clés :

Pseudocytisus integrifolius, Chott El-Gharbi, *Sinapis arvensis*, composition chimique, huiles essentielles, activité microbiologique, glucosinolates, valeur biologique, di- et trisulfure de diméthyle, pent-4-ènenitrile.



**Essential oil study of *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.) Rehder
and *Sinapis arvensis* L., cruciferous plants of western Algeria region.
Compounds description and nutritive consequences.**

Abstract

The study of the steppic species *Pseudocytisus integrifolius* (saline, permanent and endemic to Chott El-Gharbi) and the rural *Sinapis arvensis* was done on the composition of their essential oils which have never been a matter of publication.

The analyses were done on gas chromatography (GC) and GC-mass spectrometry (MS) coupling. 83 components, representing more than 96.5% of the oil were identified for the aerial part of *Pseudocytisus*, 75 components for its flowers and 39 components for its leaves, and, as major components, the sulphur compounds: dimethyl disulfide (33.4%), dimethyl trisulfide (24.2%) and an unsaturated nitrile (31.7%).

The fractioning ; on silica gel column ; led to the identification of traces-level compounds, in particular, polar compounds such as nitriles and aldehydes, and to the isolation of dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide and an unsaturated nitrile. Structural analysis using high isolation mass spectrometry (HRMS) and ^1H , ^{13}C RMN techniques enabled the identification of pent-4-enitrile.

Variation in essential oil composition and yields were studied according to harvesting time, drying and part of the plant.

However, the essential oil of the aerial part of *Sinapis arvensis* is constituted by a mixture of aldehydes, nitriles, sulphur containing compounds and mono- and sesquiterpens. 70 components, according about 96.4% of the oil were characterized using capillary GC and GC-MS. Major components of the oil are dimethyl trisulfide (33.6%), heptadecane (10.15%), methyl pentadecane (9.1%), 6,10,14-trimethyl pentadecane-2-one (8.6%) and dimethyl tetrasulfide (7.3%).

Seven glucosinolates were metabolized by *Pseudocytisus*, with gluconapine as the most important, and three by *Sinapis*.

Microbiology tests of *Pseudocytisus* essential oil for the dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide and pent-4-enitrile showed a sensitivity of bacterial stock and mould toward these products.

Last, we showed that these two plants have an important fodder nutritive potential (proteins, lipids and sugar). 17 amino acids are quantified regarding to the dried matter and to the protein ; proline is a major component in *Sinapis*. The biological value, for the two studied species, is consistent.

Pseudocytisus integrifolius is richer than *Sinapis arvensis* in mineral matter and salts, particularly Sodium (Na) and that is a consequence of the Chott salinity.

Key words :

Pseudocytisus integrifolius, Chott El-Gharbi, *Sinapis arvensis*, essential oils, chemical composition, microbiological activity, glucosinolates, biological value, dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide, pent-4-enitrile.



SOMMAIRE

	Page
Avant propos	i
Abréviations utilisées	vi
Résumés	vii
Sommaire	xi
Liste des Tableaux	xiv
Liste des Figures	xv
INTRODUCTION GENERALE	01
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	05
PREMIERE PARTIE : CRUCIFERES ET BOTANIQUE	06
I. INTRODUCTION	07
II. SYSTEMATIQUE DES CRUCIFERES	07
III. LE GENRE <i>Pseudocytisus integrifolius</i>	08
III.1. Synonymes	08
III.2. Description botanique	08
III.3. Répartition géographique du genre et caractères généraux du site d'étude	10
III.4. Usage	13
IV. LE GENRE <i>Sinapis</i>	13
IV.1. Synonymes	13
IV.2. Description botanique	13
IV.3. Répartition géographique du genre et caractères généraux du site d'étude	15
IV.4. Usage	15
V. CONCLUSION	15
DEUXIEME PARTIE : CRUCIFERES, CHIMIE ET BIOCHIMIE	16
I. INTRODUCTION	17
II. TRAVAUX ANTERIEURS	17
II.1. Espèce <i>Pseudocytisus integrifolius</i>	17
II.2. Espèce <i>Sinapis arvensis</i>	17
II.3. Genre <i>Brassica</i>	19
III. MODES DE FORMATION DE DIFFERENTS COMPOSES VOLATILS	22
III.1. Voie de la lipoxygénase	23



III.2. Dégradation thermique des acides gras	23
III.3. Réaction de Maillard.	25
III.4. Voie de l'alliinase	28
III.5. Formation des composés soufrés (sulfures d'alkyles et méthane-thiol)	29
III.6. Produits dérivés des glucosinolates	32
IV. CONCLUSION	40
CHAPITRE II : PARTIE EXPERIMENTALE	42
I. INTRODUCTION	43
II. MATERIEL VEGETAL	43
II.1. Origine géographique et période de récolte	43
II.2. Identification botanique	43
II.3. Préparation des échantillons	44
II.4. Solvants et produits chimiques	44
III. TESTS PHYTOCHIMIQUES	44
III.1. Différentes classes recherchées	45
III.2. Epuisement du matériel végétal	48
IV. EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES	52
V. TECHNIQUES D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES	53
VI. TESTS MICROBIOLOGIQUES	57
VI.1. Les souches testées	57
VI.2. Choix des antibiotiques et des antifongiques	58
VI.3. Milieux de culture utilisés	59
VI.4. Méthodes utilisées	60
VI.5. Matériel chimique	60
VII. CONSEQUENCES NUTRITIVES	61
VII.1. Dosage des matières azotées	61
VII.2. Dosage des lipides	64
VII.3. Dosage des glucides	64
VII.4. Dosage des éléments minéraux	66
VIII. CONCLUSION	71



CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	72
I. TESTS PHYTOCHIMIQUES	73
I.1. Introduction	73
I.2. Résultats des tests	73
I.3. Conclusion	74
II. EXTRACTION SÉLECTIVE DES HUILES ESSENTIELLES	74
II.1. Introduction	74
II.2. Influence de certains paramètres sur le rendement	75
II.2.1. Teneur en eau	75
II.2.2. Teneur en huile essentielle	75
II.3. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Pseudocytisus integrifolius</i>	79
II.4. Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Sinapis arvensis</i>	89
II.5. Glucosinolates et dérivés	94
II.6. Conclusion	99
III. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES	100
III.1. Introduction	100
III.2. Résultats de l'antibiogramme et l'antifongigramme	100
III.3. Résultats de l'activité antimicrobienne, bactéries et moisissures	102
III.4. Conclusion.	104
IV. CONSEQUENCES NUTRITIVES	105
IV.1. Introduction	105
IV.2. Composés nutritionnels	106
IV.3. Composition en acides aminés	107
IV.3.1. Estimation de la valeur biologique	112
IV.4. Dosage des éléments minéraux	114
IV.5. Conclusion	115
CONCLUSION GENERALE	118
LITTERATURE CITEE	123
ANNEXES	141
PUBLICATIONS	152



LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1 Glucosinolates mis en évidence dans <i>Sinapis arvensis</i> .	18
Tableau 2 Composés volatils identifiés dans les crucifères.	20
Tableau 3 Principaux glucosinolates présents dans les crucifères.	34
Tableau 4 Provenance des germes étudiés.	58
Tableau 5 Les antibiotiques utilisés.	59
Tableau 6 Quantité de sucre correspondant au volume de ferricyanite réduit.	66
Tableau 7 Résultats des tests phytochimiques.	74
Tableau 8 Teneurs en eau des différentes parties de la plante.	75
Tableau 9 Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> et <i>Sinapis arvensis</i> .	76
Tableau 10 Variation du rendement en huile essentielle de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> en fonction de la teneur en eau et de la durée de séchage.	76
Tableau 11 Rendement (en %) de l'huile essentielle de la partie aérienne de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> en fonction de la durée d'extraction.	77
Tableau 12 Rendement (en %) de l'huile essentielle de la partie aérienne de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> en fonction du niveau de coupe.	78
Tableau 13 Rendement (en %) de l'huile essentielle en fonction de la partie étudiée.	78
Tableau 14 Caractères physiques et chimiques de l'huile essentielle de la partie aérienne de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> .	79
Tableau 15 Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> .	85
Tableau 16 Bilan de l'étude de l'huile essentielle de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> .	88
Tableau 17 Composition chimique de l'huile essentielle de <i>Sinapis arvensis</i> .	91
Tableau 18 Bilan de l'étude de l'huile essentielle de <i>Sinapis arvensis</i> .	93
Tableau 19 Glucosinolates identifiés dans <i>Pseudocytisus integrifolius</i> et <i>Sinapis arvensis</i> .	95
Tableau 20 Comparaison des teneurs de certains constituants avec des travaux antérieurs.	98
Tableau 21 Résultat de l'antibiogramme.	100
Tableau 22 Antifongigramme représentant le diamètre de la colonie mycélienne en cm.	101
Tableau 23 Activité antibactérienne de l'huile essentielle de la partie aérienne de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> et du constituant pent-4-ènenitrile.	102
Tableau 24 Effet de l'huile essentielle de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> et de ces constituants majoritaires sur le diamètre des colonies mycéliennes.	103
Tableau 25 Composition chimique des feuilles de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> et de <i>Sinapis arvensis</i> .	106
Tableau 26 Composition en lipides et en sucres des différentes espèces.	107
Tableau 27 Composition en acides aminés de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> et <i>Sinapis arvensis</i> par rapport à 100g de matière sèche.	108
Tableau 28 Composition en acides aminés de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> et <i>Sinapis arvensis</i> par rapport à 100 g de protéine.	110
Tableau 29 Pourcentage relatif des acides aminés par rapport à la protéine de référence.	112
Tableau 30 Composition en acides aminés essentiels de quelques espèces crucifères, céréales et légumineuse.	113
Tableau 31 Composition en éléments minéraux de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> et de <i>Sinapis arvensis</i> .	115



LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1	9
Figure 2	10
Figure 3	11
Figure 4	12
Figure 5	14
Figure 6	24
Figure 7	25
Figure 8	26
Figure 9	27
Figure 10	27
Figure 11	27
Figure 12	28
Figure 13	29
Figure 14	30
Figure 15	30
Figure 16	31
Figure 17	31
Figure 18	32
Figure 19	33
Figure 20	35
Figure 21	36
Figure 22	36
Figure 23	37
Figure 24	37
Figure 25	38
Figure 26	38
Figure 27	40
Figure 28	49
Figure 29	50
Figure 30	51
Figure 31	77
Figure 32	80



Figure 33	Chromatogramme en CG/SM de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> .	80
Figure 34	Spectres RMN du proton et du carbone du composé inconnu.	82
Figure 35	Spectre de masse haute résolution du pent-4-ènenitrile.	83
Figure 36	Chromatogramme en CG-FID du pent-4-ènenitrile.	83
Figure 37	Spectre de masse sur colonne apolaire du pent-4-ènenitrile.	84
Figure 38	Chromatogramme en CG-FID polaire, apolaire de <i>Sinapis arvensis</i> .	90
Figure 39	Chromatogramme en CG/SM de <i>Sinapis arvensis</i> .	90
Figure 40	Proportions des différentes classes des composés dans <i>Pseudocytisus integrifolius</i> et <i>Sinapis arvensis</i> .	94
Figure 41	Composition en nitriles des huiles essentielles de <i>Pseudocytisus integrifolius</i> et <i>Sinapis arvensis</i> .	96
Figure 42	Composition des huiles essentielles étudiées en composés soufrés.	99
Figure 43	Résultat de l'antibiogramme.	101
Figure 44	Résultat de l'antifongigramme.	102
Figure 45	Activité de l'HE sur la croissance des moisissures.	104
Figure 46	Activité du pent-4-ènenitrile sur la croissance des moisissures.	104
Figure 47	Activité du disulfure de diméthyle sur la croissance des moisissures.	104
Figure 48	Activité du trisulfure de diméthyle sur la croissance des moisissures.	104
Figure 49	Composition par groupe d'acides aminés selon leurs caractères chimiques par rapport à la matière sèche.	111
Figure 50	Composition par groupe d'acides aminés selon leurs caractères chimiques par rapport à la protéine.	111
Figure 51	Comparaison des indices EAA des deux plantes étudiées à d'autres espèces.	114
Figure 52	composition en éléments minéraux des deux plantes étudiées à d'autres espèces crucifères.	116



INTRODUCTION GENERALE



De part sa situation géographique, la diversité de son climat, l'Algérie est un pays doté de richesses naturelles qui font de lui un remarquable laboratoire naturel. Mais l'accroissement rapide de la population et de l'exploitation des ressources, a fait prendre conscience à tout un chacun que les ressources de notre environnement ne sont pas inépuisables.

La disparition de ces biens naturels étant irréversible, la nécessité de les conserver est fondée tout à la fois sur un impératif écologique, une raison économique et une exigence éthique.

Le Sahara, le plus vaste et le plus chaud des déserts du monde, possède une végétation diffuse, clairsemée^{1,2} et un taux d'endémisme particulièrement développé.

Cependant, les conditions défavorables, rigueurs climatiques, un gradient croissant d'aridité et le surpâturage sont la cause principale de la réduction du cortège floristique. Pour cela, la notion de protection de la nature a peu à peu été remplacée par la notion de conservation de la nature.

Ce travail s'inscrit dans le cadre général des travaux (en vue de la valorisation des ressources naturelles) réalisés au sein du Laboratoire Produits Naturels. Les huiles essentielles, leurs activités et les composés nutritionnels constituent des produits à forte valeur ajoutée qui peuvent, par la suite, être valorisés dans différents secteurs d'activité en particulier la pharmacie et l'agroalimentaire.

Après avoir effectué plusieurs missions sur le terrain, essentiellement dans la région sud-ouest de Tlemcen, et après avoir relevé un certain nombre d'espèces caractéristiques de cette région,^{3,4} un taxon, en particulier *Pseudocytisus integrifolius ssp. vella glabrescens* (El-Kasdir ou Queçdir), a retenu notre attention. Il s'agit d'un arbrisseau qui évolue tout autour de l'agglomération d'El-Kasdir, qui a donné son nom à la plante. Exposée à une forte pression anthropozoïque, cette crucifère voit, de ce fait, son aire risquer d'être réduite dans un premier temps, puis disparaître par la suite.

Hormis l'intérêt antiparasitaire et nutritionnel que lui attribuent les autochtones, ses peuplements sont une source de production fourragère et de bois potentiel pour les populations (chauffage et cuisson des aliments).

Le travail qui nous a été confié consiste à approfondir la connaissance de cette espèce et la valoriser.

Introduction générale



Nous avons donc examiné sa composition chimique ainsi que celle d'une autre espèce, de la même famille *Sinapis arvensis* (moutarde des champs) utilisées toutes deux comme espèces fourragères.

La première partie de ce manuscrit rappelle les travaux déjà réalisés sur les crucifères (souvent légumières) et essentiellement sur leurs composés volatils soufrés caractéristiques de cette famille, ainsi que les voies de leur bioformation.

Dans la seconde partie, nous présenterons succinctement les outils et les techniques utilisés dans ce travail ; quelques concepts seront rappelés.

La troisième partie portera sur les travaux réalisés sur les deux matrices végétales sélectionnées. En effet, pour *Pseudocytisus integrifolius*, nous n'avons trouvé, dans la documentation, aucune étude chimique sur l'espèce ; et pour *Sinapis arvensis*, des travaux ont déjà été réalisés mais, ce qui est sûr, c'est que nous n'avons trouvé aucune étude sur ses huiles essentielles ni sur sa valeur biologique.

Il nous a paru intéressant et nécessaire de combler ce vide par :

- La détermination des différentes classes de familles chimiques par criblage phytochimique.
- La mise en évidence de l'influence de plusieurs paramètres sur le rendement et la détermination des indices physico-chimiques.
- La détermination de la composition chimique des huiles essentielles (qui a été réalisée en collaboration avec le Laboratoire Arômes, Synthèses, Interactions) avec application de plusieurs techniques chromatographiques et spectroscopiques ; les résultats ont été exploités conjointement.

L'intérêt de l'étude des huiles de ces deux plantes, appartenant à la famille des Crucifères ou Brassicacées, repose sur le fait qu'à partir des composés identifiés dans leurs huiles essentielles, on peut déterminer les glucosinolates indissociables du métabolisme des crucifères précurseurs de nitriles et isothiocyanates contenus dans les huiles essentielles suite à leur hydrolyse par distillation à la vapeur d'eau.

- Des tests microbiologiques vis-à-vis de quelques souches (trois bactériennes et quatre fongiques) sont menés sur l'huile essentielle de *Pseudocytisus integrifolius* ainsi que sur ses composés majoritaires soufrés : les di- et trisulfure de diméthyle et pent-4-ènenitrile.



- L'étude du potentiel nutritif des deux espèces pour le bétail, puisque ce dernier s'en nourrit, est évaluée par la détermination de plusieurs paramètres : le dosage des sucres réducteurs, des lipides, du résidu minéral, des protéines et des acides aminés essentiels.



CHAPITRE I

Synthèse bibliographique



PREMIERE PARTIE

Crucifères et botanique



I. INTRODUCTION

Dans la classification botanique, la famille des crucifères (*Cruciferae*) constitue une importante famille de plantes angiospermes dicotylédones. Elle regroupe approximativement 340 genres et 3350 espèces.⁵ Toutefois, le genre principal est celui des *Brassica* d'où le nom de brassicacées (*Brassicaceae*).

Les crucifères peuplent la presque totalité des habitats : roches maritimes, jardins, talus calcaires, pelouses humides ou sèches et les bords des chemins.

Cependant, de nombreuses espèces sont cultivées, certaines pour la production d'huile, d'autres comme condiments ou plantes d'ornement⁶ ou alors comme source alimentaire et de fourrage.⁷⁻¹¹ Ce qui place, économiquement, cette famille parmi les plus importantes.

Elles jouent un grand rôle dans la physionomie du Sahara septentrional et central où elles comptent des espèces très communes. Mais leur importance relative décroît rapidement lorsque l'on s'avance plus au Sud.¹²

La famille est homogène, les fleurs et les fruits sont toujours constitués selon le même plan d'ensemble.^{12,13}

En effet, c'est la disposition en croix des pièces du périgone qui permet de reconnaître immédiatement une crucifère (du latin : "crucem ferre"), d'où le nom donné à cette famille.

II. SYSTEMATIQUE DES CRUCIFERES

La classification a été l'objet de plusieurs modifications depuis celle de Schultz.¹⁴ Plusieurs tribus et genres ont fait que cette famille est souvent considérée comme difficile pour une classification taxonomique. Cette classification du genre et les relations systématiques des "sous tribus" dans les crucifères n'est pas encore résolue et est en cours d'étude actuellement.

La composition chimique ; en plus de la morphologie, l'anatomie et la cytogénétique ; est un outil majeur pour les botanistes qui procèdent à la classification des plantes. Elle repose essentiellement sur la forme et la structure du fruit, sur l'embryon qui est replié sur lui-même dans la graine, sur la forme des stigmates, sur la pilosité de la plante...

La systématique des crucifères selon Quezel et Santa³ :

Règne :	Végétal
Sous-règne :	Rhizophytes
Embranchement :	Cormophytes



Sous-embanchement :	Angiospermes
Série :	Thalamifères
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Dialypétales
Ordre :	Pariétales
Famille :	Crucifères-brassicacées.

III. LE GENRE *Pseudocytisus integrifolius*

Genre : *Pseudocytisus*

Espèce : *integrifolius*

Sous-espèce : *vella glabrescens*.

III.1. Synonymes

* *Pseudocytisus* O. Kuntze

* *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb) Rehder ; sous-espèce *vella glabrescens* Coss. (Lit. et Maire)

* Nom commun : Queçdir ou El-Kasdir ;

Ce genre peut être confondu avec celui de *vella* L. endémique en Espagne, Maroc et Algérie¹⁵ :

vella pseudocytisus sous-espèce *glabrata greuter*

vella pseudocytisus sous-espèce *gomez-campo*

vella pseudocytisus L. sous-espèce *pseudocytisus*

III.2. Description botanique

Pseudocytisus integrifolius est une espèce endémique des hauts plateaux de l'Oranie.^{3,16} C'est un sous-arbrisseau qui mesure de 70 à 80cm de hauteur (Figures 1 et 2). Les feuilles vertes sont petites (7 à 20 x 2 à 11 mm) et ovales. Les grappes florifères sont allongées. Les fleurs sulfurines assez grandes (15 à 20 mm) apparaissent aux mois de mars et avril. Les fruits lomentacés sont à deux articles : l'un inférieur globuleux à un ou deux grains par loge, l'autre, supérieur, est laminaire.³





HERBARIUM NICAENSIS HORTI BOTANICI
(JBVN)
France (NICE B - 3981)

Locus : Hautes Plaines au Sud d'El Aricha (Chott El Gharbi)
(Sud des Monts de Tlemcen - ALGÉRIE)

Data : 31 - 03 - 03 Altitude : 970 m

Ecologia : *Pseudocystisus integrifolius* (Salisb) Rehder
ssp. *vella glabrescens* (Coss.) Lit. et Maire. Queçdir
ou El-Kasdir (*Brassicaceae*)

Color florum & aliae proprietates : sous arbrisseau de
70 à 80 cm de hauteur à feuilles ovales, petites, vertes,
fleur sulfurine assez grande _ logit

Figure 1 : *Pseudocystisus integrifolius* (planche d'herbier).

Chapitre I : Synthèse bibliographique



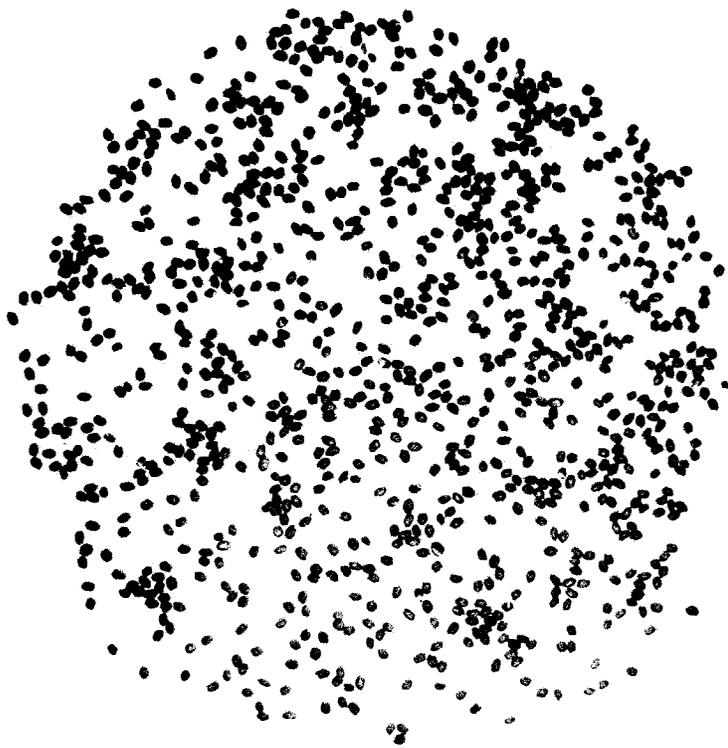


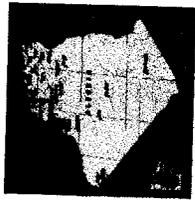
Figure 2 : Graines de *Pseudocystis integrifolius* (Salisb.) Rehder sous-espèce *vella glabrescens*.

III.3. Répartition géographique du genre et caractères généraux du site d'étude

Pseudocystis integrifolius se développe dans la région El-Kasdir se trouvant à proximité de la frontière algéro-marocaine (entre 34° et 34° 40' de latitude nord et 0° 30' et 2° 30' de longitude ouest).⁴

Les hautes plaines culminent au Sud d'El Aricha, vers Naâma et Aïn Sefra à 2236 m. Elles baissent sensiblement d'altitude pour atteindre 970 m à El-Kasdir (Chott El-Gharbi) (Figure 3).





Légende de la carte :

- - - - Limite d'Etat
 - o Agglomération
- Routes :**
- Principale
 - Secondaire
 - - - - Oued
- Retenue, Sebkhia, Chott
 - Zone d'étude
- 0 50 100 km

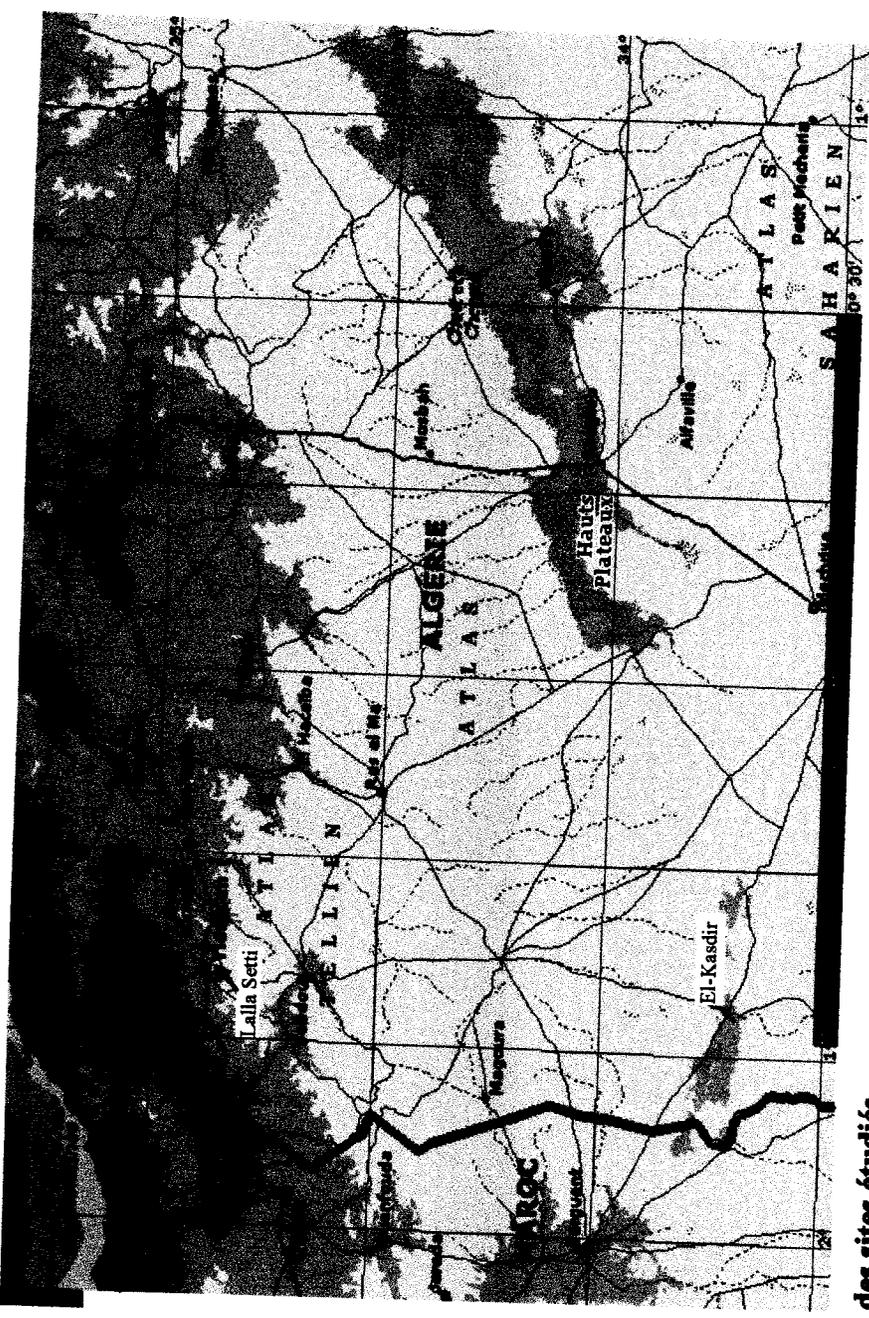


Figure 3 : Situation géographique des sites étudiés.

Le Chott est une vaste dépression collectant toutes les eaux de ruissellement.

L'accumulation des dépôts est le résultat d'une action pluviale.⁴ Le sol de ce chott, en saison sèche, est recouvert d'efflorescences cristallines blanches ou grises ou d'une croûte saline, dues aux conditions semi-arides et arides (Figure 4) d'une grande partie de cette région où l'évaporation est considérable et la pluviosité limitée. Elle est due aussi à la présence de dépôts géologiques salifères et de nappes phréatiques.^{4,17} Sans prétendre détailler l'aspect climatique, nous avons été amenés sur le plan bioclimatique à fournir des indications relatives au site où se développe notre taxon. Au sens d'Emberger,¹⁸ la région appartient à l'étage bioclimatique aride inférieur à hiver frais avec une moyenne de température du mois le plus froid de 2°C.¹⁷

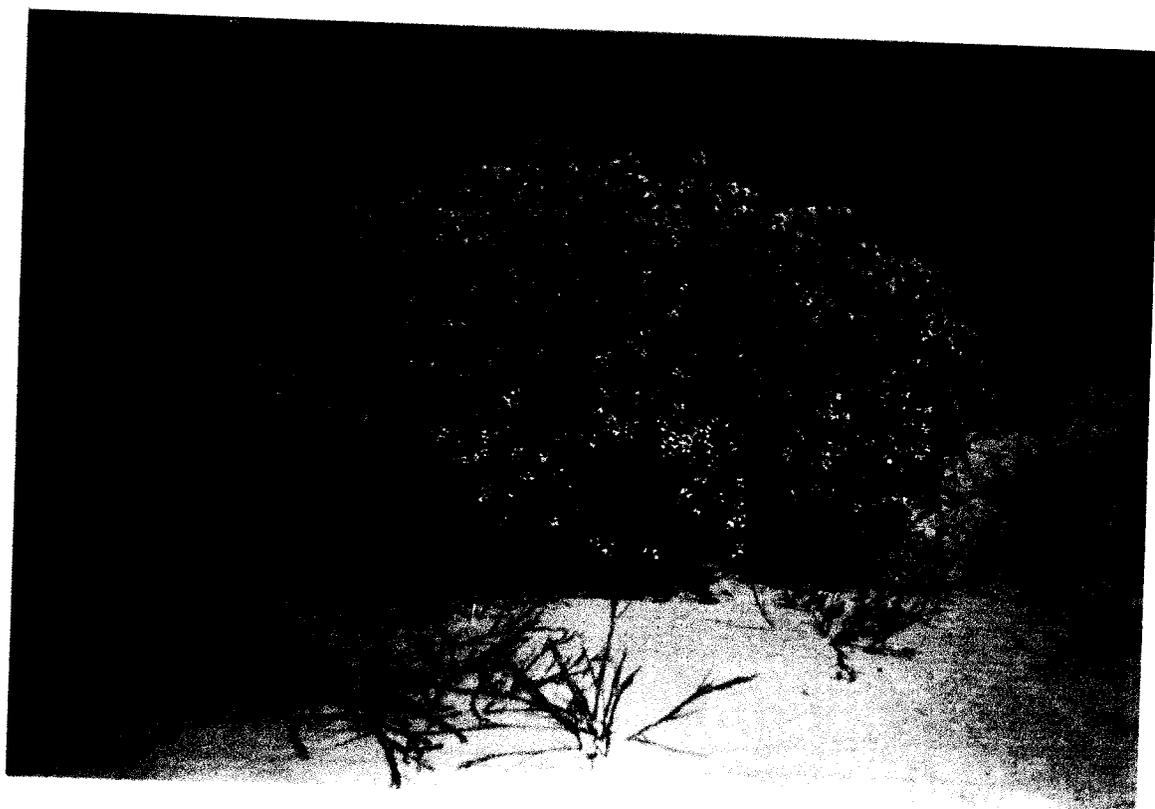


Figure 4 : *Pseudocytisus integrifolius*.



III.4. Usage

La plante est utilisée par la population, d'El-Kasdir, pour la nourriture des animaux d'élevage (ovins, caprins et bovins). Les autochtones lui attribuent des propriétés antiparasitaires. Selon une petite enquête, certains l'utilisent mélangée à d'autres plantes pour le traitement du rhumatisme. Dépourvues de leurs feuilles, les branches sont utilisées comme bois de chauffage.

IV. LE GENRE *Sinapis*

Genre : *Sinapis*

Espèce : *arvensis*

IV.1. Synonymes

- * *Brassica arvensis* Kuntze & Rabenhorst
- * *Brassica kaber* var. *pinnatifida* Stokes L.C. Wheeler
- * *Brassica sinapis* Visiani
- * *Brassica sinapistrum* Boissier
- * *Sinapistrum arvense* Spach.
- * Charlock
- * Wild mustard

Nom commun : Moutarde des champs

Nom arabe : El- Khardel, « chnafou »

Synonymes du nom commun : senevé, sanve, raveluche.

Au stade végétatif, cette plante peut être confondue avec *Raphanus raphanistrum* (le radis sauvage).

IV.2. Description botanique

C'est une plante annuelle ou bisannuelle, de 30 à 80 cm de hauteur (Figure 5). Sa tige est rameuse et porte des feuilles vertes alternes, sinuées, dentées et velues. Celles de la base de la tige sont pétiolées. Les feuilles supérieures sont sessiles. Les fleurs jaunes, groupées en grappes terminales, s'épanouissent d'avril à novembre. Le calice comprend 4 sépales écartés des pétales. La corolle a 4 pétales en croix. Le fruit caractéristique est une gousse, une silique allongée portant sur chaque valve 3 à 5 nervures et renfermant des graines globuleuses brunes et lisses.¹⁹





HERBARIUM NICAENSIS HORTI BOTANICI
(JBVN)
France (NICE B-3985)

Locus : Hauteurs de Tlemcen (Plateau de Lalla Seti) ALGÉRIE
Datum : 30 - 05 - 2004 Altitude : 970 m
Ecologia : *Sinapis arvensis*, moutarde des champs.
(*Brassicaceae*)

Color florum & aliae proprietates : plante annuelle de taille

à feuilles alternes, sinuées

IV.3. Répartition géographique du genre et caractères généraux du site d'étude

La moutarde des champs est une espèce très fréquente, elle est répandue en tâches dans les clairières des forêts et dans les champs de culture surtout. De même que l'on peut la rencontrer dans les landes ou abondante le long des routes, biotope particulier. Nous avons évité systématiquement tout échantillonnage dans ce dernier cas.

La zone d'étude – plateau de Lalla Setti (Figure 3) : altitude 950 m, 34°85' de latitude nord et 1°40' de longitude ouest – s'insère dans l'ensemble des Monts de Tlemcen qui se situent dans le domaine tellien et les hautes plaines de l'ouest algérien.

Les sols de la région de Tlemcen sont multiples et variés. Leur diversité est liée à la grande variabilité lithologique, géomorphologique et climatique. Ceux des Monts de Tlemcen sont formés de deux grands types : des sols rouges méditerranéens de calcaire et/ou de dolomie que l'on trouve aussi bien en position de plateau qu'en position de pente. Le bioclimat des Monts de Tlemcen, au sens d'Emberger,¹⁸ est semi-aride supérieur à hiver tempéré.

IV.4. Usage

La plante est broutée par le bétail, en particulier, ses feuilles de base. Ces dernières, utilisées en cataplasme, soignent les blessures et lésions cutanées.

V. Conclusion

A chaque récolte que nous avons effectuée, nous avons constaté une diminution frappante des surfaces couvertes par *Pseudocytisus integrifolius*. Ainsi est née une volonté de sauvegarder cette végétation steppique dans sa variété et sa richesse, au-delà de sa diversité.

Ainsi, pour maintenir cette espèce, permettre l'utilisation de ses constituants sous tous les aspects et la promouvoir, pourquoi pas, à une échelle plus importante sur le plan industriel, il faudrait aussi mieux connaître, préserver, valoriser et utiliser ces ressources végétales spontanées. Il serait nécessaire d'approfondir ces travaux afin de mieux cerner l'importance quantitative et qualitative de ces espèces.



DEUXIEME PARTIE

Crucifères

Chimie et Biochimie



I. INTRODUCTION

Un grand nombre de crucifères est constitué de légumes destinées à la consommation humaine ou animale. On peut ainsi en consommer les graines (moutarde noire : *Brassica nigra* ; moutarde brune : *Brassica juncea* ; colza : *Brassica napus* L. var. *oleifera*) pour la production d'huiles ; les feuilles et inflorescences (toutes les différentes variétés de choux existantes, chou-fleur : *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* ; choux de Bruxelles : *Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* ; les choux blancs et rouges : *Brassica oleracea* L. var. *capitata*...) ou encore les racines (navet : *Brassica rapa* ; rutabaga : *Brassica napus* L. var. *napobrassica*). Les espèces de crucifères sauvages sont souvent considérées comme de mauvaises herbes.

Dans le monde végétal, toute espèce produit des métabolites primaires (protéines, acides aminés et dérivés, lipides et carbohydrates) et d'autres substances différentes et dispersées qui ne paraissent pas essentielles à la vie de la plante : ce sont les métabolites secondaires (composés phénoliques, terpéniques, azotés et/ou soufrés...).

Beaucoup de travaux ont été réalisés sur la famille des crucifères et notamment sur leurs composés volatils en s'attachant particulièrement à caractériser les composés contenant du soufre, élément fondamental du métabolisme de cette famille. D'autres visent à déterminer la valeur alimentaire due principalement à leur contenu en sucres, protéines, lipides, cellulose, vitamines et sels minéraux.²⁰

Certaines déterminent la valeur nutritionnelle des protéines c'est-à-dire la composition en acides aminés et notamment les acides aminés essentiels⁷ ainsi que leurs substances antinutritionnelles.²¹ Par contre, d'autres travaux ont montré que les plantes de la famille des Brassicacées sont accumulatrices de métaux lourds.²²⁻²⁶

II. TRAVAUX ANTERIEURS

II.1. Espèce *Pseudocytisus integrifolius*

L'espèce *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.) Rehder, sous-espèce *vella glabrescens* (Coss.) Lit. et Maire n'a fait l'objet d'aucune étude chimique.

II.2. Espèce *Sinapis arvensis*

Certains travaux sur le genre *Sinapis* ont été réalisés et quelques uns sur l'espèce *arvensis*. Cette espèce contiendrait plusieurs flavonoïdes dans les extraits des feuilles et des fleurs.²⁷



L'étude menée par Lockwood *et coll.*,²⁸ sur plusieurs crucifères algériennes montre que les feuilles de *Sinapis arvensis* contiendraient trois glucosinolates dérivés de la méthionine et deux dérivés de la phénylalanine.

Sept stérols ont été identifiés dans les graines : il s'agit du brassicastérol, du campestérol, du sitostérol, de l'isofucostérol, du shottérol, de l'avénastrol et du stigmasta-5,25-diène-3-béta-ol.²⁹

Les graines de *Sinapis* auraient une prédominance pour les glucosinolates, glucobrassicine, néoglucobrassicine et la glucosinalbine.³⁰ Le tableau ci-après met en évidence les différents glucosinolates dans *Sinapis arvensis*.

Tableau 1 : Glucosinolates mis en évidence dans *Sinapis arvensis*.^{28,30-34}

Glucosinolates de :	Nom trivial
Indol-3-ylméthyl	Glucobrassicine
1-méthoxyindol-3-ylméthyle	Néoglucobrassicine
p-hydroxybenzyle	Glucosinalbine
3- (méthylsulfinyl) propyle	Glucoibérine
3-(méthylsulfonyl) propyle	Glucocheiroline
3-méthylthiopropyle	Glucoibervérine
Allyle	Sinigrine
3- butényle	Gluconapine
2(R)-hydroxy-3-butényle	Progoitrine
2(S)-hydroxy-3-butényle	Epiprogoitrine
2-phénéthyle	Gluconasturtiine

Alors que la saveur caractéristique des graines de *Sinapis alba* ou *Brassica alba* (moutarde blanche ou jaune) est dérivée du sinalbine glucosinolate, les graines marrons (*Brassica juncea* L.), qui sont un hybride de *Brassica nigra* L. (vraie moutarde) et *Brassica campestris* (colza), doivent leur goût plus prononcé principalement au sinigrine glucosinolate ; celles de la moutarde des champs entrent dans la préparation d'une moutarde de faible qualité.³⁵



La résistance et la susceptibilité de *Sinapis arvensis* (moutarde sauvage) vis-à-vis des herbicides auxiniques ont été longuement étudiées,³⁶⁻³⁸ ces derniers ont été parmi les premiers groupes d'herbicides utilisés en agriculture et ont révolutionné cette industrie.³⁹

II.3. Genre *Brassica*

La famille des crucifères, et plus particulièrement les espèces du genre *Brassica*, jouent un rôle primordial dans l'alimentation humaine. L'intérêt suscité par ce genre découle principalement de leurs propriétés culinaires. Qu'elles soient consommées crues ou cuites, le premier souvenir associé à toutes les espèces du genre *Brassica* (chou, chou-fleur...) est fréquemment l'odeur forte, soufrée et tenace, voire désagréable. C'est cette particularité qui a motivé la plupart des travaux sur l'arôme, mettant ainsi en évidence l'importance des composés soufrés et les spécificités de leurs modes de formation.

Le sulfure d'hydrogène, le sulfure de diméthyle, le disulfure de diméthyle et l'allyle isothiocyanate ont été reportés pour être des composés volatils relativement abondants dans les légumes brassicacées.⁴⁰⁻⁴³

Le tableau 2 regroupe une liste de composés identifiés dans les fractions volatiles du genre *Brassica* ; notamment les choux, le chou-fleur, les choux de Bruxelles et le brocoli ; cuits, coupés ou mixés.

Les composés soufrés, en majorité les sulfures d'alkyle sont incontournables et majoritaires dans les crucifères, en particulier :

- le sulfure de diméthyle.⁴⁴
- le disulfure de diméthyle⁴⁵⁻⁴⁷
- le trisulfure de diméthyle^{45,48}
- le méthanéthiol⁴⁷
- et l'isothiocyanate d'allyle.⁴⁴⁻⁴⁷



Tableau 2 : Composés volatils identifiés dans les crucifères. ⁴⁴⁻⁵⁷

COMPOSES SOUFRES			
méthanethiol	sulfure de butyle et de méthyle	disulfure de butyle et de propyle	
éthanethiol	disulfure de carbone	disulfure de but-3-èneyle et de propyle	
propanethiol	disulfure de diméthyle	trisulfure de diméthyle	
sulfure d'hydrogène	disulfure de diéthyle	trisulfure de diéthyle	
sulfure de diméthyle	disulfure de dipropyle	2,4,5-trithiahexane	
sulfure de diéthyle	disulfure de dibut-3-èneyle	tétrasulfure de diméthyle	
sulfure de dipropyle	disulfure d'éthyle et de méthyle	diméthylsulfoxyde	
sulfure de dibutyle	disulfure de méthyle et de propyle	3-méthylthiopropional (<i>méthional</i>)	
sulfure d'éthyle et de méthyle	disulfure de butyle et de méthyle	5-vinyloxazolidine-2-thione (<i>goitrine</i>)	
sulfure de méthyle et de propyle	disulfure d'éthyle et de propyle	benzothiazole	
ISOTHIOCYANATES (ITC)	NITRILES	ALCOOLS	
thiocyanate et ITC de méthyle	acétonitrile		
ITC de propyle	2-méthylprop-2-énenitrile	méthanol	hex-3(Z)-énol
ITC d'isopropyle	but-3-énenitrile	éthanol	heptanol
ITC d'allyle	(Z)- et (E)-crotonitrile	propan-2-ol	hept-2(E)-énol
ITC de butyle	1-cyano-2,3-épithiopropane	prop-2-énol	octanol
ITC d'isobutyle	3-méthylbutanenitrile	but-2(E)-énol	oct-1-èn-3-ol
ITC de but-3-èneyle	pent-4-énenitrile	pentanol	oct-2(E)-énol
ITC de 2-méthylbutyle	3-méthylpentanenitrile	pent-1-èn-3-ol	octa-1,5-dièn-3-ol
ITC de 3-méthylthiopropyle	4-méthylthiobutanenitrile	pent-2(Z)-énol	nonanol
ITC de 3-méthylsulfanylpropyle	5-méthylthiopentanenitrile	pent-3(Z)-énol	<i>p</i> -vinylguaïacol
ITC de 4-méthylthiobutyle	phénylacétonitrile	hexanol	
ITC de 2-phényléthyle	3-phénylpropanenitrile		
CÉTONES			
acétone	pentèn-3-one	octan-3-one	
butanone	pent-3-èn-2-one	oct-1-èn-3-one	
butanedione (<i>diacétyle</i>)	3-méthylpentan-2-one	oct-3-èn-2-one	
3-hydroxybutan-2-one (<i>acétoïne</i>)	4-méthylpentan-2-one	octa-3,5-dièn-2-one	
méthylbutanone	heptan-3-one	nonan - 5-one	
pentan-3-one	heptan-4-one	acétophénone	
pentane-2,3-dione	octan-2-one	<i>p</i> -méthylacétophénone	
ALDEHYDES			
méthanal	3-méthylbutanal	hepta-2(E),4(E)-diénal	
éthanal	3-méthylbut-2-énal	octanal	
propanal	pentanal	oct-2-énal	
prop-2-énal (<i>acroléine</i>)	pent-2-(E)-énal	nonanal	
2-méthylpropanal	hexanal	non-2-énal	
2-méthylpropénal	hex-2(E)-énal	décanal	
butanal	heptanal	déca-2(E),4(E)-diénal	
but-2-énal	hept-2(E)-énal	benzaldéhyde	
2-méthylbutanal	hepta-2(E),4(Z)-diénal	phénylacétaldéhyde	
AUTRES			
octane, nonane	hexanoate d'éthyle	2-pentylfurane	terpinolène
éther diéthylique	tétrahydrofurane	limonène	γ -terpinène
acétate d'hexyle	2-méthylfurane	α - et β -pinène	indole
acétate d'hex-3(Z)-èneyle	2-éthylfurane	δ -3-carène	1,2-diméthoxybenzène
benzène mono-, di- et trisubstitué (R = Me, Et)			



Beaucoup de facteurs influent sur la composition chimique des crucifères tels que le temps de cuisson, la technique de cuisson (traditionnelle et/ou au micro-onde : micro-onde sans eau et micro-onde avec l'eau).⁵⁸⁻⁶⁰

La tendance générale consiste en une chute des sulfures et des aldéhydes à six atomes de carbone et à une augmentation des nitriles ; observation particulièrement marquée dans le cas d'une cuisson à la vapeur.

Les parties de la plante utilisées entraînent des variations dans la composition.^{44,55,58} Les feuilles externes du chou (les plus vieilles) libèrent plus d'aldéhyde, d'alcools, d'esters et de cétones alors que les composés soufrés et les isothiocyanates sont majoritaires pour le cœur (feuilles, les plus jeunes). Résultat également vrai pour le chou-fleur si l'on compare les feuilles (aldéhydes, alcools) et l'inflorescence (composés soufrés, isothiocyanates).

L'étude menée par Engel et coll.⁵⁴ a montré que quatre substances sont impliquées dans l'acceptation ou le rejet de l'arôme du chou-fleur cuit : l'isothiocyanate d'allyle (note soufrée, âcre, amère et piquante), le trisulfure de diméthyle (note soufrée rappelant le chou-fleur cuit) puis, à un degré moindre, le sulfure de diméthyle (note de chou cuit) et le méthanéthiol (indésirable pour sa note désagréable et putride). La note verte de ces variétés de *Brassica* est en partie due aux aldéhydes (surtout nonanal : verte citronnée).⁴⁵

La conservation commerciale a une grande influence sur la composition.^{44,61} En effet, le conditionnement en sachets hermétiques montre une apparition de notes désagréables dues à l'accumulation de composés soufrés (le méthanéthiol et le disulfure de diméthyle).⁶²⁻⁶⁵ L'étude menée par Valette⁵⁷ en 2005 confirme que le vieillissement et la congélation diminuaient la proportion en isothiocyanates au profit des nitriles et des sulfures avec la formation privilégiée de l'aldéhyde (hex-2-(E)énal) ainsi que le tétrasulfure de diméthyle. Ces deux derniers deviennent ainsi des marqueurs de congélation.

D'autres travaux réalisés sur la nature de certaines pratiques horticoles, employées notamment dans l'espacement entre les plants,^{52,66,67} ont permis de déterminer que la teneur en composés soufrés augmente avec un espace réduit et que 60 cm de distance entre les plants donnaient les meilleurs résultats.

Suite à des études entomologiques,^{68,69} il a été montré que chez les insectes inféodés aux crucifères, certaines substances volatiles ont généralement des effets toxiques (en attirant certains parasites). Par exemple les isothiocyanates attirent les adultes de la mouche du chou à la recherche d'une plante pour déposer leur ponte.⁶⁸



La littérature relative à l'étude des composés volatils est considérable. En effet, toutes les études apportent des informations évidentes sur la composition des fractions volatiles des crucifères.

D'autres publications concernent les précurseurs de ces composés volatils telles que la détermination de la concentration en sulfoxyde de S-méthylcystéine^{70,71} et la quantité de glucosinolates métabolisés dans différentes variétés de *Brassica oleracea*.^{72,73} Il s'est avéré que les concentrations dans le feuillage des crucifères n'atteint pas des niveaux critiques pour les ruminants.⁷⁴

La mise en évidence de l'importance de ces molécules soufrées volatiles a logiquement conduit à l'étude et la discussion sur leurs précurseurs, leur mode de formation et leur dégradation correspondante.

III. MODES DE FORMATION DE DIFFERENTS COMPOSES VOLATILS

L'identification des précurseurs et la compréhension des mécanismes de formation sont des atouts majeurs dans la recherche des composés volatils caractéristiques émis par une matrice végétale.

Les composés volatils sont classés en deux catégories : ^{75,76}

a- les volatils primaires issus de la synthèse des végétaux vivants ne nécessitent aucune transformation. Ils sont présents dans la majorité des fruits plutôt que dans les légumes et apparaissent pendant leur mûrissement.

b- les volatils secondaires ne sont pas présents tels quels dans les végétaux, mais ils sont induits par des événements extérieurs et indépendants du développement. Ils résultent de la dégradation par une enzyme après rupture des parois cellulaires (broyage, mastication ou simplement en coupant la plante) ou encore les procédés de préparation de l'aliment (cuisson, fermentation). Ces composés volatils sont issus de deux grandes familles de précurseurs distinctes : les produits de sulfoxyde alkyl cystéine et les produits des glucosinolates. Il est à remarquer que ces précurseurs ne sont pas des composés volatils.

Les modes de biosynthèse des composés volatils secondaires peuvent être facilement généralisés. En effet, les composés obtenus proviennent d'un processus défini (cuisson, mixage...) appliqué à des séries de précurseurs communs à de nombreuses matrices (acides aminés, sucres et acide gras). Ce sont quelques unes de ces réactions qui vont être exposées.



Issus des triglycérides, des phospholipides et des glucolipides par voie enzymatique (action des acylhydrolases), les acides gras sont une source considérable de composés aromatisants⁷⁷ tels que les aldéhydes, les alcools et les esters. Il existe deux modes de dégradation des acides gras, la voie enzymatique, dite voie de la lipoxygénase, et la dégradation thermique.

III.1. Voie de la lipoxygénase

Pour les légumes et les fruits, la voie de la lipoxygénase joue un rôle fondamental dans la formation de certains composés aromatisants. Lors de la rupture des parois cellulaires végétales, la lipoxygénase va pouvoir entrer en contact avec deux acides gras insaturés primordiaux : les acides linoléique et linolénique. Cette enzyme va alors catalyser l'addition stéréosélective d'une molécule de dioxygène sur le motif penta-1(Z),4(Z)-diène de ces acides gras pour former des hydroperoxyacides. Plus précisément, deux types de lipoxygénase sont en compétition pour favoriser l'addition de façon régiospécifique, soit en position 9 soit en position 13 des acides gras. Les hydroperoxyacides formés sont ensuite clivés par d'autres enzymes, les hydroperoxyde lyases (HPL), pour générer des aldéhydes et des oxoacides. Enfin, les aldéhydes (isomérisés ou non par les isomérases) peuvent être réduits en alcools par action d'alcool déhydrogénase (ADH) (Figure 6).^{77,78}

Encore une fois, il existe des 9-HPL, 13-HPL et des HPL non spécifiques. De l'abondance relative de ces HPL, propre à chaque plante, dépendra la composition en produits issus de cette voie. Ceci explique que certains végétaux présentent une majorité de composés en C6 (à six atomes de carbone) et d'autres une prépondérance des composés en C9.

III.2. Dégradation thermique des acides gras

Ce type de réaction intervient dans tous les aliments contenant des acides gras insaturés aussi bien de nature animale que végétale. La première étape est une auto-oxydation, favorisée par le chauffage, et formant à nouveau des hydroperoxyacides. Cependant, dans ce cas, il n'y a plus de spécificité de substrat ou de stéréosélectivité pour l'addition de l'oxygène puisque ces phénomènes sont relatifs à l'activité enzymatique de la lipoxygénase. Les acides, linoléique et linolénique, ne sont plus les seuls acides gras concernés ; les acides, oléique et arachidonique, peuvent être impliqués dans ce processus.



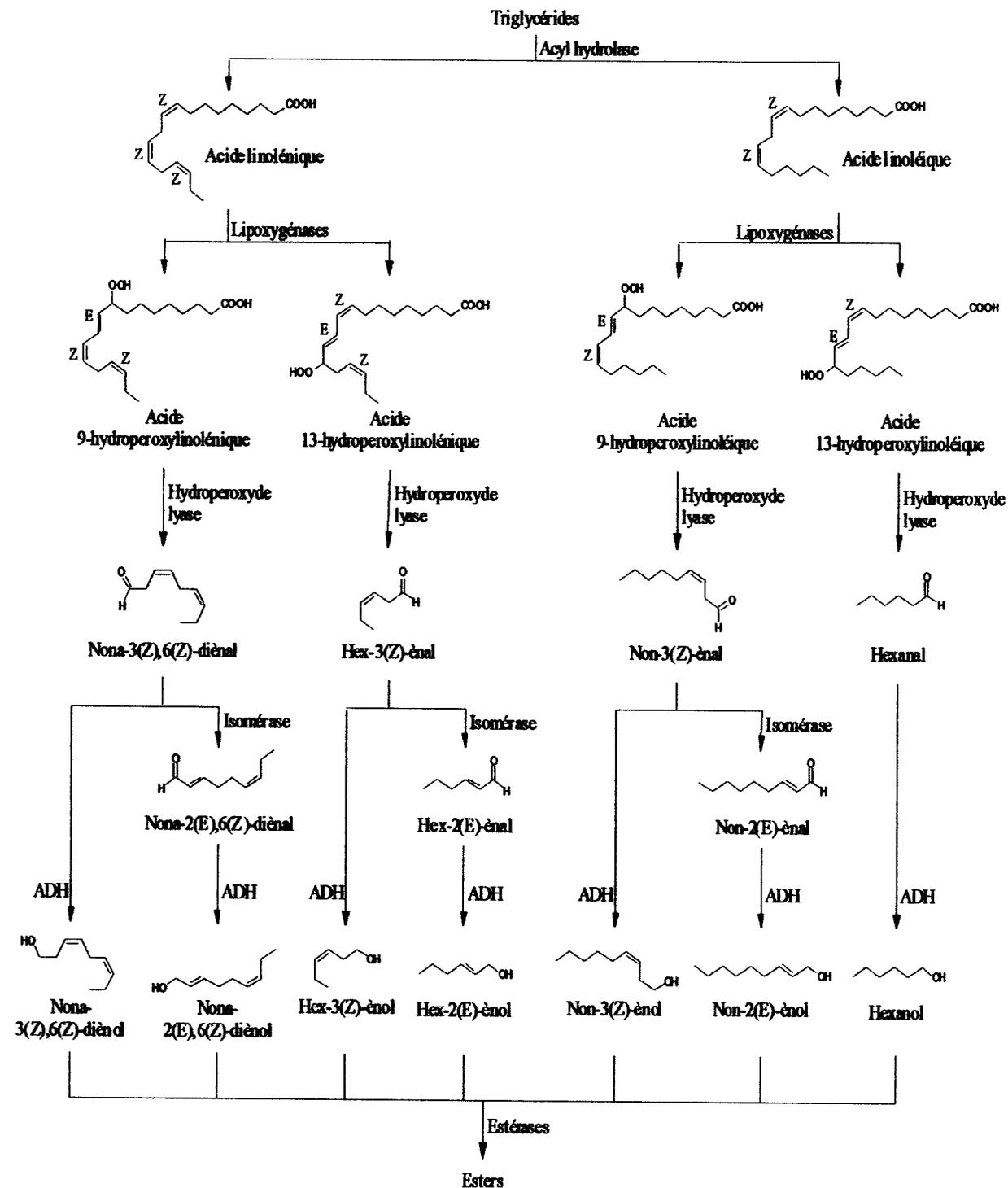


Figure 6 : Dégradation enzymatique des acides gras insaturés. Voie de la lipoxygénase.



Les hydroperoxyacides formés se décomposent ensuite en perdant un radical hydroxyle. Les radicaux obtenus sont alors engagés dans diverses réactions permettant la formation de nombreux composés volatils cétones, esters, acides, aldéhydes, alcanes et alcènes (Figure 7).⁷⁹

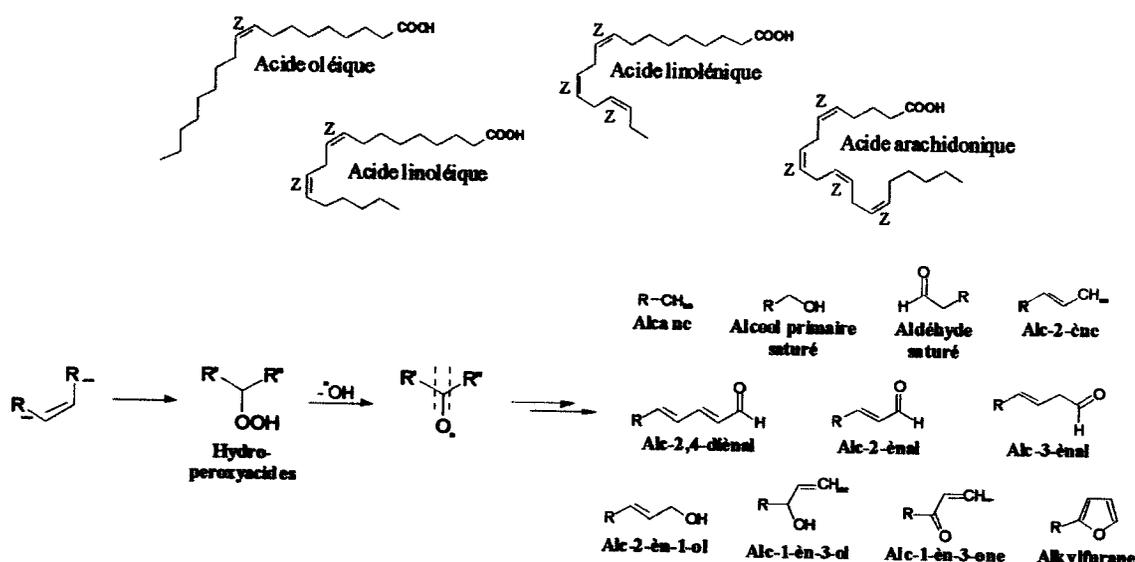


Figure 7 : Dégradation thermique des acides gras – Exemples de composés formés.

Ces différentes voies de dégradation des acides gras expliquent pleinement l'origine des aldéhydes, alcools, esters et cétones identifiés dans les fractions volatiles de *Brassica*. La présence de l'activité de la lipoxygénase est d'ailleurs confirmée dès 1979 par MacLeod et Pikk.⁵²

III.3. Réaction de Maillard

Découverte et publiée en 1912 par le chimiste Louis Camille Maillard,⁸⁰ cette réaction est également appelée « réaction de brunissement non enzymatique ».

Le principe de cette réaction résulte de la condensation entre la fonction amine d'une protéine, d'un peptide ou d'un acide aminé, et le groupement carbonyle d'un sucre réducteur, favorisé sous l'effet de la chaleur. La base de Schiff obtenue est en équilibre avec sa forme cyclisée : une N-glycosylamine. En milieu acide, cette glycosylamine va se réarranger pour conduire à un 1-amino-1-déoxycétose (intermédiaire d'Amadori) si le monosaccharide de départ est un aldose, ou un 2-amino-2-déoxyaldose (intermédiaire de Heyns) dans le cas d'une cétose. Par dégradation thermique et déshydratation, ces intermédiaires vont libérer des composés carbonylés précurseurs de nombreuses molécules aromatisantes (Figure 8).⁸¹

La gamme de composés hétérocycliques issus de ce processus est assez importante et diversifiée. Il est possible d'identifier des cycles azotés et/ou sulfurés comme les pyroles, les imidazoles, les pyridines, les pyrazines, les thiazoles et les thiophènes.

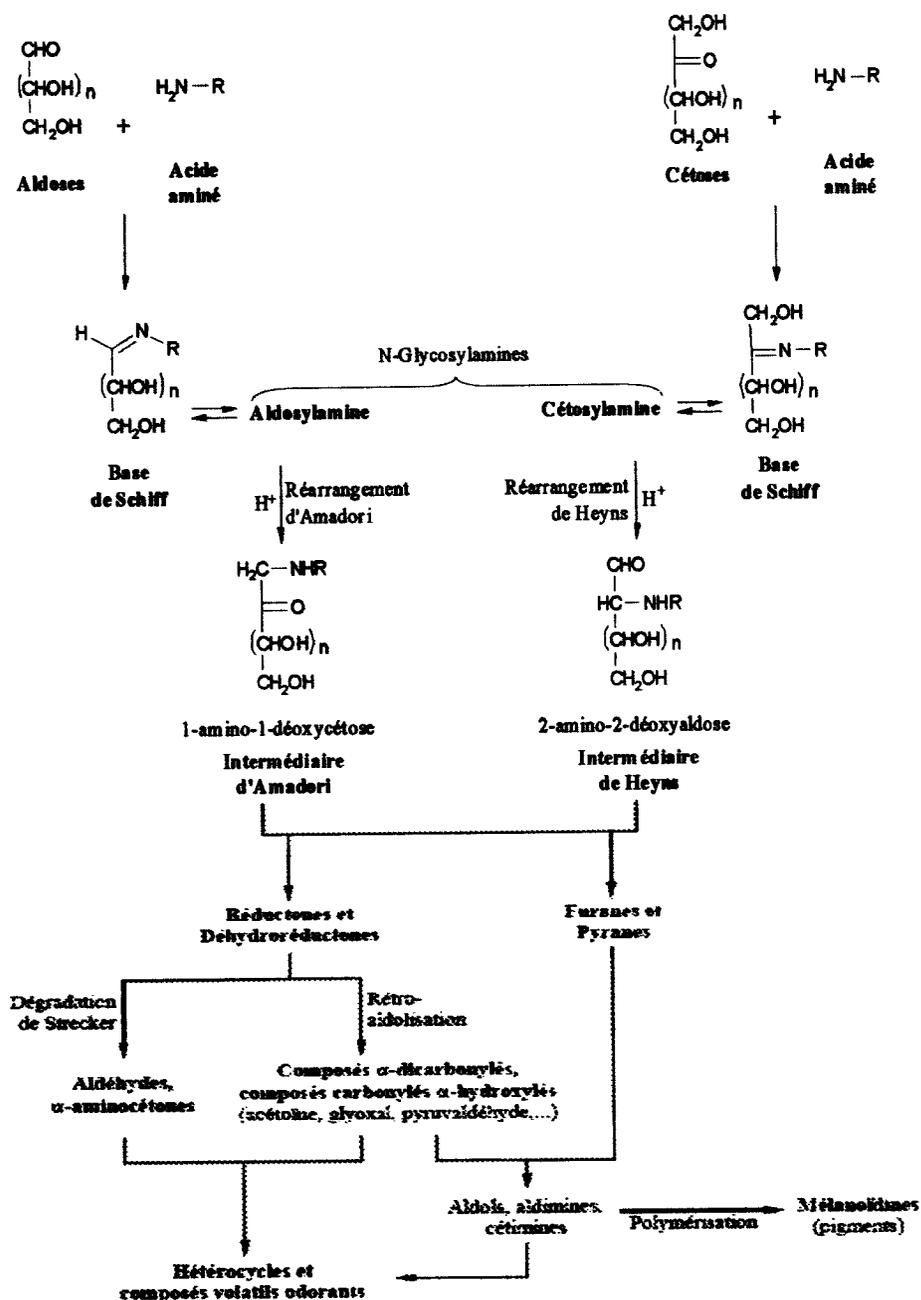


Figure 8 : Représentation schématique de la réaction de Maillard.

La dégradation de Strecker est une étape prépondérante dans la formation de ces hétérocycles. Cette réaction repose sur la condensation d'un acide aminé sur un

composé α -dicarboxylé résultant de la réaction de Maillard. Après décarboxylation et transamination, la réaction libère un aldéhyde et un composé α -aminocarbonylé (Figure 9).⁷⁹

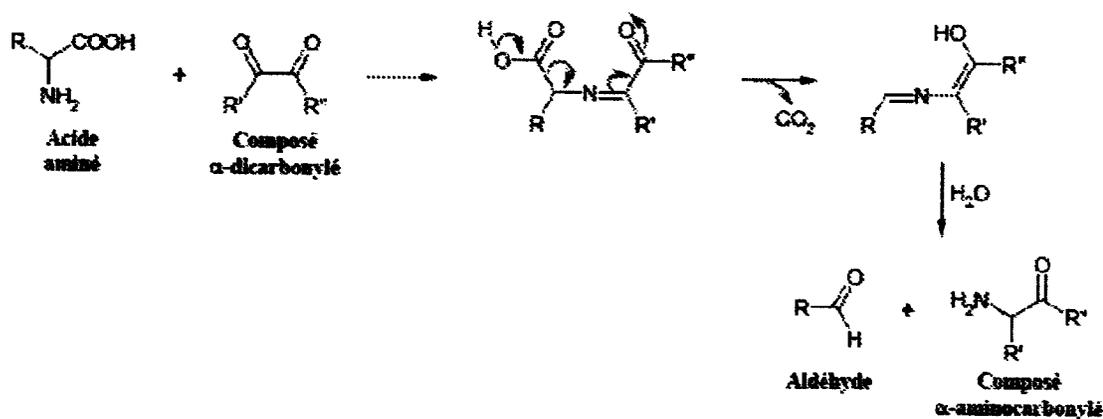


Figure 9 : Dégradation de Strecker.

Appliquée aux acides aminés sulfurés (cystéines et méthionine), la dégradation de Strecker permet d'obtenir des molécules sulfurées souvent importantes pour l'arôme d'un végétal, ainsi que des intermédiaires (ammoniac et sulfure d'hydrogène) intervenant dans la formation d'autres substances (Figures 10 et 11).^{76,79}

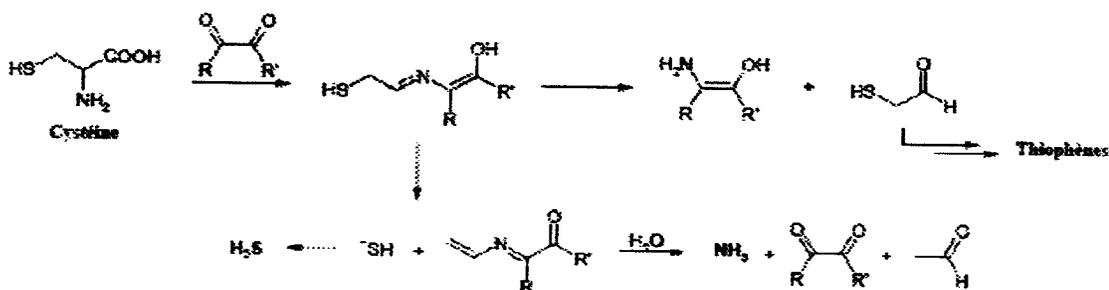


Figure 10 : Dégradation de Strecker de la cystéine.

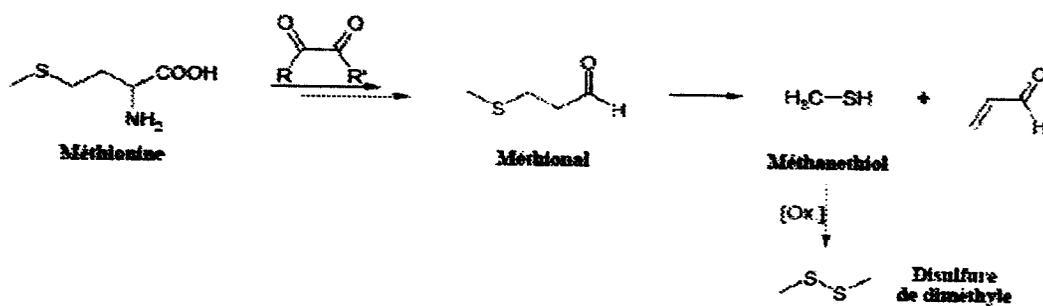


Figure 11 : Dégradation de Strecker de la méthionine.



III.4. Voie de l'alliinase

L'alliinase est une cystéine sulfoxyde lyase spécifique des espèces du genre *Allium* (famille des Liliacées) comprenant notamment l'ail (*Allium sativum*), l'oignon (*Allium cepa*), et le poireau (*Allium porrum*).

Ce sont en effet les plantes pour lesquelles il est possible de se rendre compte de la biosynthèse des composés soufrés volatils secondaires. En effet, quand on coupe un oignon, le produit lacrymogène ou thiopropanal S-oxyde, en est l'exemple le plus simple. Le mécanisme repose, une nouvelle fois, sur une action enzymatique provoquée par la destruction des parois cellulaires. Lorsqu'elle est libérée l'alliinase va cliver les sulfoxydes de S-alk(èn)yl cystéine et former ainsi les acides sulféniques intermédiaires. Très instables, ces derniers se condensent pour donner des thiosulfates (Figure 12). Ces thiosulfates très volatils et également peu stables, sont rapidement dégradés surtout lors de la cuisson, générant les mono-, di- et trisulfure correspondants.

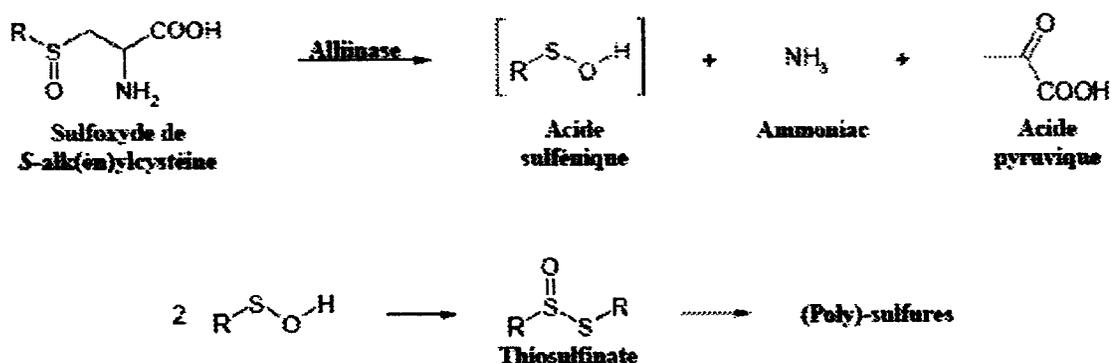


Figure 12 : Voie de l'alliinase.

La distinction principale entre l'ail et l'oignon vient des sulfoxydes présents dans chaque plante. Le sulfoxyde de prop-2-énylcystéine (allicine) est caractéristique de l'ail et de l'oignon renferme les sulfoxydes de propyl- et prop- (Z et E)-ényl cystéine. Cette différence entraîne la formation de composés originaux, propres à ces deux variétés (Figure 13).^{76,82,83}



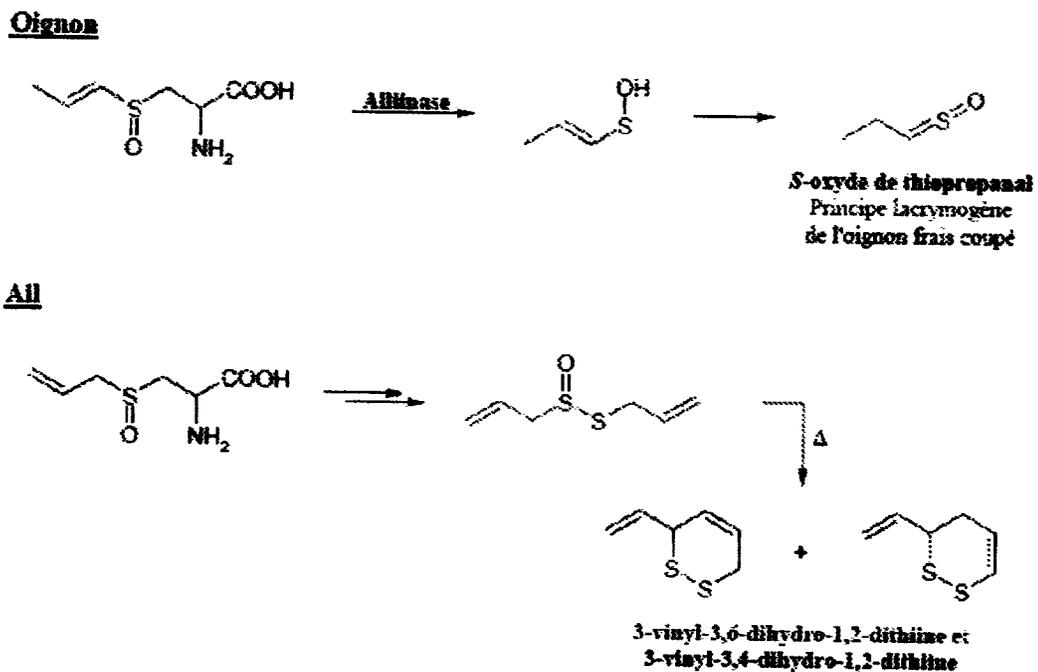


Figure 13 : Exemples de composés propres à deux espèces du genre *Allium*.

III.5. Formation des composés soufrés (sulfures d'alkyles et méthaneithiol)

Issu de la transméthylation entre la méthionine et la cystéine,⁸⁴ suivi d'une oxydation,⁸⁵ le sulfoxyde de S-méthyl cystéine est un acide aminé libre caractéristique du genre *Brassica*. Il fut identifié par deux équipes de recherche distinctes dès 1956.^{86,87} Lors de la destruction des parois cellulaires végétales, la dégradation enzymatique de cet acide aminé par une cystéine sulfoxyde lyase (C-S lyase) suit un processus similaire à la voie de l'alliinase (Figure 13). En effet, cette dernière n'est qu'un cas particulier de C-S lyase spécifique du genre *Allium*. Isolée par Mazelis,⁸⁸ une C-S lyase, présente dans les *Brassica*, possède la faculté supplémentaire de cliver la cystine (condensation de deux unités de cystéine) d'où son nom de cystine lyase (EC 4.4.1.8).⁸⁹

Cette enzyme est active pour un pH optimum compris entre 8 et 8,5.⁸⁹ Le mécanisme proposé implique donc l'action de C-S lyases qui vont catalyser la formation de l'acide méthanesulfénique.

L'instabilité de ce dernier induit l'apparition du méthylméthanethiosulfinate par dimérisation (Figure 14).



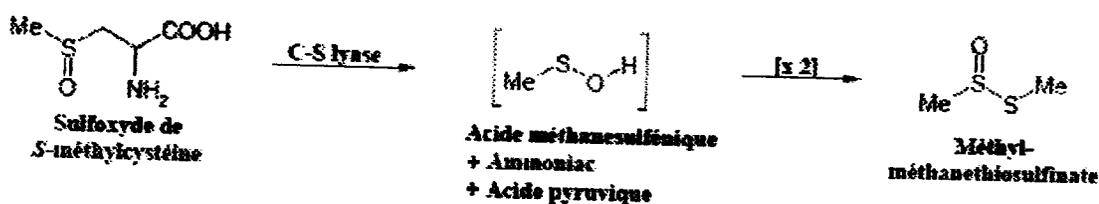


Figure 14 : Action de la C-S lyase sur le sulfoxyde de S-méthylcystéine.

Longtemps hypothétique et mal défini, ce mécanisme est aujourd'hui admis. Les travaux de Marks et coll.⁷⁰ ont pu mettre en évidence la relation enzymatique entre le sulfoxyde de S-méthylcystéine et l'apparition du méthyl méthanethiosulfinate. Néanmoins, la suite du mécanisme aboutissant aux composés soufrés volatils (sulfures de diméthyle et méthanethiol), soulève encore quelques incertitudes. Une étude très complète de Chin et Lindsay⁹⁰ a pourtant permis d'accréditer la formation du disulfure de diméthyle à partir du méthyl méthanethiosulfinate (Figure 15), et non pas par oxydation du méthanethiol puisque cette réaction peut avoir lieu en milieu anaérobie. Cependant les auteurs n'excluent pas cette seconde option.

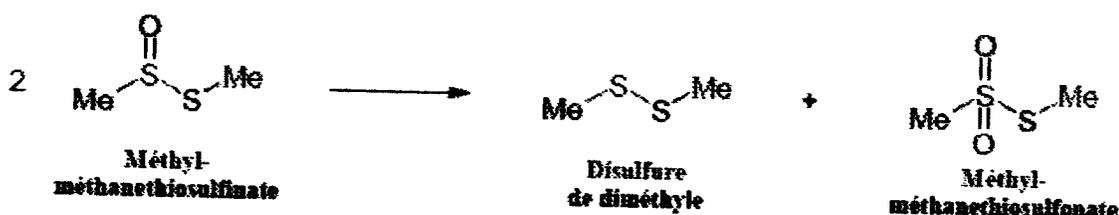


Figure 15 : Principal mode de formation du disulfure de diméthyle.

De la même façon, plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la formation du trisulfure de diméthyle : réaction entre le disulfure de diméthyle et le soufre élémentaire⁹¹ ou encore réaction entre le méthaneithiol et le sulfure d'hydrogène.⁴⁸

Ces propositions ont été écartées par Chin et Lindsay,⁹⁰ pour qui l'attaque nucléophile du méthyl méthanethiosulfinate, ou plus favorablement, du méthyl méthanethiosulfonate par le sulfure d'hydrogène (Figure 16), est plus favorable. Encore une fois, d'autres possibilités ne sont pas exclues mais restent secondaires.



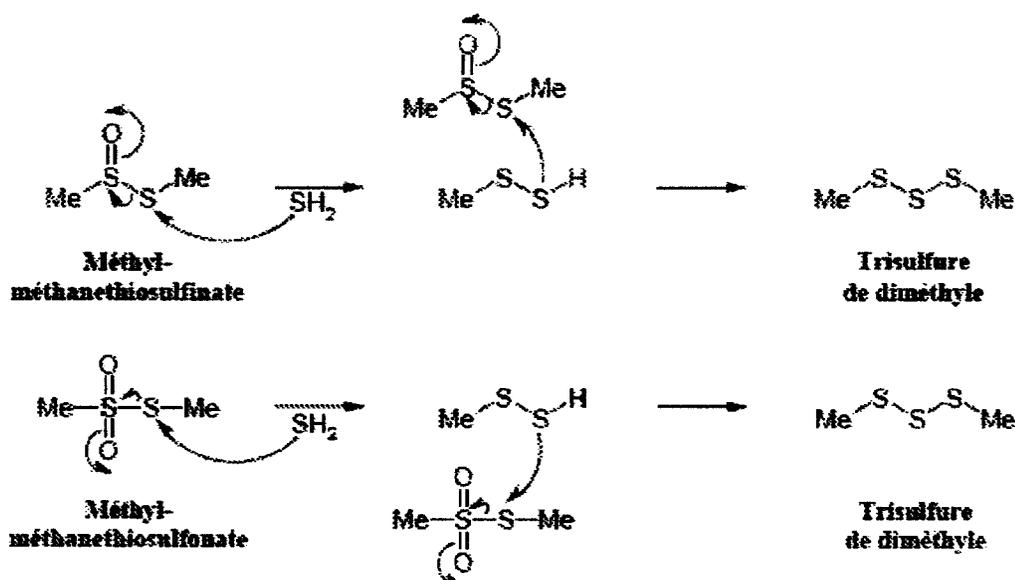


Figure 16 : Principal mode de formation du trisulfure de diméthyle.

Bien que l'action des C-S lyases induise clairement la synthèse des di- et trisulfure de diméthyle, cette voie n'explique pas de manière évidente la présence du sulfure de diméthyle dans l'arôme des crucifères.

Jusqu'à présent, le principal précurseur, clairement identifié pour cette substance, est le S-méthylméthionine ou plus précisément le sel de sulfonium de S-méthylméthionine.⁹²

En effet, ce dernier peut être dégradé thermiquement ou par action enzymatique pour générer le monosulfure (Figure 17).

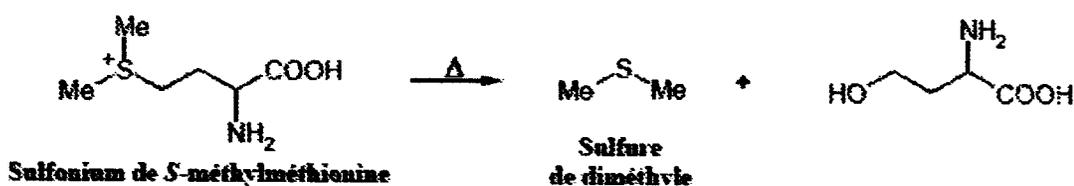


Figure 17 : Principal mode de formation du sulfure de diméthyle.

La formation du méthanethiol est également un sujet complexe. A nouveau, plusieurs processus ont été proposés (Figure 18). En 1986, Hamamoto et Mazelis⁸⁹ rapportent la dégradation de la S-méthylcystéine par la cystine lyase isolée du brocoli. Selon le même principe, Dipentina et coll.⁹² constatent la dégradation de la S-méthylcystéine mais aussi de la méthionine.



Suite à cette observation, ils suggèrent la possible intervention d'une enzyme de type méthioninase. Chin et Lindsay,⁹⁰ envisagent quant à eux, un mode de formation dérivé de l'attaque des méthylméthanethiosulfinate et sulfonates par H₂S. Une dernière possibilité consiste en l'intervention d'une méthyl transférase dont Attih et coll.⁹³ ont démontré l'existence et dont l'activité implique la formation de méthanethiol à partir de la S-adénosylméthionine.

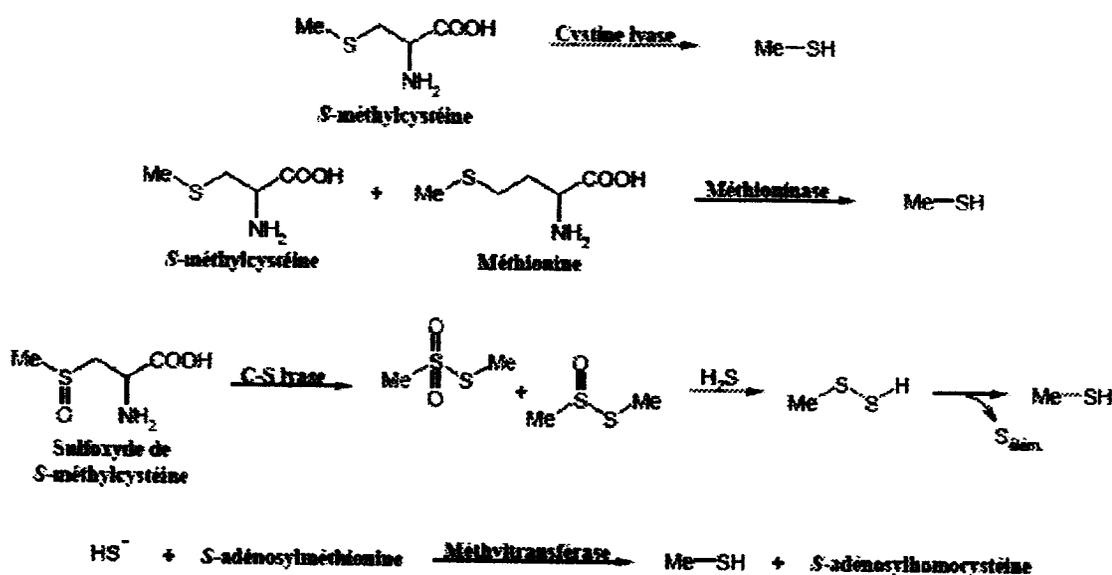


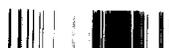
Figure 18 : Différents modes de formation du méthanethiol.

Enfin, l'émission de sulfure d'hydrogène, impliqué dans certaines réactions précédentes mais aussi dans la formation de composés soufrés plus originaux, est due à la dégradation de la cystéine par d'autres enzymes : Les cystéines désulfhydrases.⁶³ Rappelons également que le sulfure d'hydrogène et le méthanethiol peuvent provenir de la dégradation de Strecker de la cystéine ou de la méthionine (voir les figures 10 et 11).

III.6. Produits dérivés des glucosinolates

III.6.1. Structure générale des glucosinolates

Indissociables du métabolisme des crucifères, les glucosinolates, autrefois appelés hétérosides soufrés, sont des composés hétérosidiques anioniques responsables des odeurs fortes et caractéristiques dégagées par de nombreuses *Brassicacées* ainsi que par diverses espèces appartenant à 15 autres familles de végétaux, botaniquement proches, parmi elles les *Capparacées*, *Résédacées* et les *Caricacées*.⁹⁴



Les premières recherches remontent au XVII^{ème} siècle et sont liées aux interrogations relatives à l'origine de la saveur de la moutarde.⁶

Les glucosinolates sont des (Z) N-hydroxysulfate de β -thioglycoside (également appelés thiohydroxymate de S-glucopyranosyle) possédant une chaîne latérale variable et un motif β -D-glucopyranose (Figure 19) dont la première structure générale correcte a été établie par Ettlinger et Lundeen.⁹⁵ La première synthèse chimique d'un glucosinolate est décrite en 1957.⁹⁶

La molécule existe sous la forme d'un sel de potassium.

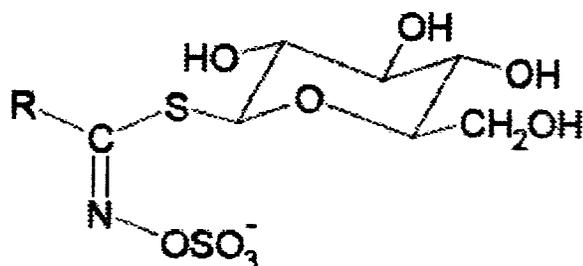


Figure 19 : Structure générale d'un glucosinolate (R-GLS).

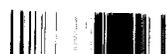
La diversité des structures des glucosinolates est liée à celle des acides aminés précurseurs de ces molécules, la méthionine, l'alanine, la valine, la leucine ou l'isoleucine pour les glucosinolates aliphatiques, la phénylalanine ou la tyrosine pour les glucosinolates aromatiques et le tryptophane pour les glucosinolates indoliques.

Près de 120 glucosinolates différents ont été recensés dans plusieurs centaines d'espèces crucifères, dont environ le 1/3 contient un atome de soufre dans des états variés d'oxydation (exemple : méthylthioalkyl-, méthylsulfinylalkyl-, ou méthylsulfonylalkyl).⁶ Le tableau 3 regroupe les glucosinolates les plus fréquents. Certains glucosinolates sont considérés comme marqueur taxonomique,⁹⁷⁻⁹⁹ il s'agit par exemple du glucosinolate de méthyle (glucocapparine) caractéristique des Capparacées.



Tableau 3 : Principaux glucosinolates présents dans les crucifères.^{72,100}

Structure de la chaîne latérale	Nom	Nom trivial
$\text{H}_3\text{C}-\text{GLS}$	GLS de méthyle	Glucocapparine
	GLS d'allyle	Sinigrine
	GLS de but-3-ényle	Gluconapine
	GLS de pent-4-ényle	Glucobrassicinapine
	GLS de 2(R)-hydroxybut-3-ényle	Progoitrine
	GLS de 2(S)-hydroxybut-3-ényle	Epiprogoitrine
	GLS de 2-hydroxypent-4-ényle	Gluconapoleiférine
	GLS de 3-méthylthiopropyle	Glucobervérine
	GLS de 4-méthylthiobutyle	Glucocéruine
	GLS de 3-méthylsulfinylpropyle	Glucobérine
	GLS de 4-méthylsulfinylbutyle	Glucoraphanine
	GLS de 4-méthylsulfinylbut-3-ényle	Glucoraphénine
	GLS de benzyle	Glucotropaeoline
	GLS de 2-phényléthyle	Gluconasturtine
	GLS de p-hydroxybenzyle	Sinalfine
	GLS d'indol-3-ylméthyle	Glucobrassicine
$\text{R} = \text{R}' = \text{H}$	GLS de 1-méthoxyindol-3-ylméthyle	Néoglucobrassicine
$\text{R} = \text{OCH}_3$ $\text{R}' = \text{H}$	GLS de 4-hydroxyindol-3-ylméthyle	4-hydroxy-glucobrassicine
$\text{R} = \text{H}$ $\text{R}' = \text{OH}$	GLS de 4-méthoxyindol-3-ylméthyle	4-méthoxy-glucobrassicine
$\text{R} = \text{H}$ $\text{R}' = \text{OCH}_3$		



III.6.2. Bioformation des glucosinolates

La biosynthèse des glucosinolates suit un processus complexe suscitant encore quelques interrogations. Ce processus, qui implique divers acides aminés comme précurseurs de ces molécules, se décompose en trois étapes distinctes : ^{6,100,101}

a/ **Elongation de chaîne latérale** (insertion du groupe méthylène $-CH_2$ dans la chaîne). Nous citerons à titre d'exemple l'élongation de chaîne de la méthionine. L'acide aminé concerné peut subir une ou plusieurs élongations de chaîne via la formation d'oxoacides intermédiaires. Falk et coll.¹⁰¹ ont pu mettre en évidence l'activité d'une 2-(ω -méthylthioalkylmalatesynthase)(MAMS) catalysant la réaction de condensation du 4-méthylthio-2-oxobutanoate (MTOB) avec l'acétyl-CoA (Figure 20).

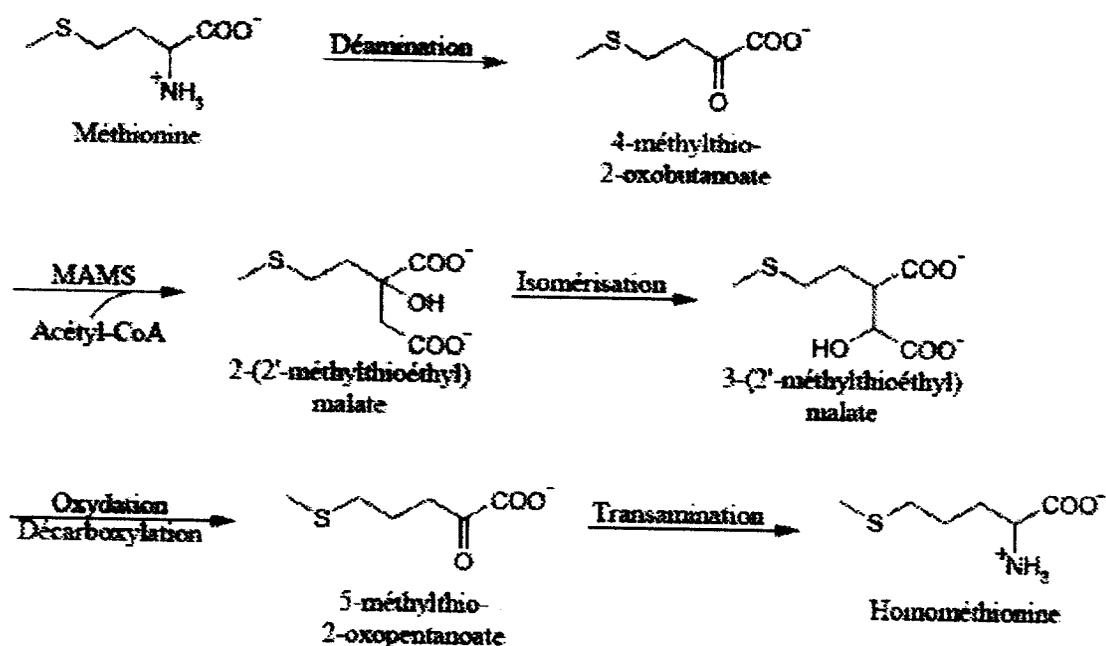


Figure 20 : Bioformation des glucosinolates – Etape 1.

b/ **Formation du motif glucosinolate** : fondamentale et indépendante de la chaîne latérale de l'acide aminé, cette étape passe tout d'abord par la formation d'un intermédiaire aldoxime. Ce dernier conduirait à un acide thiohydroximique après oxydation et introduction du soufre (provenant probablement de la cystéine), mais, jusqu'à présent, aucune évidence expérimentale n'a pu certifier ce mécanisme. Par la suite, une enzyme de type thiohydroximate S-glucosyltransférase permet d'obtenir le désulfoglucosinolate à partir de l'uridine 5'-diphosphoglucose (UDP-Glc). Puis l'introduction du motif sulfate est effectuée



par une désulfoglucosinolate sulfotransférase en utilisant le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS) (Figure 21).

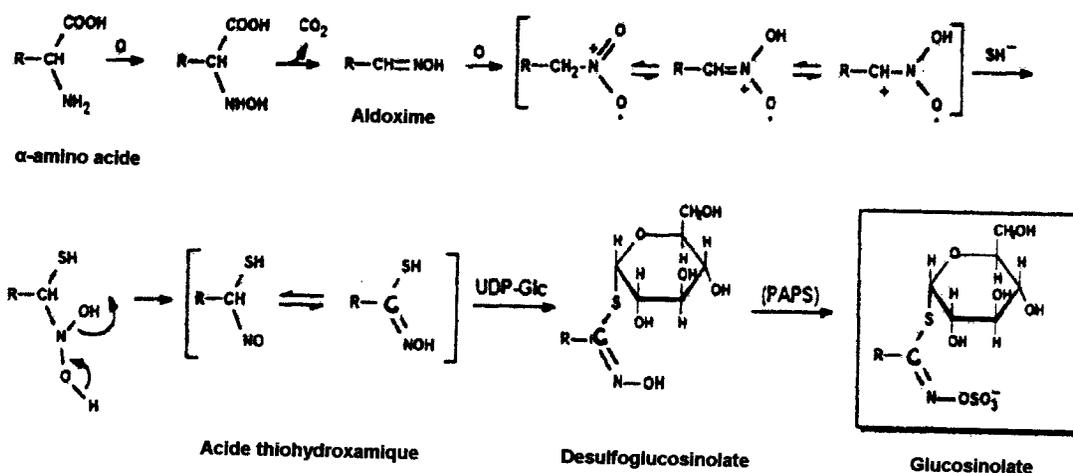


Figure 21 : Bioformation des glucosinolates – Etape 2.

c/ **Modification de la chaîne latérale des glucosinolates.** Elle consiste en une oxydation ou une élimination du groupement méthylthio. La figure 22 représente un exemple de modification de la chaîne.

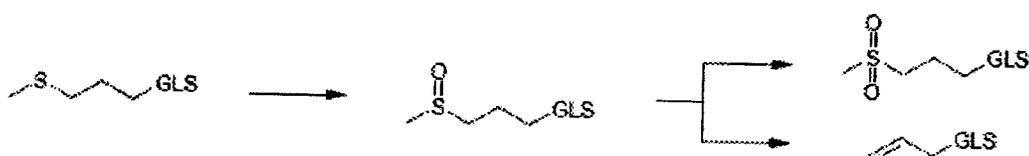


Figure 22 : Bioformation des glucosinolates – Etape 3.

III.6.3. Dégradation des glucosinolates

La dégradation des glucosinolates, ou plus précisément, leur hydrolyse, réalisée par une enzyme de type thioglucoside glucohydrolase appelée myrosinase (EC 3.2.3.1), entraîne la formation de trois types de composés : les isothiocyanates, les nitriles et les thiocyanates (Figure 23), les deux premiers sont habituellement majoritaires et le dernier plus rare.^{32,102}



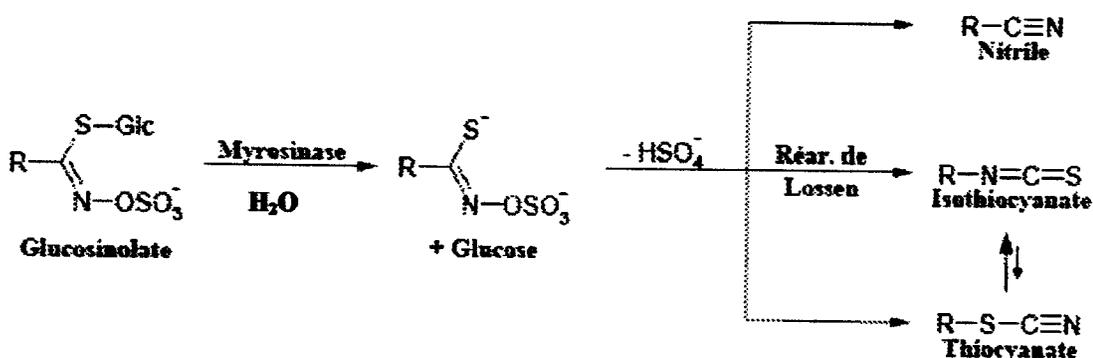


Figure 23 : Dégradation enzymatique des glucosinolates.

Les glucosinolates sont physiquement séparés de la myrosinase dans un végétal intact, leur hydrolyse ne peut avoir lieu que lors de la destruction des cellules de la plante (mastication, préparation, altération). Dans ce cas, la myrosinase rompt le lien thioglucosidique et génère un intermédiaire qui se réarrange différemment selon les conditions du milieu.¹⁰³

Pour un pH neutre ou légèrement basique un réarrangement de type Lossen entraîne préférentiellement la formation des isothiocyanates (Figure 24).



Figure 24 : Formation des isothiocyanates - Réarrangement de type Lossen.

En revanche, un pH acide privilégie la production des nitriles, ceux-ci sont également favorisés par l'apparition d'ions ferreux Fe^{2+} , même pour un pH propice à l'apparition des isothiocyanates.¹⁰⁴

Les thiocyanates sont plus rares et une interconversion des isothiocyanates en thiocyanates est également observable.

La typicité des crucifères reste cependant attribuée, sans conteste, aux composés soufrés et surtout aux isothiocyanates et nitriles. Ces molécules sont toutes issues de précurseurs soufrés dérivant de la biosynthèse des acides aminés¹⁰⁵ : les glucosinolates, pour les isothiocyanates et les nitriles, et le sulfoxyde de S-méthyl cystéine principalement pour les composés soufrés.



Les glucosinolates possédant une chaîne β -hydroxylée, engendrent, par action enzymatique, des isothiocyanates instables qui se cyclisent spontanément pour donner des oxazolidines-2-thiones. La progoitrine en est l'exemple le plus connu (Figure 25).^{104,106}

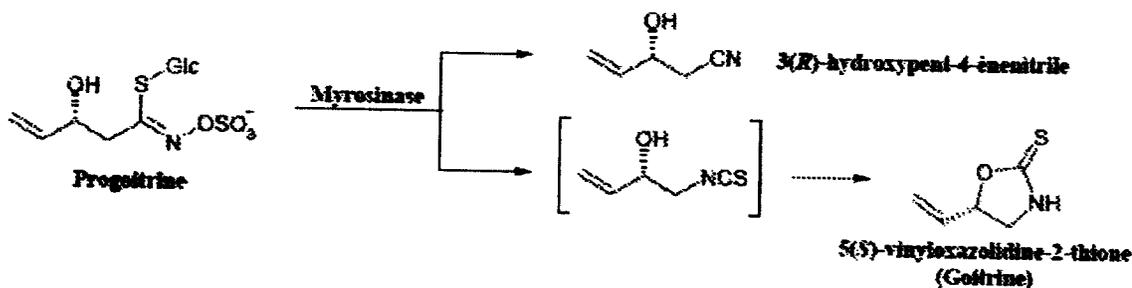


Figure 25 : Dégradation enzymatique de la progoitrine.

La dernière possibilité de dégradation concerne les glucosinolates d'alkényles présents dans de nombreuses crucifères et souvent majoritaires, générant parfois des 1-cyanoépithioalcanes.^{107,108}

Ces composés originaux sont induits par l'existence d'un co-facteur chez certaines espèces. Ce co-facteur est une protéine, dite épithiospécifique (ESP), qui interagit avec la myrosinase lors de l'hydrolyse des glucosinolates en présence d'ions ferreux Fe^{2+} (Figure 26).^{109,110} Inactive par elle-même, cette protéine, très fragile, favorise la formation des nitriles avec transfert de soufre et inhibe, de ce fait, celle des isothiocyanates.¹¹¹

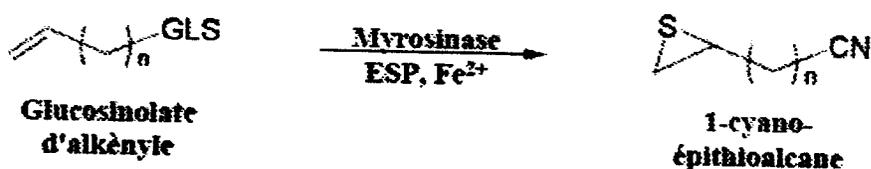


Figure 26 : Formation des cyanoépithioalcanes ($n=1,2,3$).

III.6.4. Propriétés – toxicité des glucosinolates

Les glucosinolates, dont la principale source alimentaire est la famille des *Brassica* (espèces légumières) sont généralement et rapidement dégradés par des myrosinases (enzymes également présentes dans les microflores intestinales). L'action des glucosinolates d'un grand nombre de plantes (via leurs produits de dégradation) a principalement été testée.^{32,112,113}

Certains ont des propriétés antibactériennes, antifongiques,¹¹⁴⁻¹¹⁷ antivirales,¹¹⁸ insecticides,¹¹⁹ nématocides,^{120,121} allélopatiques¹²² ou encore phototoxiques.¹²³⁻¹²⁵

Certaines protéines de ces végétaux peuvent donner lieu à des allergies immédiates, des dermatites de contact dues à l'allyl isothiocyanate,¹²⁶ et leur pollen, à un rhume des foins.¹²⁷

Décrite dès 1928 par Chesney et coll.¹²⁸, la consommation de certaines crucifères favorise l'apparition du goitre. Toxiques potentiels à fortes concentrations, plusieurs composés seraient susceptibles de provoquer cette déformation mais la 2-vinyloxazolidine-2-thione a été reconnue comme la principale responsable d'où son appellation de « goitre ». Sa présence empêche la fixation de l'iode par la glande thyroïdienne.

Le phénomène de formation du goitre était particulièrement prononcé pour des espèces animales nourries avec les résidus de colza préalablement extraits pour leurs huiles. Ce problème, visant à diminuer le taux de progoitrine dans ce végétal, a abouti à la création des variétés de « canola ».¹⁰⁰

Chez l'homme, bien que l'on constate une fréquence anormale de goitres, des remarques identiques peuvent être formulées en ce qui concerne la consommation de lait provenant d'animaux recevant des rations alimentaires riches en crucifères.⁹⁴ Chez les animaux (moutons, bœufs, lapins) ceci provoquerait des avortements et mort des fœtus in utero.⁹⁴

Cependant, ce sont les propriétés anticancéreuses et antitumorales des *Brassica* qui captivent bon nombre de chercheurs à l'heure actuelle.^{129,130}

L'étude menée par Munday et Munday¹³¹ montre que la plupart des isothiocyanates présentent une activité notable in vivo, le sulforaphane (isolé et caractérisé par Zhang et coll.¹³²), en particulier, suscite un intérêt considérable de part son potentiel in vitro et sa faible cytotoxicité.^{133,134} Ce composé provient de l'hydrolyse de la glucoraphanine.

Les modifications des quantités émises d'isothiocyanates ou de nitriles résultent des variations dans la composition initiale du végétal en glucosinolates. Les principaux responsables sont, d'une part les pratiques horticoles qui impliquent un taux initial de glucosinolates plus ou moins important dans la plante et d'autre part, les méthodes de conservation et les modes de cuisson qui peuvent induire des pertes plus ou moins notables de glucosinolates.^{135,136}



De même, les thiocyanates pourraient également jouer le rôle de suppresseurs bloquant l'évolution des cellules précancéreuses.¹³⁷

Pour préserver l'intégrité de son ADN cellulaire, l'organisme doit certes se prémunir contre les radicaux libres, il les neutralise en mobilisant des antioxydants tels que les fruits et légumes. Lorsqu'on les ingère, ils sont transformés par des enzymes (dits de phase I) en particulier chargées, très réactives, pouvant se coller à l'ADN puis les dénaturer. Ces particules électrophiles peuvent être neutralisées puis excrétées grâce à des enzymes de phase II. Les isothiocyanates inhibent les enzymes de phase I et stimulent l'activité des enzymes de phase II ce qui leur confère le rôle chimioprotecteur (Figure 27).¹³¹⁻¹³⁴

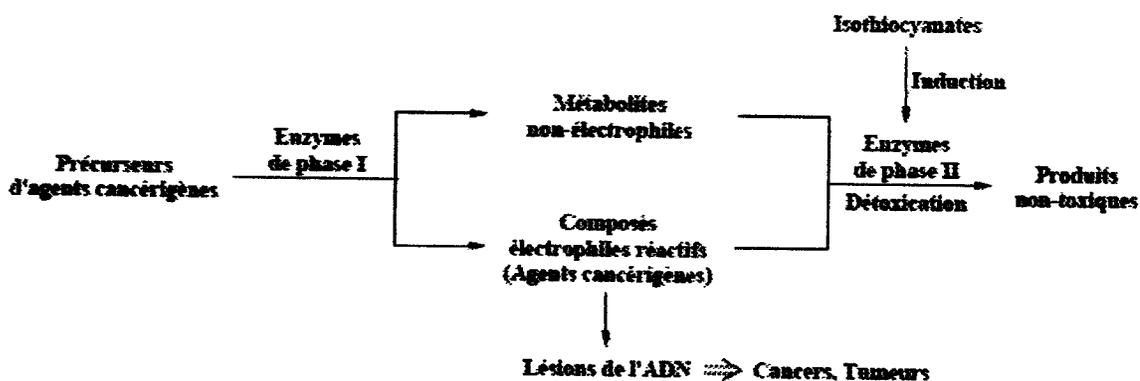


Figure 27 : Mécanisme de détoxication - influence des isothiocyanates.

L'objectif actuel, émanant de la volonté d'exploiter cette propriété bienfaitrice, réside dans l'identification^{138,139} voire la création de variétés riches en glucosinolates¹⁴⁰ (exception faite des glucosinolates d'indole dont certains dérivés sont nocifs).

Il est même envisageable d'utiliser la glucoraphanine comme complément alimentaire¹⁴⁰ du fait que la microflore intestinale possède une activité similaire à la myrosinase.^{141,142}

IV. Conclusion

Il est important de souligner que dans la vaste famille des brassicacées figure bon nombre de plantes comestibles d'importance commerciale et médicinale.

Les substances aromatisantes soufrées jouent un rôle très important dans les crucifères et les alliées, elles sont issues soit de l'action d'enzymes, durant le concassage, le broyage



ou la mastication ; soit d'une transformation microbienne par fermentation ; soit enfin d'une dégradation thermique.

Le disulfure de diméthyle est issu, en particulier, du sulfoxyde de S-méthylcystéine par action enzymatique, alors que le trisulfure de diméthyle peut être issu de l'action du sulfure d'hydrogène sur le méthylméthanethiosulfonate.

Cet aperçu bibliographique permet de comprendre les mécanismes généraux de la biogénèse des composés soufrés volatils. Les sulfures d'alkyles proviennent des sulfoxydes d'alkylcystéine issus du métabolisme des acides aminés qui, par action d'enzymes (alliinase), génèrent des sulfures, des thiosulfates ou des thiosulfonates ; alors que glucosinolates, provenant du métabolisme des hydrates de carbone, génèrent par action de la thioglucosidase (myrosinase) des thiocyanates, des isothiocyanates et, sous l'effet de la chaleur, des nitriles.



CHAPITRE II

PARTIE EXPERIMENTALE



I. INTRODUCTION

Si l'on s'intéresse tout particulièrement à une matrice végétale, comme *Pseudocytisus integrifolius*, il est important de définir son identité, décrire sa morphologie, connaître son origine, son mode de production et analyser sa composition chimique. Toutefois, cette étude n'est pas exhaustive et le domaine concerné, étant très vaste, nécessite plus d'approfondissement.

De nombreuses recherches continuent d'élaborer des méthodologies et des instrumentations plus optimisées. Néanmoins, bien que certaines techniques analytiques soient largement connues, il n'est pas inutile de rappeler brièvement leur concept avant de procéder aux données expérimentales et modes opératoires.

Une attention particulière sera simplement portée aux méthodes disponibles et utilisées dans nos travaux.

II. MATERIEL VEGETAL

II.1. ORIGINE GEOGRAPHIQUE ET PERIODE DE RECOLTE

Pseudocytisus integrifolius et *Sinapis arvensis* ont été récoltées en période de pleine floraison (mars pour *Pseudocytisus integrifolius* et mai pour *Sinapis arvensis*) dans les stations Kasdir et Lalla Setti respectivement (Chapitre I).

II.2. IDENTIFICATION BOTANIQUE

Les deux espèces ont été identifiées grâce aux spécimens de deux herbiers distincts :

- Identification faite par le professeur N. BENABADJI du Laboratoire d'Ecologie et Gestion des Ecosystèmes Naturels ; Université Abou Bakr BELKAID – Tlemcen (Algérie).
- Identification faite par le professeur G. ALZIAR du Jardin Botanique de la ville de Nice (France).

Les deux plantes ont été enregistrées sous les références :

□ Nice B. 3981 pour *Pseudocytisus integrifolius*

□ Nice B. 3985 pour *Sinapis arvensis*.

II.3. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Après leur récolte, les échantillons ont été triés. Le séchage du matériel végétal a été réalisé dans un espace couvert (à l'abri du soleil) et bien aéré. Le matériel végétal était retourné au fur et à mesure de son séchage.

Les échantillons broyés ont été mis dans des bocaux, en verre hermétiquement fermés, conservés à basse température (congélateur). Ces farines permettent de doser les éléments nécessaires pour déterminer la matière grasse, la matière minérale, les glucides et les protéines.

II.4. SOLVANTS ET PRODUITS CHIMIQUES

Les réactifs utilisés lors des différents travaux présentés sont commerciaux et utilisés sans purification supplémentaire.

Les solvants utilisés lors de la séparation ou de la purification (colonne chromatographique) sont distillés à pression atmosphérique à l'aide d'une colonne de type vigreux.

Le gel de silice utilisé pour la chromatographie sur colonne présente une granulométrie de 0,063-0,2 mm (70-230 mesh) Merck-gel de silice 60.

Pour la chromatographie sur couche mince, des plaques d'aluminium recouvertes de gel de silice 60 avec indicateur de fluorescence UV 254 nm ont été utilisées.

III. TESTS PHYTOCHIMIQUES

La découverte de ressources naturelles du monde végétal reste capitale par la mise au point de nouveaux remèdes thérapeutiques. Ces composés chimiques sont déterminés par une étude phytochimique, dont l'un des buts essentiels est la détection de classes des composés existant dans les différents organes des plantes (tiges, feuilles, racines, graines...).

Les tests physicochimiques sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de coloration et de précipitation, ainsi que des examens en lumière ultraviolette. Les techniques de détection doivent être sensibles et reproductibles pour permettre la mise en évidence de classes chimiques.



III.1. Différentes classes recherchées

III.1.1. Les alcaloïdes

Ce sont des composés organiques azotés existant à l'état de sels. Ils constituent, avec les hétérosides, la majorité des principes actifs des plantes médicinales. Le terme alcaloïde a été introduit au début du XIX^{ème} siècle par W. Meisner (1818) ; il rappelle le caractère alcalin de ces substances, mettant à profit leur extraction et leur dosage.¹⁴³

Leur caractérisation est faite en présence d'acide chlorhydrique, en additionnant quelques gouttes de réactif de Wagner, afin d'obtenir un précipité brun indiquant leur présence.¹⁴⁴

Leur action pharmacologique est importante : stimulants, anesthésiques locaux, antitumoraux...

III.1.2. Les flavonoïdes

Ce sont des composés polyphénoliques très répandus dans le règne végétal dont la fonction principale est la pigmentation des plantes. Largement distribués dans le règne végétal, les flavonoïdes sont présents en plus ou moins grande quantité dans les aliments et les boissons d'origine végétale (thé, café, jus de fruits, vins...).¹⁴⁵

Ils donnent généralement avec le Magnésium, en présence d'acide chlorhydrique, une coloration rose ou rouge.¹⁴⁶

III.1.3. Les tanins

Ce sont des composés phénoliques, de structures variées, qui peuvent être divisés en deux groupes^{147,148} :

* Les tanins hydrolysables appelés tanins pyrogalliques et qui sont des polyesters de glucides et d'acides-phénol. Ils sont facilement scindés par les acides ou les enzymes (tannases) en -ose et en acide-phénol. On distingue les tanins galliques (dans le cas de l'acide gallique) et les tanins ellagiques dans le cas de l'acide ellagique (ce dernier résulte de la condensation de deux acides galliques).

Leur caractérisation est faite en présence de sels ferriques ; le précipité obtenu est bleu-noir. Les tanins galliques donnent une coloration rose avec l'iodate de potassium (l'acide gallique libre est coloré en orange par ce réactif).



* Les tanins condensés ou proanthocyanidols diffèrent, fondamentalement, des tanins galliques et ellagiques.

Leur structure est voisine de celle des flavonoïdes, ils ne possèdent pas de sucre dans la molécule. Ils sont formés de deux ou plusieurs molécules de flavan-3-ols, dont l'union se fait par des liaisons carbone-carbone.

Caractérisé par les sels ferriques, le précipité coloré obtenu est brun-verdâtre.

En présence de la vanilline chlorhydrique, les tanins condensés sont colorés en rouge.^{148,149} La plupart des propriétés biologiques des tanins est liée au pouvoir qu'ils ont de former des complexes avec les macromolécules, en particulier avec les protéines (enzymes digestives).

Les tanins favorisent la régénération des tissus en cas de blessures superficielles ou de brûlures (effet vasoconstricteur dû à l'astringence). Certains problèmes peuvent être posés en agriculture notamment la diminution de la valeur nutritive des fourrages.¹⁴⁸

III.1.4. Les anthracénosides et émodols

Cette classe de familles regroupe les composés phénoliques hétérosidiques, les émodols (dérivés hydroxyanthracéniques) et les anthraquinones. Leur caractérisation fait appel à la réaction de Bornträger. Cette réaction n'est positive qu'avec les formes anthraquinoniques libres.¹⁵⁰

Ils ont des propriétés irritantes et laxatives sur le gros intestin facilitant ainsi le transit intestinal.¹⁵¹

III.1.5. Les coumarines

Dérivés de la benzo α -pyrone, ils sont très répandus dans le règne végétal. Leurs propriétés chimiques sont principalement dues à la fonction lactone. L'ouverture de cette dernière et sa solubilisation sont réalisées en milieu alcalin. Sa régénération (par sa fermeture) est réalisée en milieu acide.¹⁵² Leur spectre UV est caractéristique et sert à leur identification.^{153,154} Elles sont caractérisées par une fluorescence des solutions extractives.

L'examen en lumière UV permet leur révélation en milieu alcalin (KOH, NaOCH₃).

La CCM présente des taches dont la coloration, exaltée en présence d'ammoniaque, varie du bleu au jaune et au pourpre.¹⁵²



Certaines coumarines sont présentées comme veinotoniques et vasculoprotectrices.¹⁵²

III.1.6. Les anthocyanosides (anthocyanes)

Les anthocyanosides sont issus du métabolisme général des flavonoïdes. Ces pigments sont présentés sous forme d'hétérosides (anthocyanosides), dont les génines (les anthocyanidols) sont des dérivés du cation 2-phénylbenzopyrylium communément appelé cation flavylium (oxygène sous forme d'oxonium) et dont l'hydroxyle en position 3 est toujours lié à un sucre, le plus souvent un glucose.¹⁵⁰

Elles ont des colorations variant en fonction du pH. De rouge stable en $\text{pH} < 3$, elles virent au bleu en milieu alcalin.

L'intérêt industriel majeur est leur pouvoir colorant.¹⁵⁵

III.1.7. Les stérols et stéroïdes

Ce sont des composés terpéniques se présentant sous forme d'alcool libres (sitostérol), ou sous forme d'esters associés par le glucose (glucoside stérol).¹⁵⁶⁻¹⁵⁸

Ils jouent un rôle important dans la qualité des graisses et des huiles.¹⁵⁸ Leur caractérisation est basée sur la réaction de Liebermann-Burchardt.

L'intérêt thérapeutique et l'emploi industriel des triterpènes et des stéroïdes en font un groupe de métabolites secondaires de première importance.¹⁵⁹

III.1.8. Les saponosides

Les saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux.

Selon la nature des génines, il existe des saponosides à génines stéroïdiques et des saponosides à génines triterpéniques. Leur caractérisation est faite en milieu aqueux, la formation d'une couche hydrophobe est expliquée par l'intermédiaire des liaisons hydrogènes entre plusieurs groupes hydroxyles ou carboxyliques de saponines et les molécules d'eau.

Avec l'anhydride acétique en milieu sulfurique (réaction de Liebermann), les colorations diffèrent selon que la génine est triterpénique (rose à rouge) ou stéroïdique (bleu-vert).¹⁶⁰



En pratique, les saponosides sont caractérisés par un indice de mousse, déterminé sur un décocté obtenu par ébullition prolongée. Après agitation, la hauteur de mousse est mesurée.¹⁶⁰

Ils possèdent des propriétés anti-inflammatoires, vasculoprotectrices et veinotoniques.¹⁶¹

III.1.9. L'amidon

Principale forme de réserve glucidique des végétaux, il existe sous forme d'une structure correspondant à un homopolymère de D-glucose. Il est caractérisé au moyen du réactif à l'eau iodée par apparition d'une couleur bleue.¹⁶²

III.1.10. Les composés réducteurs

Les glucides, appelés hydrates de carbone ou saccharides, sont des composés organiques carbonylés (aldéhydiques ou cétoniques). Le caractère réducteur des aldoses ou des cétooses vis-à-vis de la liqueur de Fehling donne une coloration bleue.

III.2. Epuisement du matériel végétal

L'épuisement est réalisé dans un ballon monocol contenant 50 g de poudre de matériel végétal en présence de 300 ml de solvants : éthanol, éther diéthylique et eau. L'ensemble est porté à reflux pendant une heure. Le mélange filtré est soumis aux différents tests (Figures 28, 29 et 30 pages suivantes).

III.2.1. Réactifs et réactions de caractérisation

Les réactifs utilisés lors des tests sont les suivants :

- * *Réactif de Wagner* : dissoudre 2 g de KI et 1,27 g de I₂ dans 75 ml d'eau. Ajuster le volume total à 100 ml d'eau.
- * *Réactif de Mayer* : dissoudre 1,358 g de HgCl₂ dans 60 ml d'eau. Dissoudre 5 g de KI dans 10 ml d'eau. Mélanger les deux solutions puis ajuster le volume total à 100 ml d'eau.
- * *Réactif d'amidon* :
Dissoudre 1,2 g d'iode dans 50 ml d'eau distillée contenant 2,5 g d'iodure de potassium. Chauffer, dans un bain-marie, 5 ml de la solution à tester avec 10 ml d'une solution de NaCl saturée jusqu'à ébullition.



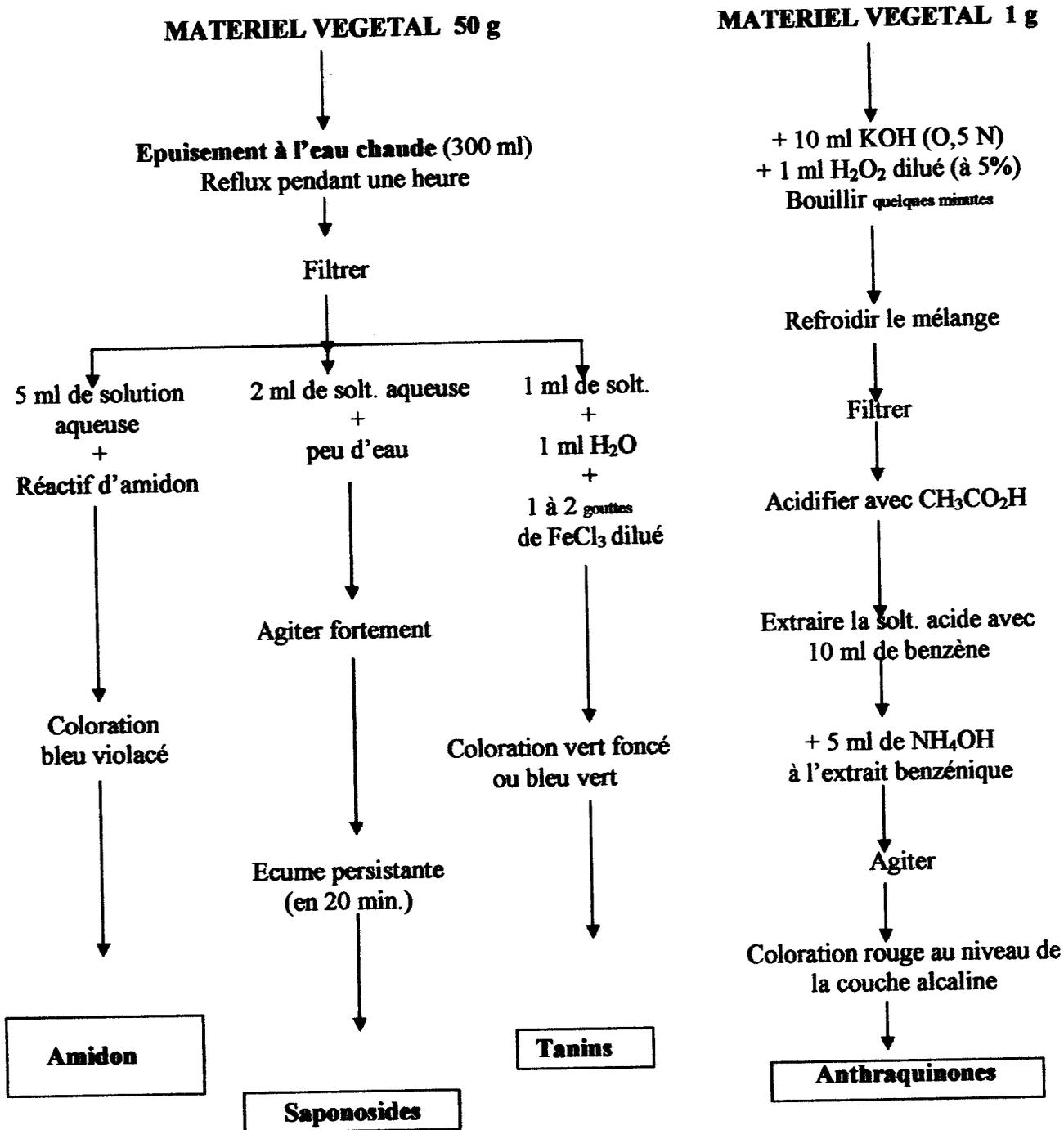


Figure 29 : Représentation schématique des tests phytochimiques.

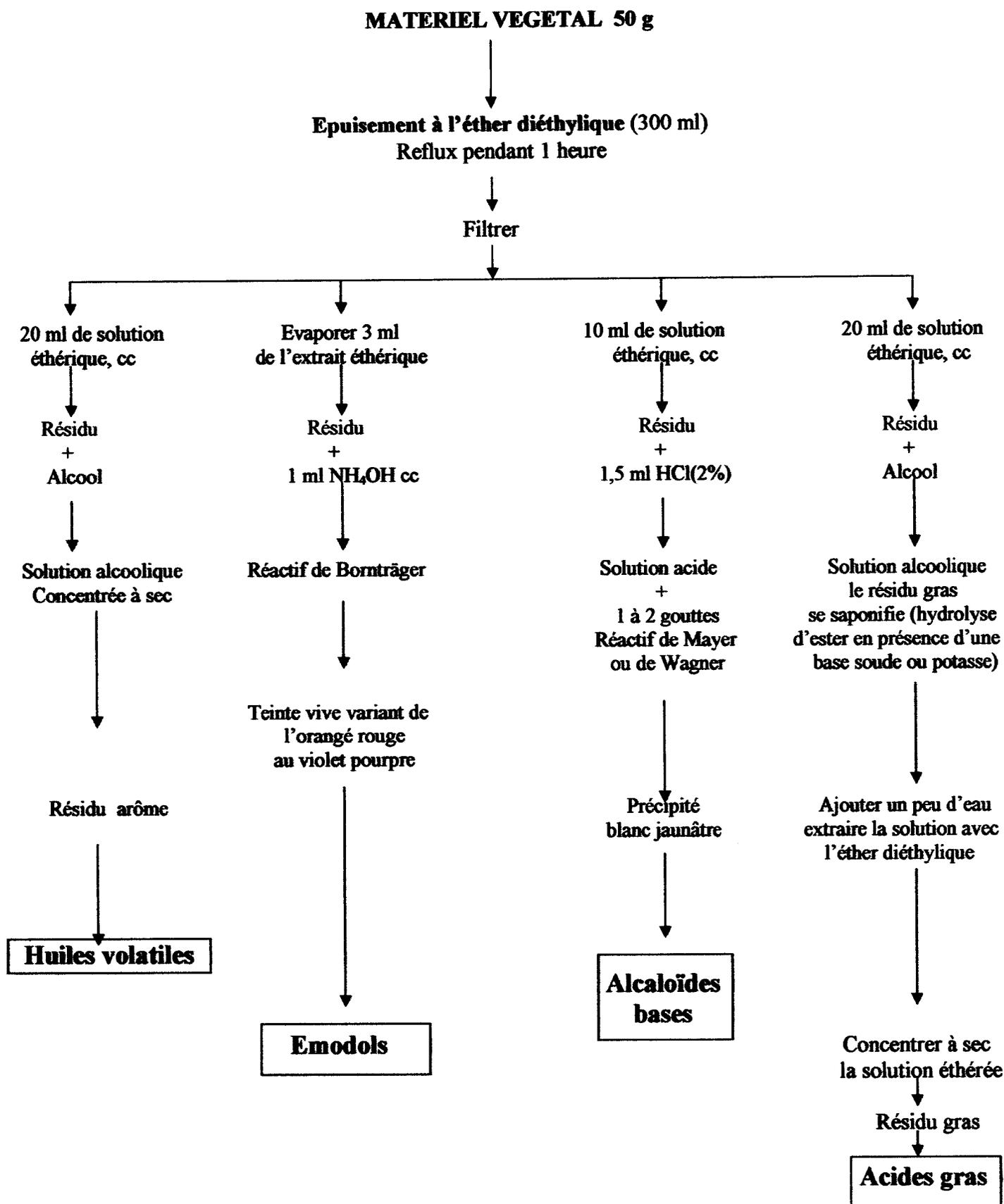


Figure 30 : Représentation schématique des tests phytochimiques.

*** Réaction de Liebermann Burchardt**

Mélanger 5 ml de la solution à tester avec 5 ml d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique concentré. Agiter et laisser la solution reposer 30 minutes à 21°C. Les stéroïdes donnent avec cette réaction une coloration violacée fugace virant au vert.

*** Réaction de Bornträger**

En milieu alcalin aqueux (NH₄OH), les anthracénosides et emodols donnent à la solution une teinte vive variant, selon la structure et les substituants de la quinone, de l'orangé rouge au violet pourpre plus ou moins violacé.

IV. EXTRACTION DES HUILES ESSENTIELLES

De part la volatilité des composés considérés, l'extraction, souvent délicate, est l'étape cruciale. L'entraînement à la vapeur d'eau est une méthode traditionnelle simple et assez efficace. La plante est placée, sur une grille, au-dessus de l'eau puis chauffée. Les composés volatils sont entraînés par la vapeur jusqu'à un réfrigérant. Après condensation, une phase organique (insoluble dans l'eau) est récupérée : l'huile essentielle.¹⁶³ Toutefois, ce chauffage assez conséquent, 100 °C en milieu aqueux, peut provoquer des modifications chimiques ; ce qui aboutit à la formation de nouvelles substances (réarrangements ou destruction de certaines molécules).

Technique d'extraction : Entraînement à la vapeur d'eau

Le montage utilisé est constitué d'un ballon métallique contenant 5 l d'eau, posé au-dessus d'une source de chaleur et surmonté d'une enceinte contenant le matériel végétal placé sur une grille (Annexe A). L'enceinte est reliée à son tour à des réfrigérants qui condensent les vapeurs que l'on recueille sous forme de distillat dans une fiole à décanter. Cette phase est séchée sur du sulfate de magnésium. L'échantillon d'huile essentielle obtenu est conservé à -18°C jusqu'à analyse.

La détermination des indices physiques et chimiques de l'huile fraîchement extraite a été réalisée suivant la norme AFNOR.¹⁶⁴

Appareillage utilisé :

- Réfractomètre : Paralux optique de précision 000989.
- Polarimètre :
Modèle D2 (31-01),
Lampe de sodium.



V. TECHNIQUES D'ANALYSE DES HUILES ESSENTIELLES

L'identification des constituants nécessite plusieurs techniques chromatographiques et une ou plusieurs techniques spectroscopiques.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une méthode d'analyse par séparation qui s'applique aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition.¹⁶⁵ La détection, qui est appliquée à la quasi-totalité des molécules organiques, est faite à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme.

La revue publiée par Bartle et Myers¹⁶⁶ rappelle que si la création de la chromatographie gazeuse est attribuée à A.T. James et A.J.P. Martin (1952), le concept théorique avait été énoncé dès 1941 par le même A.J.P. Martin et R.L.M. Synge.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) permet d'opérer la séparation des composés volatils de mélanges très complexes et une analyse quantitative des résultats à partir d'un volume d'injection réduit.¹⁶⁵

Les phases stationnaires peuvent être de plusieurs types.^{167,168}

Pour une identification, à chacun des composés, deux indices de rétention (IR) polaire et apolaire peuvent être obtenus. Ils sont calculés à partir des temps de rétention d'une gamme étalon d'alcane.¹⁶⁹

Toutefois, il est fréquent d'observer des variations (principalement pour la colonne polaire), parfois importantes, lorsque l'on compare les indices de rétention obtenus en laboratoire à ceux trouvés dans la littérature.¹⁷⁰⁻¹⁷⁶

$$IR_x = [100 (TR_x - TR_n) / (TR_{n+1} - TR_n)] + 100 n.$$

TR_n et TR_{n+1} sont respectivement les temps de rétention des alcanes de référence comportant n et $n+1$ atomes de carbone et encadrent le temps de rétention choisi.

C'est pourquoi la comparaison des indices sur deux colonnes de polarités différentes est nécessaire.

Pour la CG-FID :

Appareillage utilisé :

L'analyse des extraits de *Pseudocytisus integrifolius* et *Sinapis arvensis* a été réalisée à l'aide d'un chromatographe Agilent Hewlett-Packard HP 6890N équipé de détecteurs à ionisation de flamme.



- Gaz vecteur : Hélium,
- Température de l'injecteur : 250°C,
- Température des détecteurs : 250°C,
- Débit constant : 1 ml/min,
- Programmation de la température : 60°C à 250°C à raison de 2°C/min puis 250°C pendant 60 min,

Pour *Pseudocytisus* :

* Colonne capillaire apolaire : HP-1 (polydiméthysiloxane, 50 m x 0,2 mm de diamètre interne, épaisseur de la phase stationnaire 0,5 µm),

* Colonne capillaire polaire : Innowax (polyéthylèneglycol, 50 m x 0,2 mm x 0,33 µm)

* Injection automatique : 0,1 µl en Mode Splitless,

Pour *Sinapis* : colonne capillaire apolaire : HP-1 (polydiméthysiloxane, 50 m x 0,2 mm x 0,5 µm)

Injection automatique : 0,4 µl en Mode Split avec ration de split 1/10.

Les indices de rétention IR ont été déterminés par injection d'une série d'alcane linéaires allant de C₅ à C₂₆.

Toutefois, cette analyse ne peut suffire à une bonne identification sans l'apport de la spectrométrie de masse (SM).

Pour la CG/SM :

Le couplage CG/SM en mode impact électronique (SM-IE) est la technique la plus utilisée. Elle permet d'obtenir le spectre de masse de molécules séparées par la CPG et de connaître, dans la grande majorité des cas, la masse moléculaire d'un composé et d'obtenir des informations structurales relatives à une molécule à partir de sa fragmentation.^{177,178}

Les spectres de masse, ainsi obtenus, sont ensuite comparés à ceux des produits de référence contenus dans les bibliothèques informatisées disponibles.

Appareillage utilisé :

Un chromatographe, Hewlett-Packard 5890 série II, muni d'un injecteur automatique couplé à un spectromètre de masse Hewlett-Packard HP 5970 A.



- Gaz vecteur : Hélium,
- Température de l'injecteur : 250 °C,
- Température du détecteur : 250 °C,
- Volume injecté : 0,2 µl,
- Mode splitless,
- Ionisation par impact électronique à 70 eV,
- Gamme de détection des ions : 35-400 amu.

Pour Pseudocytisus : colonne capillaire apolaire HP-1 (50 m x 0,2 mm x 0,5 µm).
 Programmation de la température : 60°C à 200°C à 2°C/min puis 200°C pendant 120 min.

Pour Sinapis : colonne capillaire apolaire HP-1 (50 m x 0,2 mm x 0,5 µm) et colonne capillaire polaire HP-20 M (50 m x 0,2 mm x 0,1 µm).

Programmation de la température : 60°C à 250°C (220°C pour la colonne polaire) : gradient de 2°C/min puis 250°C (200°C) pendant 120 min.

Les structures proposées par la spectrométrie de masse sont par la suite vérifiées par comparaison de leur IR sur colonnes polaires et apolaires avec ceux trouvés dans la littérature.¹⁷⁰⁻¹⁷⁶

Dans le cas où un composé est nouveau ou n'est pas décrit, il est impératif de retourner au schéma classique : la purification chromatographique liquide-solide sur colonne est la technique couramment utilisée en laboratoire. Elle est fondée sur l'adsorption sélective des constituants d'un mélange. La préparation des colonnes est une opération qui nécessite beaucoup de soins, car seul un remplissage correct permettra d'obtenir de bonnes séparations.

Fractionnement de l'huile essentielle de *Pseudocytisus integrifolius* :

Après humidification de 50 g de gel de silice par du pentane, on place au sommet de la colonne 2 g d'huile essentielle. Des éluions successives de 100 ml de solvant chacune ont été effectuées pour conduire à des fractions de polarité croissante.

Numéro de fraction	% Pentane / Ether
1	100 / 0
2	99 / 1
3	95 / 5
4	90 / 10
5	50 / 50
6	0 / 100
7	0 / 100
8	0 / 100



Les fractions ainsi obtenues ont été concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif (à 35°C et à la pression atmosphérique). La concentration ne se fait pas sous vide et n'est jamais conduite à son maximum par crainte de perdre les composés les plus volatils.

La démarche qui aboutit à la détermination structurale de substances isolées passe par l'acquisition de diverses données spectrales. Les spectrométries RMN du ^1H et ^{13}C constituent actuellement les instruments les plus performants dans l'étude structurale. La RMN bidimensionnelle homonucléaire la plus courante est la COSY (Correlation spectroscopy $^1\text{H} - ^1\text{H}$). Elle permet de mettre en évidence les couplages homonucléaires ^2J et ^3J entre protons vicinaux et adjacents à l'aide de taches de corrélation observées.

L'observation des couplages entre carbone et proton, en RMN bidimensionnelle, peut être réalisée par l'utilisation des techniques de détection directe (C/H) ou inverse (H/C). Dans le premier cas, la COSY C-H permet de mettre en évidence le couplage hétéronucléaire carbone-proton ^1J . En détection inverse, la technique HMQC permet de mettre en évidence les couplages hétéronucléaires proton-carbone ^1J , alors que la technique HMBC met en évidence les couplages hétéronucléaires proton-carbone ^2J et ^3J .

L'utilisation judicieuse de ces techniques, quand la quantité du produit isolé est suffisante, permet d'aboutir, sans ambiguïté, aux attributions des carbones et protons présents dans la molécule.

Pour la RMN :

Appareillage utilisé :

Les spectres RMN du proton ^1H et du carbone ^{13}C ont été enregistrés sur un appareil BRUKER AC 200 FT. La RMN bidimensionnelle a été enregistrée à l'aide d'un appareil BRUKER DRX 500. Le solvant deutérié utilisé est le chloroforme. Les déplacements chimiques sont indiqués en ppm. Les spectres ^1H et ^{13}C ont été calibrés en référence au signal du TMS ($\delta = 0$) (tétraméthylsilane ou du CDCl_3 résonnant à 7,26 ppm en proton et 77,16 ppm en ^{13}C).¹⁷⁹

Afin de confirmer la masse du composé inconnu, la spectrométrie de masse haute résolution (SMHR) a été réalisée.



Pour la SMHR :**Appareillage utilisé :**

Chromatographe gazeux Carlo Erba 8000 couplé au spectromètre magnétique Fisons VG Prospec :

- Gaz vecteur : Hélium,
- Débit: 1.5 ml/min,
- Température du détecteur : 300°C,
- Mode split : 1/70,
- Ionisation par impact électronique à 70 eV,
- Gamme de détection de 35 à 400 amu,
- Colonne capillaire apolaire : HP-1 (50 m x 0,32 mm x 0,52 µm),
- Programmation de température de 40°C à 280°C à 4°C/min et 280°C pendant 10 min.

VI. TESTS MICROBIOLOGIQUES

Les huiles essentielles sont connues pour leurs nombreuses et diverses propriétés (antiseptiques, anti-inflammatoires et autres). Elles sont utilisées pour le traitement de nombreuses affections.

Dans cette partie, les recommandations du Comité de Standardisation de l'OMS ont été respectées, en tenant compte des valeurs définies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de la Microbiologie.¹⁸⁰

VI.1. LES SOUCHES TESTEES

Les souches utilisées dans les tests font partie de deux groupes de microorganismes (Tableau 4).

Les souches ont été conservées à +4°C dans des tubes stériles contenant 10 ml de milieux de culture inclinés (gélose nutritive pour les bactéries et PDA acidifié pour les moisissures).

- *Escherichia coli* (*E. coli*) est une espèce commensale du tube digestif de l'homme et des animaux. Elle peut acquérir, dans certains cas, une virulence très grande.
- *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie pathogène ; c'est le germe type des infections hospitalières (nosocomiales).



- *Staphylococcus aureus*, responsable de la formation du pus, cette bactérie est connue sous le nom de bactérie pyogène.¹⁸¹
- Les souches *Aspergillus flavus* et *Alternaria* ont été isolées (et purifiées) à partir de l'orge.
- La souche *Aspergillus niger* a été isolée (et purifiée) à partir du blé dur.
- La souche *Fusarium oxysporum* a été isolée (et purifiée) du palmier dattier atteint du « bayoud », ce champignon pénètre dans les racines du palmier et chemine à travers le système vasculaire du stipe jusqu'à la couronne foliaire. Les folioles d'une palme se replient successivement sur le rachis et blanchissent d'où le nom de bayoud (de abyad : blanc en arabe). L'arbre dégénère et meurt au bout de quelques semaines à plusieurs mois, en fonction des conditions climatiques.

Tableau 4 : Provenance des germes étudiés.

Souches utilisées	Origine
a- Les bactéries : <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Souches pures fournies par l'Institut Pasteur de Paris.
b- Les moisissures : <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Alternaria spp</i>	Souches isolées et purifiées par Monsieur Abdellah MOUSSAOUI Laboratoire des Produits Naturels (Equipe : valorisation des sous produits agro-alimentaire pour la production de la biomasse et des protéines d'organismes unicellulaires et des métabolites actifs). UNIVERSITE DE TLEMCEM

VI.2. CHOIX DES ANTIBIOTIQUES ET DES ANTIFONGIQUES

La sensibilité des souches a été testée vis-à-vis de quelques antibiotiques et d'un seul antifongique, ceci en fonction de leur disponibilité (Tableau 5).



Tableau 5 : Les antibiotiques utilisés

ATB	Sigle	Famille	Charge du disque (µg / disque)	Référence
Ampicilline	Am	β-Lactamines : Pénicilline A ou pénicilline du groupe IV synthétique	10	66126
Pipéracilline	Pip	β-Lactamines	100	67228
Staphylomycine	SA	Macrolide apparenté	15	67546
Amphotéricine B	AmB	Macrolide polyénique	5µl d'une solution à 0,1g/ml	-

La sensibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion ou antibiogramme.

La méthode de dilution en milieu solide, appliquée pour les moisissures, consiste à déposer un disque mycélium, au centre du milieu de culture, additionné d'une concentration connue d'antifongique.

Les boîtes sont incubées à la température de 25°C.

VI.3. MILIEUX DE CULTURE UTILISES

Pour les bactéries :

- Solution de Trypton sel pour la revivification ajustée à pH = 7

Trypton sel	Peptone de caséine tryptique	1g
	Chlorure de Sodium	8,5 g
	Eau distillée	1000 ml

- Mueller Hinton (MH)
- Les milieux spécifiques de chaque germe sont :
 - *Agar EMB pour *E. coli*
 - *Agar au Cétrimide pour *P. aeruginosa*
 - *Agar Chapman pour *St. aureus*

La stérilisation de ces milieux a été réalisée par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

Pour les moisissures :

- Sabouraud Dextrose Agar.



VI.4. METHODES UTILISEES

Pour les bactéries :

C'est la méthode de diffusion sur gélose (méthode des disques).

Elle consiste à déposer, à la surface des milieux gélosés MH en boîte de pétri, préalablementensemencée en surface, des disques de papier filtre de 6 mm de diamètre (Sanofi Diagnostic Pasteur) imbibés de 20 µl d'huile essentielle et des différentes dilutions préalablement préparées à partir d'une solution mère d'huile essentielle et d'éthanol (en pourcentage v/v) ainsi que du pent-4-ènenitrile. Après incubation à $37 \pm 1^\circ\text{C}$, la sensibilité et la résistance de la zone ont été appréciées en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

Pour les moisissures :

Des quantités appropriées d'extrait ont été ajoutées au milieu encore liquide. Un disque mycélien de diamètre 6 mm, pris de la culture du mycète, a été inoculé à chaque boîte de pétri. Le milieu de culture sans extrait a servi de témoin. Les souches ont été incubées à 25°C pendant 7 jours pour l'ensemble des moisissures.

Des mesures de diamètre des colonies ont été faites après la fin de l'incubation. Rappelons que, dans ce cas, aucune dilution n'a été faite. Les extraits ont été pris à 5 µl.

L'action microbienne a été déterminée, par la mesure de l'inhibition de la croissance de la colonie fongique, en utilisant la formule d'Ebbot¹⁸²:

$$T = \frac{D_K - D_o}{D_K} \times 100$$

D_K : diamètre de la colonie mycélienne du témoin (en cm),

D_o : diamètre de la colonie mycélienne dans l'expérience (en cm),

T : taux d'inhibition de la croissance du mycélium en pourcentage.

VI.5. Matériel chimique

L'huile essentielle de *Pseudocytisus integrifolius*,

Le pent-4-ènenitrile,

Le disulfure de diméthyle,

Le trisulfure de diméthyle.



VII. CONSEQUENCES NUTRITIVES

Le potentiel nutritif d'une matrice végétale ne peut être défini que si l'on réalise des dosages des constituants majeurs. L'analyse globale vise à établir les taux en matières azotées (protéines), matières grasses (lipides), éléments glucidiques ou de minéraux totaux (cendres).

Il est important de souligner que dans l'alimentation animale ou humaine, les risques d'action indésirable sont fonction des quantités ingérées des substances. Il est certain que le problème lié aux facteurs antinutritionnels soit extrêmement complexe.

VII.1. Dosage des matières azotées

Le dosage des formes azotées d'un produit agro-alimentaire se fait par méthodes chimiques.

La technique la plus utilisée, à ce jour, est celle de Kjeldhal¹⁸³ (depuis 1883) ; elle reste la technique de base pour ce type d'analyse.

Elle consiste à minéraliser l'échantillon à l'aide de l'acide sulfurique et de catalyseur minéral (cuivre, sélénium), en chauffant jusqu'à disparition de toute coloration, il est indispensable d'ajouter des adjuvants de nature forte, tels que les oxydants, afin d'accélérer l'opération.

La totalité des formes organiques d'azote est convertie en sulfate d'ammonium. L'ammoniaque est déterminée par une technique appropriée (distillateur).

VII.1.1. Dosage de l'azote total

Pratique expérimentale :

a/ Minéralisation :

2 g de matière végétale sont introduits dans un matras de Kjeldhal avec 10 ml d'acide sulfurique concentré et 1 g de catalyseur (15 g de K_2SO_4 , 5 g de $CuSO_4$ et 5 g de Se).

Le chauffage est mené jusqu'à décoloration du liquide. Après refroidissement, le contenu est transvasé et complété jusqu'à 100 ml avec de l'eau distillée.

Minéralisateur utilisé : unité de digestion Büchi K - 435

b/ Distillation : elle consiste en la libération de l'ammoniac par action de la soude qui est retenue dans l'acide sulfurique. Cette distillation est faite dans l'appareil de Parnas-Wagner.



A 10 ml du minéralisat on ajoute 10 ml de soude (10 N) ; le distillat passant dans l'appareil de Parnas-Wagner est recueilli dans 10 ml d'acide sulfurique (0,1 N) en présence de quelques gouttes d'indicateur Tashiro (10 ml de méthyl rouge à 0,03% dans l'éthanol à 70% et 1,5 ml de bleu de méthylène aqueux à 0,1%).

c/ Titration : le recueilli est titré par NaOH à 0,1N jusqu'à obtention de la couleur initiale de l'indicateur. Un essai à blanc est mené sur 10 ml de la solution d'acide sulfurique.

$$\text{Teneur en azote total (N\%)} = \frac{(V_b - V)10^{-4} \times 14 \times 10}{M} \times 100$$

Où V_b : volume de NaOH pour l'essai à blanc

V : volume de NaOH pour la solution à doser

M : masse de la prise d'essai (masse sèche).

Couramment, on multiplie par 6,25 ou par un coefficient spécifique pour l'échantillon, pour obtenir le taux de « protéines brutes ».

Ce mode classique de calcul de la conversion du taux d'azote en protéine est fait par l'estimation de 16g d'azote contenu dans 100g de protéines¹⁸⁴ (16g d'azote x 6,25 = 100g de protéines).

Cependant, ce mode classique de calcul comporte une certaine marge d'inexactitude dans la mesure où le coefficient de multiplication est appliqué à la fraction protidique de l'azote comme aux formes non protidiques (ensemble de formes azotées ne se présentant pas à l'état d'acides aminés inclus dans une structure peptidique et où ces substances offrent généralement peu d'intérêt sur le plan nutritionnel).

VII.1.2. Dosage de l'azote protéique

Le principe consiste à précipiter des protéines pures à l'aide de l'acide trichloracétique et par là même à éliminer l'azote non protéique.

Pratique expérimentale :

On traite 2 g de matériel végétal par 10 ml d'acide trichloracétique à 10%. Le tout est laissé au repos pendant 30 minutes puis filtré. Le résidu est lavé deux à trois fois par 10 ml d'acide trichloracétique puis séché à l'étuve à 50°C.

L'azote protéique est dosé par la méthode de Kjeldhal décrite précédemment.



VII.1.3. Détermination de l'azote non protéique

C'est la différence des teneurs en azote total et azote protéique.

VII.1.4. Dosage des acides aminés individuels

Eléments de base des protéines et des peptides, les acides aminés sont des substances amphotères. Leur dosage se fait par chromatographie échangeuse d'ions.

La méthode de Moore et Stein¹⁸⁵⁻¹⁸⁷ est appliquée : l'échange d'ions est le phénomène par lequel une matrice chargée (colonne), par des groupes qui lui sont liés, fixe de façon réversible des ions de signes contraires apportés par une phase mobile (solution). Ces ions peuvent être échangés avec d'autres ions, de même signe, apportés par cette phase mobile.

L'élution sélective de chacun des acides aminés se fait suivant un gradient de pH et une détection spectrophotométrique après dérivation en sortie de colonne.

La méthode usuelle s'applique à l'ensemble des acides aminés à l'exclusion du tryptophane, détruit lors de l'hydrolyse acide des liaisons peptidiques, et la transformation des amides (glutamine et asparagine) en acides aminés glutamique et aspartique.

Pratique expérimentale :

L'échantillon (200 mg) est soumis à une hydrolyse acide 6N (10 ml) des protéines ; le traitement a lieu à 110°C durant 20 heures. Le précipité est filtré à travers un embout constitué d'une membrane en PVDF (MillexGV, diamètre 0,22 microns, Durapore) destiné à retenir les particules fines. Le filtrat, évaporé à sec, est repris et toutes les dilutions ont été effectuées dans le tampon de reprise à pH 2,2. Après passage sur une colonne échangeuse d'ions (type sulfopropyl avec support de polystyrène réticulé par du divinylbenzène) une coloration post-colonne à la ninhydrine est réalisée. Les acides aminés sont détectés à 570 nanomètres, excepté la proline lue à 440 nanomètres.

Les proportions en chaque acide aminé sont déterminées par comparaison à un aminogramme d'une solution étalon de composition parfaitement déterminée en acides aminés.

Appareillage utilisé :

Analyseur Beckman Coulter (high performance analyzer) system 6300 ; ordinateur et logiciel de Pack 450 de Kontron.



VII.2. Dosage des lipides

Les huiles grasses sont extraites à l'aide d'un solvant organique dans l'appareil de type soxhlet. Après évaporation du solvant, le taux de matière grasse est déterminé, gravimétriquement, selon la méthode indirecte des résidus¹⁸⁸ souvent appliquée dans les plantes et les graines non oléagineuses.

Pratique expérimentale :

L'opération consiste à traiter en même temps trois cartouches poreuses, tarées, dans lesquelles sont mis 2 g de poudre végétale et 150 ml de solvant ; l'extraction se fait à la température d'ébullition du solvant. Le solvant le plus commun est l'hexane, très sélectif vis-à-vis des huiles et graisses.

Les cartouches contenant le résidu sont séchées à l'étuve à 80°C jusqu'à poids constant ($\leq 0,2$ mg). Le taux de matière grasse est le rapport de la masse du résidu sec puisé sur la masse de la matière végétale sèche rapporté à 100.

VII.3. Dosage des glucides

Répondus largement chez les végétaux, les glucides remplissent à la fois des rôles structuraux et métaboliques. Leur dosage se fait par équivalent en glucose (réducteur de référence). Ce dernier, à l'état libre ou combiné, est l'un des composés organiques les plus abondants. Il est l'un des aldohexoses le plus stable thermodynamiquement.

La technique de référence européenne pour la détermination des sucres réducteurs (ou sucres totaux) après inversion est une méthode volumétrique.¹⁸⁹ Les sucres réducteurs réduisent l'ion complexe ferricyanure en ferricyanate, réaction mise à profit par Magedonr Jensen.¹⁹⁰

Le principe consiste à doser les ferricyanures de potassium, qui n'ont pas réagi avec les sucres réducteurs, par une solution de thiosulfate de potassium. A chaque volume de ferricyanure réduit correspond une teneur en glucose.

Pratique expérimentale :

- Extraction : déprotéinisation des glucides :

Selon la teneur estimée en glucides, dans le matériel végétal, on prend entre 5 g (pour les plus riches en sucre) et 10 g (pour les plus pauvres) de poudre végétale que l'on broie dans un mortier en présence de 0,5 g de carbonate de calcium, d'une petite quantité de quartz qui



facilite le broyage et 15 ml d'eau. Le broyat est transvasé dans une fiole de 100 ml que l'on complète avec l'eau distillée jusqu'aux deux tiers.

Les sucres sont extraits au bout de 30 minutes au bain-marie à 80°C. Après refroidissement de la solution, on additionne 10 ml de solution de sulfate de zinc à 4,5% et 6 ml de solution de chlorure de sodium à 2%.

On chauffe, au bain-marie bouillant, pendant 3 minutes afin de précipiter les protéines.

La solution, complétée à 100 ml, est filtrée à froid. Le filtrat est utilisé pour doser les sucres réducteurs.

- Détermination des sucres réducteurs (équivalent en glucose) :

10 ml de solution de $K_3Fe(CN)_6$ à 0,05 N sont mis dans un tube à essai de 25x100 mm.

On additionne un volume V de la solution à analyser (si la solution est concentrée, procéder à sa dilution). Le tube est chauffé, au bain-marie bouillant, pendant 20 minutes.

Après refroidissement, le tout est transvasé dans un erlenmeyer de 100 ml. On additionne 20 g de $ZnSO_4$, 70 g de KCl et 20 ml de CH_3COOH . On laisse reposer et on ajoute 0,5 g de KI et 1 ml de solution d'empois d'amidon à 5%. On laisse reposer pendant 2 minutes.

La solution, ainsi obtenue, est titrée par le thiosulfate de potassium à 0,05 N.

Le titrage est atteint au virage du bleu au blanc.

Un essai à blanc est mené en parallèle dans les mêmes conditions.

La différence, entre les deux volumes de thiosulfates de potassium utilisé pour la solution à analyser et l'essai à blanc, correspond au volume de ferricyanure réduit qui permet d'atteindre la teneur en sucres au moyen de la table d'équivalence établie expérimentalement ci-après :



Tableau 6 : Quantités de sucre correspondant au volume de ferricyanure réduit.

V(ml) \ V(ml)	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
0	-	-	-	-	-	0,72	0,87	1,02	1,18	1,34
1	1,51	1,67	1,83	2,00	2,16	2,31	2,47	2,62	2,78	2,94
2	3,1	3,26	3,42	3,58	3,74	3,90	4,06	4,22	4,38	4,57
3	4,72	4,88	5,04	5,20	5,36	5,52	5,70	5,86	6,03	6,20
4	6,37	6,54	6,71	6,88	7,05	7,22	7,39	7,55	7,72	7,89
5	8,06	8,22	8,39	8,56	8,72	8,89	9,06	9,22	9,39	9,55
6	9,72	9,89	10,06	10,23	10,41	10,58	10,75	10,82	11,10	11,28
7	11,46	11,64	11,82	12,00	12,18	12,36	12,84	12,73	12,91	13,10
8	13,20	13,46	13,63	13,80	13,97	14,14	14,31	14,49	14,66	14,83
9	14,99									

Le résultat est exprimé en équivalent-glucose (G). Sa quantité est exprimée par :

$$G \% = \frac{m \cdot V_i}{V \cdot M} \times 100$$

Où
 m : quantité de sucre en mg prise dans le tableau,
 V_i : volume initial pour l'obtention d'extrait (100 ml pour notre cas),
 V : volume de la prise d'essai pour le dosage,
 M : masse du matériel végétal exprimée en mg,
 100 : pourcentage.

Nous avons utilisé 5 g de matériel végétal (matière sèche).

Aucune dilution de la solution-mère n'a été effectuée.

VII.4. Dosage des éléments minéraux

La recherche des éléments minéraux répond à des préoccupations diverses. Les éléments qui seront dosés font partie d'un système biologique vital pour un organisme animal.

Le phosphore, le calcium, le magnésium, le sodium et le potassium sont des macro-éléments essentiels du milieu intra ou extracellulaire. Le soufre n'est qu'exceptionnellement considéré comme un constituant minéral étant donné qu'il est présent sous forme protéique dans sa quasi-totalité.

Les techniques de dosage des éléments minéraux pour l'aliment de bétail ont été suivies.^{188,191,192}

VII.4.1. Dosage de la matière minérale

Le résidu minéral est obtenu à la suite de la destruction de la matière organique d'un produit. La technique d'incinération sèche est utilisée.

Le principe consiste en une calcination au bec bunsen de l'échantillon (mis au préalable dans un creuset en porcelaine et taré) jusqu'à l'apparition d'une fumée noire ; puis, une incinération dans un four à moufle, à une température de 550°C, jusqu'à ce que les résidus deviennent blancs.

La teneur en cendres est le rapport entre la masse du résidu, après incinération, et la masse de la matière végétale sèche rapportée à 100.

La solution minérale est préparée à partir de 1 g de matière végétale calcinée dans 10 ml d'acide chlorhydrique à 25%. Bien mélanger, transvaser dans un ballon de 250 ml. Rincer le creuset à l'eau distillée bouillante. Ajuster au trait de jauge, laisser reposer (10 min) puis filtrer.

VII.4.1. Dosage du phosphore

Le phosphore joue un rôle fondamental dans le métabolisme. Intervenant dans toutes les grandes fonctions, il entre en combinaison avec de nombreux métabolites pour donner des dérivés phosphorylés.

Son dosage repose sur la méthode photolorimétrique au réactif sulfomolybdique. La densité optique de la solution formée (de couleur bleue) est mesurée par spectrophotométrie à 650 nm.

Pratique expérimentale :

Mettre 5 ml de la solution minérale obtenue, dans un bécher de 100 ml, compléter au quart du volume à l'eau distillée.

Agiter puis ajouter 2,5 ml de réactif sulfomolybdique (à 25 g de molybdate d'ammonium ajouter 125 ml d'eau distillée, dissoudre, tiédir éventuellement, laisser refroidir, ajouter 125 ml d'eau distillée et 75 ml d'acide sulfurique concentré) mélanger, ajouter 7 gouttes d'une solution de chlorure d'étain (à 1%), mélanger, ajuster à 100 ml avec l'eau distillée et laisser reposer 10 minutes (la couleur devient bleue).



Mesurer la densité optique de la solution à 620 nm.

La concentration en phosphore de la prise d'essai est réalisée en se référant à la courbe d'étalonnage établie comme suit :

- Préparer la solution de dihydrogénophosphate de potassium KH_2PO_4 (0,439 g dans 100 ml d'eau distillée). Un millilitre de cette solution étalon comporte 0,005 mg de phosphore.
- Préparer 6 solutions de 1, 2, 8, 14, 20 et 26 ml de solutions étalons en leur ajoutant de l'eau distillée jusqu'au 1/4 du volume. Dans chaque fiole, ajouter 2,5 ml de réactif sulfomolybdique, mélanger, ajouter 7 gouttes de chlorure d'étain et ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml. Mesurer les densités optiques des six solutions.

La concentration C en phosphore est établie suivant :

$$C_{\text{phosphore}} = \frac{50 \times C_x}{m} \text{ (en g/kg d'échantillon)}$$

Avec C_x : concentration en phosphore en mg/ml déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

m : masse de la prise d'essai (matière sèche)

50 : Coefficient numérique.

Appareillage utilisé :

Spectrophotomètre UV/Visible SECOMAM modèle S750 SARCELLES (France).

VII.4.2. Dosage du calcium

Le dosage du calcium repose sur son insolubilisation par l'oxalate d'ammonium sous forme d'oxalate de calcium (peu soluble en milieu faiblement acide). L'acide oxalique formé est titré par une solution de permanganate de potassium.

Partie expérimentale :

Prendre un certain volume de la solution minérale, l'introduire dans une fiole de 250 ml, ajouter 1 ml d'acide acétique (ou citrique) (à 30%) et 5 ml de solution de chlorure d'ammonium (à 5%) et compléter le volume à 100 ml avec de l'eau distillée. Porter à ébullition, ajouter 8 à 10 gouttes de solution de rouge de méthyle (à 0,04%) (ou vert de bromocrésol) et 30 ml de solution chaude d'oxalate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ (solution saturée à froid). Si un précipité apparaît, dissoudre celui-ci par addition de quelques gouttes d'acide chlorhydrique.

Neutraliser ensuite, très lentement, à l'ammoniac, en agitant constamment jusqu'au virage de l'indicateur. Placer le bécher dans un bain d'eau bouillante, maintenir durant 30 minutes (laisser déposer le précipité formé). Retirer le bécher du bain d'eau, laisser reposer une heure et filtrer.

Laver le bécher et le creuset à l'eau jusqu'à l'élimination de l'excès d'oxalate d'ammonium.

Dissoudre le précipité (sur filtre) dans 50 ml d'acide sulfurique. Rincer le creuset à l'eau chaude et ajuster le filtrat à 100 ml avec l'eau distillée.

Amener la température à 70-80°C et titrer, goutte à goutte, par la solution de permanganate de potassium à 0,1 N jusqu'à obtention d'une coloration rose pendant 1 minute.

A chaque millilitre de permanganate de potassium à 0,1 N correspondent 2,004 mg de calcium.

$$\% \text{ Ca} = V_{\text{ml}} (\text{KMnO}_4 \text{ 0,1N}) \times 2,004 \times F$$

$$F = \frac{V}{V'} \times \frac{100}{m}$$

où V : volume total du filtrat (solution minérale),
 V' : quantité prise du filtrat pour doser la solution,
 m : masse en mg de la prise d'essai (matière sèche).
 F : coefficient de concentration dans la solution finale.

VII.4.3. Dosage du magnésium

Son dosage consiste en la précipitation du magnésium dans un milieu alcalin selon la réaction ci-après :



Le précipité est dissout dans de l'acide sulfurique avec une concentration connue et, d'après la quantité de l'acide sulfurique en excès, on détermine le magnésium.

Pratique expérimentale :

Le filtrat utilisé pour la détermination du calcium est repris pour le dosage du magnésium.

Ce filtrat est concentré à 70 ml puis neutralisé avec 10 ml d'ammoniaque en présence du méthyle rouge (coloration jaune). On acidifie avec du HCl 10% (coloration jaune-rose).

On ajoute à cette solution 5 à 10 ml de solution Na_2HPO_4 (à 10%) ; on chauffe jusqu'à 90°C , puis on ajoute quelques gouttes d'ammoniaque à 2,5% pour précipiter le magnésium. On ajoute à la solution 10 ml d'ammoniaque à 2,5% et on laisse reposer 12 à 15 heures (ou même 20 heures).

Le dépôt formé est filtré puis lavé, avec de l'ammoniaque, puis récupéré dans une fiole de 200 ml, on lui ajoute un volume d'acide sulfurique à 0,1 N (20 à 25 ml).

L'excès d'acide sulfurique est titré avec le NaOH à 0,1 N en présence d'indicateur méthyle rouge jusqu'au changement de la couleur au jaune.

$$\% \text{Mg} = \frac{(V - V_x) \times 0,00202}{m} \times 100$$

Où V : volume en ml de H_2SO_4 à 0,1N (20 à 25 ml),

V_x : volume en ml de NaOH à 0,1N,

m : masse en g de la prise d'essai,

VII.4.4. Dosage du sodium et du potassium

Le dosage de la solution minérale se fait par photométrie à flamme.

Le principe est basé sur la nébulisation d'un échantillon à travers une flamme, ce qui entraîne une excitation des atomes et provoque le passage des électrons d'une couche (ou sous-couche) à une sous-couche immédiatement supérieure. L'électron, en revenant à son niveau d'énergie, restitue cette énergie sous forme de photon. Les photons émis par les atomes donnent un flux de lumière qui passe au travers d'un filtre interférentiel et qui est ensuite mesuré par une cellule.

L'échantillon doit se présenter sous forme d'un aérosol de façon à ce que le solvant s'évapore instantanément dans la flamme.

L'arrivée d'un air comprimé au moyen d'un capillaire relié à l'échantillon crée une dépression au bout du capillaire et permet l'aspiration de la solution à doser.

Un ensemble électronique permet d'intégrer l'énergie reçue par la cellule.

Appareillage utilisé :

Nom de l'appareil : HYCEL *Phf 106* groupe Lisabio Deltalab,

Brûleur en acier inoxydable,

Flamme : au gaz butane,



Calibrage à l'eau distillée puis par la solution étalon Zéro Lithium (Standard PASS'IONS).

VIII. CONCLUSION

Les produits naturels présentent un grand intérêt comme matière première pour plusieurs activités de différents secteurs.

L'analyse des huiles essentielles reste une étape importante qui, malgré les progrès constants des différentes techniques de séparation et d'identification, demeure toujours une opération délicate.

L'établissement global de la composition ne constitue qu'une étape préliminaire, suivie obligatoirement d'un ensemble de données mesurant l'efficacité nutritionnelle des différents composants.



CHAPITRE III

Résultats et discussion



I. TESTS PHYTOCHIMIQUES

I.1. INTRODUCTION

Lors de l'étude des plantes, les informations obtenues par la détermination de leurs constituants chimiques et/ou de leur activité biologique, pourront servir, non seulement pour la mise au point d'agents thérapeutiques, mais aussi parce qu'elles peuvent être à l'origine de nouvelles sources de matériaux économiques.

De nos jours, la découverte des ressources naturelles du monde végétal reste capitale dans et pour la fabrication de ces produits.

La méthode de détection consiste en une précipitation ou une coloration par des réactifs spécifiques. En effet, ces réactions se traduisent par l'apparition d'une turbidité, d'une floculation ou d'un changement de couleur qui nous renseignent sur la nature des familles existantes.

I.2. RESULTATS DES TESTS

Les tests phytochimiques (réalisés sur les tiges et les feuilles de *Pseudocytisus integrifolius* et les feuilles de *Sinapis arvensis*) ont permis de détecter les différentes familles de composés par des réactions qualitatives de caractérisation.

Cette dernière présente quatre possibilités :

- (+) : est enregistré si le réactif présente une légère opacité (présence en faible quantité).
- (++) : est enregistré si le réactif produit une turbidité et non une floculation (présence en quantité moyenne).
- (+++): est enregistré si le réactif produit une floculation ou un précipité lourd (présence en forte quantité)
- (-) : absence de turbidité et de floculation.

L'analyse a révélé que les alcaloïdes, les anthocyanosides, les émodols et les anthraquinones sont des classes de familles chimiques totalement absentes dans les parties des plantes étudiées. D'autres classes y sont présentes en faibles quantités, à savoir les saponosides, les huiles volatiles et les tanins. Les coumarines sont une classe de familles présente dans *Pseudocytisus* mais absente dans l'autre espèce.

Les composés réducteurs et les acides gras, présents en quantité moyenne, ont été caractérisés dans les feuilles des deux plantes.



Nous nous sommes intéressés particulièrement à l'extraction sélective des huiles essentielles, des sucres réducteurs et des lipides.

Tableau 7 : Résultats des tests phytochimiques.

Espèce étudiée	<i>Pseudocytisus integrifolius</i>		<i>Sinapis arvensis</i>
	Tiges	Feuilles	Feuilles
Partie de la plante étudiée			
Familles chimiques			
Flavonoïdes	-	-	++
Tanins	+	++	+
Stérols et stéroïdes	-	-	+
Alcaloïdes	-	-	-
Anthracénosides	-	+	-
Anthocyanosides	-	-	-
Amidon	+	-	++
Emodols	-	-	-
Anthraquinones	-	-	-
Composés réducteurs	-	++	++
Huiles volatiles	+	+	+
Saponosides	+	+	+
Acides gras	+	++	++
Coumarines	+	+	-

I.3. CONCLUSION

Bien que les deux plantes semblent peu riches en familles chimiques, ces tests ont néanmoins permis de caractériser la présence ou l'absence de celles-ci.

II. EXTRACTION SELECTIVE DES HUILES ESSENTIELLES

II.1. INTRODUCTION

Une des étapes importantes dans l'étude, quantitative et qualitative des composés volatils (HE), est la préparation de l'échantillon. Parmi les paramètres et techniques d'extraction, nous avons utilisé l'entraînement à la vapeur d'eau qui est basé, entre autres, sur les lois de l'azéotropie (une substance insoluble peut donc être distillée en faisant passer de la vapeur d'eau au travers de la matière végétale).

II.2. INFLUENCE DE CERTAINS PARAMETRES SUR LE RENDEMENT

II.2.1. Teneur en eau

La richesse en eau des différentes parties d'une plante entraîne deux conséquences : d'une part, elle permet d'utiliser au maximum ses composés chimiques qui se trouvent à l'état soluble (son action solvante favorise les réactions enzymatiques et les attaques microbiennes) et, d'autre part, elle ne leur permet pas d'être stockés (cas des légumes). Pour cela, ils doivent être transformés et conservés dans les plus brefs délais.

Les résultats sont représentés dans le tableau ci-après :

Tableau 8 : Teneurs en eau des différentes parties de la plante (exprimées en g pour 100 g de matière fraîche).

Espèce étudiée	<i>Pseudocytisus integrifolius</i>				<i>Sinapis arvensis</i>
	Mars	Avril	Mai	Octobre	Mars
Mois de prélèvement					
Partie de la plante étudiée					
Feuilles	80	50	42,5	73,23	74,6
Fleurs	78	55	-	-	81
Tiges	66,5	45	25	34,5	77,6
Graines	-	-	24,5	-	-

Les teneurs en eau pour *Pseudocytisus integrifolius* varient d'un mois à un autre. Ces teneurs sont élevées en période de pleine floraison. Pour la même période, les fleurs et les tiges de *Sinapis arvensis* sont plus riches en eau que celles de *Pseudocytisus integrifolius*.

La teneur en eau varie en fonction de la période de récolte et des conditions climatiques.

II.2.2. Teneur en huile essentielle

a- Caractères organoleptiques

La détermination des caractères organoleptiques (Tableau 9) ne donne qu'une idée fluctuante et fragmentaire d'une huile essentielle.



Tableau 9 : Caractéristiques organoleptiques des huiles essentielles de *Pseudocytisus integrifolius* et *Sinapis arvensis*.

Espèce étudiée	<i>Pseudocytisus integrifolius</i>			<i>Sinapis arvensis</i>
	Partie aérienne	Fleurs	Feuilles	Partie supérieure de la plante
Aspect	Liquide limpide	Liquide limpide	Liquide limpide	Liquide limpide
Couleur	Jaune	Jaune	Jaune	Jaune
Odeur	Caractéristique soufrée très intense rappelant celle du chou-fleur cuit (attire les mouches)	Caractéristique soufrée moins intense (attire les mouches)	Caractéristique soufrée moins intense (attire les mouches)	Caractéristique moins intense
Saveur	Chaude, Légèrement anesthésiante	Chaude	-	-

b- Influence de la durée de séchage

Le matériel végétal utilisé est la partie aérienne de la plante *Pseudocytisus integrifolius*. Celle-ci donne des traces d'huile essentielle pour un échantillon frais (Tableau 10 et Figure 31). En effet, ceci peut être expliqué par la forte teneur en eau. Le rendement (0,005 % au bout de cinq jours de séchage) atteint, au bout de huit jours, 0,034 % (maximum d'huile essentielle) correspondant à 29 % en eau (soit 71 % de matière sèche), puis diminue jusqu'à 0,004 % au bout de 12 jours de séchage.

Cette diminution est certainement due à l'évaporation de certains composés volatils pendant cette longue durée de séchage.

La période optimum de séchage est de 8 jours.

Tableau 10 : Variation du rendement (en %) de l'huile essentielle de *Pseudocytisus integrifolius* en fonction de la teneur en eau et de la durée de séchage.

Jours de séchage	1 Fraîchement récoltée	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
% en H ₂ O	74,8	50	40,2	37	33,8	33,5	33,1	29	27,5	27	26,3	25,8
% de matière sèche	25,2	50	59,8	63	66,2	66,5	66,9	71	72,5	73	73,5	74,2
Rendement en HE*	tr** incolore	tr** incolore	tr** incolore	tr** jaune	0,005	0,016	0,029	0,034	0,026	0,014	0,005	0,004

*: Extraction de 2000g de la partie aérienne

** : rendement non quantifié

tr : traces.

CHAPITRE III

Résultats et discussion



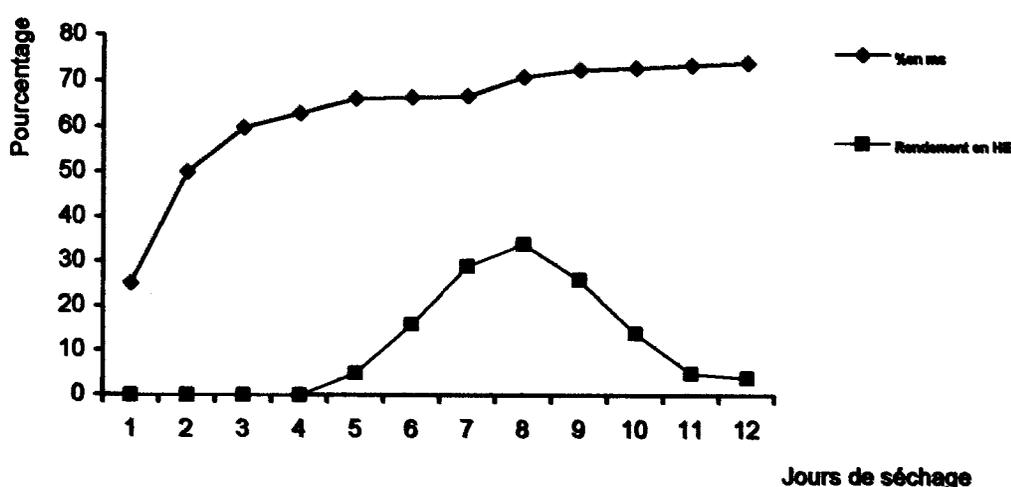


Figure 31 : Rendement en huile essentielle ($\times 10^{-3}$) en fonction de la teneur en eau pendant les 12 jours de séchage.

c- Influence de la durée d'extraction

Afin de vérifier la durée optimum d'extraction, nous avons procédé à la détermination du rendement toutes les trente minutes pendant 6 heures.

Les résultats (Tableau 11) montrent que 41,5 % du rendement total en huile essentielle sont extraits au bout de 90 minutes. Durant les trente minutes suivantes, environ 20,4 % sont encore extraits. Puis 26,5 % au bout des troisième et quatrième heures.

Nous optons ainsi pour une durée d'extraction minimum de 4 heures.

Tableau 11 : Rendement (en %) de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Pseudocytisus integrifolius* en fonction de la durée d'extraction.

Temps en minute	30	60	90	120	180	240	300	360
Rendement en HE	0,00175	0,00245	0,00995	0,00695	0,00515	0,0039	0,0021	0,00185

d- Influence du niveau de coupe

Trois coupes ont été faites à 25 %, 50 % et 75 % de la longueur de l'arbrisseau *Pseudocytisus integrifolius* à partir du sommet.

Les résultats (Tableau 12) montrent que la teneur en huile essentielle par rapport à la matière sèche est maximale quand la coupe est effectuée à 25 % et minimale pour une coupe à 75 %.

Tableau 12 : Rendement (en %) de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Pseudocytisus integrifolius* en fonction du niveau de coupe.

Coupe	25 %	50 %	75 %
Rendement en huile essentielle	0,0495	0,023	0,0145

L'ensemble des résultats fait ressortir l'importance à accorder à certains facteurs (les méthodes de récolte, de séchage et de distillation de la partie de la plante utilisée).

Le tableau ci-après donne un récapitulatif des résultats obtenus pour les deux plantes.

Tableau 13 : Rendement (en %) de l'huile essentielle en fonction de la partie étudiée.

Espèce étudiée	<i>Pseudocytisus integrifolius</i>			<i>Sinapis arvensis</i>
	Partie aérienne	Fleurs	Feuilles	Partie aérienne supérieure
Rendement en huile essentielle	0,0145 - 0,0495	0,023	.*	.*

.* : rendement non quantifié (huile essentielle récupérée au solvant chloroforme).

e- Indices physico-chimiques

En vue de caractériser l'huile essentielle de la partie aérienne de *Pseudocytisus integrifolius*, la détermination de quelques paramètres physico-chimiques s'impose.

Les résultats obtenus sont représentés dans le Tableau 14.

La valeur du pouvoir rotatoire nous a permis de déduire que l'huile essentielle de *Pseudocytisus integrifolius* est dextrogyre.

L'indice d'iode est lié au caractère insaturé d'une huile. Plus cet indice est élevé, plus l'huile présente un degré important d'insaturation¹⁹³ et s'expose donc facilement aux altérations.

La température de congélation de l'huile essentielle de *Pseudocytisus integrifolius* est inférieure à -18 °C, ce qui nous permet de déduire que certaines modifications chimiques dues à un effet de température ou de conservation peuvent avoir lieu. Il serait donc important de procéder à la détermination de la composition chimique pour l'huile fraîchement extraite.

Tableau 14 : Caractères physiques et chimiques de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Pseudocytisus integrifolius*.

Caractéristiques (Pour l'huile fraîchement extraite)	
Densité d_{20}^{20}	0,9920
Indice de réfraction n_D^{20}	1,6980
Pouvoir rotatoire α_D^t (à 22,8°C)	+ 0,125°
Pouvoir rotatoire spécifique apparent $[\alpha]$ (à 22,8°C)	+ 4,8°
Miscibilité à l'éthanol à 95 %	1 : 1 (V/V)
Point de congélation	< - 18°C
Indice d'acide	1,12
Indice d'ester	4,49
Indice d'iode	209,38
Indice de peroxyde	3600 $\mu\text{g O}_2/\text{g}$ (ou 0,9 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3/\text{g}$)

II.3. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *Pseudocytisus integrifolius*

La composition chimique des huiles essentielles varie quantitativement en fonction de la partie de la plante (partie aérienne, fleurs et feuilles)

Le profil chromatographique de l'huile essentielle de la partie aérienne ainsi que celui obtenu pour les différents niveaux de coupe (25 %, 50 % et 75 %) de l'arbrisseau est le même (Figures 32 et 33). Ce chromatogramme est caractérisé par la présence de trois composés majoritaires : les di- et trisulfure de diméthyle et un composé inconnu.

L'identification par spectrométrie de masse, des constituants, est assez délicate en raison du phénomène de coélution du disulfure de diméthyle avec un composé inconnu (qui n'a été identifié ni par son spectre de masse ni par ses indices de rétention).



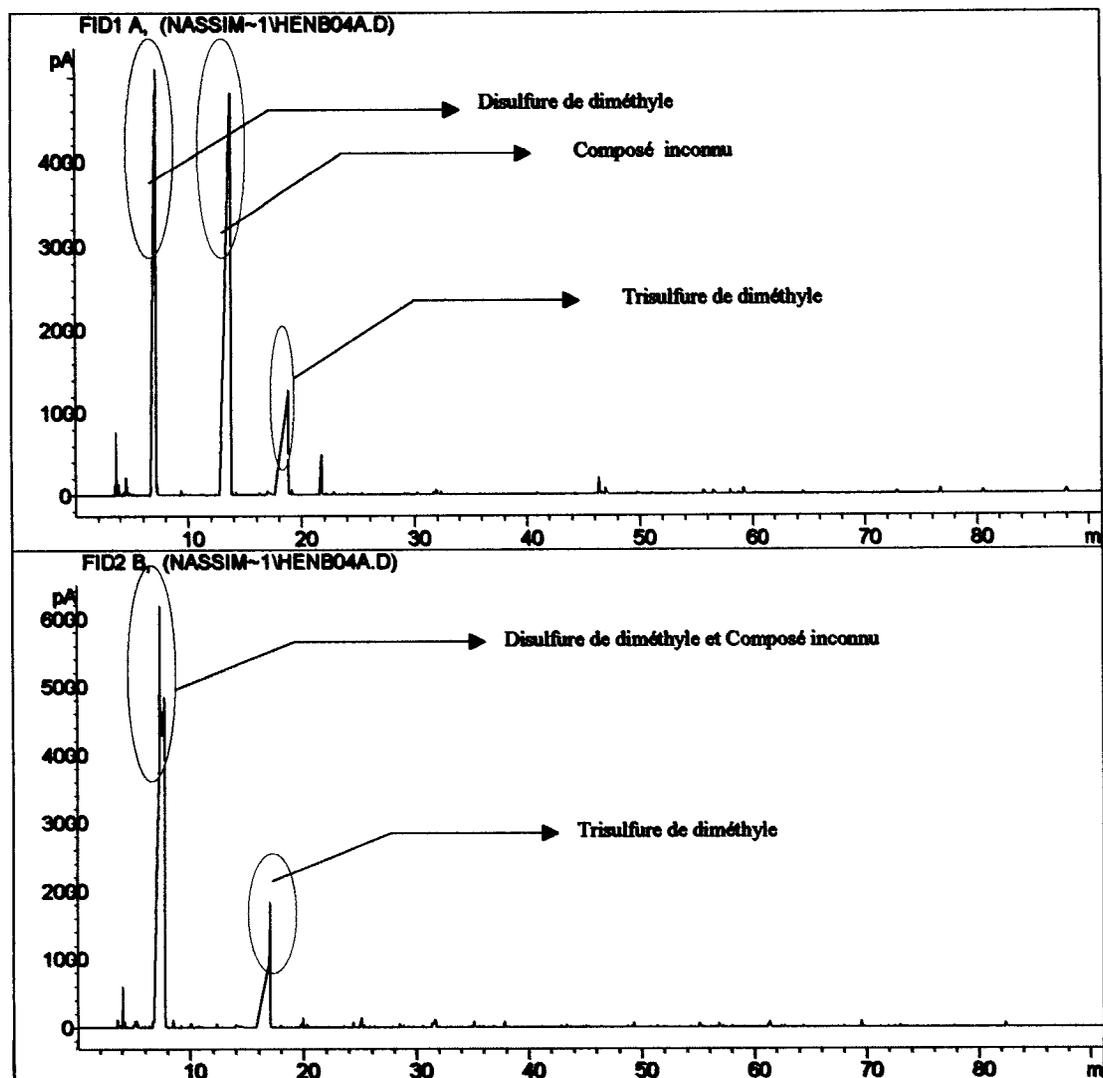


Figure 32 : Chromatogramme en CG-FID polaire, apolaire de *Pseudocytisus integrifolius*.

Abundance

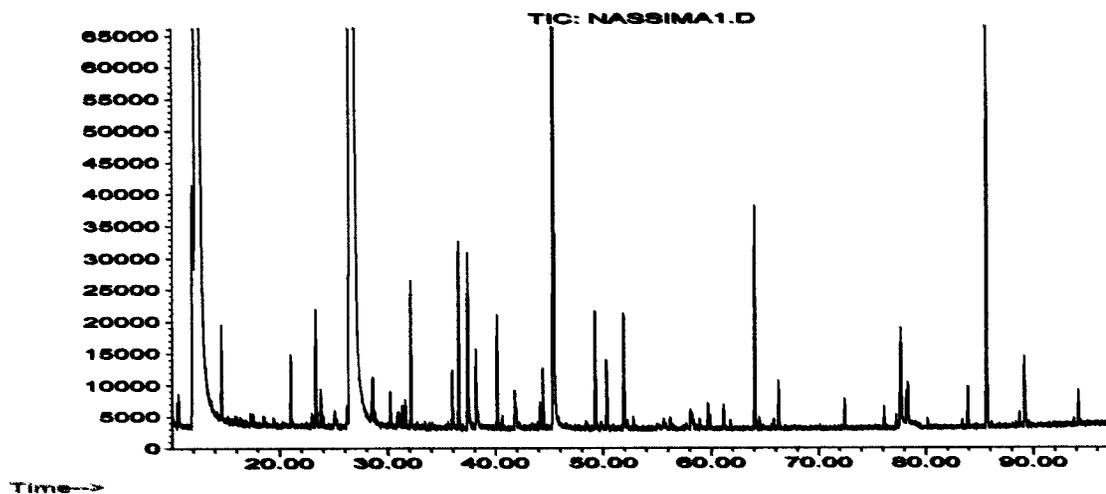


Figure 33 : Chromatogramme en CG/SM de *Pseudocytisus integrifolius*.



Un fractionnement de l'huile essentielle de *Pseudocytisus integrifolius* s'est imposé. Huit fractions ont été obtenues. La polarité de l'éluant est augmentée par ajout croissant d'éther diéthylique. L'analyse est réalisée par CG-SM.

F₁ : fraction obtenue au pentane pur, contient les sulfures (di-, tri- et tétra-) ainsi que les alcanes et plusieurs composés hydrocarbonés.

F₂, F₃ et F₄ : les fractions obtenues (respectivement 99/1, 95/5 et 90/10) sont semblables à la première fraction.

F₅ : obtenue avec 50/50, contient essentiellement les sulfures résiduels, des cétones, des aldéhydes, des terpénoïdes et l'isothiocyanate de but-3-èneyle.

F₆, F₇ et F₈ : dans ces fractions (éther pur), le composé inconnu et les nitriles sont majoritaires

a- Identification du composé inconnu

Afin de déterminer la structure du composé inconnu, une purification supplémentaire de la dernière fraction (100 % éther) sur colonne, en utilisant le gel de silice, a permis de l'isoler avec une grande pureté (avec un gradient d'éluant éther/pentane 99/1).

La caractérisation spectrale du composé liquide jaune de $R_f = 0,675$. (Figures 34, 35, 36 et 37 ; annexe B) a permis d'attribuer la structure du pent-4-énitrile au composé inconnu.



RMN ¹H : (δ en ppm) : 2,38 [m,2H, H (3)] ; 2,42 [m,2H, H (2)] ;

5,15 [dm,1H, H (5 cis) , J = 10,2 HZ] ;

5,18 [dm,1H, H (5 trans) , J = 17,1 HZ] ;

5,82 [ddt,1H, H (4) , J = 17,1 ;10,2 et 6,5 HZ].

RMN ¹³C : (δ en ppm) : C₁:119,18 C₂:16,86

C₃:29,25 C₄:134,17 C₅:117,57.



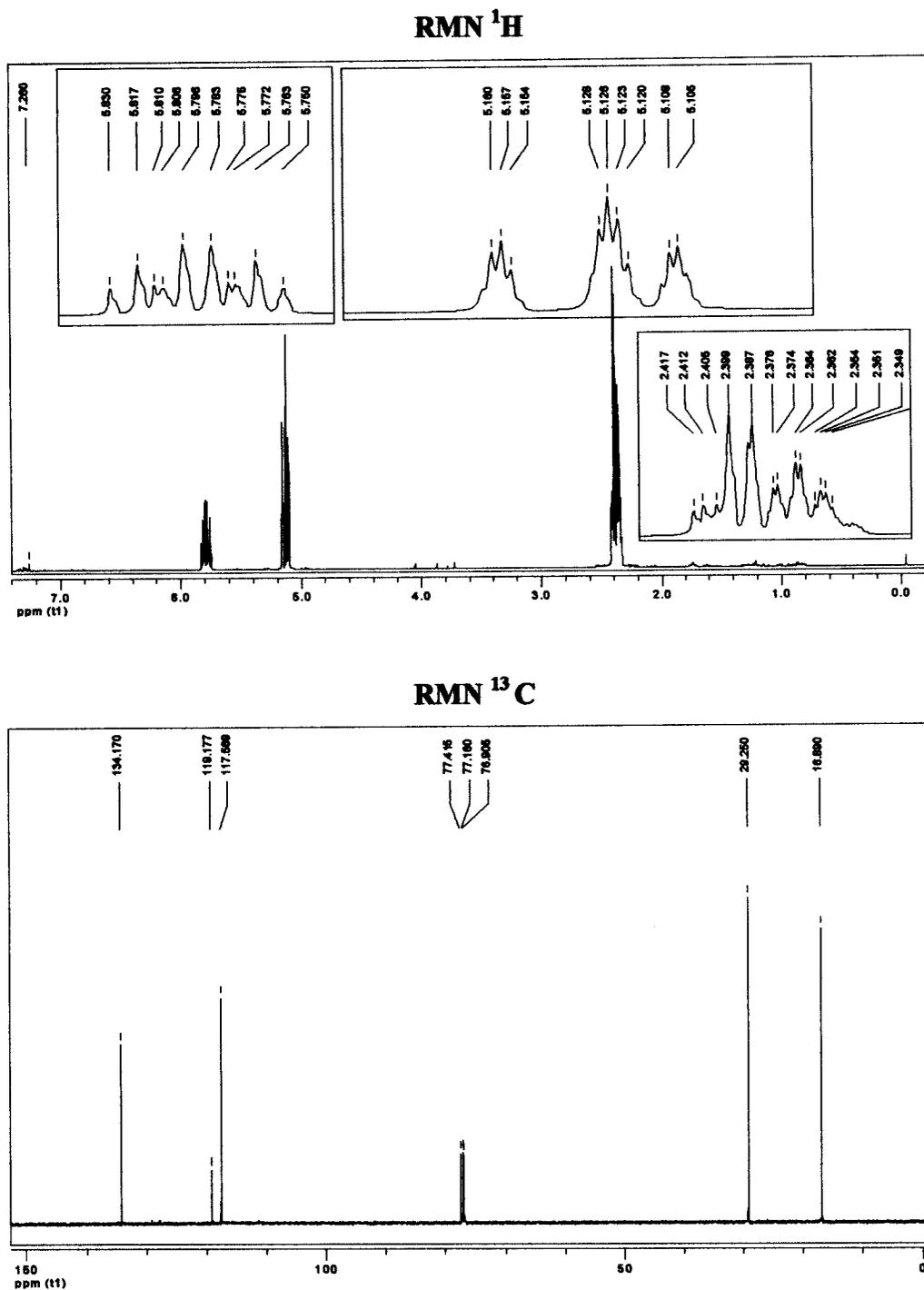


Figure 34 : Spectres RMN du proton et du carbone du composé inconnu.

Par ailleurs, la spectrométrie de masse haute résolution a permis de déterminer la formule brute C_5H_7N et l'analyse chromatographique en phase gazeuse a permis de confirmer la structure du composé.



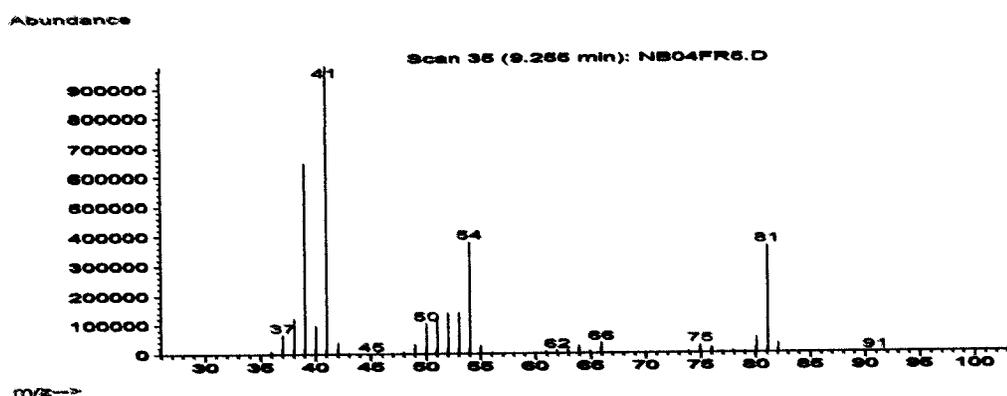
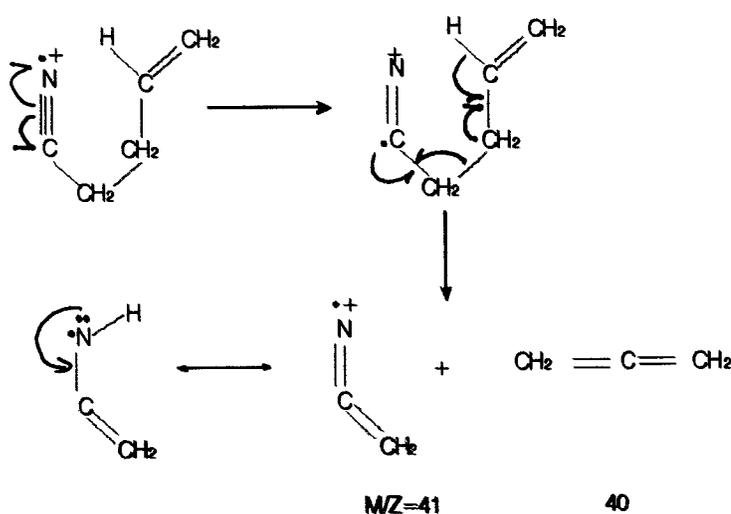


Figure 37 : Spectre de masse sur colonne apolaire du pent-4-ènenitrile.

Le spectre en IE confirme la structure. En effet, on retrouve les fragments du squelette pent-4-ènenitrile et l'ion moléculaire $C_5H_7N^{+} = 81$. Le pic de base intense $C_2H_3N^{+} m/z = 41$ est caractéristique des nitriles aliphatiques (obtenus par réarrangement de Mc Lafferty).



Ce composé nitrile a déjà été identifié dans certaines crucifères.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶

La composition chimique de l'huile essentielle des différentes parties de *Pseudocytisus integrifolius* est donnée dans le Tableau 15 et est répartie dans des familles chimiques différentes (Tableau 16).

Cette étude a permis d'identifier 83 composés représentant 96,5 % de l'huile essentielle de la partie aérienne, 75 composés pour les fleurs (97,8 %) et 39 composés pour les feuilles (97,7 %).

Tableau 15 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Pseudocytisus integrifolius*.

Composés ^a	IR ^b		Huile essentielle (% ± D.S.) ^c		
	Apolaire	Polaire	Partie arienne	Fleurs	Feuilles
Sulfure de diméthyle*	505	746	0,2	tr	-
3-méthylbutanal*	640	916	0,2	tr	-
But-2(E)-ènenitrile [#]	637	1157	tr	-	-
Disulfure de diméthyle*	731	1095	33,4 ± 0,6	40,9 ± 2,4	23,8 ± 0,1
Pent-4-ènenitrile ^d	731	1275	31,7 ± 0,4	3,6 ± 1,0	9,9 ± 0,1
Pent-2-ènenitrile [#]	755	-	tr	-	0,8
Hexanal*	776	1098	0,2	tr	0,1
Octane* [#]	801	800	tr	-	-
3-méthylbutanenitrile [#]	809	1196	tr	-	-
Hex-2(E)-ènal* [#]	825	1216	0,1	tr	-
Hexanenitrile* [#]	850	1303	tr	-	0,1
2,4-dithiapentane [#]	862	1300	tr	tr	-
Heptan-2-one* [#]	868	1165	tr	-	-
Heptanal*	880	1184	0,1	0,1	0,1
Nonane*	901	898	tr	-	-
5-méthylhexanenitrile	917	1350	0,4 ± 0,1	0,3	0,4
α-thujène	922	1020	-	tr	-
Hept-2(E)-ènal*	931	1280	tr	-	-
Benzaldéhyde* [#]	944	1518	tr	-	-
α-pinène* [#]	932	1010	tr	0,1	-
Heptanenitrile* [#]	945	1396	tr	-	-
ITC de but-3-ènyle [#]	959	1489	tr	-	-
6-méthylhept-5-èn-2-one	962	1347	tr	-	-
Octan-2-one [#]	965	1275	tr	-	-
Trisulfure de diméthyle*	957	1380	24,2 ± 0,1	24,8 ± 0,1	35,4 ± 0,3
Sabinène*	968	1120	-	tr	-
β-pinène* [#]	970	1096	tr	tr	-
Sulfure de furfuryle et de méthyle [#]	975	1425	tr	-	-
2-pentylfurane	981	1216	0,1	tr	0,1
Octanal*	983	1263	0,1	tr	tr
Myrcène*	984	1140	tr	tr	-
Δ-3-carène*	1003	1129	tr	tr	-
α-terpinène*	1011	1171	-	tr	-
Phénylacétaldéhyde*	1013	1626	tr	-	-
β-phèllandrène*	1014	1161	tr	tr	-

Chapitre III : Résultats et discussion

<i>p</i> -cymène*	1016	1250	0,1	5,0 ± 0,1	1,8
2,2,6-triméthylcyclohexanone	1017	1310	-	0,2	-
Limonène*	1025	1195	0,2 ± 0,1	0,1	tr
1,8-cinéole* [#]	1027	1220	tr	0,1	tr
Oct-2(E)-énal*	1033	1429	tr	tr	-
Acétophénone* [#]	1035	1552	tr	-	-
<i>p</i> -méthylbenzaldéhyde	1042	1605	tr	-	-
γ-terpinène*	1050	1235	-	0,1	-
Octanol*	1051	1294	tr	-	-
Nonan-2-one	1070	1393	0,1	0,2	-
Dihydro <i>p</i> -cymène	1074	-	-	0,1	-
Fenchone	1075	1410	tr	-	-
Nonanal*	1083	1393	0,3	0,1	1,2
Phénylacétonitrile*	1095	1896	0,5	0,4	0,2
2,3,5-trithiahexane	1097	1632	tr	0,2	-
Undécane [#]	1099	1106	0,1	-	-
Nona-2(E),6(Z)-diénal [#]	1127	1587	0,2	-	-
Camphre*	1130	1520	tr	0,2	-
Non-2(E)-énal	1135	1540	tr	-	-
4-méthyl-2,3,5-trithiahexane	1144	-	tr	0,4	0,1
Acétate de <i>p</i> -crésyle*	1146	1684	0,1 ± 0,1	-	-
2-méthoxy-3(1-méthylpropyl)pyrazine	1155	-	tr	-	-
Bornéol*	1150	1723	-	0,2	-
Cryptone	1156	1659	tr	0,6	-
Terpinèn-4-ol*	1163	1581	-	0,3	-
Décan-2-one	1172	1491	tr	-	-
Safranal	1175	1614	0,1	0,1	0,5
Décanal	1186	1490	0,3	tr	tr
Tétrasulfure de diméthyle	1190	1438	0,7	0,1 ± 0,1	4,4
β-cyclocitral*	1203	1600	tr	tr	0,3
Cuminaldéhyde	1213	1753	-	0,5	-
Déc-2(E)-énal	1238	1628	tr	-	-
<i>Inconnu I</i>	1244	-	tr	1,0	0,7
2-phénylbut-2-énal	1240	1896	0,3	tr	1,2
Phéllandral	1251	1720	-	0,9	-
Indole*	1256	2489	0,3	0,1	-
<i>trans</i> -anéthole	1264	1798	0,2	tr	-
Thymol*	1270	2162	-	0,6	-
Undécán-2-one [#]	1272	1590	0,3	tr	-

Chapitre III : Résultats et discussion



Carvacrol	1278	2190	-	0,1	-
Undécanal [#]	1274	-	tr	-	-
4-vinylguaïacol	1286	2170	tr	0,3	-
Déca-2(E),4(E)-diène	1290	1792	tr	tr	-
Tridécano	1297	1290	tr	-	-
Acétate d' α -terpinyle	1332	1672	-	0,2	-
Undéc-2(E)-ène [#]	1340	1740	tr	tr	0,5
<i>trans</i> - β -damascénone	1361	1797	0,1	0,1	0,5
α -copaène	1375	1470	0,1	0,1	1,5
Tétradécane	1397	1405	0,1	tr	1,0
α -ionone [#]	1402	1805	tr	0,1	-
Géranyl acétone	1428	1850	0,1	tr	0,5
β -ionone	1469	1907	0,4	0,3	1,4
Tridécan-2-one [#]	1474	1786	0,1	-	0,5
Tétradécanal	1489	1932	0,1	tr	0,3
Pentadécane	1496	1499	0,1	-	-
Calamène	1509	1800	-	0,2	0,4
Δ -cadinène	1514	1755	-	0,2	0,4
Spathulénol	1564	2093	-	3,2	2,4
Oxyde de caryophyllène*	1567	1947	-	0,4	2,6
<i>épi</i> -globulol	1578	2080	-	0,4	0,3
Hexadécane	1586	1600	tr	0,1	-
Copabornéol	1592	2147	-	3,0 \pm 0,3	-
1- <i>épi</i> -cubénol	1612	2031	-	0,7	0,6
Δ -cadinol	1626	2155	-	0,1	-
β -eudesmol	1632	2222	-	0,2	-
<i>Inconnu II</i>	1658	-	1,3	0,1	0,3
<i>Inconnu III</i>	1687	2109	0,1	1,4	0,9
Pentadécanal [#]	1693	2020	0,1	0,1	0,3
Heptadécane	1696	1700	tr	0,1	-
3-indolylacétonitrile	1740	-	0,1	0,2	0,3
Octadécane	1804	1789	tr	0,1	-
6,10,14-triméthyl-pentécan-2-one	1830	-	0,6	1,3	2,4
Néophytadiène	1836	1910	-	0,1	1,4 \pm 0,1
Acide palmitique [#]	1940	-	0,1	-	-

* : Les composés sont listés selon leur temps de rétention sur colonne HP1. Les composés identifiés ayant une valeur inférieure à 0,1 % sont notés comme traces (tr). Les composés non identifiés à l'état de traces ne sont pas présentés.

Les spectres de masse des composés *Inconnus* sont regroupés dans l'annexe D.



^b IR : Indices de rétention, déterminés sur colonnes HP1 et Innowax en utilisant la série de n-alcanes.

^c DS : Déviation standard à la moyenne de trois injections (nulle si non précisée)

^d : Composé isolé et identifié par étude RMN.

*: Structure confirmée par injection du composé standard.

: Composés identifiés après fractionnement sur gel de silice.

Tableau 16 : Bilan de l'étude de l'huile essentielle de *Pseudocytisus integrifolius*.

Types de composés	Nombre de composés et leur (%)		
	Partie aérienne	Fleurs	Feuilles
Composés soufrés	9 (58,5)	7 (67,3)	4 (63,7)
Composés azotés (nitriles)	9 (32,7)	4 (4,5)	6 (11,7)
Aldéhydes	23 (1,7)	17 (1,7)	11 (4,5)
Alcanes	7 (0,3)	2 (0,2)	1 (1)
Monoterpènes	7 (0,3)	12 (5,4)	2 (1,8)
Monoterpènes oxygénés	6 (0,3)	11 (2,7)	3 (0,8)
Sesquiterpènes	1 (0,1)	3 (0,5)	3 (2,3)
Sesquiterpènes oxygénés	-	7 (8,0)	4 (5,9)
Composés identifiés au total			
	83 (96,5)	75 (97,8)	39 (97,7)
Composés non identifiés			
	3 (1,4)	3 (2,5)	3 (1,9)

Les chromatogrammes des huiles essentielles des différentes parties de la plante de *Pseudocytisus integrifolius* sont caractérisés par la présence de trois composés majoritaires qui représentent à eux seuls respectivement : 89,3 % de l'extrait de la partie aérienne ; 69,3 % de celui des fleurs et 69,1 % de celui des feuilles.

Concernant la partie aérienne, le composé majoritaire est le disulfure de diméthyle (33,4 %) suivi du pent-4-énitrile (31,7 %) suivi lui-même du trisulfure de diméthyle (24,2 %). Neuf composés soufrés, représentant 58,5 % de l'extrait et 9 nitriles (32,7 %) sont identifiés. Ces deux classes, sulfures et nitriles, représentent clairement les deux classes les plus importantes : 23 aldéhydes (1,7 %), 7 hydrocarbures monoterpéniques (0,3 %), 6 monoterpènes oxygénés (0,3 %) et un sesquiterpène hydrocarboné (0,1 %) avec la présence de traces du seul isothiocyanate de but-3-ényle. Ces composés obtenus sont issus grâce aux



différentes voies citées en première partie ; certains d'entre eux sont obtenus par la voie de dégradation thermique des acides gras, d'autres par la lipoxigénase ; cependant, les plus importants quantitativement sont issus des précurseurs soufrés dérivant de la biosynthèse d'acides aminés.

Au niveau des fleurs, les deux constituants les plus abondants sont les di- et trisulfure de diméthyle (40,9 % et 24,8 % respectivement) représentant à eux seuls 65,7 %. Ce qui souligne leur importance. Toutefois, le taux de sulfures (67,3 %) reste très important. En revanche, la proportion des monoterpènes hydrocarbonés et oxygénés est plus importante dans les fleurs (5,4 % et 2,7 %). Les dérivés des glucosinolates dans les fleurs ne sont pas importants en raison du faible pourcentage de nitriles (4,5 %, au nombre de 4) et absence d'isothiocyanate.

Les feuilles renferment quant à elles plus de nitriles (11,7 %) et d'aldéhydes (4,5 %) que les fleurs ; mais elles contiennent une proportion intermédiaire (63,7 %) de composés soufrés.

Parmi ces derniers, les sulfures d'alkyles sont toujours importants (59,2 %) pour les di- et trisulfure de diméthyle avec une augmentation du taux du tétrasulfure de diméthyle (4,4 %).

L'analyse a été marquée là aussi par l'absence d'isothiocyanate.

II.4. COMPOSITION CHIMIQUE DE L'HUILE ESSENTIELLE DE *Sinapis arvensis*

Le profil chromatographique de l'huile essentielle de *Sinapis arvensis* (Figure 38) permet l'identification de 70 composés représentant 96,4 % de la composition chimique de l'huile essentielle de *Sinapis arvensis*.

Neuf composés soufrés ont été mis en évidence, représentant 43,8 % du profil chromatographique. Le trisulfure de diméthyle est le composé majoritaire de l'extrait puisqu'il représente 33,6 %. Le tétrasulfure de diméthyle est présent avec 7,3 %. Quant au disulfure de diméthyle, il se présente avec un taux assez faible de 1,2 %. Les autres composés soufrés sont principalement des sulfures d'alkyles possédant une fonction nitrile.



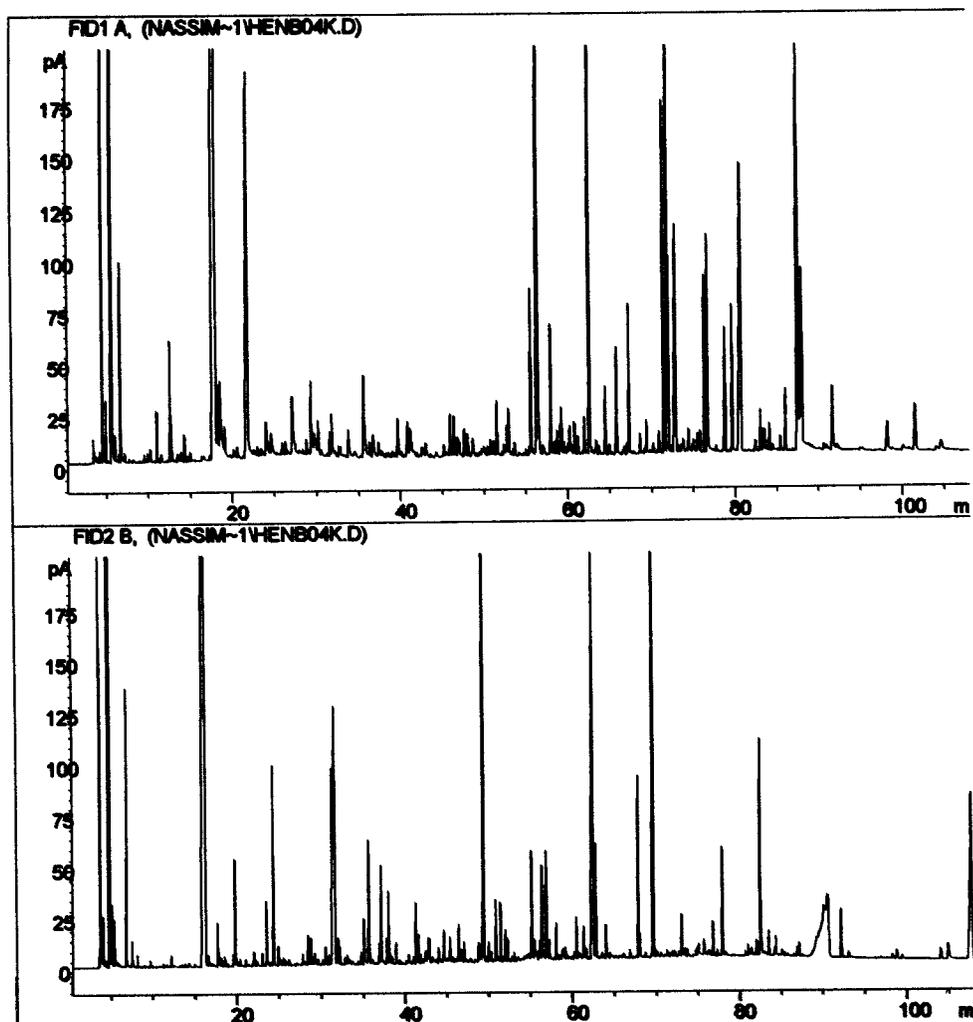


Figure 38 : Chromatogramme en CG-FID polaire, apolaire de *Sinapis arvensis*.

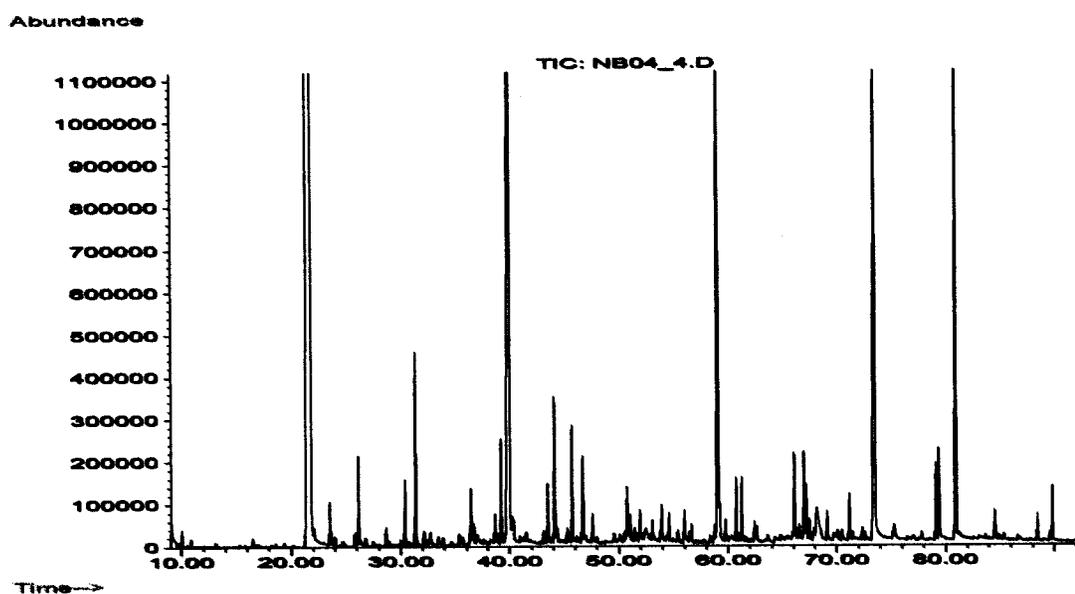


Figure 39 : Chromatogramme en CG/SM de *Sinapis arvensis*.



Tableau 17 : Composition chimique de l'huile essentielle de *Sinapis arvensis*.

COMPOSES ^a	IR ^b		(% ± D.S.) ^c
	Apolaire	Polaire	
Pent-4-ènenitrile	722	1257	0,3
Disulfure de diméthyle [#]	726	1068	1,2
Toluène [#]	753	1035	0,1
Hexanal [#]	775	1099	0,1
Heptanal [#]	876	1191	0,1
Trisulfure de diméthyle [#]	953	1364	33,6 ± 0,5
2,3-octanedione	959	1310	0,1
2-pentylfurane	978	1219	0,3
Octanal [#]	980	1260	0,1
<i>p</i> -cimène [#]	1012	1247	0,8
Limonène [#]	1021	1196	0,1
4-méthylthiobutanenitrile	1032	1759	0,1
Nonane-2-one	1069	1370	0,5
Nonanal [#]	1082	1376	1,8
Phénylacétonitrile [#]	1091	1895	0,2
2,3,5-trithiahexane	1098	-	0,1
3,5-diméthyl-1,2,4-trithiolane ^{**}	1101	1546	tr
3,5-diméthyl-1,2,4-trithiolane ^{**}	1110	1562	0,1
Trans 2-nonénol	1134	-	0,1
Disulfure de méthyl-1-(méthylthio) éthyle	1143	1605	0,3
Terpène-4-ol [#]	1169	1586	tr
Octanoate d'éthyle [#]	1175	1414	0,2
Décanal	1186	1484	1,4 ± 1,4
Tétrasulfure de diméthyle	1190	1580	7,3 ± 1,4
Safranal	1198	1600	0,1
Cuminaldéhyde	1212	1748	0,1
Trans 2-decènal	1237	-	0,1
<i>Inconnu IV</i> ^d	1242	1766	0,4
2-decènal ^{**}	1250	-	1,4
Phèllandral	1257	1654	tr
Thymol	1270	2137	0,2 ± 0,3
2-undécanone [#]	1275	1567	0,4 ± 0,4
<i>n</i> -undécanal	1285	-	0,7
2,4-décadiéнал ^{**}	1292	1756	0,1
Tridécane [#]	1298	1299	0,2
Décanoate de méthyle [#]	1305	1556	tr
Dehydro-ar-ionène (1,2-dihydro-1,1,6-triméthylnaphtalène)	1334	1691	0,6

Chapitre III : Résultats et discussion



Ionène (1,2,3,4-tétrahydro-1,1,6-triméthyl-naphtalène)	1338	1632	0,4
Undécanol	1356	-	0,3
<i>Inconnu V^d</i>	1358	1605	0,3
Décanoate d'éthyle [#]	1374	1627	0,2
Dodécanal	1384	1709	0,4
Tétradécane [#]	1394	1387	0,3
β -caryophyllène [#]	1419	1580	0,3
Géranyl acétone	1424	1892	0,1 \pm 0,1
Méthylpentadécane ^{**}	1464	1440	9,1 \pm 0,2
Trans β -ionone	1469	1878	tr
2-tridécane	1474	1795	0,3
<i>n</i> -tridécane	1489	1777	0,6
<i>n</i> -pentadécane [#]	1498	1495	0,5
Calaménène ^{**}	1507	1790	0,3
δ -cadinène [#]	1512	1753	0,2
Spathuléol	1558	2089	1,1
Oxyde de caryophyllène [*]	1573	1927	0,2
9-méthylthionononitrile [†]	1578	2315	1,2 \pm 0,1
<i>Inconnu VI^d</i>	1585	2141	1,7
1- <i>épi</i> -cubénol	1605	2003	0,4
β -eudesmol	1638	2271	tr
<i>Inconnu VII^d</i>	1652	1921	0,2 \pm 0,2
2-pentadécane	1671	1995	0,5
<i>n</i> -heptadécane [#]	1697	1690	10,5 \pm 0,2
<i>Inconnu VIII^d</i>	1697	2469	1,0
Tétradécanoate d'éthyle	1775	2020	0,1
Octadécane [#]	1795	1798	2,0 \pm 0,5
6,10,14-triméthylpentadécane-2-one	1830	2108	8,6 \pm 0,2
Heptadécane-2-one	1878	-	0,1
Nonadécane [#]	1895	1903	0,5
Isophytol	1931	2271	0,1
Hexadécanoate d'éthyle [#]	1974	2231	0,3
Octadécane	1999	2320	1,4
Octadécénoate de méthyle ^{**}	2064	2403	0,1
Heneicosane [#]	2097	2098	1,9 \pm 0,1
Phytol	2100	2570	0,1
Tricosane [#]	2295	2298	0,7
Pentacosane [#]	2501	2495	0,8

^a : Les composés sont listés selon leur temps de rétention sur colonne HP1. Les composés identifiés ayant une valeur inférieure à 0,1 % sont notés comme traces (tr). Les composés non identifiés à l'état de traces ne sont pas présentés.

^b IR : Indices de rétention, déterminés sur colonnes HP1 en utilisant la série de n-alcane.

^c DS : Déviation standard à la moyenne de trois injections (nulle si non précisée)

^d : Fragmentation SM ; Les spectres de masse des composés *Inconnus* sont regroupés dans l'annexe D.

^{*} : Structure confirmée par co-injection du standard.

^{**} : Isomère correct non caractérisé.

^t : Tentative (IR = 1578) : 185 (M⁺,19), 110(22), 96 (85), 83 (26), 82 (19), 69 (21), 61 (100), 55 (53), 41 (56), 39 (18).

La deuxième classe de familles la plus importante, après celle des sulfures (Tableau 18), est celle des alcanes, puisqu'elle représente, en effet, 26,5 % du total. Les cétones sont présentes avec un taux plus important (10,7 %) comparé à celui des nitriles (1,8 %).

Les alcools et les esters sont présents avec des proportions de 2 % et 0,9 % respectivement. Quant aux aldéhydes, au nombre de douze, ils sont présents avec 6,9 %.

L'analyse est marquée par l'absence totale d'isothiocyanate et de thiocyanate.

Tableau 18 : Bilan de l'étude de l'huile essentielle de *Sinapis arvensis*.

Types de composés	Nombre de composés et leur (%)
Composés soufrés	9 (43,8)
Composés azotés (nitriles)	4 (1,8)
Alcools	5 (2,0)
Aldéhydes	12 (6,9)
Cétones	9 (10,7)
Esters	6 (0,9)
Alcanes	10 (26,5)
Monoterpènes	2 (0,9)
Monoterpènes oxygénés	4 (0,3)
Sesquiterpènes	3 (0,8)
Sesquiterpènes oxygénés	4 (1,7)
	Composés identifiés au total
	70 (96,4)
	Composés non identifiés
	5 (3,6)



Le métabolisme des espèces *Pseudocytisus integrifolius* et *Sinapis arvensis* est bien mis en évidence avec l'importance prise par les sulfures. Ces derniers, bien plus importants dans les différentes parties de *Pseudocytisus integrifolius* que dans *Sinapis arvensis* (Figure 40), proviennent essentiellement du sulfoxyde de S-méthylcystéine (métabolisme des acides aminés) et des dérivés d'hydrolyse des glucosinolates (issus du métabolisme des hydrates de carbone) notamment les nitriles. Les alcanes et les cétones sont des classes de familles plus importantes dans *Sinapis arvensis* que dans *Pseudocytisus integrifolius*, alors que les mono- et sesquiterpènes sont plus importants dans les fleurs et les feuilles de *Pseudocytisus integrifolius* que dans *Sinapis arvensis*.

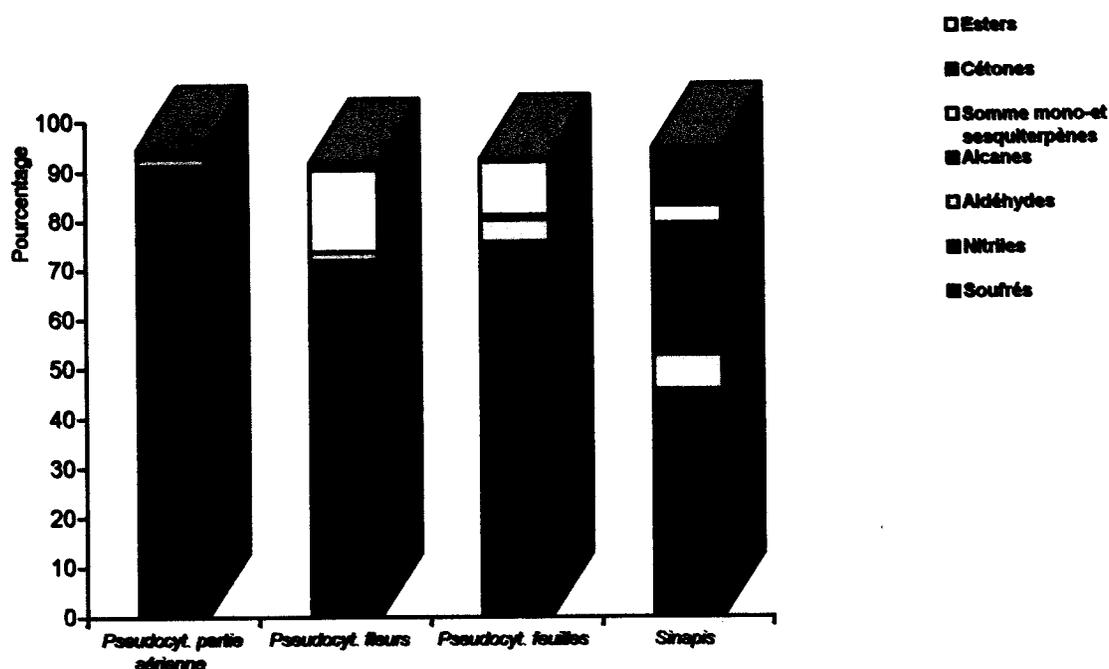


Figure 40 : Proportions des différentes classes des composés dans *Pseudocytisus integrifolius* et *Sinapis arvensis*.

II.5. GLUCOSINOLATES ET DERIVES

Comme nous l'avons décrit précédemment (Chapitre I, deuxième partie), les glucosinolates se dégradent pour former, selon certaines conditions des nitriles, des isothiocyanates ou des thiocyanates.

Après distillation, les nitriles sont clairement les composés les plus abondants, avec des traces d'isothiocyanates de but-3-ényle pour *Pseudocytisus integrifolius*, alors que pour

Sinapis arvensis les nitriles sont bien moins importants. Ces composés sont les seuls issus de la voie de dégradation des glucosinolates (Tableau 19).

La gluconapine est le glucosinolate le plus important pour *Pseudocytisus integrifolius*, puisque le pent-4-ènenitrile représente respectivement 31,7 %, 3,6 % et 9,9 % de la composition des huiles essentielles pour la partie aérienne, les fleurs et les feuilles. Par contre, les glucosinolates d'isobutyle et de n-hexyle sont absents des feuilles et des fleurs.

Tableau 19 : Glucosinolates métabolisés par *Pseudocytisus integrifolius* et par *Sinapis arvensis*.

Produits d'hydrolyse identifiés dans		Glucosinolates correspondants
<i>Pseudocytisus integrifolius</i>	<i>Sinapis arvensis</i>	
*Pent-4-ènenitrile *Isothiocyanate de but-3-ènyle	Pent-4-ènenitrile	Gluconapine
3-méthylbutanenitrile	-	Glucosinolate d'isobutyle
5-méthylhexanenitrile	-	Glucosinolate de 4-méthylpentyle
n-hexanenitrile	-	Glucosinolate de n-pentyle
n-heptanenitrile	-	Glucosinolate de n-hexyle
Phénylacétonitrile	Phénylacétonitrile	Glucotropaéoline
3-indolylacétonitrile	-	Glucobrassicine
-	4-méthylthiobutanenitrile	Glucoibervérine

Les glucosinolates, dans la partie de la plante utilisée de *Sinapis arvensis*, sont peu nombreux. Le 4-méthylthiobutanenitrile (provenant de la glucoibervérine) a été identifié dans des espèces algériennes²⁸ et égyptiennes.³⁰

Cependant, d'autres glucosinolates, qui sont les plus importants selon la littérature comme l'indol-3-ylméthyle (glucobrassicine), 1-méthoxyindol-3-ylméthyle (néogluco-brassicine) et le p-hydroxybenzyle (glucosinalbine), sont absents.

Dans les feuilles de la base de *Sinapis arvensis*, Lockwood et coll.²⁸ ont montré la présence de la progoitrine et de l'épiprogoitrine (2-hydroxybut-3-ènyle). Pour notre cas, nous avons pu confirmer que l'absence de certains glucosinolates, dans notre plante, pourrait



provenir de la partie utilisée (partie aérienne supérieure de la plante) ou alors (par la littérature) de l'origine de la plante (égyptienne ou algérienne).

Les nitriles proviennent indubitablement des glucosinolates sans une intervention enzymatique.

Les glucosinolates, comme la myrosinase, sont décrits comme relativement stables sous l'effet de la chaleur.^{6,133,197} De ce fait, les études utilisant les dérivés des glucosinolates, après action de la myrosinase, préconisent une incubation d'une heure de la matrice broyée à température optimale, comprise entre 30 et 40°C pour une hydrolyse quantitativement maximale.^{103,108} Un chauffage modéré est favorable à la formation des isothiocyanates.¹⁰²

Cependant, à haute température, la myrosinase est dénaturée et devient inefficace.¹¹¹

Les glucosinolates sont alors dégradés thermiquement, ce qui expliquerait la proportion importante de nitriles.^{194,198} (Figure 41).

Ceci corrobore donc l'importance du facteur thermique.

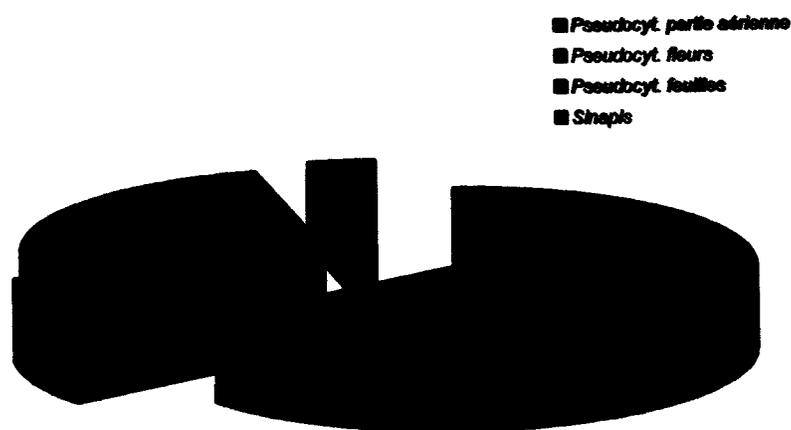


Figure 41 : Composition en nitriles des huiles essentielles de *Pseudocytisus integrifolius* et *Sinapis arvensis*.

On voit clairement que le taux de nitrile dans l'huile essentielle de la partie aérienne supérieure de *Sinapis arvensis* est comparable à celui des fleurs de *Pseudocytisus integrifolius*.

Cette étude a permis de noter la présence de 7 glucosinolates, pour l'huile essentielle de la partie aérienne de *Pseudocytisus integrifolius* et de 3 glucosinolates pour *Sinapis arvensis*, précurseurs de plusieurs composés volatils^{6,100,113}.



L'absence d'isothiocyanate d'allyle⁵⁴, abondant chez les crucifères, et les traces du seul isothiocyanate nous permettent de déceler une non amertume de la plante *Pseudocytisus integrifolius*. La plante est broutée par les troupeaux mais pas continuellement : la forte teneur en composés soufrés peut expliquer ce fait. Les autochtones ont signalé la présence de composés indésirables (soufrés) dans le lait ainsi que dans la viande.

Il est à noter que certains composés volatils, bien que présents dans la plupart des crucifères, sont absents dans les deux plantes. Il s'agit en l'occurrence du méthane-thiol très volatil (température d'ébullition +6°C) ou du sulfure de diméthyle pouvant être masqué par le solvant.

Devant la diversité des techniques utilisées (relatives à l'étude des composés volatils des crucifères) et le manque d'appareillage, au niveau de notre laboratoire, la comparaison directe avec nos résultats, de certains éléments, serait difficile. Toutefois, nous essayons, malgré tout, de les comparer à certains travaux réalisés par d'autres auteurs sur plusieurs espèces légumières communes à cette famille.

Lors de la distillation des huiles essentielles, notamment de *Pseudocytisus integrifolius*, certaines odeurs désagréables se sont émanées dans l'atmosphère, rappelant celles du gaz, du chou pourri ou du chou-fleur. Dans cette étude comparative (Tableau 20), certains de ces composés nous ont amené à prendre en considération les composés volatils de nos huiles. Parmi ces derniers :

Méthane-thiol : responsable de mauvaises odeurs,¹⁹⁹ il est dérivé de la décomposition du sulfoxyde de S-méthylcystéine.

Sulfure de diméthyle : note soufrée, présent dans différents légumes, responsable des odeurs dans les produits stockés sous atmosphère anaérobie,^{62,200} formé à partir du sulfonium de S-méthylméthionine.

Di- et trisulfure de diméthyle : note soufrée, odeur très forte, produit dérivant de la décomposition du S-méthylcystéine sulfoxyde. Le trisulfure est un composant clé de la saveur des légumes crucifères cuisinés.^{42,48}

Tétrasulfure de diméthyle : issu, lui aussi, de la décomposition enzymatique de la S-méthylcystéine.



Tableau 20 : Comparaison des teneurs de certains constituants avec des travaux antérieurs.

ESPECES	MT	DMS	DMDS	DMTS	DM tétra S	pent-4- énenitrile	ITC d'allyle	ITC de but- 3-ényle
<i>Pseudocytisus integrifolius</i>								
HE Partie aérienne*	-	0,2	33,4	24,2	0,7	31,7	-	Tr
HE Fleurs*	-	tr	4,09	24,8	1	3,6	-	-
HE Feuilles*	-	-	23,8	35,4	4,4	9,9	-	-
<i>Sinapis arvensis</i>								
HE Partie aérienne supérieure*	-	-	1,2	33,6	7,3	0,3	-	-
Chou-fleur Romanesco ^{**35} (var. <i>navona</i>)								
Feuilles fraîches	-	-	2,1	6,5	0,2	-	-	-
Inflorescence fraîche	-	-	30,2	24,5	0,5	-	-	-
Chou blanc ^{#57}	0,1	0,8	0,5	8,1	-	0,2	42,9	9,0
Chou rouge ^{#57}	tr	0,8	0,3	7,8	0,5	0,3	22,0	43,5
Chou chinois ^{#57}	tr	0,4	-	-	-	-	64,0	6,4
Chou-fleur blanc ^{#57}	0,2	2,7	16,4	12,3	0,9	-	10,8	-
Chou de Milan ^{**57}	-	-	1,7	14,8°	0,2	-	33,9	°
Chou de Bruxelles ^{**57}	-	-	4,1	13,1°	0,1	-	27,9	°
Chou-fleur blanc ^{**57}	-	-	10,8	24°	0,6	-	17,2	°
Brocoli ^{**57}	-	-	3,9	30,5	1,0	-	-	-
<i>Farsetia aegyptia</i> ⁿ¹⁹⁴	-	-	-	-	-	1,0	59	2,5
<i>Farsetia ramosissima</i> ⁿ¹⁹⁴	-	-	-	-	-	8,5	tr	77,5
<i>Eruca sativa</i> feuilles (HE) ^{**201}	-	-	-	-	-	-	-	0,04

* : par entraînement à la vapeur d'eau ; ** : par hydrodistillation ; # : par SPME ; ° : par distillation au solvant ; ° : Valeur (DMT + ITC de but-3-ényle).

MT : Méthanéthiol ; DMS : Diméthyl sulfure ; DMDS : Diméthyl disulfure ; DMTS : Diméthyl trisulfure ; DM tétra S : Diméthyl tétrasulfure ; ITC : Isothiocyanate ; SPME : Solid phase microextraction.

Déjà cités au chapitre I, beaucoup de facteurs influent sur la composition des volatils des crucifères : l'espèce, le temps de conservation et la technique d'extraction.

Pseudocytisus integrifolius est très riche en sulfures d'alkyles et pent-4-ènenitrile en comparaison à toutes les espèces citées qui, en revanche, sont plus riches en d'autres composés tels que les isothiocyanates ; notamment la présence du 4-méthylthiobutyl isothiocyanate (60,13 %) dans *Eruca sativa*²⁰¹ et l'isothiocyanate d'allyle présent dans plusieurs espèces.

Ces sulfures d'alkyles impliquent soit la présence de C-S-lyases, soit des précurseurs c'est-à-dire les acides aminés soufrés.

La toxicité des composés soufrés et notamment le disulfure de diméthyle vis-à-vis de plusieurs insectes a été testé.^{202,203} Vu la richesse de *Pseudocytisus* en ces composés (Figure 42), il serait intéressant, comme bonne alternative, d'approfondir l'étude des propriétés pesticides de ces composés volatils pour lutter contre les insectes ravageurs.

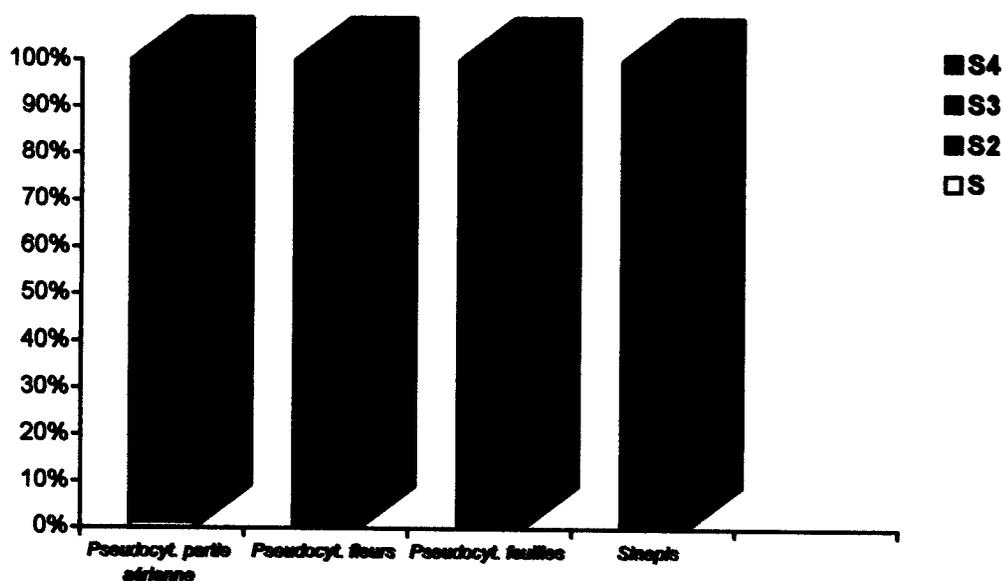


Figure 42 : Composition des huiles essentielles étudiées en composés soufrés.

II.6. CONCLUSION

Tout en gardant à l'esprit que plusieurs facteurs peuvent intervenir et influencer la composition d'une plante, le domaine d'étude des glucosinolates, indissociables du métabolisme des crucifères, permet d'envisager l'approfondissement de l'étude de *Pseudocytisus* par celle de ses graines en les comparant à celles d'autres crucifères qui pourraient avoir un impact commercial intéressant.

III. ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

III.1. INTRODUCTION

Une multitude de souches bactériennes et de champignons se trouve partout dans notre environnement. L'évolution grandissante de leur résistance constitue une menace sérieuse pour l'efficacité de la thérapeutique antifongique et antibactérienne. Aussi, il est recommandé de tester tout matériel végétal en vue de déterminer son effet antimicrobien.²⁰⁴

Les crucifères présentent un pourcentage élevé en composés soufrés ; ce qui confirme l'importance de l'étude entre la composition chimique et l'activité microbienne.²⁰⁵

Pour *Sinapis arvensis*, sa très faible teneur en huile essentielle ne nous a pas permis de réaliser l'étude microbiologique.

Par contre, pour *Pseudocytisus integrifolius*, cette analyse a été possible pour l'huile essentielle de la partie aérienne.

III.2. RESULTATS DE L'ANTIBIOGRAMME ET DE L'ANTIFONGIGRAMME

L'antibiogramme consiste à rechercher la sensibilité des souches vis-à-vis des antibiotiques. Nous avons testé l'activité antibactérienne par la méthode standard des disques.

Cette sensibilité est exprimée par l'apparition de zones d'inhibition autour de ces disques. Les mesures de celles-ci figurent dans le tableau ci-après :

Tableau 21 : Résultat de l'antibiogramme (diamètre de la zone d'inhibition en mm).

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>St. aureus</i>
Gram positif/Gram négatif	-	-	+
Ampicilline	17	na	17
Staphylomycine	13	13	15
Pipéracilline	13	20	na

na : non active.

Les trois souches bactériennes ont montré des sensibilités vis-à-vis des antibiotiques à l'exception de l'ampicilline sur *Pseudomonas aeruginosa* et de la pipéracilline sur *Staphylococcus aureus*. La figure 43 montre que l'action de la pipéracilline, sur *Pseudomonas aeruginosa*, présente la zone d'inhibition la plus élevée.



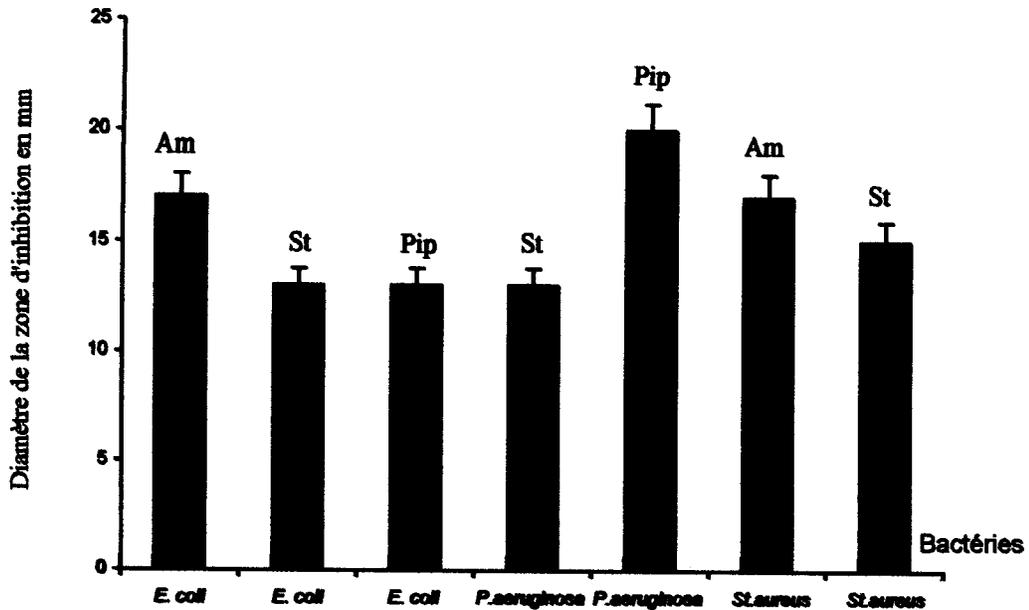


Figure 43 : Résultat de l'antibiogramme.

Pour les moisissures, un seul antifongique, l'amphotéricine B, a été utilisé vis-à-vis des mycètes. Les résultats sont regroupés dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Antifongigramme représentant le diamètre de la colonie mycélienne en cm.

	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Alternaria</i>
AmB	6,3	7	5,5	5,8

La Figure 44 montre l'activité de l'amphotéricine B vis-à-vis de ces quatre moisissures.

On y voit que cet antifongique réduit faiblement le taux de la croissance des colonies mycéliennes d'environ 20 % pour *Alternaria*, 12,5 % pour *Aspergillus niger* et 12,7 % pour *Fusarium oxysporum*.

Cependant, il s'est manifesté avec le plus faible taux d'inhibition vis-à-vis d'*Aspergillus flavus* (10 %).

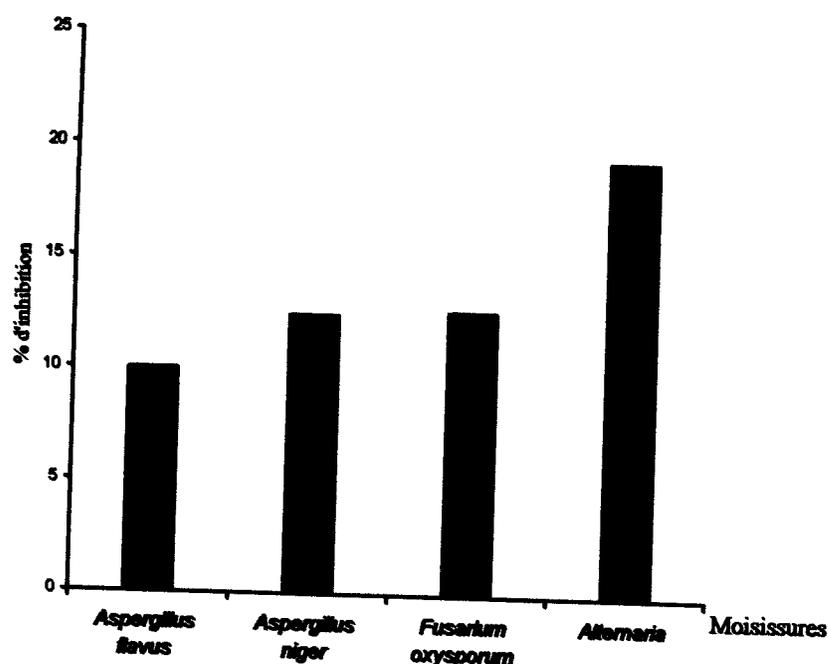


Figure 44 : Résultat de l'antifongigramme

III.3. RESULTATS DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE, BACTERIES ET MOISSURES

Pour les bactéries :

La présence de zones d'inhibition, pour les deux souches *E. coli* et *P. aeruginosa*, nous a amené à la lecture des boîtes de pétri, 48 heures après l'incubation. Pour *St. aureus*, aucune zone d'inhibition n'est apparue, même après 72 heures (Tableau 23).

Tableau 23 : Activité antibactérienne de l'huile essentielle de la partie aérienne de *Pseudocytisus integrifolius* et du constituant pent-4-èneitrile. (diamètre de la zone d'inhibition en mm).

Espèce bactérienne	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>St. aureus</i>
Huile essentielle	26	22	na
50*	24	18	na
25*	18	8	na
12,5*	8	na	na
Pent-4-èneitrile	9	14	-

na : non active.

*: Dilutions d'huile essentielle (%V/V).



Ces résultats montrent clairement que les germes testés sont sensibles aux solutions de l'huile essentielle, de ses dilutions et du pent-4-ènenitrile. Ces solutions sont actives vis-à-vis des souches à Gram négatif *E. coli* et *P. aeruginosa*. Cependant, la souche *St. aureus* s'est avérée résistante à l'huile. Les valeurs des zones d'inhibition du pent-4-ènenitrile se rapprochent des valeurs trouvées pour les dilutions d'huile essentielle 12,5 (V/V) pour la souche *E. coli* et se rapproche de la dilution 50 pour *P. aeruginosa*.

Les tests microbiologiques ont révélé une grande sensibilité des souches bactériennes à l'exception de *St. aureus*. Ce pouvoir antimicrobien est comparé à celui des antibiotiques testés. L'huile essentielle s'est avérée plus efficace que ces derniers.

Pour les moisissures :

Les résultats de l'essai de l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Pseudocytisus integrifolius* du pent-4-ènenitrile, des di- et trisulfure de diméthyle sont donnés ci-après.

Tableau 24 : Effet de l'huile essentielle de *Pseudocytisus integrifolius* et de ses constituants majoritaires sur le diamètre (en cm) des colonies mycéliennes.

SOUCHES	HE de la partie aérienne	Pent-4-ènenitrile	Disulfure de diméthyle	Trisulfure de diméthyle
<i>Aspergillus flavus</i> (M1)	4,8	5,7	5,7	6,2
<i>Aspergillus niger</i> (M2)	5,6	6,7	7,3	7,1
<i>Fusarium oxysporum</i> (M3)	4,8	4,8	5,3	5,6
<i>Alternaria</i> (M4)	5,6	5,7	5,9	6,5

Les quatre souches se sont montrées sensibles vis-à-vis de l'huile essentielle et de ses constituants majoritaires : le pent-4-ènenitrile et les di- et trisulfure de diméthyle. Ces derniers présentent des taux d'inhibition, vis-à-vis de toutes les souches, inférieurs à celui de l'huile essentielle (Figure 45, 46, 47 et 48) à l'exception du nitrile qui présente le même taux d'inhibition vis-à-vis de *Fusarium oxysporum*.



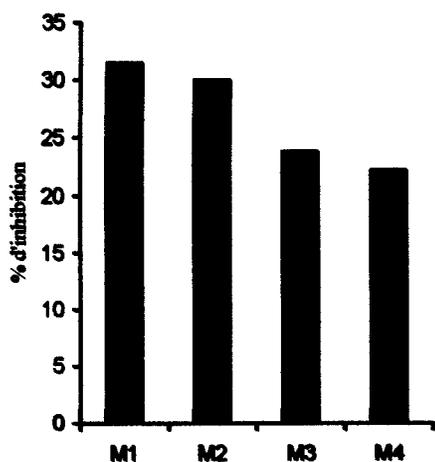


Figure 45 : Activité de l'HE sur la croissance des moisissures.

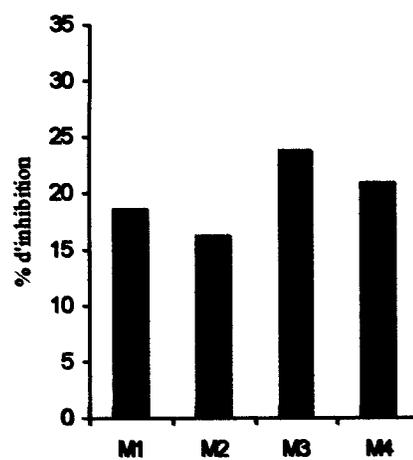


Figure 46 : Activité du pent-4-ènenitrile sur la croissance des moisissures.

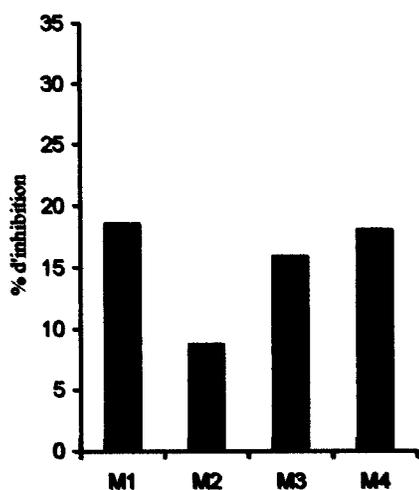


Figure 47 : Activité du disulfure de diméthyle sur la croissance des moisissures.

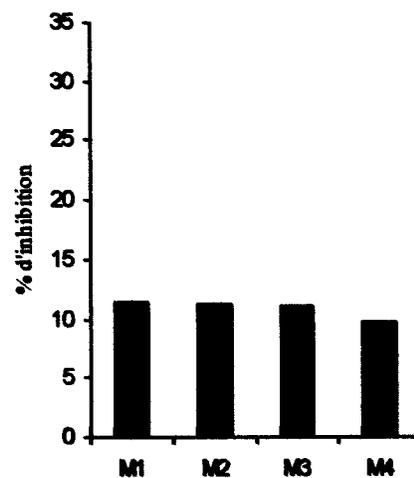


Figure 48 : Activité du trisulfure de diméthyle sur la croissance des moisissures.

L'huile essentielle de *Pseudocytisus integrifolius* inhibe mieux la croissance des souches *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* que celle de *Fusarium oxysporum* et *Alternaria*.

Le nitrile inhibe mieux les souches que les di- et trisulfure de diméthyle.



Cependant, l'action des di- et trisulfure, sur les souches *Aspergillus niger* et *Alternaria* respectivement, est la plus faible.

La croissance d'*Aspergillus niger* est mieux réduite par le trisulfure de diméthyle que par le disulfure ; mais, pour les deux, elle est moins importante que par le nitrile.

L'ensemble des résultats nous amène à proposer d'approfondir ces tests en variant les concentrations de l'huile essentielle, et de ses constituants majoritaires, vis-à-vis d'une multitude de souches bactériennes et fongiques ; et permettre ainsi de déterminer la concentration minimale inhibitrice.

En effet, l'activité est toujours corrélée avec les quantités d'extrait utilisées.

III.4. Conclusion

Grâce à ces tests biologiques, réalisés sur ces bactéries et sur ces champignons phytopathogènes, nous avons pu montrer leur sensibilité à l'huile essentielle et à ses constituants majoritaires.

IV. CONSEQUENCES NUTRITIVES

IV.1. INTRODUCTION

La composition chimique et la valeur alimentaire d'un produit végétal varient suivant la famille botanique, le stade de végétation et les conditions climatiques.

Les glucides, les lipides et les protéines, à un degré moindre, sont des nutriments qui produisent de l'énergie.

La valeur biologique représente la qualité des protéines, leur transformation et leur utilisation dans l'organisme. Ce terme est lié à la teneur en acides aminés essentiels des protéines. Pour estimer la valeur nutritionnelle des protéines, de nombreuses méthodes ont été proposées puis discutées par d'autres auteurs.^{206,207}

Ces méthodes supposent que les acides aminés soient dosés avec précision. Les protéines de différentes espèces ont permis de classer ces derniers par rapport à ceux de l'œuf.

Pour cela, il faut déterminer deux indices : le premier, préconisé par Mitchell et coll.,²⁰⁸ appelé indice chimique de Mitchell (Chemical score) et correspondant à son homologue dans l'œuf ; le second indice est celui d'Oser²⁰⁹ utilisé pour la détermination de la valeur biologique des protéines (EAA index). Ce dernier peut varier selon l'espèce à laquelle la protéine est destinée.



IV.2. COMPOSES NUTRITIONNELS

Afin de déterminer les valeurs nutritives des composés de nos deux plantes, nous avons réalisé le dosage des sucres réducteurs, des lipides totaux et des protéines ; uniquement sur les feuilles ; de *Pseudocytisus integrifolius* et de *Sinapis arvensis*.

Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 25 : Composition chimique des feuilles de *Pseudocytisus integrifolius* et de *Sinapis arvensis*.

	Espèces étudiées	
	<i>Pseudocytisus integrifolius</i> (en % de matière sèche foliaire)	<i>Sinapis arvensis</i> (en % de matière sèche foliaire)
Lipides totaux	17 ± 0.82	8.12 ± 0.21
Sucres réducteurs	2,94 ± 0.72	3.01 ± 0.36
Azote total	3,22	2,99
Azote protéique	2,42	2,76
Azote non protéique	0,8	0,23
Protéines brutes	20,12	18,7
Protéines pures	15,16	17,24

Le règne végétal fournit un apport considérable de corps gras. Le taux de lipides dans *Pseudocytisus integrifolius* est plus important que dans *Sinapis arvensis*. En comparaison, le premier aurait environ 53 % plus de lipides que le second.

Les valeurs des lipides sont nettement plus élevées comparées (tableau 26) à celles d'autres espèces de légumes crucifères (*Brassica oleracea*) telles que le chou, les choux fleurs dont la teneur n'excède pas 1 %.

Nous prévoyons, dans un proche avenir, d'étudier la composition en acide gras, de ces huiles, au moyen d'analyses chromatographiques

Les valeurs correspondant aux sucres totaux (réducteurs) sont relativement proches : à savoir 2,94 % en m.s. pour *Pseudocytisus integrifolius* et 3,01 % en m.s. pour *Sinapis arvensis*. Ces valeurs sont comparables à celles du navet. Celle de l'oignon est environ deux fois plus importante (Tableau 26).



Tableau 26 : Composition en lipides et sucres de différentes espèces.²¹⁰

	Lipides (en %)	Sucres (en %)
<i>Brassica rapa</i> (navet)	0,1 – 0,2	2,7 – 3
<i>Brassica oleracea var. botrytis</i> (chou-fleur)	0,3	1,6 – 2
<i>Brassica oleracea var. capitata</i> (chou rouge)	0,3	3 – 4
<i>Brassica oleracea var. gemmifera</i> (choux de Bruxelles)	0,4 – 0,8	2,2 – 2,9
<i>Brassica oleracea var. italica</i> (Brocoli)	0,4	1,3 – 2,3
<i>Allium cepa</i> (oignon)	0,2	6 - 7

Ces taux de sucres ont été rapportés au glucose. En effet, comme nous l'avons déjà souligné, le broyage rompt le lien thioglucosidique, ce qui permet de générer un intermédiaire instable qui se réarrange selon les conditions du milieu, avec libération des molécules de glucose.

Le taux d'azote total (protéines brutes) est plus important dans *Pseudocytisus integrifolius* que dans *Sinapis arvensis*. Cependant, le taux d'azote protéique (protéines pures) représente la majeure partie dans cette dernière. *Pseudocytisus* a environ 71 % plus d'azote non protéique que *Sinapis*.

Les teneurs en protéines brutes, en pourcentage par rapport à la matière sèche foliaire, ont été comparées à celles établies par Nagy et coll.⁷ Il en ressort que cette teneur dans *Sinapis* est inférieure à celles du chou chinois (*Brassica oleraceae var. chinensis*) 26 % en m.s.; du chou-fleur (*Brassica oleraceae var. botrytis*) 24 % en m.s. et du chou (*Brassica oleraceae var. capitata*) 21,2 % en m.s.. Cette dernière valeur est comparable à celle de *Pseudocytisus* (20,12 % en m.s.).

Ces teneurs en protéines dépendent, sans aucun doute, de l'espèce, des conditions pédo-climatiques et du stade de développement.

IV.3. COMPOSITION EN ACIDES AMINES

La composition en acides aminés est déterminée en vue d'établir la qualité nutritionnelle des protéines étudiées (e). Cette composition sera traduite par rapport à celle de la protéine de référence (r) l'œuf.



La formule suivante permet d'évaluer, en pourcentage relatif, les teneurs en acides aminés correspondant à celles des acides aminés de l'œuf.

Ces conversions étant établies pour n acides aminés indispensables, l'indice d'Oser²⁰⁹ correspond à :

$$\text{Indice EAA} = \sqrt[n]{\frac{\text{Ile}_e}{\text{Ile}_r} \times \frac{\text{Leu}_e}{\text{Leu}_r} \times \dots \times \frac{\text{Val}_e}{\text{Val}_r}} \times 100$$

Ile : isoleucine Leu : leucine Val : valine.

Le tableau ci-après donne la composition en acides aminés par rapport à la matière sèche foliaire.

Tableau 27 : Composition en acides aminés de *Pseudocytisus integrifolius* et *Sinapis arvensis* par rapport à 100 g de matière sèche.

Espèce étudiée Acides aminés	<i>Pseudocytisus integrifolius</i>	<i>Sinapis arvensis</i>
Acide aspartique	1,44	1,41
Thréonine	0,72	0,72
Sérine	0,79	0,7
Acide glutamique	2,22	1,86
Proline	1,08	3,44
Glycine	1,29	0,79
Alanine	1,17	0,88
Cystine	0,03	0,22
Valine	1,04	1,02
Méthionine	0,14	0,3
Isoleucine	0,63	0,73
Leucine	1,18	1,33
Tyrosine	0,25	0,52
Phénylalanine	0,71	0,86
Histidine	0,30	0,38
Lysine	0,85	0,92
Arginine	0,59	0,79
TOTAUX	14,43	16,87

Pour les deux plantes, 17 acides aminés ont été quantifiés par rapport à la matière sèche et par rapport à la protéine.

La composition en acide aspartique, thréonine, sérine et valine est comparable. Cependant, l'acide glutamique, la glycine et l'alanine sont plus importants dans *Pseudocytisus* que dans *Sinapis*. Les autres acides aminés (l'arginine, la lysine, l'histidine, la phénylalanine, la tyrosine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine, la cystine et la proline) sont plus importants dans *Sinapis*.

L'acide glutamique est l'acide aminé le plus important dans *Pseudocytisus* avec 22,2 mg/g de matière sèche. L'acide aspartique est le second par importance dans cette plante avec 14,4 mg/g de matière sèche. Ces deux acides représentent, respectivement, 15,38 % et 9,98 % du total en acides aminés. L'abondance en acides (glutamique et aspartique) est comparable à celle du chou frisé (*Brassica oleraceae var. acephala*)²¹¹ dont les valeurs sont plus élevées (33,2mg/g de m.s.) pour l'acide glutamique et 27,6 mg/g de m.s. pour l'acide aspartique.

La proline (iminoacide) est l'acide le plus important dans *Sinapis* puisqu'il est présent avec 34,4 mg/g de m.s. et représente environ 20,4 % du total en acides aminés. Cet acide a un rôle important dans la synthèse des protéines et dans la régénération des tissus.²¹² Dans cette plante, l'acide glutamique est le second en importance ; il est présent avec 18,6 mg/g de m.s. et il représente environ 11 % du total en acides aminés.

Les acides aminés soufrés sont les moins abondants dans *Pseudocytisus* et *Sinapis* avec 0,3 et 2,2 mg de cystine par gramme de m.s. et 1,4 et 3 mg de méthionine par gramme de m.s. respectivement. Le tryptophane n'a pas été étudié pour les deux plantes.

Dans le tableau 28 ci-après, on peut observer des variations, similaires à celles du tableau précédant, pour les acides aminés par rapport à la protéine sachant que la proline est l'acide aminé dominant dans *Sinapis* et que ces protéines végétales sont toutes deux carencées en acides aminés soufrés indispensables.



Tableau 28 : Composition en acides aminés de *Pseudocytisus integrifolius* et *Sinapis arvensis* pour 100 g de protéine.

Espèce étudiée	<i>Pseudocytisus integrifolius</i>	<i>Sinapis arvensis</i>
Acides aminés		
Acide aspartique	7,16	7,54
Thréonine	3,58	3,85
Sérine	3,93	3,74
Acide glutamique	11,03	9,95
Proline	5,37	18,4
Glycine	6,41	4,22
Alanine	5,82	4,71
Cystine	0,15	1,18
Valine	5,17	5,45
Méthionine	0,70	1,6
Isoleucine	3,13	3,90
Leucine	5,86	7,11
Tyrosine	1,24	2,78
Phénylalanine	3,53	4,6
Histidine	1,49	2,03
Lysine	4,22	4,92
Arginine	2,93	4,22
TOTAUX	71,71	87,19

Afin de mieux visualiser la richesse de ces protéines vertes par rapport aux classes d'acides aminés, nous les avons regroupées dans les diagrammes ci-après (Figures 49 et 50).

La classe des acides aminés monocarboxyliques est la plus importante dans les deux espèces. Cependant, il y a environ, en matière sèche, 22 % plus d'acides aminés monocarboxyliques dans *Sinapis* et ceci en raison de la richesse de cette dernière en proline.

Les valeurs des classes des acides aminés dicarboxyliques sont assez proches pour les deux plantes, et elles sont secondes quantitativement. Toutefois, les classes restantes (des acides aminés soufrés, dibasiques, hydroxylés et aromatiques) sont plus importantes dans *Sinapis* que dans *Pseudocytisus*.



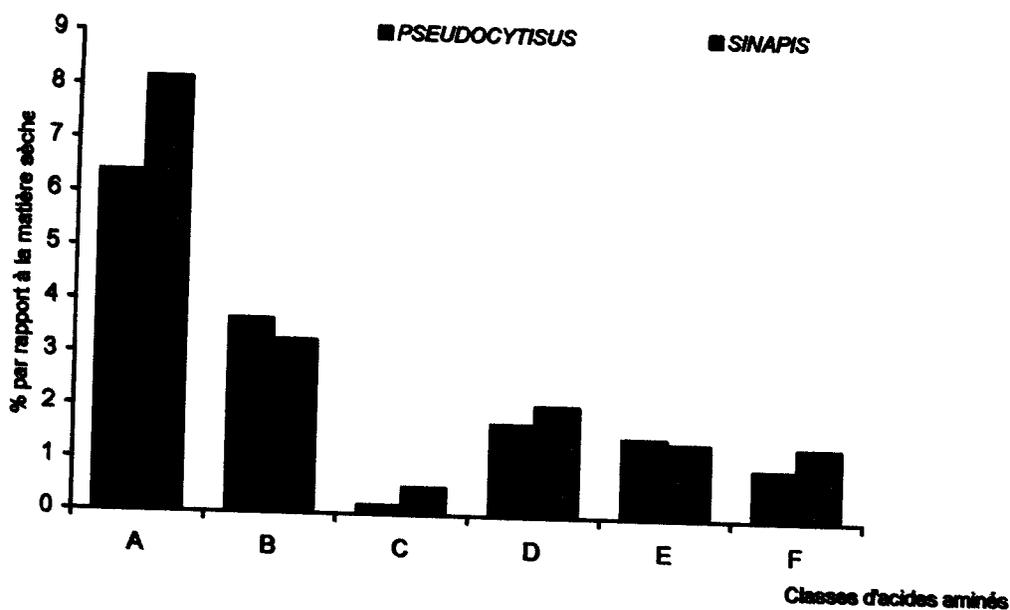


Figure 49 : Composition par groupe d'acides aminés selon leurs caractères chimiques par rapport à la matière sèche.

Les abréviations dans ces deux figures sont comme suit :

A = A. A. monocarboxyliques : Gly + Ala + Val + Leu + Ile + Pro.

B = A. A. dicarboxyliques : Asp + Glu.

C = A. A. soufrés : Cys + Met.

D = A. A. dibasiques : Lys + His + Arg.

E = A. A. hydroxylés : Ser + Thr.

F = A. A. aromatiques : Phe + Tyr.

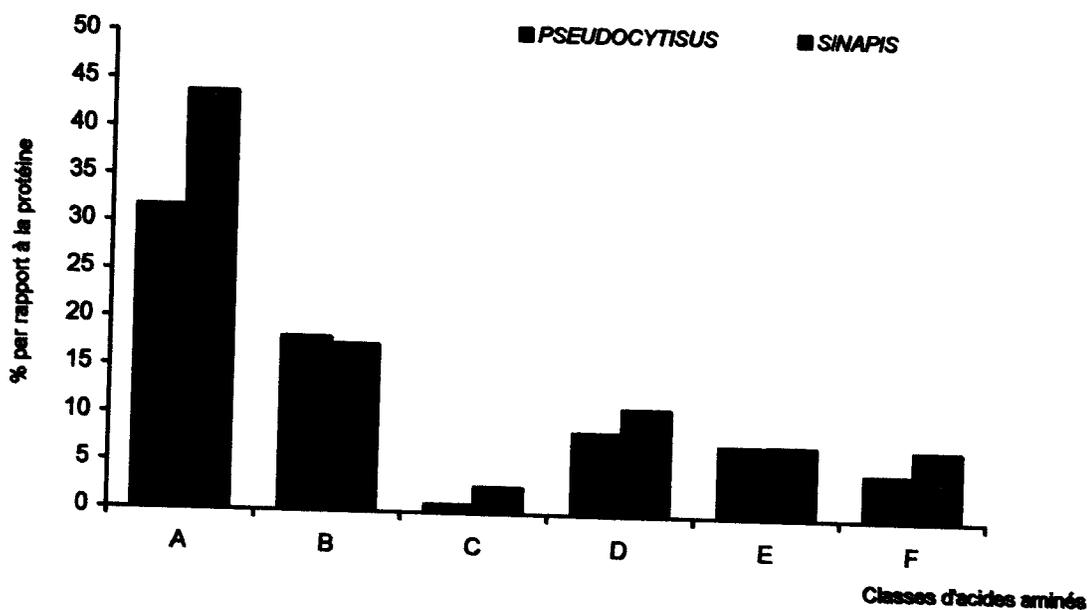


Figure 50 : Composition par groupe d'acides aminés selon leurs caractères chimiques par rapport à la protéine.



IV.3.1. ESTIMATION DE LA VALEUR BIOLOGIQUE

Après l'étude de la composition en acides aminés des deux plantes, nous allons en estimer l'indice EAA.

En effet, les résultats obtenus (tableau ci-dessous) montrent que *Sinapis arvensis* est plus riche en acides aminés essentiels ce qui traduit une meilleure valeur biologique (63,74) en comparaison à *Pseudocytisus* (49,36).

L'acide aminé soufré, la méthionine, limite la qualité protéique en raison de sa faible teneur ; ce rôle, de facteur limitant, est vérifié dans plusieurs autres espèces.²¹³⁻²¹⁷

Tableau 29 : Pourcentage relatif des acides aminés essentiels par rapport à la protéine de référence.

Acides aminés	Oeuf % AA	<i>Pseudocytisus integrifolius</i>		<i>Sinapis arvensis</i>	
		% AA	% relatif	% AA	% relatif
Isoleucine	8,0	3,13	39	3,9	49
Leucine	9,2	5,86	64	7,11	77
Lysine	7,2	4,22	58	4,92	68
Méthionine	4,1	0,7	17	1,6	39
Phénylalanine	6,3	3,53	56	4,60	73
Thréonine	4,9	3,58	73	3,85	78
Valine	7,3	5,17	71	5,45	75
TOTAUX	47,00	26,19	-	31,43	-
Facteur limitant		Méthionine	-	Méthionine	-
Indice EAA*			49,36		63,74

* L'indice EAA (7) ne tient pas compte du tryptophane.

Les valeurs biologiques, de nos deux plantes, ont été comparées à celles de quelques crucifères, des céréales et une légumineuse (voir le tableau 30 et la figure 51 qui en découle). Elles sont inférieures à celles du chou chinois qui en présente la plus forte valeur (81,15). Celle de *Sinapis*, comparable à celle du chou-fleur (64,61), se rapproche de celle du maïs (62,39), cependant elle est supérieure aux valeurs des autres espèces considérées.

Par contre, la valeur biologique de *Pseudocytisus integrifolius* est supérieure à celle du navet (45,71) et inférieure à celles des autres espèces considérées.

Tableau 30 : Composition en acides aminés essentiels de quelques espèces de crucifères, des céréales et une légumineuse (pour 100 g de protéine).

Espèce	Ile	Leu	Lys	Mét	Phé	Thr	Val
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> ²¹⁸ Chou (feuilles)	3,7	5,45	5,5	0,95	3,25	3,6	4,15
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i> ²¹⁸ Choux de Bruxelles (feuilles)	4,9	5,5	5,4	0,90	3,65	4,25	4,85
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i> ²¹⁸ Brocoli (feuilles)	4,3	5,45	5,05	1,4	4,1	3,75	4,9
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i> ²¹⁸ Chou-fleur	4,85	6,95	5,95	1,6	3,6	4,2	5,45
<i>Brassica rapa</i> ²¹⁸ Navet (racine)	3,5	5,4	3,7	0,85	2,85	3,35	3,6
<i>Brassica rapa</i> ²¹⁸ Navet (feuilles)	3,8	6,5	5,05	1,2	4,2	3,85	4,55
<i>Brassica chinensis</i> ⁷ Chou chinois	4,6	9,3	7,1	1,9	6,2	5,2	6,1
<i>Triticum (aestivum)</i> ²¹⁸ Son	3,55	6,25	4,15	1,4	3,95	3,3	4,75
<i>Avena sativa</i> ²¹⁸ Avoine (grain)	4,25	7,1	3,6	1,6	4,75	3,15	5,25
<i>Zea mays</i> ²¹⁸ Maïs (grain)	3,75	11,6	2,8	1,85	4,7	3,7	4,8
<i>Hordeum vulgare</i> ²¹⁸ Orge (son et grain)	3,9	6,65	3,7	1,55	5,0	3,3	4,9
<i>Vicia faba</i> ²¹⁸ Fève	4,75	7,3	6,55	0,65	4,25	3,35	5,0

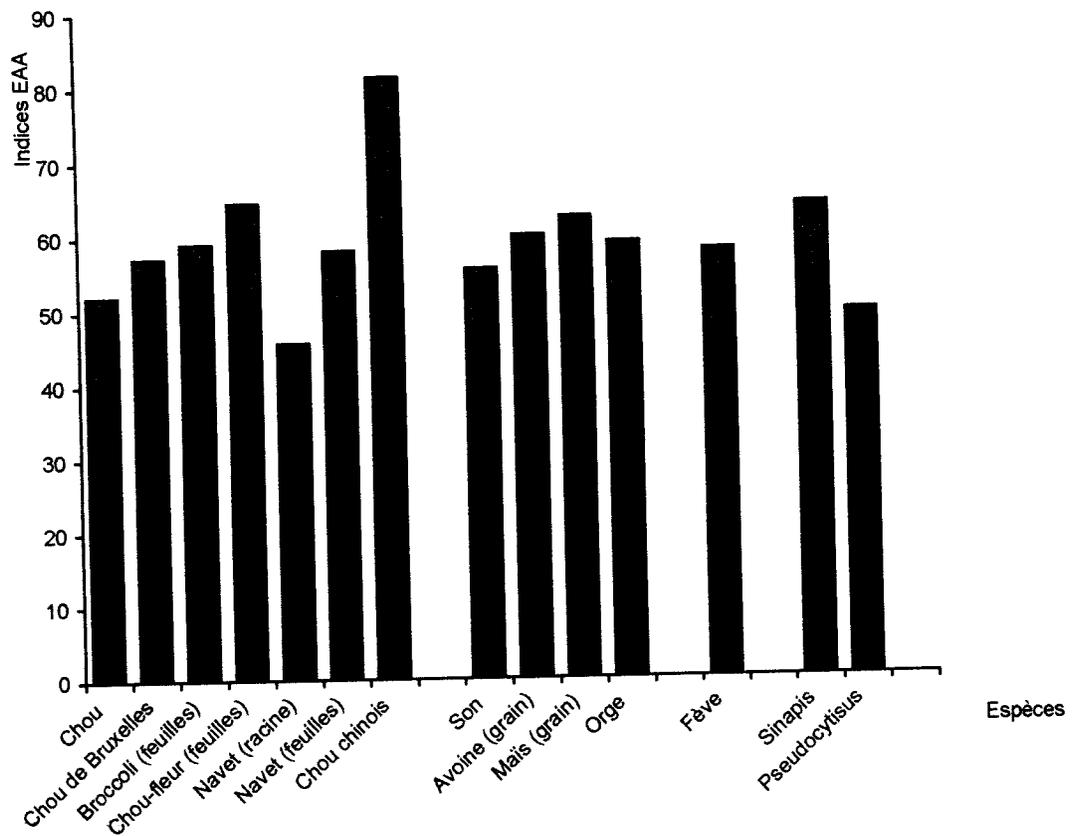


Figure 51 : Comparaison des indices EAA des deux plantes étudiées à ceux d'autres espèces.

Ces résultats (en valeur biologique) nous montrent que *Sinapis arvensis* est, comparativement, de meilleure qualité; par contre, *Pseudocytisus integrifolius*, bien que de qualité moindre, reste néanmoins intéressante.

IV.4. DOSAGE DES ELEMENTS MINERAUX

La composition minérale des produits végétaux est importante à connaître pour de plusieurs raisons, alimentaires et toxicologiques en particulier.

Le tableau, ci-après, donne la composition minérale en phosphore, calcium, magnésium, sodium et potassium.

Il s'agit d'une composition moyenne, le matériel végétal, pris en considération, est celui de la pleine floraison pour les deux plantes.

Tableau 31 : Composition en éléments minéraux de *Pseudocytisus integrifolius* et de *Sinapis arvensis*.

Partie de la plante utilisée	Espèce étudiée	
	<i>Pseudocytisus integrifolius</i>	<i>Sinapis arvensis</i>
	Feuilles	Feuilles
Matière minérale (en % de matière sèche)	15,5	8
P*	38,75	39,68
Ca*	37,59	38,09
Mg*	18,6	55,2
Na*	89,12	45,92
K*	310,6	90,71

* En mg / 100 g de matière sèche.

En comparaison à *Sinapis arvensis*, *Pseudocytisus integrifolius* a environ 50 % plus de matière minérale.

Tout d'abord, ces deux plantes se différencient nettement par leur teneur en sel caractérisé par les éléments Na et K.

Au niveau de la composition, les sels, dans *Pseudocytisus integrifolius*, représentent environ 80 % de la matière minérale et 50 % environ dans *Sinapis arvensis*.

Ces résultats (figure 52) rejoignent ceux de l'ensemble des travaux réalisés sur les crucifères²¹⁰ à savoir que cette famille est riche en potassium. Il a été établi aussi que le feuillage des crucifères est en général plus riche en Ca, P, S et surtout K, et plus faible en Mg lorsqu'on le compare à celui des graminées et des légumineuses fourragères.²¹⁹

Néanmoins, la teneur en sodium est plus importante dans *Pseudocytisus integrifolius* que dans *Sinapis arvensis*. Il y a environ 50 % plus de Na (de matière sèche) dans *Pseudocytisus integrifolius*, ceci est expliqué par le fait que cette espèce est halophyte, elle est naturellement tolérante au sel et pousse bien, voire mieux, dans cet environnement salin, Chott El Gharbi, qu'en condition normale puisqu'elle est endémique. En effet, le taux de sodium, chez les végétaux, est très faible, exception faite pour les halophytes et les algues.

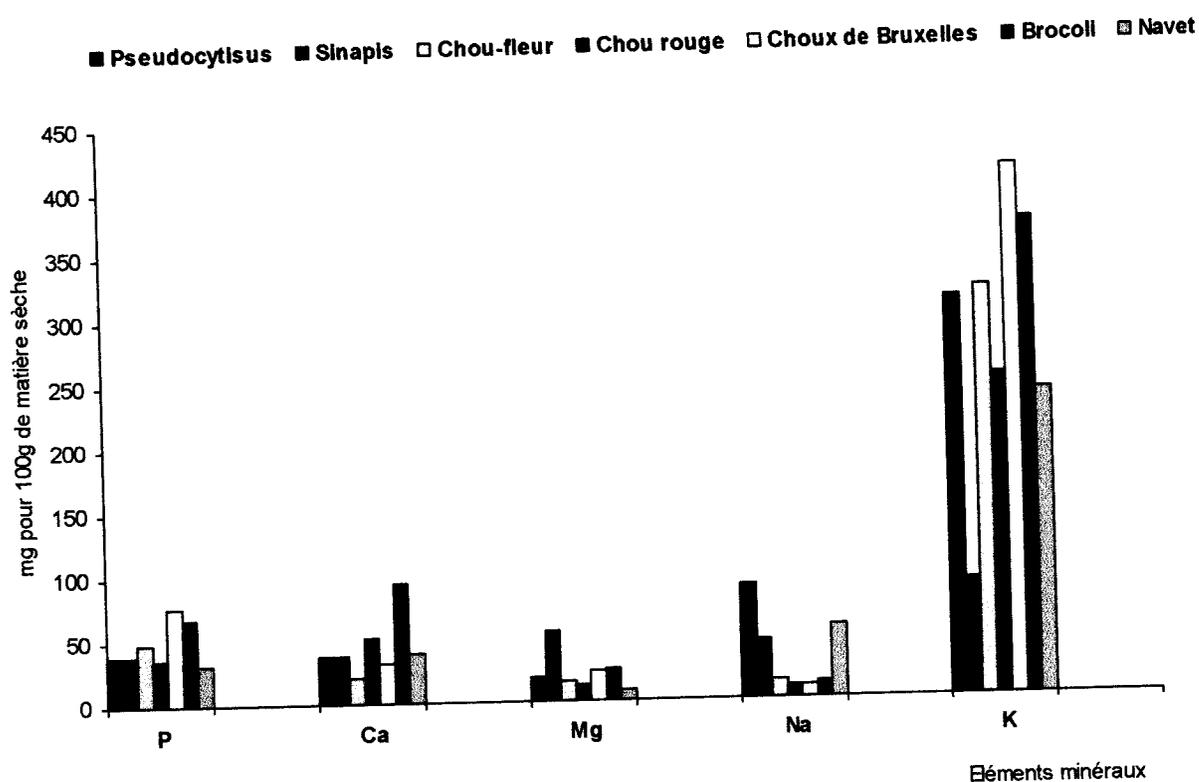


Figure 52 : Comparaison de la composition en éléments minéraux des deux plantes étudiées à d'autres espèces crucifères.

Les valeurs du phosphore sont comparables à celle du chou rouge (36 mg pour 100 g de m.s.) et du navet (31 mg pour 100 g de m.s.). Elles sont inférieures à celles du chou-fleur, des choux de Bruxelles et du brocoli. Les quantités de calcium dans les deux plantes sont comparables à celle du navet.

Sinapis arvensis présente le taux le plus élevé en magnésium, ce qui peut être expliqué par le fait qu'il est l'un des constituants de la molécule du pigment caractéristique des plantes vertes (la chlorophylle).

IV.5. CONCLUSION

Utilisées comme fourrage, pour l'alimentation des animaux (ovins, caprins et bovins), ces deux espèces ont un potentiel nutritif considérable, disponible en pâture et pour un moindre coût.

Toutes les valeurs obtenues sont à prendre avec attention, sachant qu'elles peuvent varier en fonction de la saison, du degré de maturité et des conditions pédologiques.



Pour une meilleure efficacité de ces protéines, il est possible de maximiser cette qualité nutritionnelle en les combinant à d'autres aliments protéiques, différents mais complémentaires, en vue d'une croissance optimale du bétail, par la mesure du taux de croissance des jeunes bêtes soumises au régime alimentaire proposé.



CONCLUSION GENERALE



Dans le cadre d'une stratégie de mise en valeur de produits naturels et notamment :

- Des espèces végétales appartenant aux steppes des hauts plateaux.
- Des zones arides fondées à la fois sur la productivité et la lutte contre la désertification.
- Du Chott El-Gharbi, sol salé pratiquement condamné pour l'agriculture,

notre travail a porté particulièrement sur :

- La composition chimique de *Pseudocytisus integrifolius* (Salisb.) Rehder ssp. *vella glabrescens* (Coss.) Lit. et Maire, appelée Queçdir ou El-Kasdir, qui n'a jamais fait l'objet d'aucun travail auparavant.

Comme nous l'avons déjà cité au premier chapitre de cette thèse, cette espèce peut être confondue avec d'autres espèces comme *vella pseudocytisus* ssp. *glabrata greuter*, *Vella pseudocytisus* ssp. *gomez-campo* et particulièrement *vella pseudocytisus* ssp. *pseudocytisus* commune aux pays méditerranéens et qui sont différentes de la notre.

Notre espèce a été enregistrée à l'herbarium de Nice pour la première fois (en 2003), sous le numéro Nice B-3981 et fera désormais partie des espèces répertoriées.

- A titre de comparaison, l'étude a porté sur une deuxième espèce - *Sinapis arvensis* (moutarde sauvage) - de la région semi-aride et dont les huiles essentielles n'ont jamais fait l'objet de publication.

Si dans la famille des crucifères, les espèces du genre *Brassica* jouent un rôle primordial dans l'alimentation humaine, celui-ci est plus important pour celle du bétail car elles sont fourragères.

Dans la première partie de nos travaux, nous avons tout d'abord procédé à l'extraction des huiles essentielles et à l'étude de plusieurs facteurs influençant le rendement. La période de pleine floraison, un maximum de séchage de 8 jours, un niveau de coupe de 25% de la hauteur de la plante à partir de son sommet et un temps d'extraction de 4 heures sont propices pour une extraction quantitative, mais qui reste relativement faible.

L'analyse des huiles essentielles des deux plantes a été réalisée par application de plusieurs techniques chromatographiques CG et CG-SM avec l'utilisation de colonnes capillaires, polaire (polydiméthylsiloxane) et apolaire (polyéthylène glycol).

Conclusion générale



Pour *Pseudocytisus*, elle a permis l'identification de 83 composés pour la partie aérienne, 75 composés pour les fleurs et 39 composés pour les feuilles. Les composés soufrés (9 constituants pour la partie aérienne, 7 constituants pour les fleurs et 4 constituants pour les feuilles) constituent une part importante de ces compositions. Les di- et trisulfure de diméthyle sont deux composés majoritaires dans l'huile de cette espèce.

Cette analyse a également permis de mettre en évidence la présence d'un seul isothiocyanate et d'une classe importante de composés azotés (en particulier les nitriles), notamment 9 constituants pour la partie aérienne et dont le plus important est le pent-4-ènenitrile à 31,7%. Ce composé a été isolé et identifié par fractionnement puis purifié par colonne sur gel de silice.

Pour *Sinapis arvensis*, l'analyse de ses huiles essentielles a permis d'identifier 70 composés. Les composés soufrés sont là aussi majoritaires (9 constituants). Le trisulfure de diméthyle est le constituant majoritaire puisqu'il représente à lui seul 33,6%.

Par ailleurs, et pour nos deux plantes, ces analyses ont permis une identification et une meilleure connaissance des glucosinolates présents, en notant la prépondérance de la gluconapine dans *Pseudocytisus*.

Dans la deuxième partie des travaux, nous avons testé l'huile essentielle de *Pseudocytisus* et ses composés majoritaires (le pent-4-ènenitrile et les di- et trisulfure de diméthyle) vis-à-vis de 3 souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) et 4 fongiques (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* et *Alternaria*). Les résultats se sont avérés intéressants puisqu'ils ont montré une sensibilité aux produits testés à l'exception de *Staphylococcus aureus* qui s'est montré résistant.

Dans la troisième partie, nous avons déterminé le potentiel nutritif fourrager des deux plantes. Elles sont riches en lipides totaux, sucres et protéines. Il est à remarquer que le taux d'azote protéique est plus important dans *Sinapis arvensis* que dans *Pseudocytisus integrifolius*.

La classe des acides aminés monocarboxyliques est la plus importante pour les deux espèces et particulièrement pour *Sinapis* en raison de l'abondance de la proline (3,44 g pour 100 g de matière sèche).

Sinapis arvensis est plus riche en acides aminés essentiels ce qui lui attribue une meilleure valeur biologique (avec 63,67) alors que pour *Pseudocytisus* elle est de 49,36. La

Conclusion générale



qualité des protéines est similaire à celles de certaines espèces ; pour *Sinapis*, elle est meilleure que certaines destinées à l'aliment de bétail.

La dernière partie de ce travail a été de déterminer la composition minérale, en particulier les éléments P, Ca, Mg, Na et K. Il en ressort que la matière minérale est plus importante dans *Pseudocytisus*, cette plante halophyte étant plus riche en sels et avec un taux particulièrement élevé en Na.

L'espèce endémique, *Pseudocytisus*, est menacée de disparition. Cette menace doit faire l'objet d'une attention particulière. Le Haut Commissariat au Développement de la Steppe (H. C. D. S.), soucieux de la préservation des espèces steppiques pérennes, s'attache actuellement à cette noble tâche.

Ainsi, à la vue des résultats obtenus, différentes conclusions et perspectives peuvent être considérées :

- Assurer la pérennité de l'espèce *Pseudocytisus* par une mise en valeur du paysage du Chott El-Gharbi. Une nouvelle vision de la gestion de cette région aride permettra, en proposant à la population autochtone, voire en l'obligeant, de diminuer la charge pastorale et à en augmenter, avec l'aide et/ou le support des services concernés (Forêts, Agriculture, Wilaya...) la plantation de cette espèce autour du Chott et, pourquoi pas, prospecter d'autres zones favorables à son développement tel que le Chott El-Chergui.
- De développer et intensifier cette production fourragère remarquablement adaptée à la sécheresse, à la salinité du sol et qui aide à lutter contre l'ensablement. En effet, son potentiel nutritif considérable d'une part et son aspect très économique (exigences nutritives très modestes) d'autre part, permettront une meilleure exploitation de cette ressource. Pour le bétail, il serait simplement nécessaire d'améliorer la qualité nutritionnelle par l'ajout d'aliments différents mais complémentaires et déterminer peut être les facteurs antinutritionnels. Pour les autochtones, cette espèce fournit aussi du bois nécessaire au chauffage et à la cuisson.
- Tester la sensibilité des insectes touchant le secteur agroalimentaire vis-à-vis des composés soufrés, en particulier le disulfure de diméthyle dont la toxicité est reconnue.

Conclusion générale



- A l'issue des travaux antérieurs, dans lesquels les propriétés pesticides des composés volatils soufrés des crucifères ont été prouvées et des résultats des tests microbiologiques que nous avons obtenus, il serait très intéressant d'utiliser cette ressource végétale naturelle pour son potentiel fongicide.
- L'interdiction depuis 2005, d'utilisation du bromure de méthyle (fumigène largement utilisé), due à la réduction de la couche d'ozone, permet une très bonne alternative : utilisation de cette plante comme source potentielle de disulfure de diméthyle qui semble être efficace pour lutter contre les ravageurs des denrées stockées.

Aussi, l'intérêt suscité par cette plante nous pousse à poursuivre les travaux, en particulier compléter sa connaissance par l'étude de ses graines.

Conclusion générale



LITTERATURE CITEE



- [1] **UNESCO.**
Les plantes médicinales des régions arides.
Recherche sur les zones arides. 1960 ; 99.
- [2] **P. Ozenda.**
Flore du Sahara. Ed. CNRS. Paris. 1979 ; 622.
- [3] **P. Quezel, S. Santa.**
Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique. Paris. 1962 ; 401.
- [4] **N. Benabadji.**
Physionomie, organisation et composition floristique des atriplexaies au sud de Tlemcen (Chott El-Gharbi).
Atriplex in vivo 1999 ; 8 ; 1-6.
- [5] **S.I. Warwick, A. Francis, J. La Flèche.**
In guide to wild germplasm of *Brassica* and allied crops (tribe *Brassicaceae*, *Brassicaceae*). 2nd Ed. Electronic product published by Agriculture and Agri-Food Canada, Eastern Cereal and Oilseed Research Centre: Ottawa, CA. 2000.
- [6] **J.W. Fahey, A.T. Zalemann, P. Talalay.**
The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants.
Phytochemistry 2001 ; 56 ; 5-51.
- [7] **S. Nagy, L. Telek, N.T. Hall, R.E. Berry.**
Potential food uses for protein from tropical and subtropical plant leaves.
Journal of Agric. Food Chem. 1978 ; 26(5) ; 1016-1028.
- [8] **C. Humphries.**
Trypsin inhibitors in leaf protein concentrate.
Journal of Sci. Food Agric. 1980 ; 31 ; 1225-1230.
- [9] **R. Carlsson.**
Nutritive value of leaf protein concentrates from tropical legume and from leaves of forest trees.
Nut. Rep. intern. 1984 ; 30(1) ; 87-94.
- [10] **G. Savangika, M. Ohshima.**
Application of in-vitro methods to assess the nutritive value of leaf protein concentration.
Journal of Agric. Food Chem. 1987 ; 35 ; 82-85.
- [11] **K. Gupta, D.S. Wagle.**
Nutritional and antinutritional factors of green leaf vegetable.
Journal of Agric. Food Chem. 1988 ; 36 ; 472-474.
- [12] **P. Ozenda.**
Flore du Sahara. Ed. CNRS. Paris. 1958 ; 250-273.
- [13] **R. Maire.**
Flore de l'Afrique du Nord, Vol.XIV: Dicotyledonae : Rhoeadale, Sarracéniales, Rosale.
Ed. Le Chevalier. Paris. 1976.



- [14] **O.E. Schulz.**
In Cruciferae; Engler, A. Eds.; Die natürlichen Pflanzenfamilien, 2, 17 b, Engelmann: Leipzig, Germany, 1936 ; 227-658.
- [15] **M.B. Crespo, M.D. Lledó, M.F. Fay, M.W. Chase.**
Subtribe Vellinae (*Brassicaceae*, *Brassicaceae*): a combined analysis of ITS nr DNA sequence and morphological data.
Ann. Bot. 2000 ; 86 ; 53-62.
- [16] **A. Rehder.**
Pseudocytisus and *vella*.
J. Arnold arbor. Harv. Univ. 1927 ; 8 ; 22-24.
- [17] **N. Benabadji, M. Bouazza.**
Contribution à l'étude du cortège floristique de la steppe au sud d'El Aricha (Oranie, Algérie).
Sci. Technol. 2002 ; 17 ; 1-9.
- [18] **L. Emberger.**
La végétation de la région méditerranéenne. Essai d'une classification des groupements végétaux.
Rev. Gén. Bot. 1930 ; 183-246.
- [19] **G. Garnier, L. Bézanger-Beauquesne, G. Debraux.**
Ressources médicinales de la flore française. Tome 1,
Eds. Vigot frères. Paris. 1961 ; 536-537.
- [20] **A. A. Pokrovsky.**
Composition chimique de produits alimentaires. Moscou, 1976.
- [21] **E. Menegatti, S. Palmieri, P. Walde, P. L. Luisi.**
Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from white mustard *Sinapis alba* L.
J. Agric. Food Chem. 1985 ; 33 ; 784-789.
- [22] **A. J. Pollard, A. J. M. Baker.**
Deterrence of herbivory by zinc hyperaccumulation in *Thlaspi caerlescens* (*Brassicaceae*).
New phytologist. 1997 ; 135 ; 655-658.
- [23] **G. Rossi, A. Figliolia, S. Socciarelli and B. Pennelli.**
Capability of *Brassica napus* to accumulate cadmium, zinc and copper from soil.
Acta Biotechnologia 2002 ; 22 issue 1-2 ; 133-140.
- [24] **K. R. Wang.**
Tolerance of cultivated plants to cadmium and their utilization in polluted farmland soils.
Acta Biotechnologia 2002 ; 22 issue 1-2 ; 189-198.
- [25] **G. Rossi, A. Figliolia, S. Socciarelli.**
Zinc and copper bioaccumulation in *Brassica napus* at flowering and maturation.
Engineering in Life Sciences 2004 ; 4 issue 3 ; 271-275.
- [26] **Z.-T. Xiong, H. Wang.**
Copper toxicity and bioaccumulation in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.).
Environmental Toxicology 2005 ; 20 issue 2 ; 188-194.
- [27] **A. B. Durkee, J. B. Harborne.**
Flavonol glycosides in *Brassica* and *Sinapis*.
Phytochemistry 1973 ; 12 ; 1085-1089.



- [28] **G. B. Lockwood, A. Belkhiri.**
Glucosinolates spectrum of some Algerian *Cruciferae*.
Pl. Syst. Evol. 1991 ; 176 ; 11-20.
- [29] **N. Bettach, J. Banoub, M. Delmas.**
Etude comparative des graines de crucifères du genre *Lepidium*, *Eruca*, *Diplotaxis* et *Sinapis II*. Caractérisation des stérols.
Oléagineux, Corps gras, Lipides. (Fiche technique) (mars-avril). 1997; 2(4) ; 152-156.
- [30] **A. A. Ali, H. A. Hassanean, M. H. Mohammed, S. M. Kamel, E. S. El-Khayat.**
Chemical and biological studies of *Sinapis arvensis* growing in Egypt.
Bull. Pharm. Sci. 2000 ; 23 ; 99-109.
- [31] **R. Danielak., B. Borkowski.**
Biologically active compounds in seeds of crucifers. Part III. Chromatographical search for glucosinolates.
Dissertations of pharmacy and pharmacology 1969 ; 21 ; 563-575.
- [32] **R.A. Cole.**
Isothiocyanates, nitriles and thiocyanates as products of autolysis of glucosinolates in *Cruciferae*.
Phytochemistry 1976 ; 15 ; 759-762.
- [33] **X. Hasapis, A. J. Mac Leod, M. Moreau.**
Glucosinolate of nine *Cruciferae* and two *Capparaceae* species.
Phytochemistry 1981 ; 20 ; 2355-2358.
- [34] **M. E. Daxenbichler, G. F. Spencer, D. G. Carlson, G. B. Rose, A. M. Brinker, R. G. Powell.**
Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants.
Phytochemistry 1991 ; 30 ; 2623-2638.
- [35] **M. L. Sankaranarayana, B. Raghavan, C. P. Natar-Ajan.**
Mustard – varieties, chemistry and analysis.
Lebensmittel-wissenschaft und-Technologie 1972 ; 5 ; 191-197.
- [36] **S. R. Webb, J. C. Hall.**
Auxinic herbicide-resistant and -susceptible wild mustard (*Sinapis arvensis L.*) biotypes: effects of auxinic herbicides on seedling growth and auxin-binding activity.
Pestic. Biochem. and Physiol. 1995 ; 52 ; 137-148.
- [37] **S. Desphande, J. C. Hall.**
ATP-dependent auxin-and auxinic herbicide-induced volume changes in isolated protoplast suspensions from *Sinapis arvensis L.*
Pestic. Biochem. and Physiol. 1996 ; 56 ; 26-43.
- [38] **S. Desphande, J. C. Hall.**
Auxinic herbicide resistant may be modulated at the auxin-binding site in wild mustard (*Sinapis arvensis L.*) : a light scattering study.
Pestic. Biochem. Physiol. 2000 ; 66 ; 41-48.
- [39] **M. D. Devine, S. O. Duke, C. Fedtke.**
Herbicides with auxin activity in “physiology of herbicide action”. Prentice-Hall International. Englewood Cliffs, N.J. 1993 ; 295-309.
- [40] **J. Simpson, E. G. Halliday.**
The behavior of sulfur compounds in cooking vegetable.
J. Home Econ. 1928 ; 20 ; 121-126.



- [41] **G. P. Dateo, R. C. Clapp, D. A. M. McKay, E. J. Hewitt, T. Hasselstrom.**
Identification of the volatile sulfur components of cooked cabbage and the nature of the precursors in the fresh vegetable.
Food Research 1957 ; 22 ; 440-447.
- [42] **S. D. Bailey, M. L. Bazinet, J. L. Dricoll, A. I. McCarthy.**
The volatile sulfur components of cabbage.
J. Food Sci. 1961 ; 26 ; 163-170.
- [43] **F. S. Hing, K. G. Weckel.**
Some volatiles components of cooked rutabaga.
J. Food Sci. 1964 ; 29 ; 1-9.
- [44] **A. J. Mac Leod, G. Mac Leod.**
Flavor volatiles of some cooked vegetables.
J. Food Sci. 1970 ; 35 ; 734-738.
- [45] **R. G. Buttery, D. G. Guadagni, L. C. Ling, R. M. Seifert, W. Lipton.**
Additional volatile components of cabbage, broccoli and cauliflower.
J. Agric. Food Chem. 1976 ; 24(4) ; 829-832.
- [46] **H. J. Van Langenhove, C. P. Cornelis, N. M. Schamp.**
Identification of volatiles emitted during the blanching process of Brussels sprouts and cauliflower.
J. Sci. Food Agric. 1991 ; 55(3) ; 483-487.
- [47] **H. -W. Chin, R. C. Lindsay.**
Volatile sulfur compounds formed in disrupted tissues of different cabbage cultivars.
J. Food Sci. 1993 ; 58(4) ; 835-839.
- [48] **F. T. Maruyama.**
Identification of dimethyl disulfide as a major aroma component of cooked Brassicaceous vegetables.
J. Food Sci. 1970 ; 35 ; 540-543.
- [49] **M. R. Altamura, L. Long Jr, T. Hasselstrom.**
Goitrin from fresh cabbage.
J. Biol. Chem. 1959 ; 234(7) ; 1847-1849.
- [50] **R. C. Clapp, L. Long Jr, G. P. Dateo, F. H. Bisset, T. Hasselstrom**
The volatile isothiocyanates in fresh cabbage.
J. Am. Chem. Soc. 1959 ; 81 ; 6278-6291.
- [51] **A. J. Mac Leod, G. Mac Leod.**
Volatiles of cooked cabbage.
J. Sci. Food Agric. 1968 ; 19 ; 273-277.
- [52] **A. J. Mac Leod, H. E. Pikk.**
Volatile flavor component of fresh and preserved Brussels sprouts grown at different crops spacings.
J. Food Sci. 1979 ; 44 ; 1183-1190.
- [53] **T. W. Pearson, H. J. Dawson, H. B. Lackey.**
Natural occurring levels of dimethyl sulfoxide in selected fruits, vegetables, grains and beverages.
J. Agric. Food Chem. 1981 ; 29 ; 1089-1091.



- [54] **E. Engel, C. Baty, D. Le Corre, I. Souchon, N. Martin.**
Flavor-active compounds potentially implicated in cooked cauliflower acceptance.
J. Agric. Food Chem. 2002 ; 50 ; 6459-6467.
- [55] **L. Valette, X. Fernandez, S. Poulain, A.-M. Loiseau, L. Lizzani-Cuvelier, R. Leveil, L. Restier.**
Volatile constituents from Romanesco cauliflower.
Food Chem. 2003 ; 80(3) ; 353-358.
- [56] **L. Valette, X. Fernandez, S. Poulain, L. Lizzani-Cuvelier, A.-M. Loiseau.**
Chemical composition of the volatile extracts from *Brassica oleracea* L. var. *botrytis* Romanesco cauliflower seeds.
Flavor and Fragrance Journal 2005 ; 21 issue 1 ; 107-110.
- [57] **L. Valette.**
Etude de nouvelles variétés de crucifères. Importance des composés soufrés volatiles.
Thèse de Doctorat en Sciences de l'U.N.S.A. Discipline : Chimie Organique. 2005.
- [58] **A. J. MacLeod, G. MacLeod.**
Effects of variations in cooking methods on the flavor volatiles of cabbage.
J. Food Sci. 1970 ; 35 ; 744-750.
- [59] **L. F. Dicesare, E. L. Fusari, A. Maestrelli, A. Avitabile Leva, V. Ferrari.**
Componenti volatili caratteristici del cavolfiore « romanesco » crudo e dopo cottura.
Industrie Alimentari 2001 ; XL(405) ; 751-754.
- [60] **L. F. Dicesare, R. Vitale, D. Viscardi, A. Maestrelli, V. Ferrari.**
Indagini sulla composizione volatile del cavolfiore cotto con metodi tradizionali e microonde.
Industrie Alimentari 2002 ; XLI(419) ; 1208-1212.
- [61] **A. J. MacLeod, G. MacLeod.**
The flavor volatiles of dehydrated cabbage.
J. Food Sci. 1970 ; 35 ; 739-743.
- [62] **C. F. Forney, J. P. Mattheis, R. K. Austin.**
Volatiles compounds produced by broccoli under anaerobic conditions.
J. Agric. Food Chem. 1991 ; 39 ; 2257-2259.
- [63] **E. Derbali, J. Makhoulouf, L.-P. Vezina.**
Biosynthesis of sulfur volatile compounds in broccoli seedlings stored under anaerobic conditions.
Postharvest Biol. Technol. 1998 ; 13 ; 191-204.
- [64] **A.Z. Tulio, H. Yamanaka, Y. Ueda, Y. Imahori.**
Formation of methanethiol and dimethyl disulfide in crushed tissues of broccoli florets and their inhibition by freeze-thawing.
J. Agric. Food Chem. 2002 ; 50 ; 1502-1507.
- [65] **A.Z. Tulio, H. Yamanaka, Y. Ueda, Y. Imahori, K. Chakin.**
Reversible and irreversible emission of methanethiol and dimethyl disulfide for anaerobically stored broccoli.
J. Agric. Food Chem. 2003 ; 51 ; 6774-6781.
- [66] **A. J. MacLeod, M. L. Nussbaum.**
The effects of different horticultural practices on the chemical composition of some cabbage cultivars.
Phytochemistry 1977 ; 16 ; 861-865.



- [67] **A. J. MacLeod, H. E. Pikk.**
A comparison of the chemical flavor composition of some Brussels sprouts cultivars grows at different crop spacings.
Phytochemistry 1978 ; 17; 1029.
- [68] **C. Hawkes, T. H. Coaker.**
Factors affecting the behavioral responses of the adult cabbage root fly *Delva brassica* to host plant odor.
Entomol. Exp. Appl. 1979 ; 25 ; 45-58.
- [69] **A. Blaakmeer, J. B. F. Geewliet, J. J. A. Van Loon, M. A. Posthumus, T. A. Van Beeck, Ae. de Groot.**
Comparative headspace analysis of cabbage plants damaged by two species of *Pieris caterpillars* : consequences for in-flight host location by *Cotesia parasitoids*.
Entomol. Exp. Appl. 1994 ; 73 ; 175-182.
- [70] **H. S. Marks, J. A. Hilson, H. C. Leichtweis, G. S. Stoewsand.**
S-methylcysteine sulfoxide in *Brassica* vegetables and formation of methyl methanethiosulfinate from Brussels sprouts.
J. Agric. Food Chem. 1992 ; 40 ; 2098-2101.
- [71] **R. Kubec, M. Svobodova, J. Velisek.**
Gas-chromatographic determination of S-methylcysteine sulfoxide in cruciferous vegetables.
Eur. Food Res. -Technol. 2001 ; 213 ; 368-388.
- [72] **J. A. Lewis, G. R. Fenwick, A. R. Gray.**
Glucosinolates in *Brassica* vegetables : green-curded cauliflowers (*Brassica oleracea L.* Botrytis group) and purple-headed broccoli (*Brassica oleracea L. Italica* group).
Lebensm. -Wiss. U. Technol. 1991 ; 24 ; 361-363.
- [73] **I. Schonhof, A. Krumbein, B. Brückner.**
Genotypic effects on glucosinolates and sensory properties of broccoli and cauliflower.
Nahrung 2004 ; 48(1) ; 25-33.
- [74] **R. H. Smith.**
Kale poisoning : the *Brassica* anaemia factor.
Veterinary Record 1980 ; 107 ; 12-15.
- [75] **H. G. Maier.**
Volatile flavoring substances in foodstuffs.
Angew. Chem. Int. Ed. 1970 ; 9(12) ; 917-926.
- [76] **L. Schutte.**
Precursors of sulfur-containing flavor compounds.
CRC Crit. Rev. Food Technol. 1974 ; 4(4) ; 457-505.
- [77] **G. Takeoka.**
Flavor chemistry of vegetables. in Flavor chemistry : Thirty years of Progress. R. Teranishi, E. L. Wick, I. Hornstein (Eds.) ; Kluwer Academic / Plenum publishers ; New York (U.S.) ; 1999 ; 287-304.
- [78] **P. Shreier.**
Biogenesis of plant aromas. in Developments in Food Flavors. G. G. Birch, M. G. Lindley (Eds.) ; Elsevier Appli. Sci.; London (U.K.) 1986 ; 89-106.



- [79] **F. B. Whitfield.**
Volatiles from interactions of Maillard reactions and lipids.
CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **1992** ; 31 ; 1-58.
- [80] **L.-C. Maillard.**
Action des acides amines sur les sucres ; formation des mélanoidines par voie méthodique.
C. R. Acad. Sci. **1912** ; 154 ; 66-68.
- [81] **G. Vernin, J. Metzger, T. Obretenov.**
La réaction de Maillard.
Actualité chimique **1983** ; 3 ; 7-14.
- [82] **E. Block.**
The organosulfur chemistry of the genus *Allium*-Implication for the organic chemistry of sulfur.
Angew. Chem. Int. Ed. **1992** ; 31(9) ; 1135-1178.
- [83] **M. H. Brodnitz, J. V. Pascale.**
Thiopropional S-Oxide : a lacrymatory factor in onions.
J. Agric. Food Chem. **1971** ; 19(2) ; 269-272.
- [84] **J. F. Thompson, R. K. Gering.**
Biosynthesis of S-methylcysteine in radish leaves.
Plant physiol. **1966** ; 41(8) ; 1301-1307.
- [85] **W. N. Arnold, J. F. Thompson.**
The formation of (+)S-methyl-L-cysteine sulfoxide from S-methyl-L-cysteine in crucifers.
Biochem. Biophys. Acta **1962** ; 57 ; 604-606.
- [86] **C. J. Morris, J. F. Thompson.**
The identification of (+)S-methyl-L-cysteine sulfoxide in plants.
J. Am. Chem. Soc. **1956** ; 78 ; 1605-1608.
- [87] **R. L. M. Synge, J. C. Wood.**
(+)- (S-methyl-L-cysteine S-oxide) in cabbage.
Biochem. J. **1956** ; 64 ; 252-259.
- [88] **M. Mazelis.**
Demonstration and characterization of cysteine sulfoxide lyase in the *cruciferae*.
Phytochemistry **1994** ; 2(1) ; 15-21.
- [89] **A. Hamamoto, M. Mazelis.**
The C-S lyases of higher plants. Isolation and properties of homogeneous cystine lyase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) buds.
Plant physiol. **1986** ; 80(3) ; 702-706.
- [90] **H.-W. Chin, R. C. Lindsay.**
Mechanisms of formation of volatile sulfur compounds following the action of cysteine sulfoxide lyase.
J. Agric. Food Chem. **1994** ; 42(7) ; 1529-1536.
- [91] **M. Boelens, P. J. de Valois, H. J. Wobben, A. Van der Gen.**
Volatile flavor compounds from onion.
J. Agric. Food Chem. **1971** ; 19 ; 984-991.



- [92] **J. H. Di Pentina, J. J. Rios, A. Clemente, J. M. Olias.**
Biogenesis of off-odor in broccoli storage low oxygen atmosphere.
J. Agric. Food Chem. 1995 ; 43(5) ; 1310-1313.
- [93] **J. M. Attieh, A. D. Hanson, H. S. Saini.**
Purification and characterization of a novel methyl transferase responsible for biosynthesis of halomethane and methanethiol in *Brassica oleracea*.
J. Biol. Chem. 1995 ; 270(16) ; 9250-9257.
- [94] **J. Bruneton.**
Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.
3^{ème} Edition. Tec. et Doc. Eds Lavoisier, Paris. 1999 ; 199-202.
- [95] **M. G. Ettlinger, A. J. Lundeen.**
The structures of sinigrin and sinalbin : an enzymatic rearrangement.
J. Am. Chem. Soc. 1956 ; 78 ; 4172-4173.
- [96] **M. G. Ettlinger, A. J. Lundeen.**
First synthesis of a mustard oil glucoside : the enzymatic lossen rearrangement.
J. Am. Chem. Soc. 1957 ; 79 ; 1764-1765.
- [97] **J. E. Rodman.**
A taxonomic analysis of glucosinolate-proceeding plants. Part I : phenetics.
Systematic Botany 1991 ; 16 ; 598-618.
- [98] **J. E. Rodman.**
A taxonomic analysis of glucosinolate-proceeding plants. Part II : phenetics.
Systematic Botany 1991 ; 16 ; 619-629.
- [99] **R. Mithen, B. G. Lewis, R. K. Heaney, G.R. Fenwick.**
Glucosinolate of wild and cultivated *Brassica* species.
Phytochemistry 1987 ; 26 ; 1969-1973.
- [100] **E. A. S. Rosa, R. K. Heaney, G. R. Fenwick, C. A. M. Portas.**
Glucosinolates in crop plants.
Hort. Rev. 1997 ; 19 ; 99-215.
- [101] **K. L. Falk, C. Vogel, S. Textor, S. Bartram, A. Hick, J. A. Pickett, J. Gershenzon.**
Glucosinolate biosynthesis: demonstration and characterization of the condensing enzyme of the chain elongation cycle in *Eruca sativa*.
Phytochemistry 2004 ; 65(8) ; 1073-1084.
- [102] **C. H. Van Etten, J. E. Daxenbichler, J. E. Peters, H. L. Tookey.**
Variations in enzymatic degradation products from the major thioglucosides in *Crambe abyssinica* and *Brassica napus* seed meals.
J. Agric. Food Chem. 1966 ; 14 ; 426-430.
- [103] **A. J. MacLeod, J. T. Rossiter.**
Isolation and examination of thioglucoside glucohydrolase from seeds of *Brassica napus*.
Phytochemistry 1986 ; 25(5) ; 1047-1051.
- [104] **A. J. MacLeod, J. T. Rossiter.**
Degradation of 2-hydroxybut-3-enyl glucosinolate (progoitrin).
Phytochemistry 1987 ; 26(3) ; 669-673.
- [105] **G. S. Stoewsand.**
Bioactive organosulfur phytochemicals in *Brassica oleracea* vegetables. A review.
Food Chem. Toxicol. 1995 ; 33(6) ; 537-543.



- [106] **M. E. Daxenbichler, C.H. Van Etten, I. A. Wolff.**
 (S)- and (R)-1-cyano-2-hydroxy-3-butene from myrosinase hydrolysis of epi-progoitrin and progoitrin.
Biochemistry 1966 ; 5(2) ; 692-697.
- [107] **J. T. O. Kirk, C. G. Macdonald.**
 1-cyano-3,4-epithiobutane : a major product of glucosinolate hydrolysis in seeds from certain varieties of *Brassica campestris*.
Phytochemistry 1974 ; 13 ; 2611-2615.
- [108] **R. A. Cole.**
 1-cyanoepithioalkanes : major product of alkenyl glucosinolate hydrolysis in certain *cruciferae*.
Phytochemistry 1975 ; 14 ; 2293-2294.
- [109] **R. J. Petroski, H. L. Tookey.**
 Interactions of thioglucoside glucohydrolase and epithiospecifier protein of cruciferous plants to form 1-cyanoepithioalkanes.
Phytochemistry 1982 ; 21(8) ; 1903-1905.
- [110] **A. J. MacLeod, J. T. Rossiter.**
 The occurrence and activity of epithiospecifier protein in some *cruciferae* seeds.
Phytochemistry 1985 ; 24(9) ; 1895-1898.
- [111] **N. V. Matusheski, J. A. Juvik, E.H. Jefferey.**
 Heating decreases epithiospecifier protein activity and increases sulforaphane formation in broccoli.
Phytochemistry 2004 ; 65 ; 1273-1281.
- [112] **C.H. Van Etten, M. E. Daxenbichler, P. H. Williams, W. F. Kwolek.**
 Glucosinolates and derived products in cruciferous vegetables. Analysis of the edible part from twenty two varieties of cabbage.
J. Agric. Food Chem. 1976 ; 24(3) ; 452-455.
- [113] **M. E. Daxenbichler, C.H. Van Etten, G. F. Spencer.**
 Glucosinolates and derived products in cruciferous vegetables. Identification of organic nitriles from cabbage.
J. Agric. Food Chem. 1977 ; 25(1) ; 121-124.
- [114] **G. C. Papavizas, J. A. Lewis.**
 Effect of amendments and fungicides on *Aphanomyces* root rot of peas.
Phytopathology 1971 ; 61 ; 215-220.
- [115] **M. K. Y. Chan, R. C. Close.**
Aphanomyces root rot of peas 3. Control by the use of cruciferous amendments. N. Z.
J. Agric. Res. 1987 ; 30 ; 225-233.
- [116] **J. F. Angus, P. A. Gardner, J. A. Kirkegaard, J. M. Desmarchelier.**
 Biofumigation : Isothiocyanates released from *Brassica* roots inhibit growth of the take-all fungus.
Plant Soil 1994 ; 162 ; 107-112.
- [117] **A. Gamliel, J. J. Stapleton.**
 Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues.
Phytopathology 1993 ; 83 ; 899-905.



- [118] **L. M. Manici, L. Lazzeri, S. Palmieri.**
In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi.
J. Agric. Food Chem. 1997 ; 45(7) ; 2768-2773.
- [119] **E. P. Lichtenstein, D. G. Morgan, C. H. Mueller.**
 Naturally occurring insecticides in cruciferous crops.
J. Agric. Food Chem. 1964 ; 12(2) ; 158-161.
- [120] **H. Mojtahedi, G. S. Santo, A. N. Hang, J. H. Wilson.**
 Suppression of root-knot nematode populations with selected rapeseed cultivars as green manure.
J. Nematol. 1991 ; 23 ; 170-174.
- [121] **L. Lazzeri, R. Tacconi, S. Palmieri**
In vitro activity of some glucosinolates and their reaction products toward a population of the nematode *Heterodera schachtii*.
J. Agric. Food Chem. 1993 ; 41(5) ; 825-829.
- [122] **S. F. Vaughn, R. A. Boydston.**
 Volatile allelochemicals released by crucifer green manures.
J. Chem. Ecol. 1997 ; 23(9) ; 2107-2116.
- [123] **W. Mason-Sedun, R. S. Jessop, J. V. Lovett.**
 Differential phytotoxicity among species and cultivars of the genus *Brassica* to wheat.
Plant Soil 1986 ; 93 ; 3-16.
- [124] **C. L. Vera, D. I. Mc Gregor, R. K. Dawney.**
 Detrimental effects of volunteer *Brassica* on production of certain cereal and oilseed crops.
Can. J. Plant Sci. 1987 ; 67 ; 983-995.
- [125] **W. Oleszek.**
 Allelopathic effects of volatiles from some *Cruciferae* species on lettuce barnyard grass and wheat growth.
Plant Soil 1987 ; 102 ; 271-273.
- [126] **C. J. Dannaker, I. R. White.**
 Cutaneous allergy to mustard in a salad maker.
Contact Dermatis 1987 ; 16(4) ; 212-214.
- [127] **W. Hemmer, M. Focke, F. Wantke, S. Jager, M. Gotz, R. Jarisch.**
 Oilseed rape pollen is a potentially relevant allergen.
Clin. Exp. Allergy 1997 ; 27(2) ; 156-161.
- [128] **A. M. Chesney, T. A. Clauson, B. Webster.**
 Endemic goitre in rabbits. I. Incidence and characteristics.
Bul. Johns Hopkins Hosp. 1928 ; 43 ; 261-290.
- [129] **I.T. Johnson.**
 Glucosinolates: Bioavailability and importance to health.
Int. J. Vitam. Nutr. Res. 2002 ; 72(1) ; 26-31.
- [130] **G. Brandi, G. F. Schiavano, N. Zaffaroni, C. De Marco, M. Paiardini, B. Cervasi, M. Magnani.**
 Mechanisms of action and antiproliferative properties of *Brassica Oleracea* juice in human breast cancer cell lines.
J. Nutr. 2005 ; 135(6) ; 1503-1509.



- [131] **R. Munday, C. M. Munday.**
Induction of phase II detoxification enzymes in rats by plant-derived isothiocyanates: comparison of allyl isothiocyanate with sulforaphane and related compounds.
J. Agric. Food Chem. 2004 ; 52(7); 1867-1871.
- [132] **Y. Zhang, P. Talalay, C.-G. Cho, G. H. Posner.**
A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure.
Proc. Natl. Acad. Sci. 1992 ; 89 ; 2399-2403.
- [133] **J. W. Fahey, P. Talalay.**
Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of phase II detoxification enzymes.
Food Chem. Toxicol. 1999 ; 37 ; 973-979.
- [134] **J. W. Fahey, K. K. Stephensen.**
Cancer chemoprotective effects of cruciferous vegetables.
Hort Science 1999 ; 34(7) ; 1159-1163.
- [135] **R. Verherk, M. Dekker, W. M. F. Jongen.**
Post-harvest increase of indolyl glucosinolates in response to chopping and storage of *Brassica* vegetables.
J. Sci. Food Agric. 2001 ; 81(9) ; 953-958.
- [136] **F. Vallego, F. A. Tomàs-Barberan, C. Garcia-Viguera.**
Glucosinolates and vitamin C content in edible parts of broccoli florets after domestic cooking.
Eur. Food Res. Technol. 2002 ; 215 ; 310-316.
- [137] **D. T. H. Verhoeven, H. Verhagen, R. A. Goldbohm, P. A. Van Der Brandt, G. Van Poppel.**
A mini-review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by *Brassica* vegetables.
Chemico-Biological Interactions 1997 ; 103 ; 79-129.
- [138] **M. M. Kushad, A. F. Brown, A. C. Kurilich, J. A. Juvik, B. P. Klein, M. A. Wallig, H. Jeffrey.**
Variation of glucosinolates in vegetable crops of *Brassica oleraceae*
J. Agric. Food Chem. 1999 ; 47(4); 1541-1548.
- [139] **L. G. West, K. A. Meyer, B. A. Balch, F. J. Rossi, M. R. Schultz, G. W. Haas.**
Glucoraphanin and 4-hydroxyglucobrassicin contents in seeds of 59 cultivars of broccoli, raab, kohlrabi, radish, cauliflower, Brussels sprouts, kale and cabbage.
J. Agric. Food Chem. 2004 ; 52(4); 916-926.
- [140] **J. W. Fahey.**
Development of novel highly chemoprotectant crucifer germplasm.
US Patent 2003 ; 6 ; 521,818.
- [141] **S. M. Getahun, F.-L. Chung.**
Conversion of glucosinolates to isothiocyanates in humans after ingestion and cooked watercress.
Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 1999 ; 8 ; 447-451.
- [142] **G. Rouzand, S. A. Young, A. J. Duncan.**
Hydrolysis of glucosinolates to isothiocyanates after ingestion of raw or microwaved cabbage by human volunteers.
Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 2004 ; 13 ; 125-131.



- [143] **J. Bruneton.**
Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.
3^{ème} Ed. Tech. et Doc. Eds. Lavoisier. Paris. 1999 ; 783.
- [144] **J. Memelink, R. Verpoort, J. W. Kijine.**
Organization of jasmonate responsive gene expression in alkaloid metabolism.
Trends in Plant Science 2001 ; 6 ; 212-221.
- [145] **J. B. Harborne**
The flavonoïds. Advances in research since 1986.
Eds. Chapman and Hall. London. 1993 ; 652.
- [146] **A. Cavé.**
Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.
2^{ème} Ed. Tech. et Doc. Ed. Lavoisier, Paris. 1993 ; 274-285.
- [147] **A. Scalbert.**
Antimicrobial properties of tannins.
Phytochemistry 1991 ; 30 ; 3875-3883.
- [148] **J. Bruneton.**
Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.
3^{ème} Ed. Tech. et Doc. Eds. Lavoisier. Paris. 1999 ; 370-388.
- [149] **M. Paris, M. Hurabielle.**
Abrégé de matière médicale "pharmacognosie". Tome 1. Généralités, morphologie.
Ed. Masson. Paris. 1981 ; 182-216.
- [150] **C. A. Rodrigues, A. E. Oliveira, A. F. S. Silva, V. Cechinel-Filho, C. L. Guimara, R. A. Yunes, F. Delle Mo-nache.**
A comparative study of stationary phase for separation of biflavonoids from *Rhedia gardneriana* using column chromatography.
Z. Naturf-orsch 2000 ; 55 ; 524-527.
- [151] **Larousse.**
Encyclopédie des plantes médicinales : Identification, préparations, soins.
2001 ; 14-16.
- [152] **J. Bruneton.**
Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.
3^{ème} Ed. Tech. et Doc. Eds. Lavoisier. Paris. 1999 ; 263-267.
- [153] **J. R. S. Hout, M. Paya.**
Pharmalogical and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential.
Gen. Pharmacol. 1996 ; 27 ; 713-722.
- [154] **T. Namba, O. S. Morita, S. L. Huang, K. Goshina, M. Hattori, N. Kakiuchi.**
Studies on cardio-active crude drugs. Effects of coumarins on cultural myocardial cells.
Planta medica 1988 ; 54 ; 277-282.
- [155] **R. L. Jackman, J. L. Smith.**
Anthocyanins and Betalains in "Natural Food Colorants".
Eds. Hendry G. A. F. and Houghton J. D., Blackie Academic and Professional.
London. 1996 ; 244-309.
- [156] **G. Linden, D. Lovient.**
Biochimie agro-industrielle. Valorisation alimentaire de la production agricole.
Ed. Masson. Paris. 1994 ; 104-109.



- [157] **J.-C. Gaiganaut, D. Bidet, M. Gaillard, J. Perronnet.**
Stérols et stéroïdes.
Ed. Marketing S. A. 1997 ; 10-53.
- [158] **W. Kamm, F. Dionisi.**
Analysis of steryl in cocoa butter by on-line liquid chromatography-gas chromatography.
J. of Chromatography A 2001 ; 918 ; 341-349.
- [159] **A. S. Clouet-Dumas, B. Le Bizec.**
Biosynthesis of 6 β -hydroxymethyltestosterone using bovine hepatocyte cultures.
J. of Steroids Biochemistry and Molecular Biology 2000 ; 74 ; 57-62.
- [160] **J. Bruneton.**
Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.
3^{ème} Ed. Tech. et Doc. Eds. Lavoisier. Paris. 1999 ; 680.
- [161] **R. M. Facino, M. Carini, R. Stefani, G. Aldini and L. Saibene.**
Anti-Elastase and anti-hyaluronidase activities of saponins and sapogenines from *Hedera helix*, *Aesculus hippocastanum* and *Ruscus aculeatus* : factors contributing to their efficacy in the treatment of venous insufficiency.
Arch. Pharm. (Weinheim) 1995 ; 328 ; 720-724.
- [162] **J.-L. Guignard.**
Abrégé de biochimie végétale.
2^{ème} Ed. Masson. Paris. 1979 ; 84.
- [163] **F. Augusto, A. Leite e Lopes, C. A. Zini.**
Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances.
Trends Anal. Chem. 2003 ; 22(3) ; 160-169.
- [164] **Afnor.**
Association française de normalisation. Détermination des caractéristiques physiques et chimiques des huiles essentielles. 1999.
- [165] **P. Arpino, A. Prévôt, J. Serpinet, J. Tranchant, A. Vergnol et P. Witier.**
Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse.
Ed. Masson. Paris. 1995.
- [166] **Bartle K. D., P. Myers.**
History of gas chromatography.
Trends Anal. Chem. 2002 ; 21(9-10) ; 547-557.
- [167] **P. Judeinstein, P. Berdague, J. P. Bayle, E. Rogalska, M. Rogalski, D. Petit Jean, M.H. Guermouche.**
Thermodynamic parameters, stationary phases, GC, liquid crystals.
J. of Chromatography 1999 ; 859 ; 59-67.
- [168] **E. Rogalska, M. Rogalski, P. Judeinstein, J. P. Bayle, M.H. Guermouche.**
Thermodynamic and interfacial study of two liquid crystals substituted with polyethylene oxide (POE) chains.
J. Molecular Liquids 2001 ; 94 ; 221-231.
- [169] **H. Van Den Dool, P. D. Kratz.**
A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography.
J. Chromatog. 1963 ; 11 ; 463-471.



- [170] **W. Jennigs, T. Shibamoto.**
In qualitative analysis of flavor and fragrance volatils by Glass Capillary Gas chromatography.
Academic Press. New York. 1980.
- [171] **F. W. Mc Lafferty, D. B. Stauffer.**
The Wiley NBS Registry of Mass Spectral Data.
J. Wiley & Sons. New York. 1989.
- [172] **N. W. Davies.**
Gas chromatographic retention indexes of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20M phases.
J. Chromatogr. 1990 ; 503 ; 1-24.
- [173] **R. P. Adams.**
In identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography (Mass Spectroscopy Allured). Publishing : Carol Stream, IL. 1995.
- [174] **BACIS (Boelens Aroma Chemical Information Service)**
ESO 2000, the complete database of essential oils. M. H. Boelens : the Netherlands. 1999.
- [175] **D. Joulain, W. A. König.**
The atlas of spectra data of sesquiterpene hydrocarbone. E. B.-Verlag : Hambourg. 1998.
- [176] **D. Joulain, W. A. König, D. H. Hochmuth.**
Terpenoids and related constituents of essential oils.
Library of Mass Finder 2.1 ; 2001.
- [177] **P. Longevialle.**
Spectrométrie de masse des substances organiques.
Ed. Masson. Paris. 1981 ; 3-14 et 83-98.
- [178] **E. Constantin.**
Spectrométrie de masse.
Ed. Lavoisier Tech. et Doc. Paris. 1996 ; 1-14.
- [179] **H. E. Gottlieb, V. Koltzar, A. Nudelman.**
NMR Chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities.
J. Org. Chem. 1997 ; 62(21) ; 7512-7515.
- [180] **J. Vandepitte, J. Verhaegen, K. Engbaek, P. Rohmer, P. Piot and C. C. Heuck.**
Basic laboratory procedures in clinical bacteriology. World Health Organization.
2nd Ed. Geneva. 2003.
- [181] **J. L. Avril, H. Dabernat, F. Denis, H. Monteil.**
Bactériologie clinique. 2^{ème} Ed. Ellipses Marketing S.A. Paris. 1992 ; 511.
- [182] **O. Motiejūnaitė, D. Pečiulytė.**
Fungicidal Properties of *Pinus sylvestris L.* for improvement of air quality.
Medicina (Kaunas) 2004 ; 40(8) ; 787-794.
- [183] **L. Kjeldhal.**
Neue Methode Zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern.
Z. Anal. Chem. 1883 ; 22 ; 366-382.



- [184] **G. Stanchev, M. Gurov, N. Mashev.**
Manuel pour l'analyse chimique des fourrages.
Ed. Candev. Sofia. 1968.
- [185] **S. Moore, M. H. Stein.**
Amino acid determination, methods and techniques.
J. Biol. Chem. 1951; 192 ; 663-670.
- [186] **J. Mossé, J. C. Huet, J. Baudet.**
The amino acid composition of wheat grain as a function of nitrogen content.
J. Cereal Sci. 1985 ; 3 ; 115-130.
- [187] **J. Mossé, J. C. Huet, J. Baudet.**
Changements de la composition en acides aminés de graines de pois en fonction de leur taux d'azote.
Sci. Aliments 1987 ; 7 ; 301-324.
- [188] **R. Lecoq.**
Manuel d'analyse alimentaire et d'expertise usuelle. Vol. II. Ed. Doin. Paris. 1995.
- [189] **J. Adrian, J. Potus, A. Poiffait, P. Dauvillier.**
Introduction à l'analyse nutritionnelle de denrées alimentaires.
Ed. Lavoisier Tech. et Doc. Londres, Paris, New York. 1998 ; 62.
- [190] **N. Mashev, P. Ivanov.**
Manuel de travaux pratiques de biochimie végétale.
Sofia, Bulgarie. 1989 ; 38.
- [191] **FAO.**
Experts FAO. Mission Algérie. 1983.
- [192] **M. Idrabi Nazar** م. نزار إيدلبي
وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي.
المخبر المركزي للأعلاف. دائرة التحاليل المعدنية
سجل طرق التحاليل المعدنية دمشق ; 1996 ; 1-61.
- [193] **J. P. Wolf.**
Manuel d'analyses des corps gras. Ed. Azoulay. Paris. 1968.
- [194] **V. Gil, A. J. MacLeod.**
Some glucosinolate of *Farsetia aegyptia* and *Farsetia ramossissima*.
Phytochemistry 1980 ; 19 ; 227-231.
- [195] **J. Velisek, J. Davidek, J. Michova, J. Pokorny.**
Rapid gas chromatographic determination of volatile degradation products of glucosinolates in rapeseed oil.
J. Chromatogr. A 1990 ; 502 ; 167-170.
- [196] **G. Froehlich, A. Hanke, H. He, W. H. Schnitzler.**
Chinese cabbage cultivars. Identification of glucosinolate degradation products by different sample preparations.
Gartenbauwissenschaft 1998 ; 36 ; 272-277.
- [197] **T. Sultana, D. L. Mc Neil, N. G. Porter, G. P. Savage.**
Investigation of isothiocyanate yield from flowering and non-flowering tissues of wasabi grown in a flooded system.
J. Food Comp. Anal. 2003 ; 16 ; 637-346.



- [198] **K. Oerlemans, D. M. Barrett, C. B. Suades, R. Verkerk, M. Dekker.**
Thermal degradation of glucosinolates in red cabbage.
Food chemistry 2006 ; 95 issue 1, 19-22.
- [199] **R. C. Lindsay, J. K. Rippe.**
Enzymatic generation of methanethiol to assist in the flavor development of cheddar cheese and other foods.
ACS Symp. Ser. 1986 ; N. 317 ; 286-308.
- [200] **M. Hansen, R. G. Buttery, D. J. Stern, M. I. Cantwell, L. C. Ling.**
Broccoli storage under low oxygen atmosphere: identification of higher boiling volatiles.
J. Agric. Food Chem. 1992 ; 40 ; 850-852.
- [201] **M. Miyazawa, T. Maehara, K. Kurose.**
Composition of the essential oil from the leaves of *Eruca sativa*.
Flavor and Fragrance Journal 2002 ; 17 ; 187-190.
- [202] **J. Auger, S. Dugravot, A. Naudin, A. Abo-Ghaila, D. Pierre, E Thibout.**
Utilisation des composés allélochimiques des *Allium* en tant qu'insecticides. Use of pheromones and other semiochemicals in integrated production.
IOBC Wprs Bulletin 2002 ; 25 ; 1-13.
- [203] **I. Arnault, I. André, S. Diwo-Allain, J. Auger, F. Vey.**
Propriétés pesticides des alliées. Biodésinfection des sols maraîchers au moyen d'oignon et poireau.
Phytoma. La défense des végétaux. Janvier 2005 ; N°578 ; 40-43.
- [204] **K. Bouhadjera, M. Bendahou, B. Tabti.**
Anti-microbial activity of extracts from algerian *Aristida pungens* L.
Pakistan Journal of Biological Sciences 2005 ; 8(2) ; 206-210.
- [205] **J. C. Kouokam, T. Jahys, H. Becker.**
Antimicrobial activity of the essential oil and some isolated sulfur rich compounds from *Scorodophloeus zenkeri*.
Planta Medi. 2002 ; 68 ; 1082-1087.
- [206] **C. E. Bodwell.**
Problems in the developments and application of rapid methods of assessing protein quality.
Food Tech. 1977 ; 31(6) ; 73-77.
- [207] **L. D. Satterlee, H. F. Marshall, J. M. Tennyson.**
Measuring protein quality.
J. A. C. Soc. 1979 ; 56(3) ; 103-109.
- [208] **H. H. Mitchell, R. J. Block.**
Some relationships between the AA contents of proteins and their nutritive value for the rat.
J. Biol. Chem. 1946 ; 163 ; 599.
- [209] **B. L. Oser.**
Method for integrating essential amino-acid content in the nutritional evaluation of protein.
J. Amer. Dietetic Assoc. 1951 ; 27 ; 396.

- [210] **J.-C. Favier, J. Ireland-Ripert, C. Toque, M. Feinberg.**
Répertoire général des aliments. Table de composition.
2^{ème} Ed. revue et augmentée, Lavoisier Tec. et Doc. Londres, Paris, New York. INRA
Eds. 1995 ; 474-529.
- [211] **F. A. Ayaz, R. H. Glew, M. Millson, H. S. Huang, L. T. Chuang, C. Sanz,
S. Hayirlioglu Ayaz.**
Nutrient contents of Kale (*Brassica oleraceae L. var. acephala D.C.*)
Food Chem. 2006 ; 96 issue 4 ; 572-579.
- [212] **T. Hodisan, M. Culea, C. Cimpoiu, A. Cot.**
Separation, identification and quantitative determination of free acids from plant
extracts.
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 1998 ; 18 ; 319-323.
- [213] **S.A. Taleb Bendiab, M. Benmahdi, N. Mashev, G.N. Vassilev.**
Contribution to the investigation on the chemical composition of the acorn of various
Quercus Species in Algeria; investigation the acorn of *Quercus ilex*.
C. R. Acad. Bulg. Sci. 1990 ; 43(7) ; 83-85.
- [214] **S.A. Taleb Bendiab, N. Mashev, G.N. Vassilev.**
Studies into the chemical composition of the acorns of various species of mediterranean
oak (*Quercus*).
C. R. Acad. Bulg. Sci. 1989 ; 23(4) ; 99-101.
- [215] **S.A. Taleb Bendiab, M. Benmahdi, N. Mashev, G.N. Vassilev.**
A tribute to the study of the chemical composition of the acorn of different *Quercus*
spread in Algeria.
C. R. Acad. Bulg. Sci. 1991 ; 44(3) ; 85-88.
- [216] **A. Benmansour, S.A Taleb Bendiab, N. Mashev, G.N. Vassilev.**
Studies on the chemical composition of *Artemisia herba alba*.
C. R. Acad. Bulg. Sci. 1990 ; 43(8) ; 65-87.
- [217] **A. Benmansour, S.A. Taleb Bendiab.**
Etude comparative en protéines et acides aminés des résidus d'*Artemisia herba alba* et
noyaux de dattes d'Algérie. Proposition comme additifs aux aliments de bétail.
J. Soc. Alger. Chim. 1998 ; 8(1) ; 67-71.
- [218] **J. Adrian, R. Frangne.**
La science alimentaire de A à Z.
Ed. Technique et Documentation. Ed. Lavoisier. Paris. 1986 ; 281-282.
- [219] **D. Grbesa, Z. Crnojevic, Z. Laskarin, J. Posavac.**
Mineral composition of some fresh herbages from grasses, legumes and *Cruciferae* and
its value for ruminants.
Krmiva 1992 ; 34(3) ; 127-134.



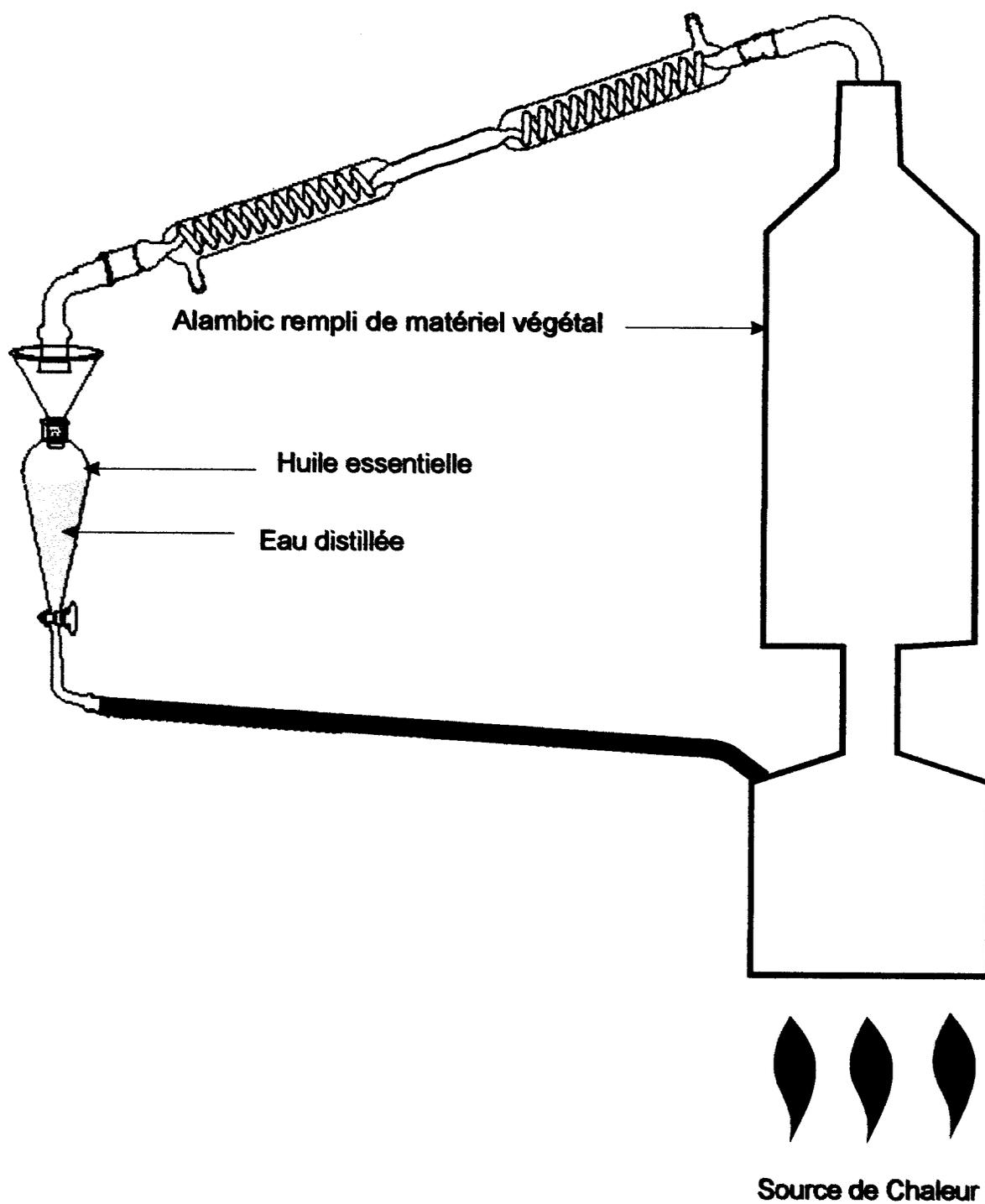
ANNEXES



ANNEXES

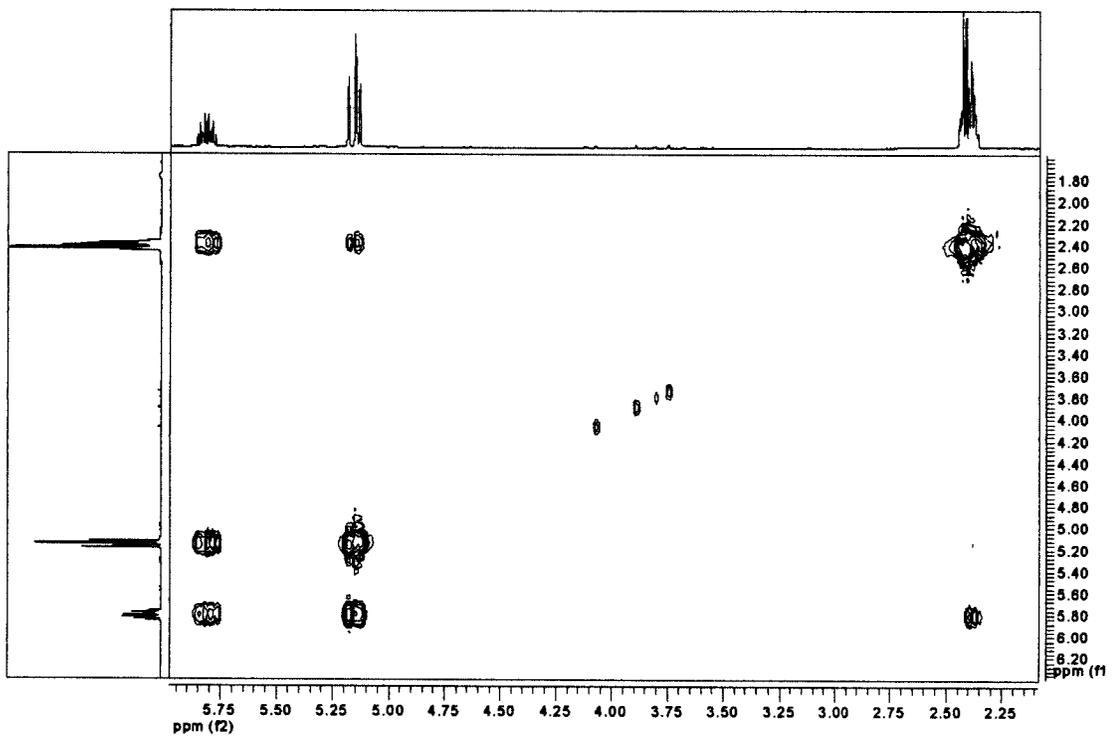
- ANNEXE A** : Appareillage d'extraction (entraînement à la vapeur d'eau). p. 143
- ANNEXE B** : Caractérisation spectrale par RMN du pent-4-ènenitrile. p. 144
- ANNEXE C** : Spectres de masse (sur colonne apolaire) et RMN ^1H , ^{13}C des di- et tri- sulfures de diméthyle. p. 145
- ANNEXE D** : Spectres de masse des composés non identifiés p. 148
- ANNEXE E** : Structures de quelques molécules identifiées dans *Pseudocytisus integrifolius* et *Sinapis arvensis*. p. 149



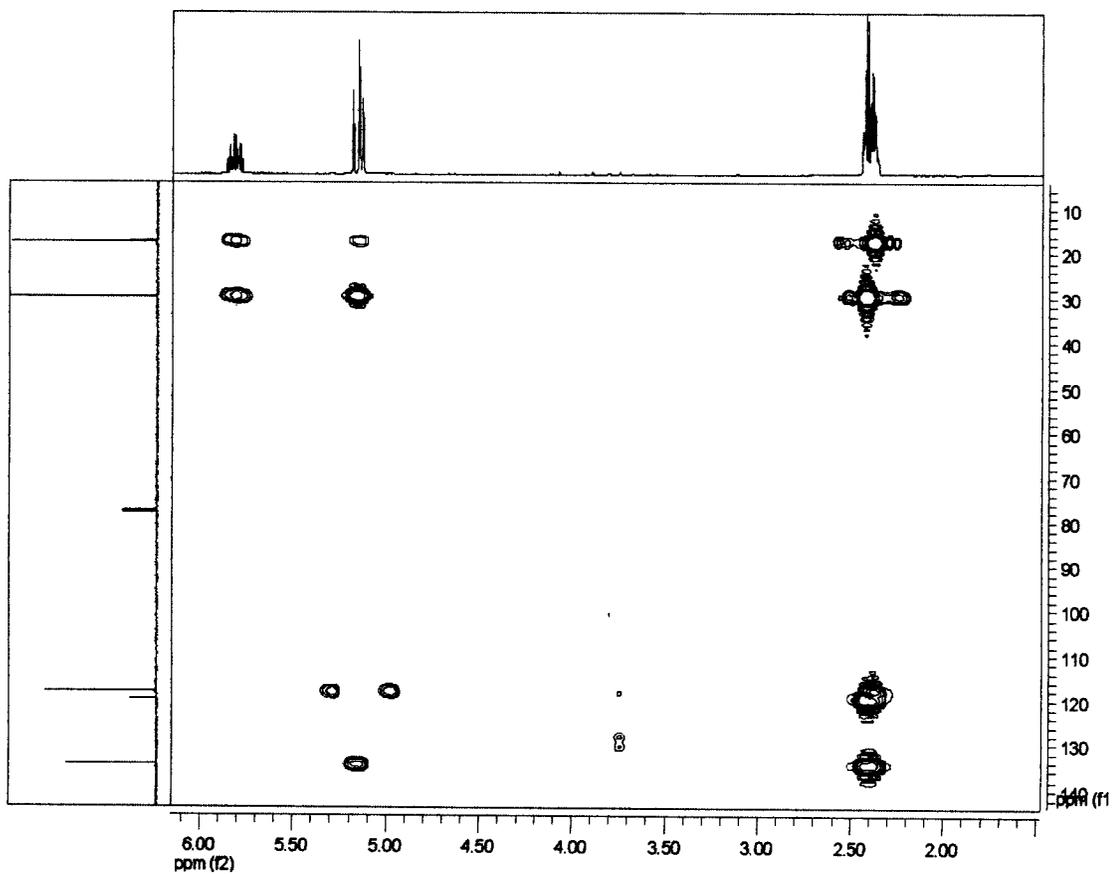
ANNEXE A : Appareillage d'extraction (entraînement à la vapeur d'eau).

ANNEXE B : Caractérisation spectrale par RMN du pent-4-énitrile.

Spectre COSY ^1H - ^1H .

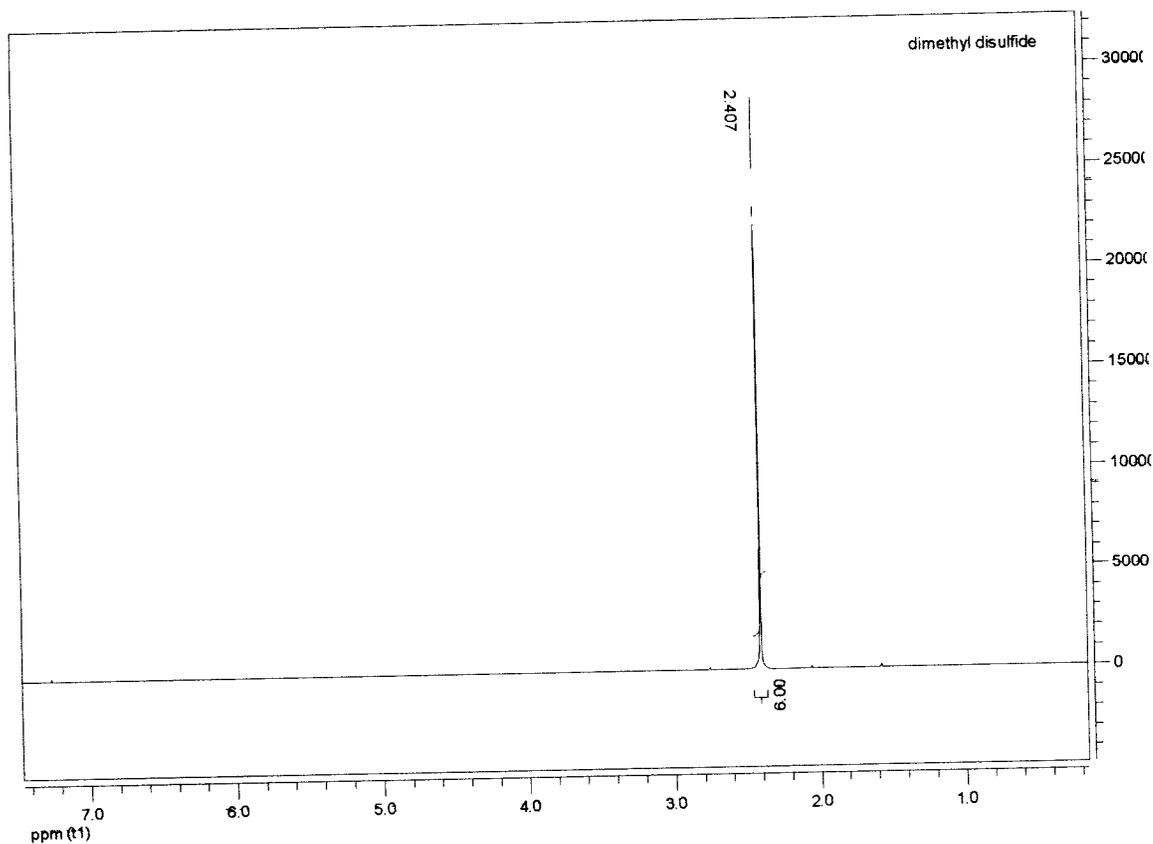
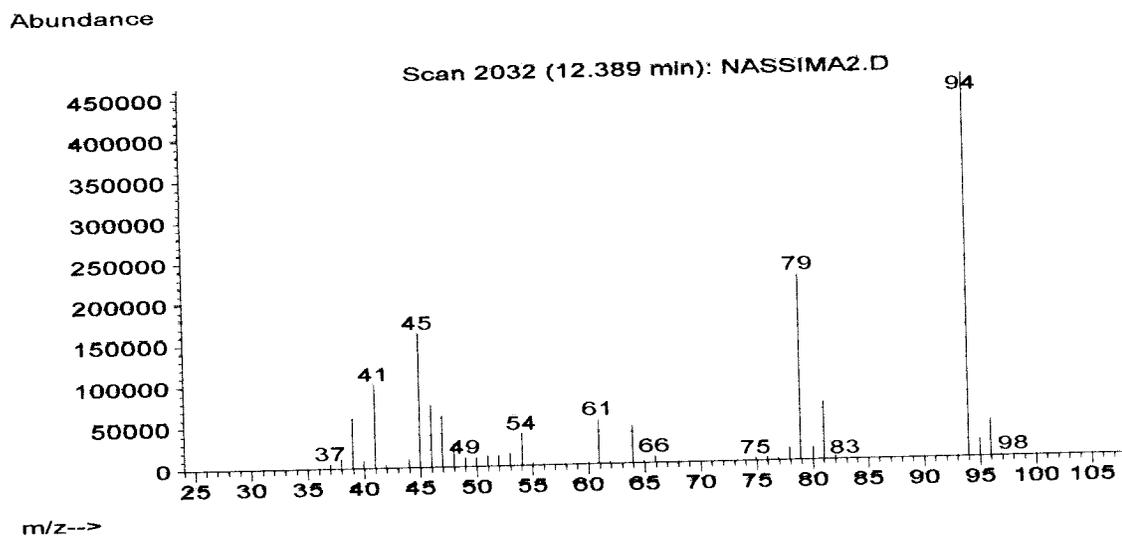


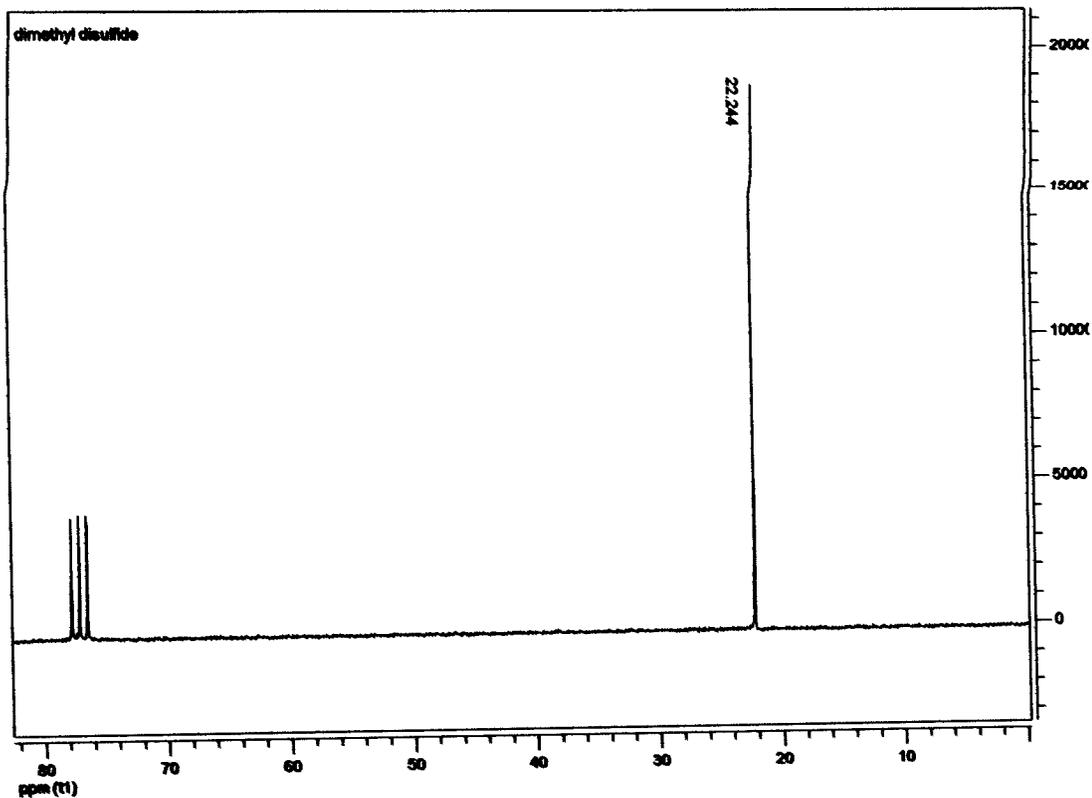
Spectre HMBC (corrélation hétéronucléaire à distance ^2J et ^3J) ^1H - ^{13}C .



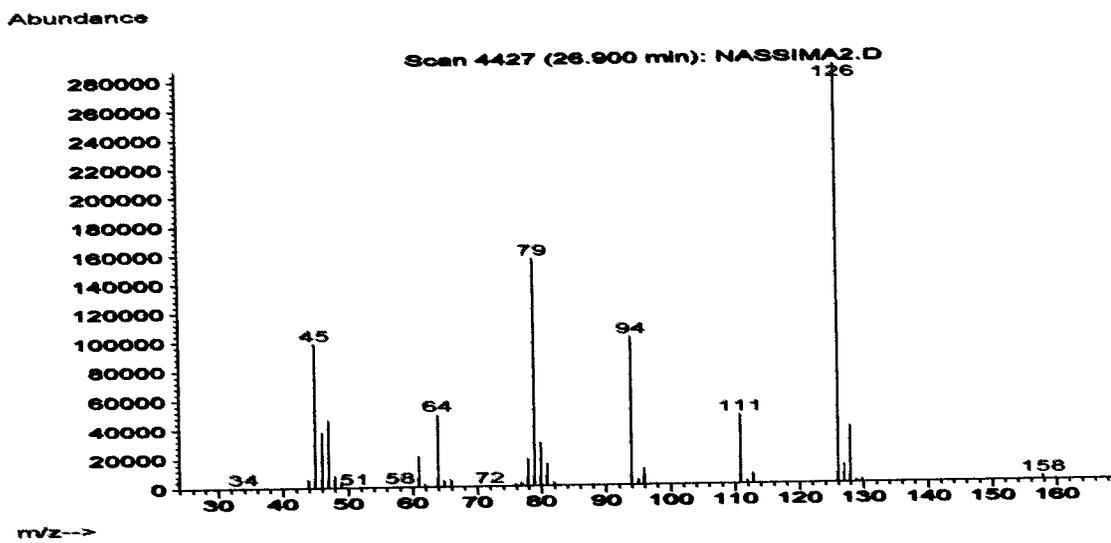
ANNEXE C : Spectres de masse (sur colonne apolaire) et RMN ^1H , ^{13}C des di- et tri-sulfures de diméthyle.

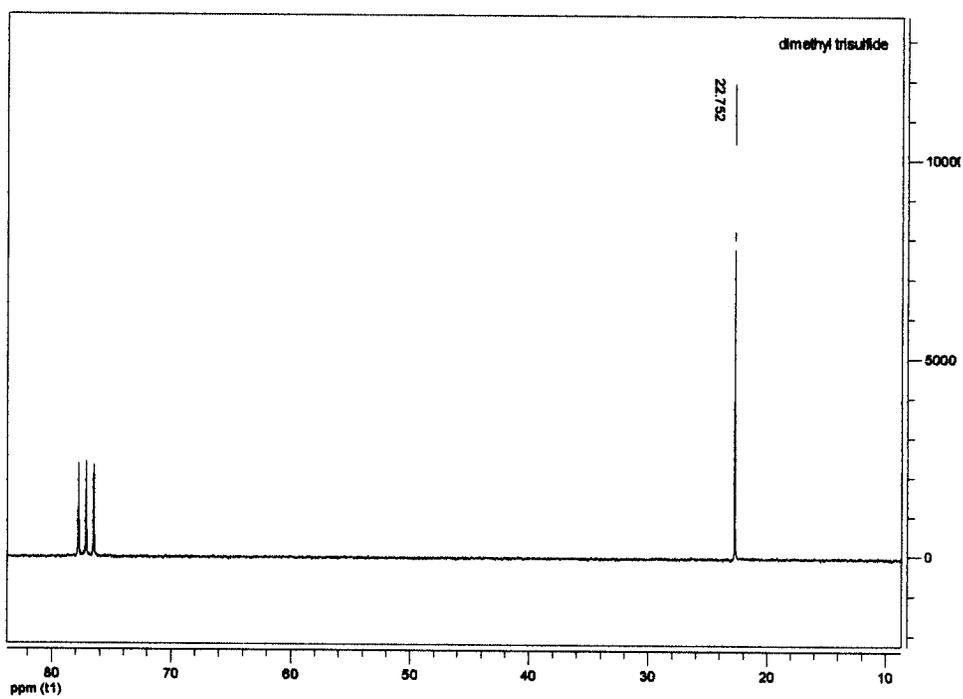
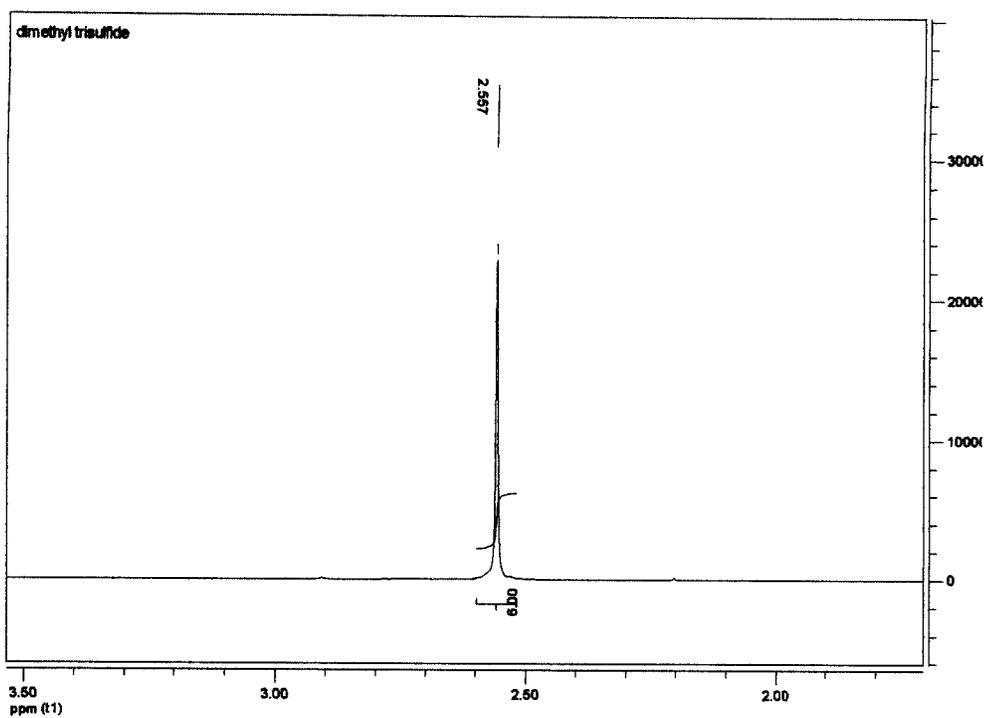
• Disulfure de diméthyle.





• **Trisulfure de diméthyle.**



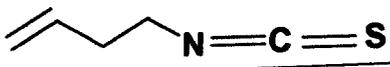
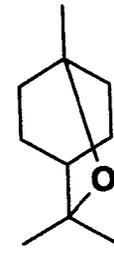
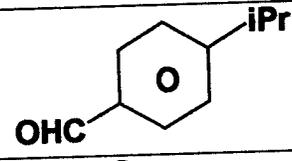
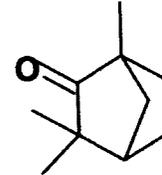
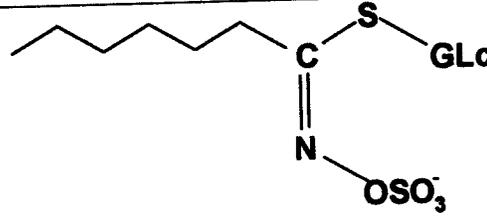
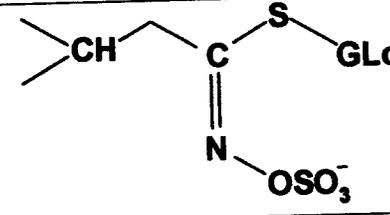
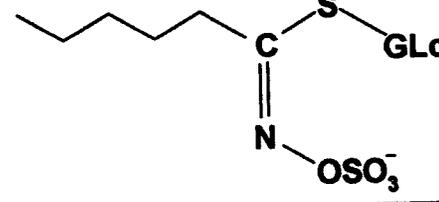
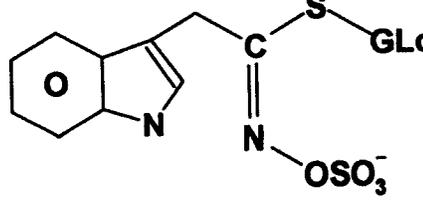


ANNEXE D : Spectres de masse des composés non identifiés.

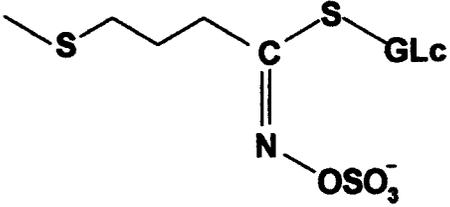
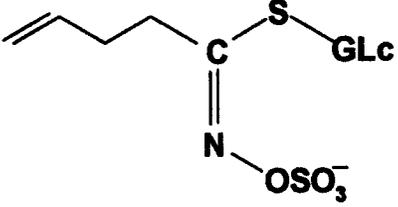
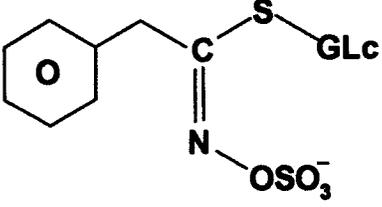
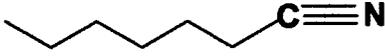
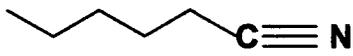
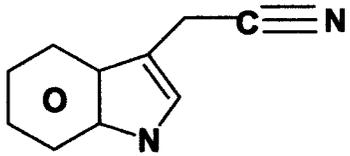
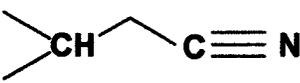
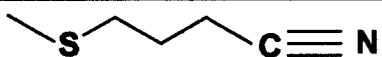
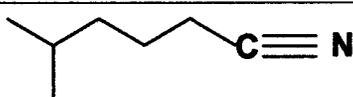
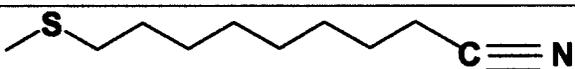
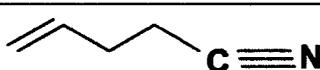
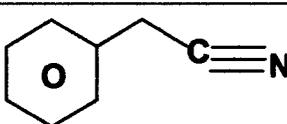
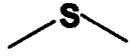
Composés	IR	m/z (%)
<i>Inconnu I</i>	1244	174(0.3), 147(93.4), 132(66.2), 118(20.3), 17(21.3), 116(100), 90(15.3), 89(59.3), 77(34.4), 63(29.4), 62(12.7), 51(13.8), 39(11.2).
<i>Inconnu II</i>	1658	234(8.4), 206(14.9), 205(100), 198(12.9), 190(9.8), 183(32.2), 134(22.0), 105(9.7), 91(24.4), 71(10.1), 43(13.2), 41(9.2).
<i>Inconnu III</i>	1687	186(64.4), 171(24.3), 156(32.3), 155(100), 154(28.8), 146(17.1), 130(18.4), 128(46.6), 127(30.6), 101(21.4), 77(15.7), 40(16.8).
<i>Inconnu IV</i>	1242	150(9), 136(21), 122(78), 108(35), 94(34), 82(21), 80(29), 9(58), 67(18), 54(31).
<i>Inconnu V</i>	1358	190(8), 121(22), 120(9), 105(11), 84(9), 79(13), 77(21), 75(100), 69(40), 60(14).
<i>Inconnu VI</i>	1585	222(1), 204(40), 161(75), 109(94), 95(100), 81(59), 67(45), 55(56), 43(79), 41(81).
<i>Inconnu VII</i>	1652	196(3), 85(42), 81(33), 71(53), 70(35), 69(46), 57(100), 56(51), 55(52.9), 43(75), 41(64).
<i>Inconnu VIII</i>	1697	199(23), 152(64), 122(31), 110(29), 96(73), 83(43), 69(30), 61(100), 55(48), 41(50).



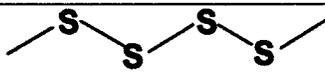
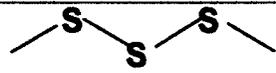
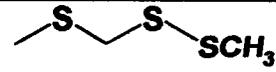
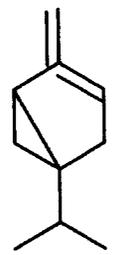
ANNEXE E : Structures de quelques molécules identifiées dans *Pseudocytisus integrifolius* et *Sinapis arvensis*.

3 - buténylisothiocyanate	
1,8 - cinéole	
Cuminaldéhyde	
Disulfure de diméthyle	
2,4 - dithiapentane	
Fenchone	
GLS d'hexyle	
GLS d'isobutyle	
GLS de pentyle	
Glucobrassicine	



Glucoibervérine	
Gluconapine	
Glucotropaéoline	
n-heptanenitrile	
n-hexanenitrile	
3 - indolylacétonitrile	
3-méthylbutanenitrile	
4-méthylthiobutanenitrile	
5-méthylhexanenitrile	
9 -méthylthiononanenitrile	
Pent-4-ènenitrile	
Phénylacétonitrile	
Sabinène	
Sulfure de diméthyle	



Tétrasulfure de diméthyle	
Trisulfure de diméthyle	
2,3,5-trithiahexane	
α-thuyène	
4-vinylguaïacol	