

UNIVERISTE SAAD DAHLAB -BLIDA-

Faculté des sciences Agrovétérinaires

Département d'Agronomie

MEMOIRE DE MAGISTER

En Sciences agronomiques

Spécialité : Nutrition et Transformation des aliments

CONTRIBUTION A L'ETUDE DES ACTIVITES TECHNO-
BIOLOGIQUES DES PROTEASES ET DES POLYPHENOLS DE LA
FLEUR D'ARTICHAUT (*Cynara scolymus* L.)

Par

Souhila MAHMOUDI

Devant le jury composé de :

L. BEN HADJA	MCA., U. S. D. Blida	Présidente
D. ELHADI	MCA., U. S. D. Blida	Examineur
A. DOUMANDJI	MCA., U. S. D. Blida	Examinatrice
M. KHALI	MCA., U. S. D. Blida	Promoteur
B. KADRI	MCB., U. S. D. Blida	Co-promoteur

Blida, Février 2012

RÉSUMÉ

La fleur d'artichaut (*Cynara scolymus*) constitue une bonne source de nutriments (protéines, minéraux, lipides, etc.), ainsi qu'elle renferme certaines biomolécules à intérêts technologique et thérapeutique comme les protéases et les polyphénols.

Dans cette étude, nous avons tenté d'extraire, de purifier et de caractériser les activités technologiques et biologiques des protéases et des polyphénols de quatre parties de la fleur d'artichaut de la variété *Violet* (Bractées, fleurs, tige et réceptacle).

Les protéases purifiées des fleurs (foins) coagulent le lait, même à des températures élevées enregistrant ainsi une force coagulante optimale à 70 °C où la présure commerciale est inactive. Comme toutes les protéases aspartiques, les cynarases d'artichaut et la présure sont actives à des pH acides. L'accroissement de la concentration du CaCl₂ améliore l'activité coagulante des protéases d'artichaut. La macération par l'éthanol et par l'acétone sont les meilleurs systèmes d'extraction des polyphénols totaux et des flavonoïdes. En revanche, la décoction aqueuse semble être mieux pour extraire les tanins. Le test de la chromatographie sur couche mince (CCM), appliqué sur les extraits éthanoliques partiellement purifiés de la fleur d'artichaut, a montré la présence d'une multitude de composés polyphénoliques qui présentent des activités antioxydantes vis-à-vis du radical libre du DPPH'. Ces activités sont comparables sinon supérieures à celles de la vitamine C et de la quercétine (standards). Les extraits polyphénoliques aqueux partiellement purifiés d'artichaut et leurs fractions aqueuses ont des effets antimicrobiens intéressants. Le meilleur effet d'inhibition a été enregistré avec l'extrait polyphénolique partiellement purifié des fleurs (foin) sur *Bacillus subtilis* et *Aspergillus fumigatus*.

Mots clés : Fleur d'artichaut, Extraction, Protéases, Polyphénols, Activité antioxydante, Effets antimicrobiens.

ABSTRACT

The artichoke flower (*Cynara scolymus*) constitutes a good source of nutriments (proteins, minerals, lipids...), as it contains some molecules with interests technological and therapeutic like the proteases and polyphenols.

In this study, we tried to extract, purify and characterize the technological and biological activities of proteases and polyphenols of four parts of the artichoke flower (Bracts, flowers, stem and receptacle).

The purified proteases of the flowers (stigmas) coagulate milk, even at high temperatures thus recording a coagulating force optimal at 70 °C where the commercial rennet is inactive. Like all the aspartic proteases, the cynarases of artichoke and the rennet are active in pH acids. The increase in the concentration of CaCl₂ improves the coagulating activity of the proteases of artichoke. The maceration by ethanol and acetone are the best systems of extraction of total polyphenols and the flavonoids. On the other hand, the aqueous decoction seems to be to better extract the tannins. The test of chromatography (CCM), applied to the partially purified ethanolic extracts of artichoke flower, showed the presence of a multitude of polyphenolic compounds which present antioxidant activity (DPPH[•] test). This activity is comparable if not higher than those of the vitamin C and quercetin (standards). The partially purified aqueous polyphenolic extracts of artichoke and their aqueous fractions have interesting antimicrobial effect. The best effect of inhibition was recorded with the partially purified polyphenolic extract of flowers (stigmas) on *Bacillus subtilis* and *Aspergillus fumigatus*.

Key words: Artichoke flower, Extraction, Proteases, Polyphenols, antioxidant Activity, antimicrobial Effect.

ملخص

تشكل زهرة الأرضي شوكي مصدرا جيدا لمختلف المواد الغذائية (بروتينات, دسم, مواد معدنية...) كما أنها تحتوي على عدة جزيئات حيوية ذات قيم تكنولوجية و علاجية كإنزيمات البروتين و متعدد الفينول. في دراستنا هذه قمنا باستخلاص, تنقية و دراسة خصائص إنزيمات البروتين و متعدد الفينول زهرة الأرضي شوكي.

إن إنزيمات البروتين المستخلصة من الأزهار الداخلية لها القدرة على تخثير الحليب حتى في درجة حرارة عالية (70م) حيث البريزور تفقد فاعليتها. ككل إنزيمات البروتين فان سيناراز زهرة الأرضي شوكي و البريزور تزيد قوة تخثيرها للحليب عند pH حامضي و كلما زادت نسبة كلورور الكلسيوم $CaCl_2$ تحسنت قوة التخثر.

النقع في الإيثانول و الأسيتون يعتبر الطريقة المثالية لاستخلاص متعدد الفينول و الفلافونويد في حين أن الغليان باستعمال الماء هو الأفضل لاستخلاص الدابغة (tanins). الكروماتوغرافي على ورق رقيق بينت وجود عدة مكونات بوليفينولية. المستخلصات الايثانولية المنقاة جزئيا لمختلف أجزاء زهرة الأرضي شوكي لها قدرة مضادة للأكسدة ضد DPPH, هذه القدرة مماثلة أو تفوق قدرة الفيتامين ت و الكارستين المستعملان للمقارنة. لمستخلصات متعدد الفينول المائية المنقاة جزئيا خاصية مضادة للميكروبات ذات أهمية, خاصة منها مستخلص الأزهار الداخلية ضد *Bacillus subtilis* و *Aspergillus fumigatus*.

كلمات المفتاح: زهرة الأرضي شوكي, الاستخلاص, الإنزيمات المحللة للبروتين, متعدد الفينول, قدرة مضادة للأكسدة, خاصية مضادة للميكروبات.

REMERCIEMENTS

Voici venu le temps de l'exercice des remerciements. Peut-être est-ce le plus difficile dans un mémoire ! En effet, chaque personne qui y est citée mérite la plus belle phrase alors que je n'ai pas de réels talents littéraires.

Je tiens à remercier intensément le bon Dieu le tout puissant de m'avoir donné la volonté et le courage pour accomplir ce modeste travail.

Je voudrais exprimer ici ma plus sincère gratitude à Dr. KHALI M., Maître de conférences A au département de biologie à l'université Saad Dahlab de Blida et Dr. KADRI B., Maître de conférences B au département d'agronomie à l'université Saad Dahlab de Blida, pour m'avoir donné une chance en m'acceptant sous leur direction. Je les remercie particulièrement pour m'avoir fait confiance et m'encouragé tout au long de ce travail, et surtout pour m'avoir laissé une grande liberté de pensée et d'expression, ainsi qu'une large autonomie dans l'organisation et la réalisation de ce travail. Leur soutien n'a pas seulement été d'ordre scientifique, mais aussi humain, par leur enthousiasme, leur dynamisme, leur motivation et leur générosité.

Je tiens à remercier chaleureusement Mme L. BEN HADJA, Maître de Conférences A au département d'agronomie de l'université Saad Dahlab de Blida, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Mes sincères remerciements vont à Mme A. DOUMANDJI, Maître de Conférences A au département d'agronomie de l'université Saad Dahlab de Blida qui m'a fait l'honneur d'accepter de me consacrer du temps et de porter son jugement expert sur ce travail.

Je souhaite également remercier vivement Mr D. ELHADI, Maître de Conférences A au département d'agronomie de l'université Saad Dahlab de Blida de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce modeste travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement Dr NOUANI N. Maître de conférences A à l'université Mohamed Bougara de Boumerdes et chef de département de technologie alimentaire, pour son accueil chaleureux dans son laboratoire des MPCA., sa disponibilité

et son efficacité qui ont permis à ce séjour d'être particulièrement fructueux en termes de résultats. Je lui remercie aussi pour avoir accepté mon invitation.

*J*e remercie chaleureusement Mr. DJEBAÏRIA L., Colonel et chef de laboratoire du contrôle de qualité de l'intendance (LCI) d'El Harrach, et je lui exprime toute ma respectueuse et immense reconnaissance de m'avoir accueilli dans son laboratoire avec gentillesse et bienveillance, ainsi que pour ses qualités intellectuelles et l'enthousiasme communicatif dont il sait faire preuve. C'est à la fois un privilège et une expérience exceptionnelle d'avoir pu bénéficier de ses conseils.

*J*e souhaite également remercier le Colonel MILOUDI A. pour son aide précieuse, ses conseils judicieux et également pour sa gentillesse et sa disponibilité. Son intérêt porté au projet, son humilité et ses connaissances ont été sincèrement très appréciées.

*U*n grand merci à vous Capitaine LAKHAL A., du LCI pour votre disponibilité malgré toutes vos responsabilités, pour votre intelligence et capacité à faciliter le difficile et ainsi pour votre plaisir à partager informations et compétences. Merci mille fois pour tout ce que vous m'avez autant apporté. Ces quelques lignes sont bien peu pour vous montrer ma reconnaissance.

*J*e remercie également les membres des équipes de LCI, sans lesquelles ce projet n'aurait évidemment pas vu le jour, pour m'avoir accordé leur confiance, et m'avoir permis de travailler dans une ambiance chaleureuse :

*A*mmi MOHAMED, ingénieur dans la section de toxicologie pour sa disponibilité et sa gentillesse, tout le staff de service physicochimie et ceux des services toxicologie et microbiologie pour leur regard, leurs commentaires scientifiques et l'intérêt constant qu'ils ont porté à mon travail pendant ces quatre mois. Votre générosité et votre sens de l'entraide m'ont beaucoup aidé.

*B*OUDELAA S., merci pour votre investissement, vous avez été vous aussi très disponible. Vous m'avez fait passer une bonne part de votre énergie scientifique et votre volonté d'avancer. Mais particulièrement, je tiens à vous remercier pour m'avoir donné confiance en moi, à des moments où j'en avais besoin. Vos interventions ont été décisives pour mon mémoire. En me faisant confiance, vous m'avez permis d'appréhender plus sereinement mon futur scientifique.

Mes plus grands remerciements vont aussi à Melle MAHMOUDI N. chargée de cours à l'université de M'sila, pour sa bonne humeur et son soutien, pour me permettre de développer l'esprit de recherche et de m'encourager dans les moments difficiles. Qui, sans compter son temps et son énergie, m'a initié avec patience et enthousiasme à finaliser ce travail. Merci autre fois pour avoir été disponible et activement présente dans la synthèse de ce mémoire.

Je tiens à remercier toute l'équipe de laboratoire MPCA de département de technologie alimentaire de Boumerdes, en particulier Mme KENNAR A. et Melle TOUZENE F., pour leur qualité et leur aide.

Je tiens à remercier Melle SILABDI S. pour l'aide et l'encouragement qu'elle m'a apporté. Merci infiniment Selma tu as participé activement dans la réalisation de ce travail.

Mes profonds remerciements vont aussi à Melle MILA A. Maître de Conférences B, Professeur AISSI M. et Mme SAHRAOUI L. Maître assistante A. à l'école nationale supérieure vétérinaire El-Harrach qui m'ont beaucoup aidé pour accomplir les testes de l'antibiogramme.

Je tiens à remercier également le chef de département de biologie à l'université Mohamed Bougera de Boumerdes qui ma permet d'accéder au niveau de son laboratoire de microbiologie ainsi que la laborantine.

Mes vifs remerciements vont aussi à Mr. DJAZOULI Z. E. et Mr MIGATLI, enseignants à l'université Saad Dahlab de Blida, qui m'ont facilité pleines de taches administratives favorisant ainsi la réalisation de mon mémoire.

*A*toutes les techniciennes des laboratoires de département d'agronomie, Amina, Zakia, Ghania, Samia et Amina, un grand merci à vous pour votre aide.

Je suis profondément reconnaissante à tous ceux qui ont su se mobiliser autour de mes recherches, et m'apporter non seulement leur expertise technique, mais aussi leur temps et leurs conseils avisés, contribuant ainsi à la qualité de mon travail et de ma formation.

*P*our finir, merci à toute ma famille et à ceux avec qui j'ai partagé des moments d'amitié, Karima, Rokaya, Kahina et Zahra. Encore merci pour votre soutien et bien sûr pour les bons et opportuns moments qu'on a passé ensemble.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail :

À la mémoire de mon grand père "Omar" et de ma grand mère "Khadoudja"

*À mon père et ma mère, être les plus chères et les plus précieux
dans ma vie, sans qui, mon succès n'aurait pas été possible.*

*Ce mémoire est le résultat de leurs sacrifices
qu'ils soient assurés de ma reconnaissance
que dieu leur prête longue vie.*

À mes chers frères et sœurs.

Mes nièces et mes neveux

Mes belles sœurs et mon beau frère.

*À tous mes enseignants, mes amies et mes collègues dès la première année
primaire jusqu'à le magister.*

Souhila.

*"No matter. Try again. Fail again. Fail better."
Samuel Beckett. Ecrivain irlandais (1906-1989)*

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figures

Figure 1.1 : Acides mono- et dicaffeoylquinique d'artichaut.....	13
Figure 1.2 : Structures chimiques des composés phénoliques existant dans l'artichaut.....	15
Figure 2.1 : Phases du processus de coagulation enzymatique du lait.....	21
Figure 3.1 : Structure du phénol (noyau aromatique).....	32
Figure 3.2 : Synthèse biologique des acides phénoliques.....	33
Figure 3.3 : Voie de biosynthèse des flavonoïdes.....	34
Figure 3.4 : Les principaux acides hydroxybenzoïques.....	36
Figure 3.5 : Les principaux acides hydroxycinnamiques.....	36
Figure 3.6 : Structure nucléaire des flavonoïdes.....	37
Figure 3.7 : Structure d'isoflavone.....	38
Figure 3.8 : Structure du flavone.....	38
Figure 3.9 : Structure de flavanols.....	39
Figure 3.10: Structures chimiques de quelques flavonols.....	39
Figure 3.11 : Structure oligomérique des tanins condensés.....	41
Figure 4.1 : Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliquées en biologie.....	46
Figure 4.2 : Pouvoir antioxydant des polyphénols.....	48
Figure 4.3 : Itinéraires pour les polyphénols diététiques et leurs métabolites chez l'homme.....	52
Figure 5.1 Les différentes parties de la fleur d'artichaut.....	83
Figure 5.2 : Diagramme général de l'étude expérimentale.....	86
Figure 5.3 : Diagramme d'extraction des polyphénols par macération.....	67
Figure 5.4: Diagramme d'extraction des polyphénols par décoction.....	68
Figure 5.5 : L'acide gallique (Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque).....	69
Figure 5.6: Principe de réaction entre les flavonoides et AlCl ₃	71
Figure 5.7: Principe de réaction entre la vanilline et les tanins condensés.....	72

Figure 5.8: Système d'extraction au Soxhlet.....	74
Figure 5.9 : Réduction du radical DPPH·	78
Figure 5.10 : Illustration de la méthode d'antibiogramme sur boîte de Pétri.....	81
Figure 6.1 : La teneur en matière grasse dans les parties de la fleur d'artichaut (% MS).....	84
Figure 6.2 : Rendement d'extraction de la matière sèche de différentes parties de la fleur d'artichaut.....	85
Figure 6.3 : Taux protéiques et rendement en protéine brute de différentes parties de la fleur d'artichaut (%MS).....	85
Figure 6.4 : Profil de la purification dans la petite (1) et la grande (2) colonne.....	87
Figure 6.5 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié d'artichaut et de la présure.....	88
Figure 6.6 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié d'artichaut.....	89
Figure 6.7 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de la présure.....	90
Figure 6.8 : Effet de la concentration de CaCl ₂ du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié d'artichaut et de la présure.....	91
Figure 6.9 : Rendement d'extraction de la MS de différentes parties de la fleur d'artichaut par décoction.....	92
Figure 6.10: Rendement d'extraction de différentes parties de la fleur d'artichaut par macération.....	93
Figure 6.11 : pH des décoctés polyphénoliques d'artichaut.....	94
Figure 6.12 : pH des macérats polyphénoliques d'artichaut.....	95
Figure 6.13: Rendement d'extraction par la méthode de Soxhlet.....	109
Figure 6.14: Chromatogrammes de différents extraits d'artichaut et standards.....	111
Figure 6.15 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits de la fleur d'artichaut avant et après la purification.....	113
Figure 6.16 : Teneurs en acide ascorbique (vitamine C) de différentes parties de la fleur d'artichaut.....	114
Figure 6.17 : Activités antioxydantes de la vitamine C et de la quercétine.....	115
Figure 6.18 : Activités antioxydantes des extraits d'artichaut.....	116
Figure 6.19 : Pouvoir antioxydant des standards et de différents extraits.....	118

Tableaux

Tableau 1.1 : Valeur alimentaire comparative de quelques cultures maraîchères	12
Tableau 3.1: Les principales classes des composés phénoliques	35
Tableau 4.1 : Activités biologiques des composés polyphénoliques	44
Tableau 5.1 : Souches microbiennes utilisées et leurs provenances	54
Tableau 5.2 : Gamme étalon de l'acide gallique	69
Tableau 5.3 : Gamme d'étalonnage de la quercétine	71
Tableau 5.4 : Gamme d'étalonnage de catéchol	73
Tableau 6.1 : Teneur en matière sèche et teneur en cendres de différentes parties de la fleur d'artichaut (% MS)	82
Tableau 6.2 : Teneur en polyphénols totaux dans différentes parties de la fleur d'artichaut extraits par décoction (mg éq AG/g PS)	96
Tableau 6.3 : Teneur en polyphénols totaux dans les différentes parties de la fleur d'artichaut extraits par macération (mg éq AG/g PS)	98
Tableau 6.4 : Teneur en flavonoïdes dans différentes parties de la fleur d'artichaut extraits par décoction	101
Tableau 6.5 : Teneur en flavonoïdes dans les différentes parties de la fleur d'artichaut extraits par macération	103
Tableau 6.6 : Teneur en tanins condensés dans les différentes parties de la fleur d'artichaut extraits par décoction	105
Tableau 6.7 : Teneur en tanins condensés dans les différentes parties de la fleur d'artichaut extraits par macération	107
Tableau 6.8 : Rendement de purification des polyphénols de différentes parties de la fleur d'artichaut	114
Tableau 6.9 : Diamètres moyennes des zones d'inhibition des extraits purifié (cm) obtenus avec les souches bactériennes	119
Tableau 6.10 : Diamètres moyennes des zones d'inhibition des extraits purifié (cm) obtenus avec les souches fongiques	121
Tableau 6.11 : Diamètres moyennes des zones d'inhibition des fractions aqueuses (cm) obtenus avec les souches bactériennes	122
Tableau 6.12 : Diamètres moyennes des zones d'inhibition des fractions aqueuses (cm) obtenus avec les souches fongiques	123

TABLE DES MATIÈRES

RESUMÉ

REMERCIEMENTS

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION	7
CHAPITRE 1 : L'ARTICHAUT	10
1.1 Généralités	10
1.2 Description botanique	10
1.3 Systématique	10
1.4 Composition et valeur nutritionnelle	11
1.4.1 Principes actifs	12
1.4.2 Propriétés biochimiques des polyphénols d'artichaut	14
1.5 Intérêts de la plante	16
1.5.1 Alimentation humaine et animale	16
1.5.2 Phytothérapie	16
1.5.3 Autres utilisations	17
1.6 Toxicité et effets indésirables	18
1.7 Production et consommation	18
CHAPITRE 2 : COAGULATION ET AGENTS COAGULANTS	19
2.1 Généralité	19
2.2 Définition	19
2.3 Types de coagulation	19
2.3.1 Coagulation par acidification	19
2.3.2 Coagulation enzymatique	20
2.3.2.1 L'hydrolyse enzymatique	20
2.3.2.2 L'agrégation des micelles de caséine	21
2.3.2.3 La réduction du gel	21
2.3.3 Coagulation mixte	22
2.4 Facteurs influençant l'activité coagulante	22
2.4.1 La température	22
2.4.2 Le pH du lait	23
2.4.3 La nature et la concentration enzymatique	23
2.4.4 La nature et la composition du lait	23
2.4.5 Effet des éléments minéraux	24

2.5 Les agents coagulants	25
2.5.1 Nature biochimique	25
2.5.2 Propriétés et caractéristiques	26
2.5.3 La présure	26
2.5.3.1 Définition	26
2.5.3.2 Composition	27
2.5.4 Les succédanés de la présure	27
2.5.4.1 Les enzymes coagulantes d'origine animale	28
2.5.4.2 Les enzymes coagulantes d'origine microbienne	28
2.5.4.3 Les enzymes d'origine végétale	29
CHAPITRE 3 : LES POLYPHENOLS	31
3.1 Généralité	31
3.2 Définition	31
3.3 Sources et localisation	32
3.4 Biosynthèse	32
3.5 Structure et classification	35
3.5.1 Formes les plus simples	36
3.5.1.1 Acides phénoliques	36
3.5.1.2 Les flavonoïdes	36
3.5.1.2.1 Définition	36
3.5.1.2.2 Structure répartition et propriétés	37
3.5.1.2.3 Classification	38
3.5.2 Formes condensées	40
3.5.2.1 Tanins	40
3.5.2.1.1 Définition	40
3.5.2.1.2 Classification biochimique	40
3.5.2.2 Phlorotanins	41
3.5.2.3 Lignines	42
3.5.2.4 Lignanes	42
3.6 Intérêts dans l'industrie agroalimentaire	42
3.7 Autres utilisations	43
CHAPITRE 4: ACTIVITES BIOLOGIQUES DES POLYPHENOLS	44

4.1	Généralité	44
4.2	Activité antioxydante	45
4.2.1	L'oxydation	45
4.2.2	Les antioxydants	46
4.2.2.1	Les antioxydants endogènes	47
4.2.2.2	Les antioxydants naturels	47
4.2.2.3	Mécanismes d'action des antioxydants phénoliques	47
4.3	Activité antimicrobienne	48
4.4	Inhibition des enzymes	49
4.5	Prévention des maladies	49
4.6	Précipitation des protéines	50
4.7	Chélation des ions métalliques	51
4.8	Toxicité	51
4.9	Métabolisme et absorption	51
	CHAPITRE 5 : MATERIELS ET METHODES	53
5.1	Matériel	53
5.1.1	Matériel biologique	53
5.1.2	Matériel non biologique	54
5.2	Méthodes	55
5.2.1	Analyses physico-chimiques	57
5.2.1.1	Détermination de la teneur en extrait sec	57
5.2.1.2	Détermination des cendres totales	57
5.2.1.3	Détermination de la teneur en matière grasse	59
5.2.1.4	Détermination du pH	59
5.2.2	Extraction, purification et caractérisation des protéases	60
5.2.2.1	Extraction des protéases	60
5.2.2.2	Purification des protéases	60
5.2.2.3	Dosage des protéines totales	61
5.2.2.4	Mesure de l'activité coagulante (méthode de Berridge)	63
5.2.2.4.1	Préparation de substrat de Berridge	63
5.2.2.4.2	Mesure du temps de prise	63
5.2.2.4.3	Calcul de la force coagulante F	63
5.2.2.5	Caractérisation de la solution enzymatique	64
5.2.2.5.1	Influence de la température du lait	64
5.2.2.5.2	Influence du pH du lait	64

5.2.2.5.3 Influence de la concentration en CaCl ₂	64
5.2.2.6 Rendement en protéines brutes	64
5.2.2.7 Rendement de prépurification	65
5.2.3 Extraction des polyphénols	65
5.2.3.1 Méthodes d'extraction	65
5.2.3.2 Dosage des composés phénoliques totaux	69
5.2.3.3 Dosage des flavonoïdes	69
5.2.3.4 Dosage des tanins condensés	72
5.2.3.5 Extraction des polyphénols par Soxhlet	74
5.2.3.6 Purification des polyphénols	74
5.2.3.7 Dosage de la vitamine C	75
5.2.3.8 Chromatographie sur couche mince CCM	76
5.2.3.9 Détermination de l'activité antioxydante	77
5.2.3.9.10 Etude de l'activité antimicrobienne	79
5.2.4 Analyses statistiques	81
CHAPITRE 6 : RESULTATS ET DISCUSSION	82
6.1 Résultats des analyses physico-chimiques	82
6.1.1 Teneur en matière sèche et teneur en cendres	82
6.1.2 Teneur en matière grasse	84
6.2 Extraction, purification et caractérisation des protéases	84
6.2.1 Rendement d'extraction	84
6.2.2 Taux protéiques et rendement en protéine brute	84
6.2.3 Forces coagulantes des extraits	85
6.2.4 Profil de la purification des protéases et rendement de prépurification	86
6.2.5 Caractérisation de la solution enzymatique	87
6.2.5.1 Influence de la température du lait	87
6.2.5.2 Influence du pH du lait	89
6.2.5.3 Influence de la concentration en CaCl ₂	90
6.3 Extraction des polyphénols	91
6.3.1 Rendement d'extraction de la matière sèche dissoute dans le solvant	92
<u>6.3.2 pH des extraits polyphénoliques</u>	<u>94</u>
<u>6.3.3 Teneur en polyphénols totaux</u>	<u>95</u>
6.3.4 Teneur en flavonoïdes	100
6.3.5 Teneur en tanins condensés	104

6.3.6	Extraction des polyphénols par Soxhlet	108
6.3.6.1	Rendement d'extraction	109
6.3.6.2	Chromatographie sur couche mince (CCM)	109
6.3.6.3	Teneur en polyphénols totaux dans les extraits bruts et purifiés	113
6.3.7	Teneurs en acide ascorbique (vitamine C)	114
6.3.8	Activité antioxydante	115
6.3.8.1	Activités antioxydantes de la vitamine C et de la quercétine	115
6.3.8.2	Activités antioxydantes des extraits d'artichaut	116
6.3.9	Activités antimicrobiennes	118
6.3.9.1	Extraits purifiés	119
6.3.9.2	Fractions aqueuses des extraits purifiés	121
	CONCLUSION	124
	APPENDICES	
	LISTE DES ABRÉVIATIONS	
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

INTRODUCTION

En industrie agro-alimentaire, la fabrication du fromage repose sur la coagulation du lait. C'est un processus physicochimique conduisant à la dénaturation des substances colloïdales, protéiques en particulier sous l'action d'agents physiques, chimiques ou biochimiques [1]. La coagulation est assurée essentiellement par la présure extraite de la caillette du préruminant [2].

Ces dernières années, l'essor de l'industrie fromagère a abouti à une forte demande en présure engendrant ainsi des problèmes d'approvisionnement en cette matière. Cette situation a encouragé les chercheurs à diversifier les sources de coagulants qui sont plus efficaces, moins coûteuses et plus disponibles.

La tendance en premier lieu est orientée vers les enzymes coagulantes extraites de proventricule du poulet, des viscères des poissons, de la pepsine bovine, etc. ; mais les résultats ne sont pas satisfaisants (amertume, friabilité du caillé...)[3].

En suite les recherches ont été focalisées sur les coagulases produites par des microorganismes génétiquement modifiés qui donnent des quantités abondantes de coagulants avec des propriétés très comparables à celle de la présure, toutefois cette source n'est pas sans risque (contamination, stabilité, mutation...).

Récemment l'attention des chercheurs est orientée vers les coagulases végétales comme source naturelle très disponible et déjà utilisée largement à l'échelle artisanale pour la fabrication des fromages traditionnels (Djben, Mekika, Serra da Estrela, Serpa...). Plusieurs travaux, d'évaluation de l'activité coagulante, ont été réalisés en Israël sur la courge (*Cucurbita pepo*) au Liban sur le caroubier [4], au Bénin et au Nigéria sur la pomme de Sodome (*Calotropis procera*) [5], en Espagne et au Portugal sur les espèces du *Cynara* [6, 7, 8].

Cependant, l'utilisation des coagulases végétales ne donne pas des résultats satisfaisants en comparaison avec ceux de la présure car leur activité protéolytique très élevée se traduit par l'apparition d'un ensemble d'inconvénients technologiques tels que l'amertume, la friabilité du caillé et le rendement fromager faible [3]. En outre, la purification des extraits coagulants permet d'éviter les interactions indésirables des autres composants des plantes en minimisant les inconvénients précitées.

Le foin de la fleur d'artichaut (*Cynara scolymus* L.) sous produit d'un légume méditerranéen appréciable, est moins étudié malgré qu'il présente une bonne activité coagulante et des caractéristiques acceptables du caillé. Cette activité coagulante est attribuée à des protéinases aspartiques (cynarases A, B et C) [7].

Le réceptacle est les sous produits d'artichaut renferment d'autres biomolécules actives (inuline, fibres, polyphénols...) à intérêts technologique et pharmaceutique. Les polyphénols des feuilles d'artichaut sont les principes actifs les plus étudiés et largement utilisés en phytothérapie pour leurs vertus curatives et leurs propriétés antioxydantes et antimicrobiennes [9, 10]. Ces activités biologiques sont attribuées aux acides caffeoylquinique et ses dérivés et aux flavonoïdes comme la lutéoline [10]. En revanche, très peu d'études ont été faites sur les polyphénols des autres parties de la plante (tige, bractées et foin).

Plusieurs extraits polyphénoliques des différentes plantes (thé, romarin...) ont été incorporés dans divers aliments pour empêcher les phénomènes de dégradation oxydatives des constituants lipidiques, qui aboutissent au rancissement. Ce phénomène présente des inconvénients sur les plans sensoriel, nutritionnel et économique [11].

L'exploitation des activités biologiques, antioxydante et antimicrobienne, des polyphénols des sous produits d'artichaut en technologie alimentaire comme additifs de conservation mérite des études approfondies pour la valorisation de ces substances.

Dans ce mémoire, nous avons étudié deux biomolécules actives, les protéases et les polyphénols, de différentes parties de la fleur d'artichaut (réceptacles, foins, tige et bractées) en vue d'évaluer leurs intérêts thérapeutique et technologique. Le travail de cette étude, a été conduit en deux parties :

Dans la première partie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation physicochimique (effets de la température, du calcium et du pH) des protéases extraites et purifiées à partir des foins de la fleur d'artichaut.

La deuxième partie a été consacrée à l'étude des polyphénols de différentes parties de la fleur d'artichaut ; dans cette partie, nous avons traité deux volets :

- Dans le premier volet, nous avons cherché le meilleur rendement d'extraction des polyphénols, en testant et modifiant les méthodes et les solvants d'extraction.
- Dans le deuxième volet, l'extrait purifié des polyphénols fait l'objet d'évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes de ces substances.

CHAPITRE 1

L'ARTICHAUT

1.1 Généralités

Le nom botanique de l'artichaut (*Cynara scolymus* L.) est dérivé en partie de la tradition de la fertilisation de la plante avec des cendres (latin : *cinis*, *cineris*), et en partie de mot grec *skolymos*, signifiant « thistle » des épines trouvées sur les bractées (elles ne sont pas des feuilles) qui enferment la fleur formant la partie comestible de la plante [12]. L'artichaut est une espèce qui a été connue depuis le IV^{ème} siècle comme aliment et remède [12].

Au Moyen-Orient on appelle souvent l'artichaut «ardhi-chouki», qui signifie littéralement «épine de terre». Les mots «Artichaut» en français, «Carciofo» en italien, «Artichoke» en anglais, «Alcachofa» en espagnol et «Artishoke» en allemand, trouvent tous leur origine dans le mot arabe «Harsciof», qui signifie «épine de terre» [13].

1.2 Description botanique

L'artichaut est une plante potagère vivace, atteignant deux mètres d'hauteur dont les feuilles, plates et lobées, forment une volumineuse rosette. Il est cultivé pour ses capitules, ou tête, dont on mange le réceptacle (fond d'artichaut) et la base des bractées (feuilles d'artichaut) [14, 15]. L'artichaut (*Cynara scolymus* L.) est une plante herbacée pérenne issue de la domestication de l'espèce *Cynara cardunculus* L. vivant à l'état spontanée dans certaines régions de l'Europe méridionale (Sardaigne, Espagne) et en Afrique du nord [16, 17].

1.3 Systematique

L'artichaut (*Cynara scolymus* L.) est une plante dicotylédone de la famille des Astéracées ou composées. C'est un chardon domestique et cultivé issu d'une sélection

horticole continue de l'espèce (*Cynara cardunculus* L.), dont la variété sauvage est *Cynara cardunculus sylvestris* [18, 19, 20].

Règne : *Plantae*
Division : *Magnoliophyta*
Classe : *Magnoliopsida*
Ordre : *Asterales*
Famille : *Asteraceae*
Genre : *Cynara*
Nom binominal : *Cynara scolymus* L.

1.4 Composition et valeur nutritionnelle

L'artichaut est une source élevée de fibres avec 4,7 g pour un artichaut de taille moyenne, ils sont constitués de substances qui ne sont pas digérées par l'organisme [21].

La valeur nutritive globale du cœur d'artichaut est comparable, sinon supérieure, à celle de la majorité des cultures maraîchères (Tableau 1.1). Il possède une valeur énergétique élevée (47 kcal/100 g). Il est riche en protéines (2,9 à 3,27 g/100 g), en sucres (10,50 g/100 g), en sodium (94 mg/100 g), en calcium (44,05 mg/100 g) et en fer (1,51 mg/100 g). Il constitue également un apport important en vitamines B₁, B₂, B₃, B₅, B₆ et en acide folique [13, 22].

L'artichaut est une excellente source de vitamine C (60 à 100 mg/kg) et de provitamine A, de potassium et de magnésium [22, 23]. Il est aussi riche en substance amère et aromatique, la cynarine, utilisée dans la fabrication médicamenteuse, ainsi que de nombreuses enzymes, des acides alcools (malique, lactique, citrique), des acides phénols, des flavonoïdes et de l'inuline [23, 24]. Les artichauts possèdent un contenu élevé d'inuline (3 % de poids frais), ses propriétés prébiotiques sont bien connues [25].

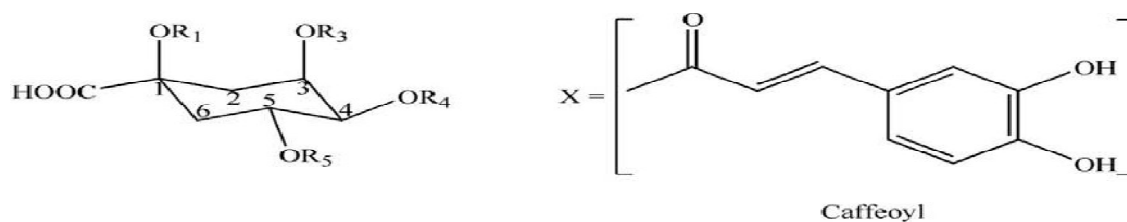
Tableau 1.1 : Valeur alimentaire comparative de quelques cultures maraîchères [13].

Pour 100g	Protéines (g)	Lipides (g)	Sucres (g)	Fibres (g)	Energie (Kcal)	Na (mg)	Vitamines					
							B ₁ (mg)	B ₃ (mg)	B ₆ (mg)	C (mg)	A (UI)	B ₉ (mg)
Artichaut	3,27	0,15	10,5	5,4	47	94	0,072	1,05	0,116	11,7	18	68
Carotte	1,03	0,91	10,1	3	43	35	0,097	0,928	0,147	9,3	2813	14
P de terre	2,07	0,1	18	1,6	79	6	0,088	1,48	2,26	19,7	0,0	12,8

1.4.1 Principes actifs

En tant que légume, le fond d'artichaut est le légume le plus riche en polyphénols totaux de notre alimentation, devant le persil et le chou de Bruxelles (de 202 à 438 mg/100 g de légume frais exprimés en équivalent acide gallique) [26]. En comparaison avec les légumes secs (pois chiches et les lentilles), l'artichaut possède les teneurs les plus élevées en polyphénols (264, 217 et 197 mg/100 g respectivement) et en tanins (9,1 ; 10,8 et 6,3 mg/100 g respectivement) [13].

Les acides mono et dicaféylquiniques sont les principaux composants actifs d'artichaut, il accumule divers acides caféiques (3,4-dihydroxycinnamique) (figure 1.1) [12, 27]. D'autres composés phénoliques appartiennent à la classe des flavonoïdes, telle que l'apigénine, la lutéoline, les anthocyanidines, la cyanidine, la péonidine, et la delphinidine ont été identifiées dans des tissus d'artichaut (figure 1.2). L'apigénine et des glycosides de lutéoline ont été détectés dans les feuilles et les têtes d'artichaut, alors que les colorants d'anthocyanine sont présents seulement dans les capitules. Néanmoins, la lutéoline est un antioxydant fort qui protège les lipoprotéines de faible densité d'oxydation [12].



Quinic acid : R₁ = H; R₃ = H; R₄ = H; R₅ = H

1-*O*-Caffeoylquinic acid: R₁ = X; R₃ = H; R₄ = H; R₅ = H

3-*O*-Caffeoylquinic acid or Neochlorogenic acid: R₁ = H; R₃ = X; R₄ = H; R₅ = H

4-*O*-Caffeoylquinic acid or Cryptochlorogenic acid: R₁ = H; R₃ = H; R₄ = X; R₅ = H

5-*O*-Caffeoylquinic acid or Chlorogenic acid: R₁ = H; R₃ = H; R₄ = H; R₅ = X

1,3-*O*-Dicafeoylquinic acid or Cynarin: R₁ = X; R₃ = X; R₄ = H; R₅ = H

1,4-*O*-Dicafeoylquinic acid: R₁ = X; R₃ = H; R₄ = X; R₅ = H

1,5-*O*-Dicafeoylquinic acid: R₁ = X; R₃ = H; R₄ = H; R₅ = X

3,4-*O*-Dicafeoylquinic acid: R₁ = H; R₃ = X; R₄ = X; R₅ = H

3,5-*O*-Dicafeoylquinic acid: R₁ = H; R₃ = X; R₄ = H; R₅ = X

4,5-*O*-Dicafeoylquinic acid: R₁ = H; R₃ = H; R₄ = X; R₅ = X

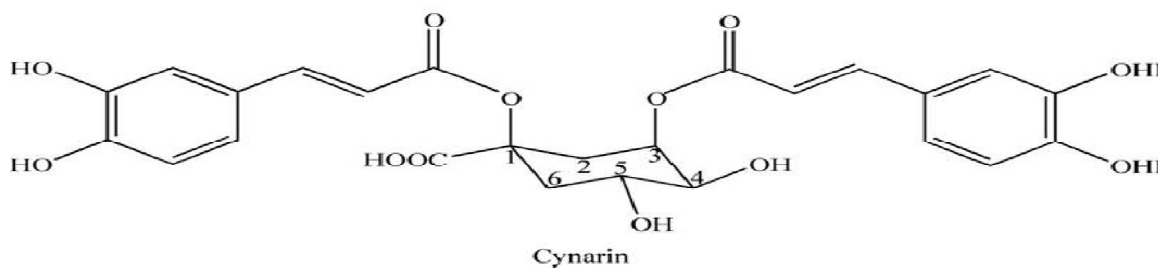
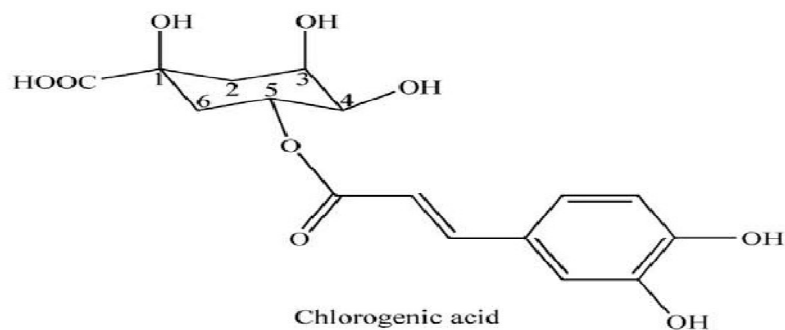


Figure 1.1 : Acides mono- et dicafeoylquinique d'artichaut [12].

D'après Wichtl et Anton [28] et Bruneton [29], l'artichaut contient :

- Des flavonoïdes (environ 0,5%), surtout des hétérosides de la lutéoline, comme la lutéoline-7- glucoside (cynaroside) la lutéoline-7- rutinoside.
- Des acides phénols et des acides alcools : esters de l'acide caféylquinique (acide chlorogénique) (0,02-2%) et de l'acide 1,5- dicaféylquinique (cynarine) présente dans la drogue fraîche.
- Des principes amers : lactones, sesquiterpénique de type guaianolide (0-4%) dont la cynaropicrine qui confèrent à la feuille une forte amertume.
- Des acides organiques divers : malique, succinique, lactique, fumarique, citrique...constituants banals du cycle de Krebs.

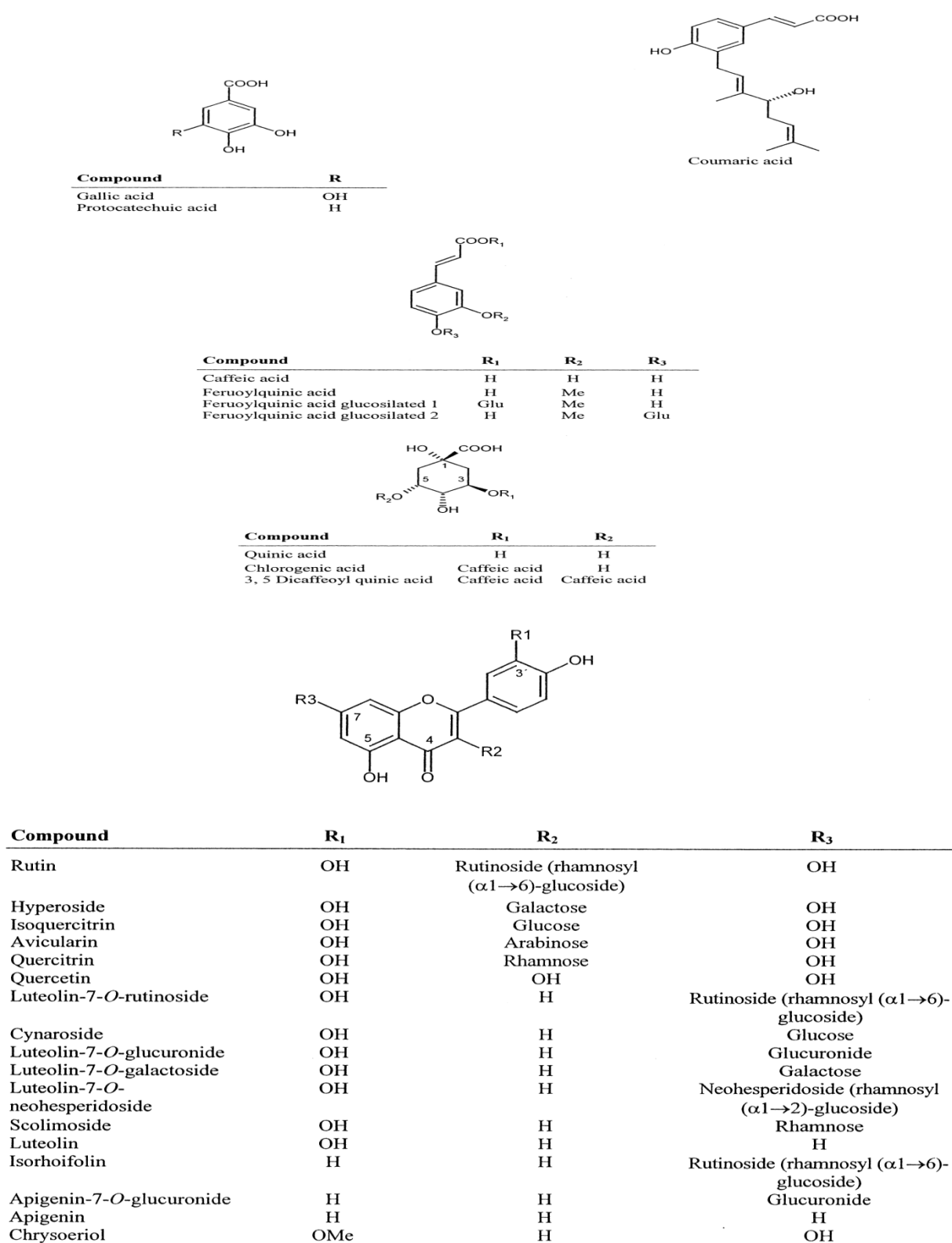


Figure 1.2 : Structures chimiques des composés phénoliques existant dans l'artichaut [30].

1.4.2 Propriétés biochimiques des polyphénols d'artichaut

La présence des esters caféylquiniques dans des tissus d'artichaut est responsable de phénomène de brunissement, ce qui se produit par l'oxydation enzymatique d'orthodihydroxyphénolique, substrats des polyphénoloxydases (PPO, EC 1.14.18.1) ou à la formation des complexes acides fer-chlorogéniques [12].

Les polyphénols et les polysaccharides peuvent former des complexes, et les mécanismes sont les mêmes que pour les protéines [31].

1.5 Intérêts de la plante

1.5.1 Alimentation humaine et animale

La partie consommée d'artichaut est le réceptacle floral avec une partie du pédoncule. Ce légume est nutritif, il est riche en vitamines, calcium, potassium, phosphore, fer et sodium [19]. L'artichaut est largement consommé en Espagne (2,6 g/j par personne), ceci est dû au contenu en protéines et en minéraux considérables, un bas pourcentage de lipides, une proportion élevée de fibre diététique, de substances polyphénoliques et de fructan-oligosaccharides [32].

Les têtes, grandes inflorescences, constituées de feuilles charnues comestibles (bractées) et de réceptacle sont employés dans le monde entier et représentent un ingrédient fondamental du régime méditerranéen [9].

Les sous-produits d'artichaut représentent des quantités importantes, aussi bien au champ (15 à 20 T/ha/an) que dans les résidus des conserveries [13]. Ils peuvent être employés après leur ensilage et sans risque sanitaire dans l'alimentation des ruminants [33, 34].

1.5.2 Phytothérapie

En phytothérapie, ce sont les feuilles qui sont utilisées [35]. Ces feuilles contiennent des principes actifs tels que l'inuline, l'acide chlorogénique (composé phénolique principal), l'apigénine et la lutéoline [36]. Ces principes actifs permettent de lutter contre la perte d'appétit, le jaunisse et stimule la sécrétion biliaire ; elle augmente également la biodisponibilité du calcium, exerce un effet régulateur de transit intestinal tout en améliorant le fonctionnement du côlon, exerce un effet hypolipidémiant et hypocholestérolémiant et favorise le contrôle de la glycémie [23, 37, 38, 39]. D'ailleurs, elle peut modifier la microflore du côlon, en augmentant la prolifération et l'activité des espèces salutaires [32].

Des extraits des feuilles d'artichaut sont traditionnellement employés dans le traitement des désordres dyspeptiques et hépatiques, principalement dus à des sécrétions biliaires insuffisantes, induisant, lors de la prise d'artichaut, une normalisation de ces fonctions. L'acide 1,5- dicaféylquinique (acide chlorogénique, cynarine), et les flavonoïdes (luteolin-7-O-glucoside) sont responsables d'une augmentation de débit biliaire (cholérétique) et induisent une hépatoprotection vis-à-vis de toxiques (éthanol, tétrachlorure de carbone, α amanitine...) [24, 28, 40, 41].

Pour les artichauts, l'activité antioxydante a été attribuée aux flavonoïdes, à l'acide chlorogénique, au cynarine (dérivé d'acide caféoylquinique) et aux hétérosides de la lutéoline (figure 1.2), tous des antioxydants in vitro [40, 42]. Cette activité engendre une modification de métabolisme lipidique (effet antiathérogène) avec diminution et empêchement de la biosynthèse de cholestérol total (baisse de taux de LDL et, inversement, augmentation de la valeur des HDL) par inhibition indirecte de l'activité réductase de 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA. La lutéoline est le flavonoïde responsable de cet effet [43, 44]. Bundy et *al.* [45], ont conclu que la consommation des extraits des feuilles d'artichaut a eu comme conséquence une modeste mais favorable différence significative en cholestérol total après 12 semaines.

Les feuilles abaissent le taux de sucre sanguin et donc employer contre le diabète [46]. Il est aussi très efficace pour accélérer l'élimination de l'urée (diurétique) et favorise une bonne circulation du sang [47, 48].

Des extraits secs d'artichaut sont actuellement commercialisés comme drogues, principalement pour le traitement des affections hépatiques et comme remède pour l'indigestion [12, 45].

1.5.3 Autres utilisations

L'extrait des fleurs de *Cynara scolymus* L., a été également prétendu être efficace comme la présure. Récemment, Chazarra et *al.* [8] ont pu purifier les protéinases de *Cynara scolymus* L., une espèce qui contient trois protéinases (cynarases A, B et C) avec une activité de coagulation du lait. Chacun des trois cynarases est une glycoprotéine qui se compose d'une grande et d'une petite sous-unité.

1.6 Toxicité et effets indésirables

La DL₅₀ d'un extrait hydroalcoolique de feuilles d'artichaut déterminée chez le rat, est supérieure à 2 g/kg par voie IP (intrapéritonéale). Les extraits d'artichaut ne semblent pas toxiques et les effets indésirables qu'entraîne (éventuellement) leur usage sont mineurs (rare manifestation d'inconfort gastro-intestinale). A noter que les sujets allergiques aux *Asteraceae* peuvent développer une réaction allergique aux produits contenant de l'artichaut [26].

1.7 Production et consommation

La production mondiale en 2002, estimée par la FAO, avoisine 1,32 millions de tonnes sur une superficie d'environ 122 mille hectares. 67 % des superficies mondiales en artichaut sont localisées en Europe. Le bassin méditerranéen produit à lui seul 90 % de la production mondiale en artichaut [49].

L'artichaut contribue d'une manière significative à l'économie agricole méditerranéenne, avec une production annuelle d'environ 770.000 tonnes, plus de 60 % de production mondiale en 2007 [12] et 85 % en 2010 [50]. Sur les 80 kha de la terre cultivée, l'Italie est le premier producteur du monde (environ 474.000 T), suivi de l'Espagne (215.000 T), la France (55.000 T) et la Grèce (25.000 T).

L'artichaut est également cultivé au Proche Orient (la Turquie et l'Iran), l'Afrique du Nord (Egypte, Maroc, Algérie, Tunisie), Amérique du Sud (l'Argentine, le Chili et le Pérou), et les Etats-Unis (principalement en Californie), et sa culture s'étend en Chine (65.000 T en 2007) [12].

CHAPITRE 2

COAGULATION ET AGENTS COAGULANTS

2.1 Généralités

La partie essentielle intervenant lors de la coagulation du lait est la micelle de caséine, une particule sphérique formée par l'association des caséines (α_{s1} - α_{s1} - β - κ - γ) et de composants salins dont les principaux sont le calcium et le phosphate [51]. Elle présente une grande stabilité à cause de la charge nette (des répulsions électrostatiques s'opposent à leur rapprochement) et le degré d'hydratation (3,7 g d'eau par gramme de protéine) [51].

2.2 Définition

La coagulation du lait ou du babeurre correspond à des modifications physico-chimiques de la caséine sous l'action d'enzymes protéolytiques (présure) et/ou d'acide lactique (fermentation) qui entraînent la formation d'un réseau protéique appelé coagulum [52, 53].

2.3 Types de coagulation

En technologie fromagère, on distingue trois types de coagulation :

2.3.1 Coagulation par acidification

Elle consiste à précipiter les caséines à leur point isoélectrique (pHi) par acidification biologique à l'aide de ferments lactiques qui transforment le lactose en acide lactique, ou par acidification chimique (injection de CO₂, addition de glucono- δ -lactone ou ajout de protéines sériques à pH acide) [54].

Le nombre élevé des groupements acides par rapport aux groupements basiques libre confère à la caséine un pHi de 4,65, une charge négative et des propriétés acides [55].

L'abaissement du pH a pour effet de faire régresser l'ionisation des fonctions acides des caséines (résidus aspartiques- glutamiques- phosphosériques). Ce qui provoque une réduction de potentiel de surface et a pour conséquence de diminuer le pouvoir séquestrant des caséines α_s , β , de diminuer la voluminosité des micelles et d'augmenter la solubilité des sels phosphocalciques dans l'eau [51, 56].

A pH 5,8, les micelles perdent de leur individualité en formant des chaînes mais maintiennent leur aspect. À partir de pH 5,5 des agrégats apparaissent lorsque tout le phosphate de calcium micellaire est solubilisé et en absence d'agitation, il y a début de formation visible du gel lactique par mis en place de liaisons électrostatiques et hydrophobe entre les agrégats. Le gel est totalement organisé à pH 4,65 [57].

➤ Propriétés des gels lactiques

Le gel lactique est un réseau protéique tridimensionnel qui englobe dans ses mailles la totalité de la matière grasse et la phase aqueuse du lait. C'est un gel fragile, friable, a un faible niveau de minéralisation en calcium colloïdal et phosphore, très perméable ; l'exsudation spontanée de lactosérum se fera facilement [58, 59].

2.3.2 Coagulation enzymatique

En fromagerie, le lait est coagulé par action de la présure. Cette coagulation enzymatique passe par trois étapes :

2.3.2.1 L'hydrolyse enzymatique

La caséine entière renferme une sous unité -la caséine kappa- qui joue le rôle de colloïde protecteur en maintiennent à l'état dispersé et stable l'ensemble des micelles dans le lait. Les enzymes coagulantes dégradent spécifiquement cette caséine kappa, ce qui entraîne dans un deuxième temps une déstabilisation de la suspension des micelles et une floculation de caséinate de calcium [60].

La chymosine provoque une protéolyse limitée de la κ caséine. Elle hydrolyse, spécifiquement, la liaison peptidique *Phe*₁₀₅ - *Met*₁₀₆. Il en résulte une libération de deux peptides : la paracaséine κ (1-105) et le peptide 106-169 qui forme le caséinomacropeptide

CMP. Le premier a un caractère hydrophobe en raison de sa teneur en acides aminés basiques le second est hydrophile (figure 2.1) [61].

La libération de CMP se traduit par une réduction du potentiel de surface des micelles et, en conséquence, une diminution des répulsions électrostatiques qui, à l'état initial, contribue à la stabilité du système colloïdal [51, 62].

2.3.2.2 L'agrégation des micelles de caséine

Lorsque les forces répulsives (électrostatiques, hydriques et stériques) à l'origine de la stabilité colloïdale sont suffisamment réduites, condition obtenue dans le cas du lait à pH 6,6 pour un taux d'hydrolyse de la caséine κ d'environ 80%, les micelles de caséine proches ou contigües commencent à s'agréger, et le lait prend un aspect floconneux. L'agrégation des micelles de caséine déstabilisées met en jeu des interactions électrostatiques entre résidus de charges opposées, des liaisons hydrophobes, hydrogènes ainsi que les ponts calciques [63].

2.3.2.3 La réduction du gel

Pendant la quelle le gel acquiert une fermeté croissante [64].

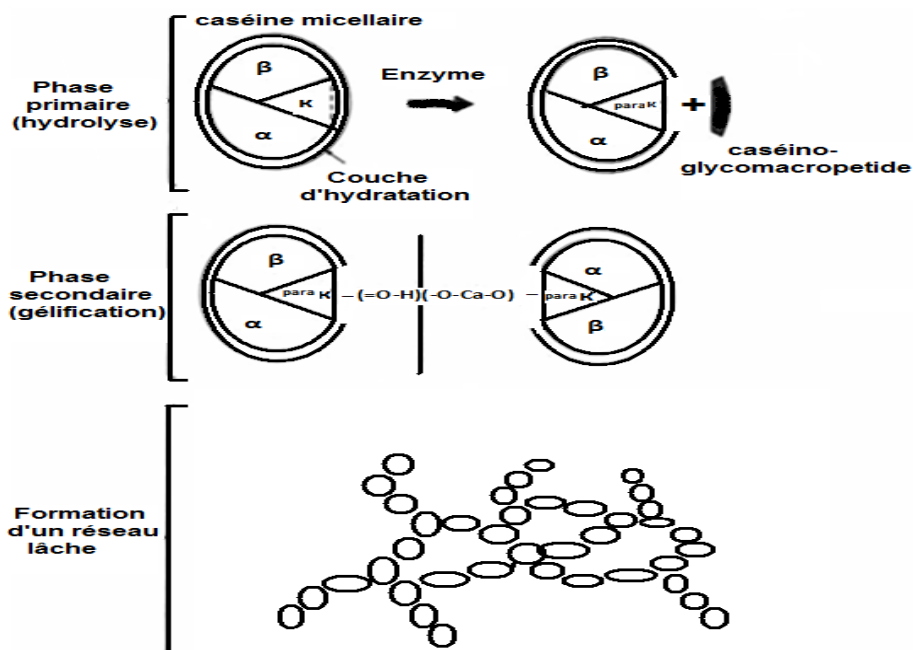


Figure 2.1 : Phases du processus de coagulation enzymatique du lait [65].

➤ Propriétés de coagulum

Ce sont des caillés moins perméables que les gels lactiques car le réseau micellaire est fermement organisé et possède des liaisons puissantes [66]. Le calcium et le phosphore sont liés aux micelles de caséine, le caillé est donc fortement minéralisé, très souple et élastique, la structure interne est homogène [59].

2.3.3 La coagulation mixte

Elle résulte de l'action conjuguée de la présure et de l'acidification. La multitude de combinaisons conduisant à différents états d'équilibre spécifique est à l'origine de la grande diversité des fromages à pâte molle et à pâte pressée non cuite [54].

On utilise toujours une quantité de présure assez importante (15 à 25 ml pour 100l du lait). L'acidification est plus précoce car la température à la quelle on se place permet le développement optimal des ferments lactique mésophiles (28 à 32 °C) [60].

➤ Propriétés de coagulum

Les propriétés des gels formés et leur aptitude à l'égouttage sont intermédiaires entre celles du coagulum obtenu par voie enzymatique dominante et celles issues d'une coagulation par voie acide [67]

2.4 Facteurs influençant l'activité coagulante

Plusieurs paramètres peuvent influencer les caractéristiques du caillé. Le contrôle de ces paramètres permet d'obtenir un caillé approprié à la transformation fromagère.

2.4.1 La température

La vitesse de coagulation du lait est maximale entre 40 et 42 °C avec la présure de veau. Au dessous de 10 °C, le gel ne se forme pas. L'inactivation thermique de l'enzyme commence à 50 °C et à 60 °C, elle est totale [60].

2.4.2 Le pH du lait

Le pH auquel s'effectue l'emprésurage est un paramètre primordial dans la fabrication du fromage. L'acidification préalable du lait augmente la production de glycomacropéptides, ce qui permet de raccourcir le temps de coagulation [68]. Selon St-Gelais et Tirard-Collet [65] lorsque le pH du lait descend, le temps de prise est plus court, le taux de raffermissement augmente et le gel devient plus ferme et atteint un maximum entre 5,8 et 6. En revanche, à des pH plus élevés, supérieurs à 7, il n'y a plus de coagulation, la présure étant rapidement inactivée. Le pH optimal de la présure est d'environ 5,5.

2.4.3 La nature et la concentration enzymatique

Le temps de prise est inversement proportionnel à la concentration d'enzyme utilisée. Par contre, si on ajoute plus de présure au lait de fromagerie, le taux de raffermissement et la fermeté du gel augmentent [65].

Si le taux de présure est trop important, nous aurons des problèmes pour contrôler le temps de coagulation (trop rapide), ainsi que des problèmes d'amertume dans le fromage (début de protéolyse conduisant à la formation de peptides amers) [59].

Le rendement fromager dépend aussi de type d'enzyme coagulante utilisée : plus l'activité protéolytique dans sa totalité est importante, plus faible est le rendement fromager (perte de spécificité pour la liaison 105-106). C'est pourquoi que la chymosine est préférable à des protéases microbiennes comme les enzymes de *Mucor miehei* par exemple [68].

2.4.4 La nature et la composition du lait

La nature du lait

Le lait de chèvre, qui est caractérisé par des teneurs en caséines plutôt faible et des teneurs en ions Ca^{2+} assez élevées, présente un temps de floculation relativement court, une vitesse de raffermissement du gel élevée et une fermeté maximale du gel faible. Le lait de brebis qui est particulièrement riche en caséines et en calcium micellaire se

singularise par une vitesse de raffermissement nettement plus élevée et une fermeté plus deux fois supérieures à celle du lait de vache [69].

Le lait de chamelle exige plus de présure de veau que le lait de vache pour se coaguler [70]. Ce fait ayant pour origine une teneur réduite en caséine Kappa et une aptitude très limitée à l'acidification et à la coagulation enzymatique [71]. Le rendement de la fabrication de fromage à partir de lait de chamelle est plus faible qu'à partir de lait de vache [72].

- La matière grasse

La coagulation du lait repose sur les propriétés de la caséine. A ce niveau, la matière grasse est une charge inerte ; elle est emprisonnée dans le caillé et s'y maintient plus ou moins complètement, selon le mode de fabrication. Par contre, elle influence beaucoup les propriétés rhéologiques du caillé et sa teneur en eau [73].

- La teneur en protéines

La variabilité habituellement observée dans la concentration de caséine dans le lait n'as pas d'effet sur le temps de coagulation mais c'est un élément déterminant pour la fermeté. De même, l'ultrafiltration du lait n'abaisse que faiblement le temps de coagulation, sauf quand ce procédé de concentration permet de dépasser un facteur de concentration de deux. En revanche, ce temps de coagulation est nettement augmenté si le lait est dilué [68, 69, 74].

La maîtrise de la teneur en protéines de lait de fromagerie a un double but: rationaliser les fabrications et améliorer le rendement en fromage du lait traité en incorporant une partie des protéines solubles perdues dans le lactosérum, l'ultrafiltration ou l' Enrichissement en caséines et caséinates [53, 75].

2.4.5 Effet des éléments minéraux

- Le calcium

L'addition au lait de chlorure de calcium, une pratique en fromagerie a pour effet de réduire le temps de coagulation et d'accroître la fermeté du gel. Cette influence résultant à

la fois de l'abaissement du pH et de l'augmentation de la teneur en calcium micellaire, un facteur déterminant de l'aptitude du lait à la coagulation par la présure [76].

Bien que la teneur en calcium n'intervienne pas sur l'activité de l'enzyme, le temps d'hydrolyse est réduit car la déstabilisation des micelles de caséines entraîne un abaissement du taux d'hydrolyse de la caséine κ pour permettre le début de l'agrégation. La baisse de l'énergie potentielle de répulsion entre micelles accroît la vitesse d'agrégation, ce qui entraîne une baisse de temps d'agrégation et de temps de gélification [63].

Les ions de calcium formeraient des ponts entre les groupes chargés négativement des caséines, conduisant à un caillé serré, plus compact et avec des particules plus grosses qui emprisonneraient moins d'eau [68].

➤ Le chlorure de sodium

L'addition de chlorure de sodium (ou de potassium) diminue le temps de coagulation et augmente la fermeté du caillé jusqu'à une concentration de 100mM. Puis la tendance s'inverse au-delà de cette limite, peut être par déplacement du calcium micellaire. Le chlorure de sodium conduit à une dissociation et libération de calcium et de phosphate micellaires dans le lactosérum [68, 77]. Par contre, Croguennec *et al.* [63] ont trouvé que l'addition de NaCl n'influe pas sur la réaction enzymatique ; par contre, le NaCl est un agent destructurant de la micelle de caséine.

2.5 Les agents coagulants

2.5.1 Nature biochimique

Les agents coagulants sont des protéases. Les protéases constituent le groupe le plus important d'enzymes industrielles utilisées dans le monde aujourd'hui [78]. La principale application des protéases est dans l'industrie laitière pour production de fromage [79].

2.5.2 Propriétés et caractéristiques

Selon Germonville [80], les enzymes coagulantes doivent répondre à un certain nombre de conditions :

- toxicité nulle ;
- pureté chimique et qualité microbiologique élevées ;
- activité protéolytique faible comparativement à l'activité coagulante ;
- comportement voisin de celui de la présure vis-à-vis de la température, du pH, des ions calcium.

D'un point de vue technologique, ces enzymes doivent :

- avoir une bonne activité coagulante dans les conditions habituelles de la fromagerie;
- donner au caillé des propriétés rhéologiques permettant de les travailler normalement, dans les délais habituels ;
- donner un rendement fromager identique à celui de la présure ;
- permettre une maturation et un affinage normal.

2.5.3 La présure

Pour coaguler le lait, on utilise traditionnellement la présure extraite de la caillette du veau [53]. L'utilisation de la présure bovine industrielle est la méthode préférée pour obtenir le lait caillé, en raison de sa production normalisée et son activité enzymatique qui permet au fabricant de fromage de déterminer exactement les périodes de coagulation et de coupure [81].

2.5.3.1 Définition

C'est un extrait qui provient de la caillette de jeunes bovidés nourris au lait [60]. La solution obtenue contient deux enzymes : la chymosine et la pepsine bovine en proportions variables, présentant un rapport : masse de chymosine active/masse de pepsine bovine $\geq 1,38$. Les solutions sont mises en vente en exprimant la force coagulante selon Soxhlet qui

correspond au volume de lait à 35 °C coagulé par 01litre de présure en 40 min. Ainsi un litre de présure *de force*10 000 doit coaguler 10 00 litres de lait à 35 °C en 40 min [2, 60].

2.5.3.2 Composition

- La chymosine (EC 3.4.23.3)

C'est une holoprotéine de 35 000 daltons, appartenant au groupe des protéases acides (pH 5,3 à 6,3) appelées protéases à aspartate, inactive dès 50 °C [2], la chymosine est la protéase majeur responsable d'au moins 85 % de l'activité coagulante totale [65, 82].

La chymosine est sécrétée inactive sous forme de prochymosine dans le quatrième estomac (abomasum), elle est activée en chymosine en présence de l'acidité d'ion H_3O^+ sécrété par cette organe [83, 84, 85]. La présure du jeune veau alimenté au lait est riche en présure (chymosine), alors que la présure du bovin adulte est riche en pepsine [86].

- La pepsine (EC3.4.23.1)

La pepsine est sécrétée par la caillette en quantité importante après le sevrage des bovidés. Son action protéolytique est voisine de celle de la chymosine mais les conditions d'action sont différentes. L'activité la plus marquée de la pepsine bovine est à pH acide [2].

2.5.4 Les succédanés de la présure

Pour pallier aux déséquilibres de l'offre et de la demande en matière de présure de veau, différentes solutions ont été proposées : à savoir, la mise en œuvre de protéases d'origine animale, végétale ou microbienne ou bien l'utilisation de chymosine recombinante [87].

L'obtention de la chymosine à partir des micro-organismes est en train de résoudre le problème de l'approvisionnement des fromageries en présure, mais dans les pays où cet approvisionnement demeure aléatoire, la recherche des autres sources d'extrait coagulant demeure d'actualité [88].

Les autres sources présentent certains inconvénients: diminution du rendement en fromage, profil d'activité différent de celui de la présure en fonction du pH et de la température, ce qui conduit souvent à des fromages amers [53].

2.5.4.1 Les enzymes coagulantes d'origine animale

➤ Pepsine bovine

La pepsine bovine, qui est assez proche de la chymosine au plan de la structure primaire est déjà présente dans la présure avec la chymosine et la gastricsine bovine [89].

➤ Pepsine de chameau

Des extraits d'abomasum de chameau adulte ont été employés pour coaguler le lait de vache avec succès [70].

➤ Pepsine d'agneau

Les pâtes de présure d'agneau sont préférentiellement utilisées dans la fabrication de certains fromages du lait de la brebis ou de la chèvre dans certains secteurs du bassin méditerranéen, tel que l'Italie (Provolone, Romano De Pecorino, Fiore Sardo), et la Grèce (feta). Les pâtes de présure d'agneau sont commercialement disponibles seulement en Italie [90].

➤ Pepsine de poissons

Les propriétés d'une pepsine coagulante extraite de la muqueuse gastrique d'un poisson (*Scyliorhinus canicula*), ont été décrites. On a pu montrer que les propriétés biochimiques de cette enzyme étaient compatibles avec une utilisation en industrie fromagère [89].

➤ Pepsine de poulet

Les travaux faits par Boughellout et Zidoune [91] ont montré que l'utilisation de la pepsine de poulet comme agent coagulant a donné des résultats comparables à ceux de la présure lors de la phase de coagulation.

2.5.4.2 Les enzymes coagulantes d'origine microbienne

La limitation des sources de la présure de veau sur les marchés mondiaux a augmenté la recherche conduite sur les enzymes alternatives de coagulation de lait d'origine microbienne [92].

La fabrication et l'utilisation en fromagerie des enzymes coagulantes extraites d'*Endothia parasitica*, de *Mucor pusillus*, *Penicillium janthinellum*, *Rhizopus chinensis* et de *Mucor miehei* sont autorisées. La dénomination de ces produits doit être « enzyme coagulante d'origine microbienne pour fromagerie » [60, 93]. Ces enzymes extracellulaires ont reçu une large acceptabilité dans l'industrie en raison de leur coagulation élevée du lait et leur basse activité protéolytique [92]. Déjà en 1974, 60 % des fromages produits aux Etats-Unis étaient fabriqués avec les protéases microbiennes. Ce rapide succès est dû en partie à leurs prix compétitifs, ne représentant que 45 % du prix d'acquisition de la présure traditionnelle. Toutefois, comparée avec la chymosine, les coagulants d'origine microbienne montrent certains désavantages, dont un ratio plus petit entre l'activité de coagulation du lait et l'activité protéolytique non spécifique et l'apparition de goûts indésirables pendant les périodes de maturation des fromages [93].

Des levures alimentaires transgéniques peuvent aussi produire des protéines hétérologues comme la chymosine A. Le gène de la chymosine A a été cloné dans la levure laitière *Kluyveromyces lactis*, puis cette chymosine a été utilisée pour fabriquer différents fromages notamment des emmentals. Les résultats obtenus avec de la chymosine produite par la levure transgénique sont identiques à ceux observés avec la présure de veau [94]. Et le temps de raffermissement de coagulum est plus rapide [60].

2.5.4.3 Les enzymes d'origine végétale

L'expérience empirique a conduit certaines populations à coaguler le lait en utilisant les écorces des arbres (*Acacia albida*) et leur sève (*Ficus carica* et *Calotropis procera*), les fruits d'un certain nombre de plantes (*Balanites aegyptiaca*, *Adenolichos anchietae*,

Droogmansia megalantha, différentes espèces d'*Eriosema*, melon et *Onopordum turcicum*) [88, 95, 96].

Ces plantes donnent avec le lait un caillé dont le comportement rappelle celui de la présure [88]. Cuvelier [3] évoque que l'utilisation de ces plantes ne donnent pas des résultats très satisfaisants en comparaison avec ceux de la présure ; l'activité protéolytique généralement très élevée, se traduit par l'apparition d'un ensemble d'inconvénient technologique tels que l'amertume, la friabilité du caillé et le rendement fromager faible.

Les enzymes extraites à partir des fleurs du *Cynara cardunculus*, *Cynara humilis*, *Cynara scolymus* et *Silybum marianum* (« cynarases » ou « cyprosins ») sont caractérisés par une activité de coagulation du lait élevée fendant le lien Phe105-Met106 de peptide dans le lait bovin et Lys116-Thr117 de caséine caprin [6, 97, 98, 99]. Elles engendrent une plus grande protéolyse et une saveur du fromage plus plaisante et plus prononcée a comparé avec du fromage à base d'une présure animal [100].

Des fromages traditionnels Espagnols et Portugais protégés d'appellation d'origine (PDO) Serra da Estrela, Castelo Branco et Serpa sont fabriqués depuis longtemps en utilisant des extraits aqueux des fleurs du cardon [43, 101].

Les fleurs de *Cynara cardunculus* sont très riches en protéases, à savoir les cardosines A et B, dus quels extraits [6, 102, 103]. Le premier est quelque peu semblable à la chymosine, tandis que le cardosine B est comme la pepsine. Quoique le cardosine A fende plus de liens de peptide que la chymosine, par conséquent produisant des modèles différents de la protéolyse, qui expliquent les différences a trouvé entre les fromages [83].

CHAPITRE 3

LES POLYPHENOLS

3.1 Généralités

Les plantes produisent une grande diversité de métabolites secondaires pour la défense et la survie dans l'écosystème. Les métabolites secondaires végétaux, dépassant actuellement 100 000 substances identifiées, appartiennent à trois classes chimiques principales : les terpènes (un groupe de lipides), les alcaloïdes (dérivés d'acides aminés) et les polyphénols (dérivés de glucides) [104].

Les polyphénols représentent une source importante de molécules utilisables par l'homme dans des domaines aussi différents que la pharmacologie ou l'agroalimentaire [105]

3.2 Définition

Actuellement, les polyphénols avec plus de 8000 structures différentes, constituent l'un des groupes phytochimiques les plus importants.

Les polyphénols sont des constituants communs des plantes, ils se trouvent sous formes conjuguées et/ou glycosylées. Ils sont caractérisés, comme l'indique leur nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes, généralement de haut poids moléculaire. Ils sont probablement produits comme des métabolites secondaires responsables de plusieurs propriétés organoleptiques des végétaux, particulièrement, de couleur et d'astringence et agir comme des détergents normaux au pâturage des animaux et en tant qu'agents antimicrobiens [106, 107, 108].

Ils sont caractérisés par la présence d'au moins un motif phénolique (cycle aromatique sur lequel viennent se greffer un ou plusieurs groupements (*OH*) (figure 3.1).

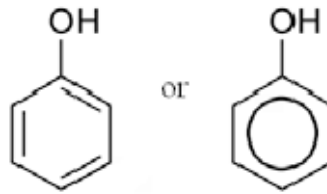


Figure 3.1: Structure du phénol (noyau aromatique)

3.3 Sources et localisation

Les principales sources des polyphénols sont les fruits, les boissons telles que le thé, le café, le jus de raisin et de fruits, le chocolat et, à un moindre degré, les légumes, les céréales et les graines de légumineuse [109].

A l'échelle cellulaire la répartition des composés phénoliques est très caractéristique. Ils s'accumulent principalement dans deux sites : d'une part la paroi cellulaire où sont présents les lignines et certains flavonoïdes et la vacuole où sont stockés les phénols solubles. Certains flavonoïdes (quercétine, kaempférol) pourraient également être présents au niveau de noyau et de la membrane plasmique [105].

3.4 Biosynthèse

Selon Katalinic *et al.* [110] et Bruneton [26], les composés phénoliques des végétaux sont issus de deux grandes voies d'aromatogenèse (figure 3.2 et 3.3) :

- La voie la plus courante est celle qui, via le shikimate (acide shikimique), conduit des oses ou amino-acides aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis, par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acides benzoïques, lignanes et lignines, coumarines...
- L'autre voie part de l'acétate et conduit à des poly- β -cétosters de longueur variable -les polyacétates- qui engendrent, par cyclisation (condensation aldolique), des composés souvent polycycliques : chromones, isocoumarines, xanthones, quinones...

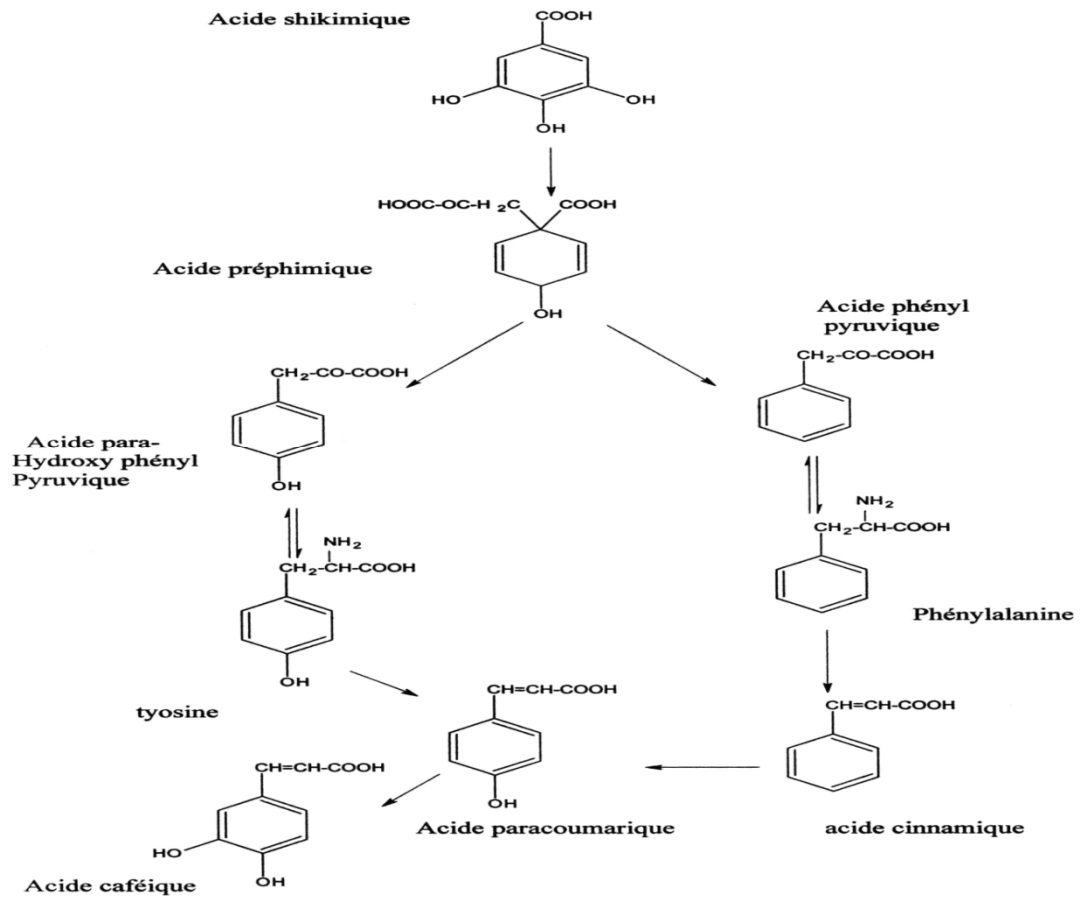


Figure 3.2: Synthèse biologique des acides phénoliques [26].

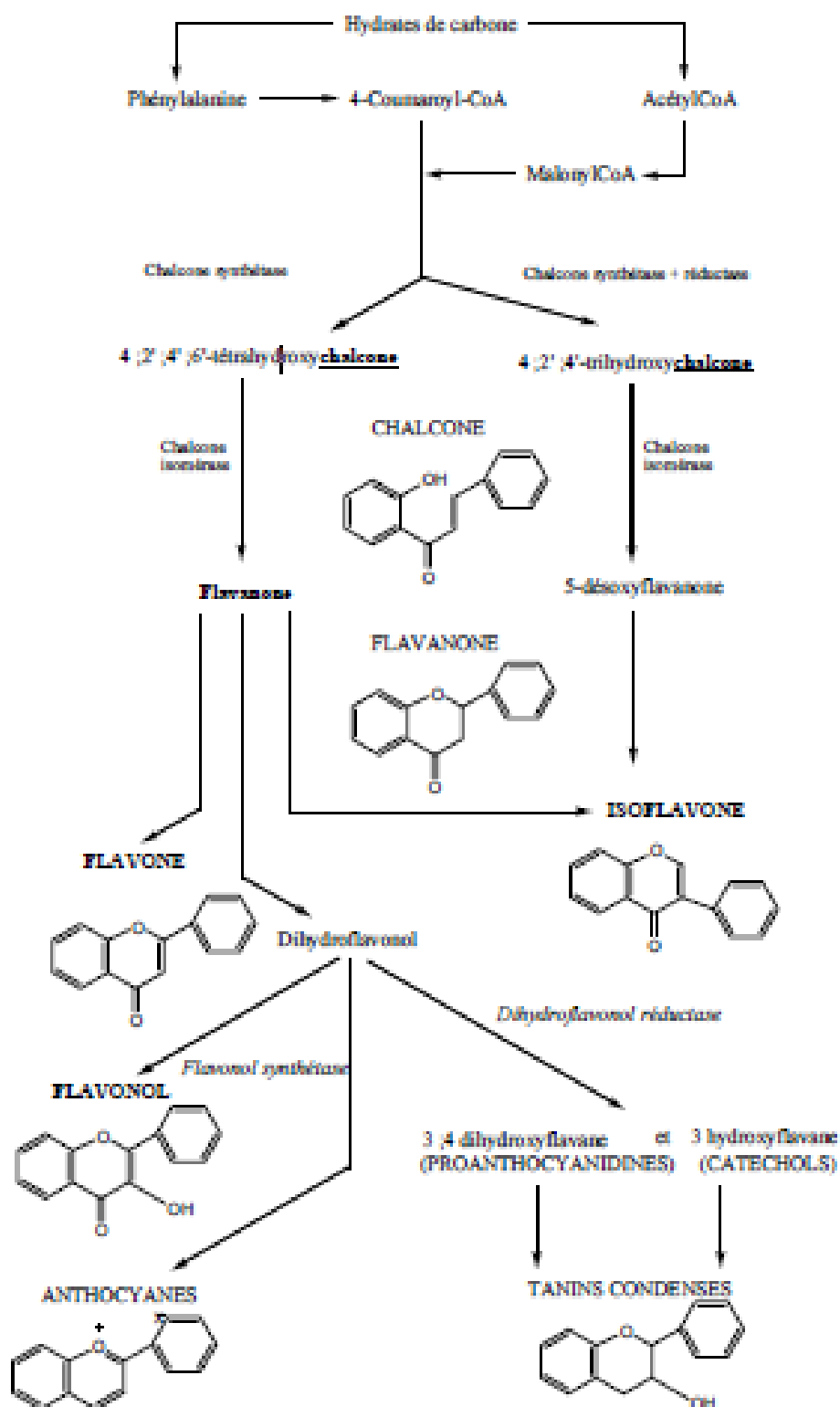


Figure 3.3: Voie de biosynthèse des flavonoïdes [111].

3.5 Structure et classification

Les polyphénols sont classifiés selon leur structure en tant que dérivés d'acides phénoliques, flavonoïdes et tannins qui représentent le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes [112, 113]. Les principales classes des composés phénoliques sont représentées dans le tableau 3.1.

Tableau 3.1: Les principales classes des composés phénoliques [105].

Classes	Squelettes carbonés	Exemples	Origines (exemples)
Acides phénoliques	C_6-C_1	Acide gallique, acide vanillique, acide Tannique	Epices, fraises
Acides hydroxycinnamiques Coumarines	C_6-C_3	Acide férulique, acide caféique, Acide p-coumarique Scopolétine	Pomme de terre, pomme, citrus
Naphtoquinone	C_6-C_4	Juglone	Noix
Stilbènes	$C_6-C_2-C_6$	Resvératrol	Vigne
Flavonoïdes ○ Flavonols ○ Anthocyanes ○ Flavanols ○ Flavanones Isoflavonoïdes	$C_6-C_3-C_6$	Kaempférol, quercétine Cyanidine, pélargonidine Catéchine, épicatechine Naringénine Daidzéine	Fruits, légume, fleurs, pois
Lignanes	$(C_6-C_3)_2$	Pinorésinol	Pin
Lignines	$(C_6-C_3)_n$		Bois, fruits à noyau
Tanins condensés	$(C_6-C_3-C_6)_n$		Raisin, Kaki

3.5.1 Formes les plus simples

3.5.1.1 Acides phénoliques

Deux classes des acides phénoliques peuvent être distinguées : dérivés de l'acide benzoïque (acides hydroxybenzoïques) (figure 3.4) et dérivés de l'acide cinnamique (acides hydroxycinnamiques) (figure 3.5) [114].

La teneur en acide hydroxybenzoïque des plantes comestibles est généralement très basse, excepté certains fruits rouges, radis noir et oignons. Le thé est une importante source d'acide gallique (4,5 g/kg). En outre, les acides hydroxybenzoïques sont des composants de structures complexes telles que les tanins hydrolysables [114].

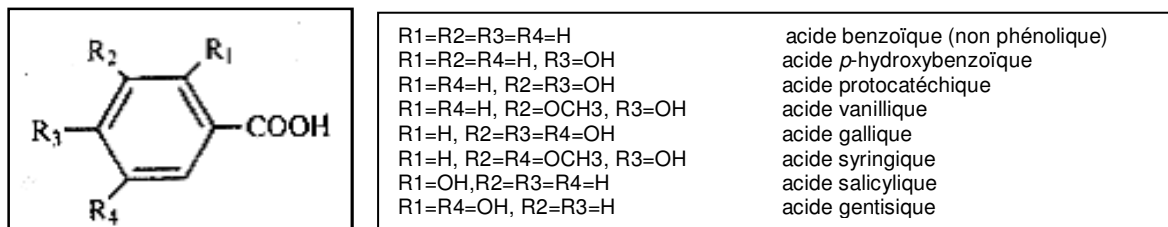


Figure 3.4: Les principaux acides hydroxybenzoïques [105].

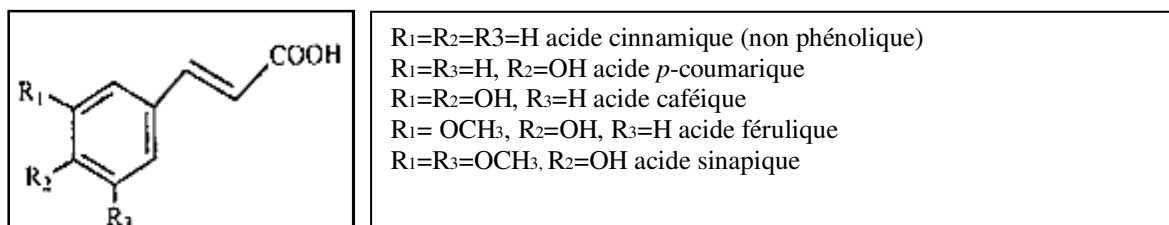


Figure 3.5 : Les principaux acides hydroxycinnamiques (phénylpropanoïdes) [105].

3.5.1.2 Les flavonoïdes

3.5.1.2.1 Définition

Le terme « flavonoïde » désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme les pigments quasiment universels des végétaux. Tous les flavonoïdes (plus de 4000) possèdent la même structure générale en C₁₅ (C₆-C₃-C₆) [115].

Les flavonoïdes sont, généralement, dérivés de benzo- γ -pyrone, qui est synonyme de chromone [116]. Ils sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phényl-chromone portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides. Les flavonoïdes sont donc des polyphénols complexes dont la structure est constituée de deux noyaux aromatiques (noyaux A et B) et d'un hétérocycle oxygéné (cycle C) (figure 3.6) [117].

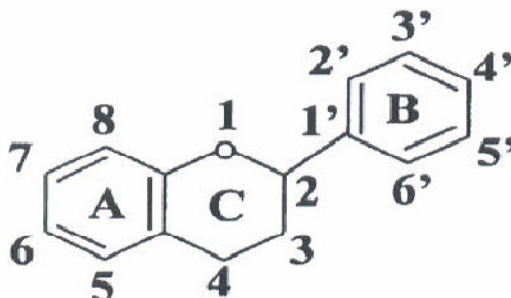


Figure 3.6: Structure nucléaire des flavonoïdes [4].

3.5.1.2.2 Structure, répartition et propriétés

Les flavonoïdes sont des hétérosides, c'est-à-dire des dérivés de génines sur lesquelles un ou plusieurs oses sont greffés. La liaison génine-ose existe grâce à la réunion, soit d'un hydroxyle phénolique, soit d'un hydroxyle de l'hétérocycle oxygéné, soit d'un -CH avec l'hydroxyle hémiacétalique du ou des ose(s). On obtient alors des O-hétérosides ou des C-hétérosides [117].

Les flavonoïdes se présentent sous la forme aglycone de glycosides et de dérivés méthylés ; on les trouve dans de nombreux fruits, légumes, feuilles et fleurs. Les glycosides sont en principe localisés dans les régions hydrophiles (vacuoles), tandis que les aglycones libres sont localisés dans les régions hydrophobes (cellules oléifères) [118]. Dans les feuilles leur fonction consiste à absorber l'ultraviolet qui pourrait être destructif pour le matériel génétique et pour les protéines de la cellule [119].

3.5.1.2.3 Classification

Le groupe des flavonoïdes comporte plus de dix classes, parmi eux citant: isoflavones, flavones, flavanones, flavanols, flavonols et anthocyanidols.

➤ Isoflavones (3-Phényl-chromone)

Les isoflavones sont des flavonoïdes appartenant aux phyto-œstrogènes (figure 3.7) [120]. Ils dérivent des flavanones mais outre une oxydation centrale, il y a transposition du cycle latéral du C_2 au C_4 de l'hétérocycle.

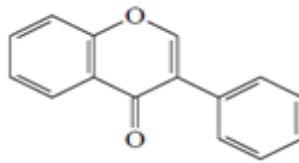


Figure 3.7 : Structure d'isoflavone [117].

➤ Flavanones

Les flavanones les plus étudiées sont la naringénine et l'hésperidine qui sont abondantes dans le pamplemousse et les oranges respectivement. Une flavanone moins étudiée, eriodictyol, est également abondante dans la peau de citron [120].

➤ Flavones (2-Phényl-chromone)

Ces molécules sont les plus nombreuses de groupe (530 flavones et environ 700 hétérosides de flavones) (figure 3.8) [26].

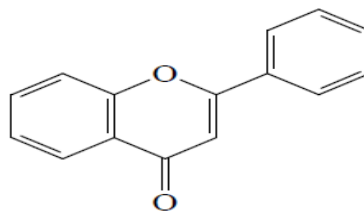


Figure 3.8 : Structure du flavone [117].

➤ Flavanols

Les flavanes sont à l'origine des tanins condensés (figure 3.9) [104].

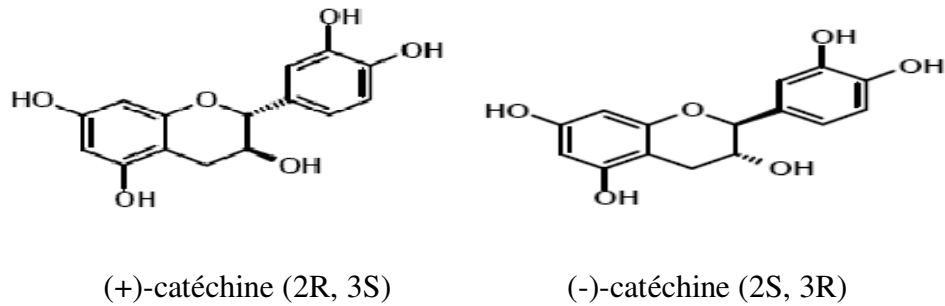


Figure 3.9 : Structure de flavanols [121, 122].

➤ Flavonols

Les flavonols (hydroxy-3flavone) sont les flavonoïdes incolores les plus omniprésentes en nourritures, et les représentants principaux sont la quercétine et la kaempférol (OH en 4', 5, 7) (figure 3.10). Ils sont présents, généralement, en concentrations relativement basses de 15 à 30 mg/kg de poids frais. Les sources les plus riches sont les oignons (jusqu'à 1,2 g/kg), chou vert, poireaux et myrtilles [114].

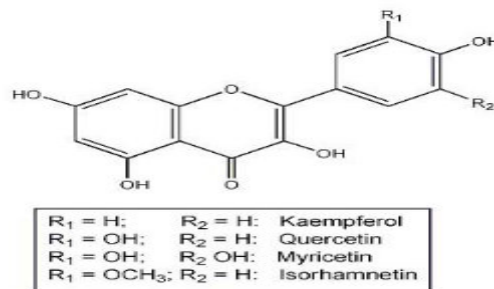


Figure 3.10 : Structures chimiques de quelques flavonols [114].

➤ Anthocyanidols

Parmi les colorants de ce type, six seulement sont importants en biochimie alimentaire. Ces composés rouges, bleus ou violets selon leurs structures, se rencontrent généralement sous la forme d'anthocyanoside, c'est-à-dire liés à un ou plusieurs glucides, ces pigments changent de teinte soit en fonction du pH (rouge-orange en milieu acide au bleu-mauve en milieu alcalin) soit lorsque le groupement glucidique est séparé par hydrolyse [123, 124].

3.5.2 Formes condensées

3.5.2.1 Tanins

3.5.2.1.1 Définition

D'un point de vue biochimique, une première définition a été proposée par Bate-Smith (1973) : « des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3 000 Da qui présentent, à coté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines ». Ainsi, les tanins sont désormais définis comme des polyphénols de masse moléculaire allant jusqu'à 20 000 Da [125, 126, 127].

3.5.2.1.2 Classification biochimique

Les tanins se divisent en deux catégories: les tanins hydrolysables (groupe principalement responsable des effets toxiques pouvant apparaître lors de la consommation de certaines plantes) et les tanins condensés (ils ne traversent pas la barrière intestinale, ils sont donc beaucoup moins toxiques que les tanins hydrolysables) [128, 129, 130]. Les deux groupes principaux de tanins sont caractérisés par des structures complexes soutenant une multiplicité de groupes phénoliques et par les masses moléculaires relatives qui, pour les métabolites secondaires, sont très hautes [131].

➤ Les tanins hydrolysables

Ce sont des substances non azotées, esters d'acides polyphénoliques associés à un sucre simple, généralement le D. glucose ou la xylose [132]. Ils sont caractérisés par le fait qu'ils peuvent être dégradés par hydrolyse chimique (alcaline ou acide) ou enzymatique. Ils libèrent alors une partie phénolique qui peut être soit de l'acide gallique (gallotanins comme le tanin de Chine ou « acide tannique ») soit un dimère de ce même acide, l'acide ellagique (tanins ellagiques) et une partie non phénolique (souvent du glucose ou de l'acide quinique) [105].

Les tanins hydrolysables sont basés sur l'unité structurale fondamentale d'acide gallique et sont presque invariablement trouvés en tant qu'esters multiples avec le D-glucose (gallotanins) [131].

➤ Les tanins condensés

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des polymères de flavan-3-ols liés par un lien interflavane de carbone ($C4-C8$ ou $C4-C6$) qui n'est pas susceptible d'être hydrolysé (figure 3.11) [133, 134].

Ils dérivent des catéchol et des proanthocyanidols par condensation des molécules. Ils sont parfois classés parmi les flavonoïdes au sens large car de structure voisine. Les tanins condensés ont un haut poids moléculaire et sont insolubles dans l'eau [135].

Les proanthocyanidines ne sont hydrolysés ni par les acides, ni par les tanases, mais en présence d'acide fort ou d'agents d'oxydation ils se transforment en substances rouges : les phlobaphènes (rouge de cola) [136].

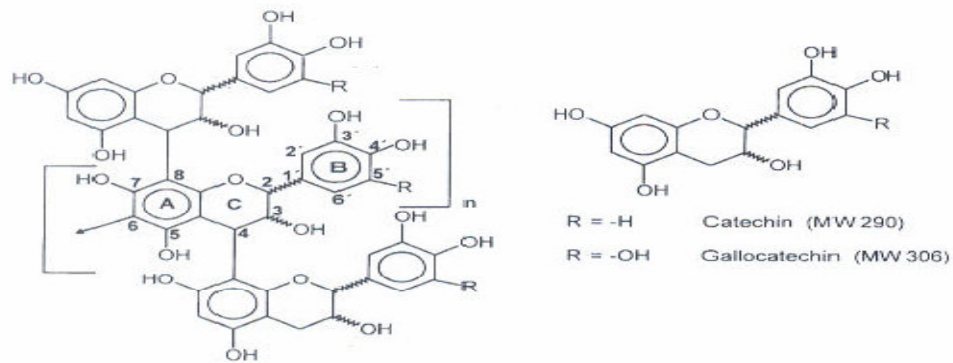


Figure 3.11: Structure oligomérique des tanins condensés (proanthocyanidines et leurs monomères catéchine et gallocatéchine) [4].

3.5.2.2 Phlorotanins

Les phlorotanins sont des polyphénols qui assurent probablement plusieurs fonctions biologiques, néanmoins, on considère qu'ils interviennent surtout comme antimicrobiens et antiappétants vis-à-vis des herbivores. Ils sont isolés d'algues, de cyanobactéries et d'éponges [137].

3.5.2.3 Lignines

Les lignines constituent 15 à 35 % du bois des Angiospermes et des Gymnospermes. En raison de leur caractère hydrophobe marqué, les lignines s'accumulent au niveau des parois des cellules. Elles résultent de la polymérisation, tridimensionnelle, de trois unités phénoliques de base dénommées monolignols et qui sont les alcools coumarylique, coniférylique et sinapylique [105].

3.5.2.4 Lignanes

Appelés aussi phyto-œstrogènes. Ce sont des composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones b des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phénylpropane [115].

3.6 Intérêts dans l'industrie agroalimentaire

Les composés phénoliques sont à l'origine du caractère amer de certains produits d'origine végétale, tels que les agrumes et leurs produits dérivés (naringine) et les olives (oléuropéine). Ils sont aussi responsables de l'astringence des fruits et des boissons. La maîtrise de ces caractères conditionne l'acceptabilité des produits par le consommateur et présente un enjeu économique majeur pour certaines industries de transformation des végétaux [126].

Bien que non connus officiellement comme des additifs puisque ils sont étiquetés comme « épices », les fabricants proposent des condiments en poudre, sous forme d'oléorésine ou d'émulsions à partir d'extraits de romarin pour stabiliser les huiles et les graisses, protéger les pigments de caroténoïdes, inhiber le brunissement et stabiliser la saveur. Ces extraits sont utilisés en pâtisserie, produits d'extrusion, huile de soja, saucisson fraîche... ils sont autorisés seulement dans les Etats-Unis [138].

Les principaux polyphénols d'intérêt technologique dans la pomme, le raisin, l'orge ou le thé sont les flavanols ou tanins condensés et lorsqu'une couleur rouge est recherchée, les pigments anthocyaniques [126].

Les tanins œnologiques exogènes rentrent dans le cadre des additifs et des traitements correctifs. De plus, leurs fonctions annoncées sont correctives sur les profils polyphénoliques, aromatiques et gustatifs des vins [139].

Récemment, les polyphénols ont suscité l'attention pour leur capacité de prolonger la durée de conservation des produits carnés en empêchant la rancidité oxydante [108].

Les polyphénols peuvent être considérés comme ingrédient fonctionnel. Les extraits riches en polyphénols comme le thé sont actuellement incorporés aux biscuits, lait, boissons et chewing-gum pour des raisons alimentaires dues à leurs effets bénéfiques sur la santé. L'addition des composés phénoliques aux produits à base de viande comme antioxydants, à la β -lactoglobuline écume comme stabilisateurs, au lait en tant qu'agents antifongiques et aux nourritures comme inhibiteurs des réactions de brunissement [108].

3.7 Autres utilisations

Dans l'industrie, les polyphénols sont employés dans la production des peintures, du papier, et des produits de beauté [140].

CHAPITRE 4

ACTIVITES BIOLOGIQUES DES POLYPHENOLS

4.1 Généralités

Les polyphénols sont des métabolites secondaires munis de plusieurs activités biologiques. Les principales propriétés biologiques sont résumées dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 : Activités biologiques des composés polyphénoliques [141].

Polyphénols	Activités
Acides Phénols (cinnamiques et benzoïques)	Antibactériennes, antifongiques et antioxydantes
Coumarines	Protectrices vasculaires et antioedémateuses
Flavonoïdes	Antitumorales Anti-carcinogènes Anti-inflammatoires Hypotenseurs et diurétiques Antioxydantes
Anthocyanes	Protectrices capillaro-veineux
Proanthocyanidines	Effets stabilisants sur le collagène Antioxydantes Anti-tumorales Antifongiques Anti-inflammatoires
Tannins galliques et catéchiques	Antioxydantes

4.2 Activité antioxydante

L'oxydation est une des plus importantes manifestations à l'origine de vieillissement des produits alimentaires et cosmétiques. Les dégradations oxydatives affectent les qualités nutritionnelles et sensorielles des aliments et peuvent avoir des répercussions sur la santé du consommateur. Elles sont également mises en cause dans le vieillissement des tissus biologiques et des organismes ainsi que dans de nombreuses pathologies [142].

Dans ce contexte, différents moyens de prévention sont disponibles pour limiter ces phénomènes. Parmi eux, la valorisation d'antioxydants d'origine végétale à des fins alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques représente un enjeu majeur pour la recherche et l'industrie [143, 144].

4.2.1 L'oxydation

L'oxydation ou le stress oxydatif est un état au cours duquel des substances oxydantes, externes comme internes, interviennent sur la capacité de défense antioxydative de la cellule [145]. Les principaux agents oxydants (radicaux libres) sont les espèces réactives de l'oxygène (O_2^- , 1O_2 , HO \cdot , H_2O_2 , NO \cdot), des enzymes (lipoxygénases, peroxydases), des ions métalliques (Cu, Fe) et les peroxydes lipidiques. Qui concourent tous à la formation en chaîne de radicaux libres. Ceux-ci attaquent les protéines, les acides nucléiques, les acides gras insaturés, les vitamines ou d'autres constituants [142]. Les radicaux libres sont produits par divers mécanismes physiologiques (la chaîne respiratoire, l'inflammation, les systèmes enzymatiques, le cycle redox, les rayonnements et les particules inhalées tels que l'amiante et la silice) afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle que la mort cellulaire programmée ou apoptose (figure4.1) [146].

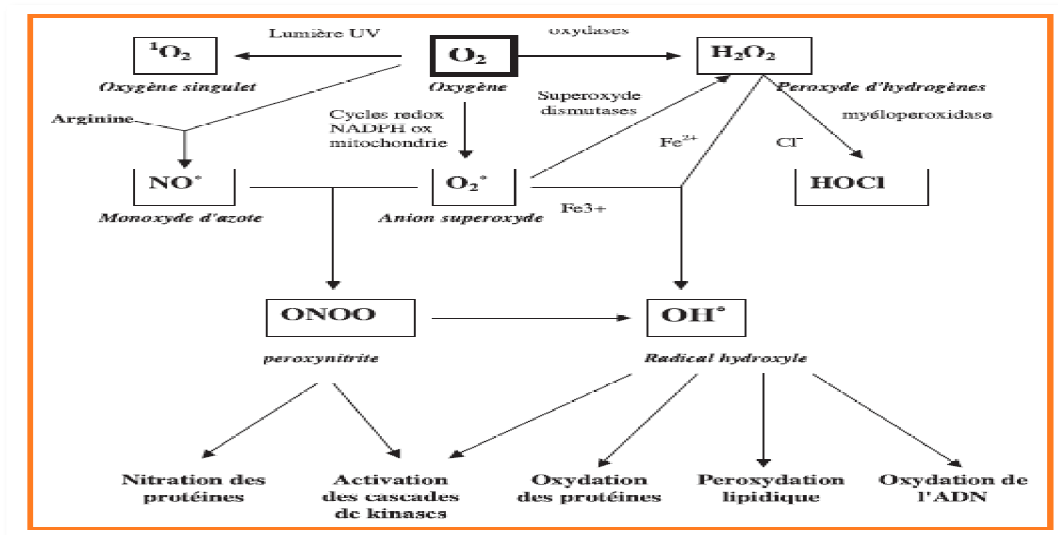


Figure 4.1: Origine des différents radicaux libres oxygénés et espèces réactives de l'oxygène impliqués en biologie [146].

➤ Oxydation des aliments

Les aliments contenant des lipides sont très sensibles à l'oxydation. Cette réaction spontanée de l'oxygène atmosphérique avec les matières grasses est le processus le plus courant entraînant la détérioration des aliments par oxydation. En conséquence, il peut se produire des modifications de goût, d'odeur, de couleur et de stabilité en stockage ; Comme les goûts crémeux ou métalliques qui peuvent se développer dans les matières grasses du lait et du beurre rance [147].

L'ajout d'antioxydants naturels dans les aliments est une technique complètement nouvelle. Depuis à peu près 1980, les antioxydants naturels sont apparus comme alternative aux antioxydants synthétiques, et ils sont aujourd'hui généralement préférés par les consommateurs [147].

4.2.2 Les antioxydants

Les antioxydants sont des molécules capables d'interagir sans danger avec les radicaux libres et de mettre fin à la réaction en chaîne avant que les molécules vitales ne soient endommagées. Chaque molécule antioxydante capte l'électron célibataire d'un radical libre sans donner elle-même un produit radicalaire [117, 147].

Certains antioxydants présents de façon naturelle, mais le plus souvent, il est nécessaire d'en ajouter à des doses très faibles, pour améliorer la conservation des produits en particulier les corps gras animal [148].

Les antioxydants phénoliques peuvent se comporter comme des prooxydants dans les conditions qui favorisent leur autoxydation, par exemple, au pH élevé avec des concentrations élevées des ions métalliques de transition et en présence de molécule d'oxygène. Les petits composés phénoliques qui sont facilement oxydés, comme la quercétine, acide gallique, possèdent une activité prooxydante ; tandis que les tannins condensés et hydrolysables, ont peu ou pas d'activité prooxydante [149].

4.2.2.1 Les antioxydants endogènes

Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser : en un système de défense primaire composé d'enzymes et de substances antioxydantes (la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxydase (GPx), l'acide urique, les protéines à groupement thiols) et en un système de défense secondaire composé d'enzymes protéolytiques. Des phospholipases, des ADN endonucléases et ligase, des macroxyprotéinases [150].

4.2.2.2 Les antioxydants naturels

Les antioxydants les plus connus sont le β -carotène, l'acide ascorbique, le tocophérol ainsi que les oligo-éléments (Cu, Zn, Se, Mn, Cr) et les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures [151, 152].

4.2.2.3 Mécanismes d'action des antioxydants phénoliques

Les polyphénols sont des antioxydants bien connus avec des effets protecteurs contre les maladies cardiovasculaires, le cancer, les maladies neurologiques et d'autres maladies dégénératives liées à l'inflammation [144, 153, 154, 155].

Les mécanismes antioxydants des polyphénols sont basés sur leur pouvoir donneur d'hydrogène et chélateur d'ions métalliques. Ils peuvent former des complexes avec les métaux et inhibent l'oxydation lipidique initiée par un métal (figure 4.2) [156, 157].

Les composés phénoliques participent à la lutte contre les radicaux libres car ils ont la propriété de pouvoir piéger de nombreuses espèces radicalaires, incluant les radicaux hydroxyles, pyroxyles et superoxydes. De par leurs nombreuses propriétés antioxydantes [107, 158]. Les tanins condensés ont des propriétés antioxydantes puissantes qui combattent l'inflammation et pourraient faciliter la prévention de la progression d'ulcère de la colite [159].

Les niveaux diététiques totaux des polyphénols sont approximativement 1 g/j, le niveau le plus haut que tous les autres antioxydants diététiques connus, autour de 10 fois plus que la vitamine C et 100 fois plus que la vitamine E et les caroténoïdes [160, 161].

Selon Zhang et Lin [162]; l'activité antioxydante des polyphénols dépend de :

- l'ampleur de leur état colloïdal,
- la facilité du fendage de lien d'interflavonoïde ou de sa structure stéréochimique,
- la facilité de l'ouverture d'anneau de pyranne (C-anneau),
- et les nombres relatifs de groupes $-OH$ sur les anneaux A et B.

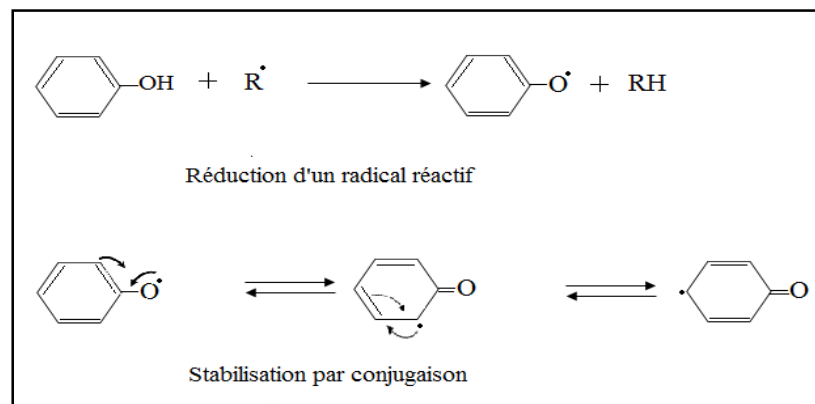


Figure 4.2 : Pouvoir antioxydant des polyphénols [163].

4.3 Activité antimicrobienne

Les polyphénols y compris des flavonoïdes et des tanins de plusieurs sources végétales (peau de pomme, raisins, propolis, et autres), ont été rapportés pour avoir des effets biologiques, y compris des activités antimicrobiennes [164, 165].

Les composés phénoliques empêchent sélectivement la croissance de microbes pathogènes et stimulent la croissance des bactéries commensales et certains probiotiques. Le niveau de l'inhibition a été lié à la structure chimique du composé phénolique et de l'espèce bactérienne [166, 167].

Le mécanisme des effets antimicrobiens des polyphénols est sans doute très complexe. Parmi les hypothèses annoncées, Milane [117] a cité :

- l'inhibition des enzymes extracellulaires microbiennes,
- la séquestration de substrat nécessaire à la croissance microbienne ou la chélation de métaux tels que le fer,
- l'inhibition du métabolisme microbien

4.4 Inhibition des enzymes

Traditionnellement, les composés phénoliques ont été considérés nutritionnellement indésirables parce qu'ils empêchent les enzymes digestives [127, 168].

Les tanins forment des complexes insolubles avec les enzymes digestives ce qui peuvent entraîner des effets antinutritionnels [169]. Beaucoup d'enzymes, Comme la tyrosinase, la peroxydase, la trypsine et la décarboxylase sont trouvées dénaturer par les polyphénols. Donc les polyphénols peuvent précipiter les enzymes digestives et par conséquence diminués la digestibilité des aliments si la quantité est excessive [170].

4.5 Prévention des maladies

La protection du corps a été largement attribuée aux propriétés antioxydantes de différentes substances phytochimiques tels que des colorants d'anthocyanine et d'autres composés phénoliques [171]. Les polyphénols ont été qualifiés bénéfiques à la santé humaine une fois consommés régulièrement en tant qu'élément d'un régime équilibré [172].

Les bénéfices des polyphénols sur la santé ont été largement décrits, particulièrement la prévention des maladies cardiovasculaires, inflammatoires, neurodégénératives et le cancer [129, 173].

En termes d'activité pharmacologique, ils protègent contre l'oxydation des lipides à haute densité (HDLs). Par conséquent, ils aident le corps à maintenir HDLs, tout en aidant à enlever le problème des lipides à basse densité (LDLs) [158, 174].

Les mécanismes de cet effet hypolipidémique peuvent impliquer la régulation de l'expression de récepteur de LDL, l'inhibition de la synthèse hépatique de lipide et de la sécrétion de lipoprotéine, ou l'élimination accrue de cholestérol par l'intermédiaire des acides biliaires [174].

4.6 Précipitation des protéines

Les polyphénols en particulier les tanins sont capables de se lier aux protéines et d'autres macromolécules (amidon, pectines, alcaloïdes, d'autres polyphénols et la cellulose) dans les conditions environnementales particulières [134, 175].

Les tanins se fixent à la quasi-totalité des protéines formant ainsi des complexes insolubles à pH physiologique (pH 7,4). En plus de former des liaisons directes avec des protéines, les tanins établissent des « ponts » entre les protéines, ce qui entraîne leur précipitation [125].

L'affinité des tanins pour les protéines augmente avec le nombre des groupements *o*-diphénols qui sont les principaux sites d'interaction. De même, toutes les protéines peuvent interagir avec les polyphénols mais les structures riches en proline sont particulièrement favorables à l'établissement de complexe [176].

En conditions de stress oxydatif, les fonctions phénols des tanins ont tendance à s'auto-oxyder en O-quinones. Ces dernières interagissent avec les protéines par des liaisons covalentes irréversibles. En conditions non oxydantes et dans la gamme de pH autour de 7, les interactions entre tanins et protéines s'établissent par des liaisons réversibles (liaisons hydrogènes ou d'interactions hydrophobes) [125].

La formation des complexes de tanin-protéine dépend non seulement de la taille, de la conformation et de la charge des molécules de protéine, mais également de la taille, la longueur et la complexité des tanins impliqués. La précipitation d'un complexe de tannin-protéine est due à la formation de la surface hydrophobe sur le complexe [127].

4.7 Chélation des ions métalliques

Les polyphénols présentant un noyau catéchol où deux groupements $C=O$ et OH coplanaires et proches (flavonols, 5-hydroxyflavones...) forment des chélates avec les ions métalliques à forte charge positive (Al^{3+} , Fe^{3+}) moyennant le remplacement d'un ou deux protons(s) de polyphénols par l'ion métallique [177].

Les tanins hydrolysables sont des bons chélateurs capables de former des précipités avec les ions métalliques [178]. Ainsi, l'acide tannique chélate les ions ferriques par ces groupements gallates ce qui limite l'absorption intestinale du fer non-héminique qui peut, si prolongé, mener à l'anémie. L'acide tannique n'affecte pas l'absorption d'autres minéraux de trace tels que le zinc, le cuivre, et le manganèse [159, 179].

4.8 Toxicité

Les polyphénols se sont avérés sains dans des études toxicologiques des extraits de thé vert et de graine de raisin [180]. Leur toxicité est faible et considérée non toxique [181]. Parfois les flavonoïdes jouent un rôle de pro-oxydants. En effet, plusieurs d'entre eux ont été décrits comme responsables d'auto-oxydation et de la génération de radicaux oxygénés actifs, comme le peroxyde d'hydrogène. Ainsi, ils seraient capables de réduire le fer ferrique (Fe^{3+}) en fer ferreux (Fe^{2+}) aboutissant à la formation de radicaux hydroxyles par réaction entre Fe^{2+} et H_2O_2 [117].

4.9 Métabolisme et absorption

Les polyphénols sont généralement présents dans les aliments végétaux sous forme attachée, le plus souvent conjuguée comme glycosides, et la plupart d'entre eux sont métabolisés par la microflore intestinale (Bactéries commensales glycohydrolases) ayant pour résultat la formation des aglycones [166].

Leur métabolisme commence dans le lumen de l'intestin grêle, la postabsorption et les modifications se produisent également dans le foie et autres organes pour que les métabolites puissent être transportés aux tissus extrahépatiques ou aux reins où ils sont excrétés dans l'urine (figure 4.3) [140, 173, 182].

L'emplacement et le taux d'absorption dépendent de la structure chimique, du degré de glycosylation/acylation, de la conjugaison d'autres composés phénoliques, de la taille moléculaire, du degré de polymérisation et de la solubilité [140].

Les tanins hydrolysables peuvent être métabolisés par les ruminants en composés toxiques tels que le pyrogallol [141] (Min et Hart, 2003). Ils sont aussi considérés comme des substances antinutritionnelles qui inhibent la protéolyse [183]. Les effets sur la santé des composés phénoliques dépendent de la quantité consommée et de leur disponibilité biologique [168].

En général, les flavonoïdes une fois déglycosylés, subissent sous l'action de la microflore intestinale (*Clostridium orbiscindens*, *Eubacterium ramulus*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus*) une fragmentation qui débute par le clivage de l'hétérocycle C et aboutit à la formation de divers acides phénoliques, absorbés par la muqueuse intestinale et excrétés dans l'urine [184].

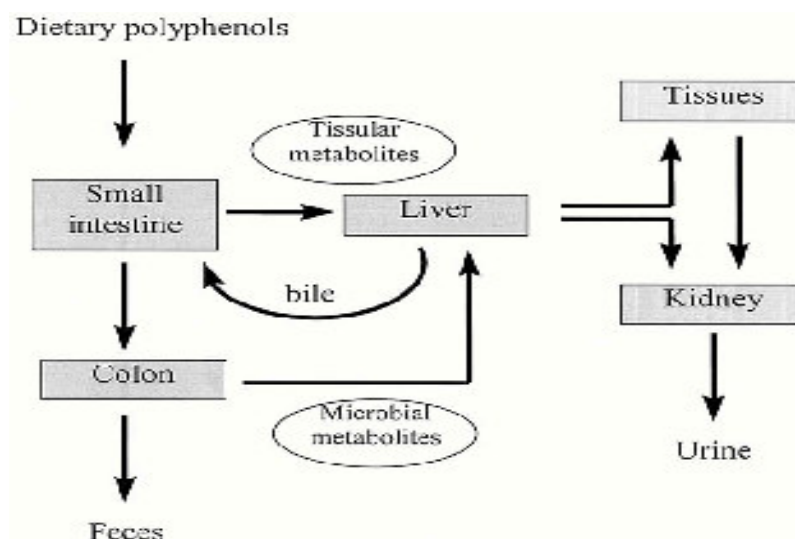


Figure 4.3: Itinéraires pour les polyphénols diététiques et leurs métabolites chez l'homme [161].

CHAPITRE 5

MATERIELS ET METHODES

Lieu de travail

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de chimie de département d'agronomie université de Blida et au niveau de laboratoire central de contrôle de qualité de l'intendance, durant une période allant du 01/02/2011 à 20/09/2011. La purification des protéases a été effectuée au niveau de laboratoire de MPCA de département de technologie alimentaire de Boumerdes durant la première semaine du mois de juillet.

5.1 Matériel

5.1.1 Matériel biologique (artichaut)

☞ Origine

L'artichaut est une culture maraîchère très répandue en Algérie, car elle est d'origine méditerranéenne (figure 5.1). Les artichauts utilisés dans ce travail sont des artichauts de la variété « artichaut violet » provenant du marché de la région de Boumerdes de la production de février et mars 2011.

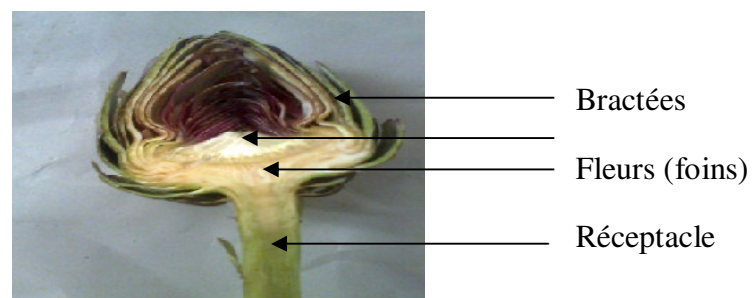


Figure 5.1 Les différentes parties de la fleur d'artichaut (original).

☞ Préparation

Les artichauts sont découpés, lavés et séparés en quatre parties : le réceptacle, les fleurs, la tige et les bractées. Chaque partie est séchée séparément durant 20 jours à l'obscurité et à température ambiante. Chaque partie est broyée en poudre à l'aide d'un moulin à café.

Le broyage du solide permet de rompre les membranes cellulaires et la matrice extracellulaire et de libérer les molécules contenues dans la cellule [185]. Il permet aussi d'intensifier les phénomènes de transfert du solvant à travers l'augmentation de la surface spécifique (surface d'échange entre le solvant et le solide) mais également la réduction de la distance de pénétration dans le matériel [104].

Souches bactériennes et fongiques

Les souches microbiennes utilisées au cours de cette étude sont résumées dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1 : Souches microbiennes utilisées et leurs provenances.

Souches microbiennes	Provenance
<i>Bacillus subtilis</i> (Gram +)	1.10649 Merck KGaA (Allemagne)
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> (Gram +)	1.11499 Merck KGaA (Allemagne)
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gram +)	Institut Pasteur de tuberculose (Alger)
<i>Escherichia coli</i> (Gram -)	Isolées au niveau de laboratoire de microbiologie école nationale vétérinaire).
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Laboratoire de microbiologie LCI
<i>Candida albicans</i>	Laboratoire de microbiologie LCI

5.1.2 Matériel non biologique

☞ Appareillage, verrerie et accessoires

L'appareillage, la verrerie, les accessoires et les milieux de culture utilisés dans ce travail sont listés dans l'appendice A.

☞ Réactifs

Les différents polyphénols (acide gallique, acide tannique, catéchol et Quercétine) proviennent de Merck. Le réactif de Folin-Ceocaltau provient de Sigma. Les autres réactifs et solvants sont obtenus auprès de Panreac, Cheminova, Prolabo, Aldrich, Organics et Janssen.

5.2 Méthodes

Notre étude s'est articulée autour de deux axes majeurs :

- ❖ Extraction et caractérisation des protéases par :
 - ☞ Extraction et purification des protéases ;
 - ☞ Détermination des forces coagulantes.
- ❖ Extraction et caractérisation des composés phénoliques :
 - ☞ Comparaison entre les différents modes et solvants d'extraction des composés phénoliques.
 - ☞ Extraction et purification des composés phénoliques.
 - ☞ Etude, *in vitro*, des activités biologiques des extraits polyphénoliques purifiés :
 - Etude de l'activité antioxydante ;
 - Etude de l'activité antibactérienne ;
 - Etude de l'activité antifongique.

Le diagramme suivant (figure 5.2) illustre en général la démarche suivie pour la réalisation de cette étude :

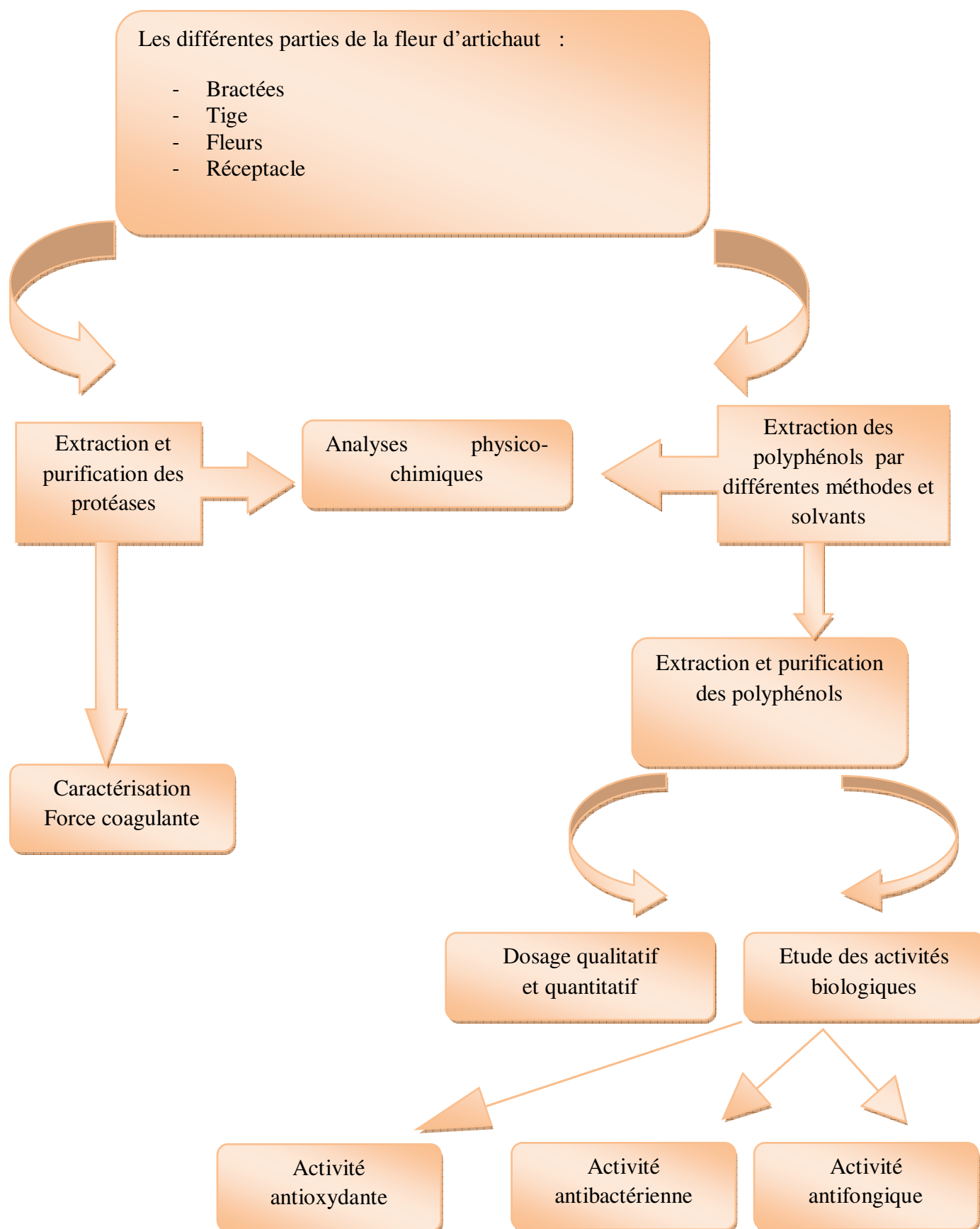


Figure 5.2 : Diagramme général de l'étude expérimentale (original).

5.2.1 Analyses physico-chimiques

5.2.1.1 Détermination de la teneur en extrait sec

La teneur en extrait sec (matière sèche) de la matière première est déterminée par la méthode de référence (NA 1213/ 1992).

☞ Principe

Le principe est basé sur la dessiccation de la prise d'essai à une température de 103 °C dans une étuve isothermique ventilée, à la pression atmosphérique jusqu'à l'obtention d'un poids pratiquement constant.

☞ Mode opératoire

- Préparer les vases à tare, en les mettant dans l'étuve (103 ± 1 °C) une demi heure, en les refroidissant et en les pesant ;
- Peser 5 g de chaque échantillon dans chaque vase à tare ;
- Sécher les échantillons dans l'étuve à 103 ± 1 °C durant 4 h, refroidir au dessiccateur pendant 30 min.

☞ Expression des résultats

La teneur en matière sèche est donnée par la relation suivante :

$$MS\% = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Où :

MS : matière sèche en %

m₀ : masse de vase à tare vide (g).

m₁ : masse de vase à tare et de la prise d'essai (g).

m₂ : masse de vase à tare et du résidu (g).

5.2.1.2 Détermination des cendres totales

La teneur en matière minérale est déterminée par la méthode de référence (NA 732/ 1990).

☞ Principe

Incinération d'une prise d'essai dans une atmosphère oxydante à une température de 550 ± 10 °C, jusqu'à combustion complète de la matière organique et obtention d'une masse constante.

☞ Mode opératoire

- Chauffer les nacelles à incinération durant 15 min dans le four à moufle à 550 ± 10 °C, laisser refroidir une heure et peser les nacelles. Porter au four à moufle ;
- Prendre une prise d'essai de 5 g et l'humecter au moyen de 1 à 2 ml d'éthanol ;
- Placer les nacelles et leurs contenus à l'entrée du four, préalablement chauffé, jusqu'à que la matière s'enflamme ;
- Après l'extinction de la flamme, placer les nacelles dans le four. Poursuivre l'incinération jusqu'à combustion totale de la matière et obtention d'une coloration blanchâtre ;
- Refroidir les nacelles dans le dessiccateur pendant une heure et les peser.

☞ Expression des résultats

La teneur en cendres exprimée en pourcentage massique de l'échantillon rapportée à la matière telle qu'elle est donnée par la relation suivante :

$$TS\% = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Où :

TS : taux des cendres (%).

m_0 : masse de vase à tare vide (g).

m_1 : masse de vase à tare et de la prise d'essai (g).

m_2 : masse de vase à tare et du résidu (g).

La teneur en matière minérale est exprimée en pourcentage massique rapportée à la matière sèche (MM% MS) est égale à :

$$TS/MS\% = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \times \frac{100}{100 - H}$$

Où :

TS/ MS: taux des cendres par rapport à la matière sèche

m_0 : masse de vase à tare vide (g).

m_1 : masse de vase à tare et de la prise d'essai (g).

m_2 : masse de vase à tare et du résidu (g).

H : la teneur, en pourcentage, en eau de la poudre végétale.

5.2.1.3 Détermination de la teneur en matière grasse

La méthode Soxhlet est la méthode de référence utilisée pour la détermination de la matière grasse dans les aliments solides déshydratés.

☞ Principe

C'est une méthode gravimétrique, puisqu'on pèse l'échantillon au début et la matière grasse extraite par un solvant apolaire à la fin de l'extraction.

☞ Mode opératoire

- sécher 5 g d'échantillon à l'étuve à 105 °C pendant 3 h ;
- placer l'échantillon sec dans une capsule de cellulose, l'échantillon est extrait en continu par de l'acétone à ébullition qui dissout graduellement la matière grasse.
- Le solvant s'évapore et la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction terminée, la matière grasse est pesée.

☞ Expression des résultats

La teneur en matière grasse est exprimée selon la formule suivante :

$$MG (\%) = \frac{Mmg}{Me} \times 100$$

Où :

MG : la matière grasse (%).

Mmg : la masse de la matière grasse après extraction (g).

Me : la masse de l'échantillon (g).

5.2.1.4 Détermination du pH

☞ Principe

Le pH est déterminé à l'aide d'un pH mètre, il consiste à introduire l'électrode dans le produit à analyser.

☞ Mode opératoire

On introduit l'électrode du pH mètre directement dans le produit à analyser et on le laisse stabiliser.

☞ Expression des résultats

La valeur du pH est affichée directement sur le pH mètre.

5.2.2 Extraction, purification et caractérisation des protéases

5.2.2.1 Extraction des protéases

Les protéases d'artichaut sont extraites selon le protocole décrit par Nouani et *al.* [186].

- Dans un erlenmeyer, introduire 10 g de la poudre d'artichaut ;
- Ajouter 100 ml d'acétate de sodium 0,1 M, pH 5 et 0,2 % d'acide borique pour éviter le développement des microorganismes ;
- Agiter doucement le mélange durant 30 minutes ;
- Macérer le mélange 24 heures à 4 °C ;
- Filtrer le mélange sur un tissu pour éliminer les grosses particules ;
- Centrifuger le filtrat à 1000 tours/minutes 45 min à 4 °C ;
- Filtrer le centrifugât sur un papier filtre n° 4 puis sur membrane 0,45 µm et conserver à 4 °C.

5.2.2.2 Purification des protéases

La purification des protéases a été effectuée par chromatographie d'exclusion, technique d'élution sur colonne selon le protocole décrit par Nouani et *al.* [186].

☞ Principe

La chromatographie d'exclusion est fondée sur la rétention sélective des solutés suivant la taille de leurs molécules lors de leur pénétration dans les pores de la phase stationnaire remplis du solvant [187].

☞ Mode opératoire

Pour la purification partielle de l'extrait enzymatique brut d'artichaut nous avons utilisé une colonne semi-préparatoire avec le gel Séphadex G75 avec un tampon d'élution, acétate de sodium 0,1 M ajusté à pH 5.

1/ Préparation du gel et remplissage de la colonne

5 g du gel séphadex G75 ont été mises à gonfler dans 150 ml d'acétate de sodium 0,1 M pendant 24 h. Le remplissage se fait au fur et à mesure que le gel décante dans la colonne en évitant la formation des bulles d'air et l'excès de tampon est évacué.

2/ Appareillage utilisé

- Réservoir d'éluant
- Colonne semi-préparatoire type Pharmacia K26/50, de dimension 40 cm × 5 cm.
- Pompe péristaltique type Desaga, Heidelberg.
- Un collecteur muni de 100 tubes à essai type Bromma 2112 Redirac fraction collector.
- Un spectrophotomètre UV visible type Perkin Elmer, réglé à 280 nm.

3/ Dépôt de l'échantillon

Déposer, délicatement, 5 ml de la solution enzymatique brute sur la surface du gel. L'éluion des protéases se fait par l'acétate de sodium par un débit de 1 ml/1,5 min à raison de 2 ml dans chaque tube. La densité optique de chaque fraction est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible à une longueur d'onde $\lambda = 280$ nm.

4/ Concentration de l'extrait enzymatique partiellement purifié

Les fractions actives douées d'une activité coagulante sont regroupées et concentrées par lyophilisation à une pression de 0,043 millibars et à une température de -58 °C.

5.2.2.3 Dosage des protéines totales (NA 652, 1992)

☞ Principe

La méthode de KJELDAHL est une méthode classique ; utilisée pour quantifier les protéines contenues dans un produit à partir de dosage de l'azote total.

Cette méthode est basée sur la minéralisation par l'acide sulfurique H_2SO_4 à 0,25 N d'une prise d'essai, en présence de catalyseurs, suivie d'une distillation de l'ammoniac libéré, dans un excès d'acide borique H_3BO_4 .

La teneur en azote de l'échantillon sera déterminée par titrimétrie de l'ammoniac par l'acide chlorhydrique HCl à 0,25 N.

☞ Mode opératoire

➤ Minéralisation

- Dans des matras de KJELDAHL, introduire environ 15 g de sulfate de potassium anhydre K_2SO_4 et 1 g de sulfate de cuivre $CuSO_4$;
- Ajouter dans le premier matras 1 g d'échantillon pour essai sur un morceau de papier sans cendre, sachant que le second matras formera l'essai à blanc ;

- Ajouter 25 ml d'acide sulfurique pure
- Introduire 5 ml de différents extraits,
- Effectuer un essai à blanc, en utilisant 1 g de saccharose comme prise d'essai ;
- Placer les matras dans le minéralisateur pendant 3 h à 350 °C jusqu'à obtention d'une solution verdâtre limpide.

➤ Distillation et dosage de l'ammoniac

- Après refroidissement des minéralisâtes, ajouter avec précaution 50 ml d'eau distillée dans chaque matras ;
- La neutralisation est réalisée avec 100 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium NaOH à 35%
- Placer la fiole au distillateur et l'allonge qui termine le dispositif dans une fiole conique contenant 50 ml d'acide borique H₃SO₄ à 4% et 1ml de l'indicateur mixte (rouge de méthyle et bleu de méthylène) ;
- Après distillation ; tirer le distillat avec l'acide chlorhydrique à 0,25 N.

☞ Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentage du poids de protéines par rapport au volume total de la prise d'essai selon la formule suivante :

$$P\% = \frac{1,4(V_1 - V_0)N.F}{V}$$

Où :

P% : La teneur en protéine, exprimée en pourcentage ;

N : Normalité de l'acide chlorhydrique, qui est de l'ordre de 0,25 N ;

V₀: Volume, en ml, de la solution d'acide chlorhydrique, utilisé pour l'essai à blanc ;

V₁ : Volume, en ml, de la solution d'acide chlorhydrique utilisé pour le titrage ;

V : Volume en ml de la prise d'essai ;

F : Facteur de conversion à appliquer pour obtenir le taux des protéines à partir de l'azote total, qui est de l'ordre de 5,7 pour les végétaux [188].

5.2.2.4 Mesure de l'activité coagulante (méthode de Berridge)

5.2.2.4.1 Préparation de substrat de Berridge

Peser 12 g du lait écrémé en poudre 0% de matière grasse (low heat milk provenant de la laiterie et fromagerie de Boudouaou) qu'il faut dissoudre dans 100 ml de solution de CaCl_2 à 0,01 mol et suivre une agitation lente pendant 20 minutes, le substrat est réparti dans des tubes à essai à raison de 10ml pour chacun et maintenir 30 minutes dans un bain Marie à 35 °C (pH 6,5).

5.2.2.4.2 Mesure du temps de prise par la méthode visuelle de Berridge

Cette méthode consiste à déterminer visuellement, à l'aide d'un chronomètre, à partir du moment de l'addition de la solution enzymatique coagulante (1 ml de la solution enzymatique dans 10 ml du lait) le temps d'apparition des premiers flocons des micelles de caséine (taille de $2,10^{-4}$ m) qui correspond au temps de prise. Le temps de coagulation est trois fois le temps de prise.

5.2.2.4.3 Calcul de la force coagulante

En 1945, Berridge a défini l'unité de présure (UP) comme la quantité d'enzyme active (1ml) qui coagule 10 ml de substrat standard dans 40 minutes, à 35 °C et à pH 6,4 [59].

Cette activité est exprimée aussi en force coagulante et calculée selon la formule suivante :

$$F = \frac{2400 \times V_1}{t \times V_2}$$

Où :

- F : la force coagulante (sans dimension).
- v_1 : le volume du lait utilisé (ml).
- v_2 : le volume de l'extrait enzymatique coagulant (ml).
- t : le temps de prise en seconde.

5.2.2.5 Caractérisation de la solution enzymatique

Plusieurs facteurs peuvent influencer la force coagulante des extraits enzymatiques. L'étude de leur impact sur la coagulation permet d'optimiser les conditions de cette dernière.

5.2.2.5.1 Influence de la température du lait

La force coagulante de l'extrait purifié et de la présure (10 mg/100 ml) est déterminée en faisant varier la température du lait de 20 °C à 80 °C par un intervalle de 10 °C en utilisant un bain-marie (pH du lait 6,5 et la concentration en CaCl₂ est de 0,01 mol).

5.2.2.5.2 Influence du pH

Pour déterminer l'influence du pH du lait sur la force coagulante de l'extrait de l'artichaut comparée à celle de la présure (CHR Hansen Danemark provenue de la laiterie et fromagerie de Boudouaou), en faisant varier le pH du lait de 5,2 à 7 par un intervalle de 0,4 (température de 35 °C et concentration en CaCl₂ de 0,01 mol).

L'ajustement du pH s'effectue par l'addition sous agitation d'acide chlorhydrique (12,5 %) et la soude (1 N).

5.2.2.5.3 Influence de la concentration en CaCl₂

La concentration du lait en CaCl₂ est variée de 0,005 mol à 0,07 mol par un intervalle de 0,002 mol pour vérifier l'influence de cette concentration sur la force coagulante de la protéase.

5.2.2.6 Rendement en protéines brutes [189]

Le rendement en protéines brutes est le rapport entre la masse en protéines d'extrait enzymatique brut et de la matière première. Ce rendement est calculé selon la formule suivante :

$$R\% = \frac{M_{pe}}{M_{pp}} \times 100$$

Où :

R : rendement en protéines brutes (%)

M_{pe} : masse en protéines d'extrait enzymatique brut (g)

M_{pp} : masse en protéines de la matière première (g).

5.2.2.7 Rendement de prépurification [189]

Le rendement de prépurification est le rapport entre la force coagulante d'extrait enzymatique pr epurifi e et celle d'extrait brut. Ce rendement est calcul e selon la formule suivante :

$$R\% = \frac{F_p}{F_b} \times 100$$

Où :

R : rendement de prépurification (%)

F_p : force coagulante d'extrait purifié (sans dimension)

F_b : force coagulante d'extrait brut (sans dimension).

5.2.3 Extraction des polyphénols

5.2.3.1 Méthodes d'extraction

Deux méthodes d'extraction, solide-liquide, sont utilisées, la macération et la décoction, le but était de tenter d'obtenir *in vitro*, de meilleurs rendements, et/ou une production sélective de polyphénols   propriétés bioactives [141].

Bien que le choix de la méthodes d'extraction puisse avoir un effet significatif sur la qualité de l'extrait, le solvant utilis e fournit les moyens les plus évidents d'influencer la composition qualitative de l'extrait [190]. Le solvant appropri e à l'extraction incluent la capacité de dissoudre les composés d'intérêt, de facilit e leur déplacement, d'être non toxique et non inflammable [190]. Les solvants à Bas-polarité rapportent des composés plus lipophiles, tandis que les alcools extraient les composés apolaires et polaires, et l'eau extrait seulement les composants polaires à partir de l'échantillon [191]. Le choix de l'éthanol comme solvant organique a été bas e sur le fait que l'éthanol une fois m lang e avec de l'eau améliore la solubilité du composants bioactifs en comparaison avec l'eau pure [158].

Dans cette étude nous avons utilisés trois solvants : l'eau, l'éthanol (70% v/v), l'acétone (70% v/v) et le méthanol (70% v/v).

☞ La macération

La macération est une opération qui consiste à laisser la poudre du matériel végétal en contact prolongé avec un solvant pour en extraire les principes actifs. C'est une extraction qui se fait à température ambiante [192].

L'opération bien que généralement longue et à rendement souvent médiocre, est la seule méthode utilisable dans le cas de l'extraction d'un ensemble de molécules fragiles. Pour être efficace, une macération, peut durer de 4 à 10 jours environ ; ceci peut présenter quelques inconvénients, en termes de fermentation, ou de contamination bactérienne notamment si le solvant utilisé est l'eau. Ces phénomènes peuvent entraîner une dégradation rapide des molécules actives [104].

Pour extraire les polyphénols des différentes parties d'artichaut (bractées, tige, fleurs et réceptacle) par macération, nous avons opté pour le protocole décrit par Romani et *al.* [17] en apportant quelques modifications (figure 5.2).

☞ Mode opératoire

- Dans une fiole, introduire 10 à 30 g de la poudre d'artichaut ;
- Ajouter 100 ml du solvant (eau, éthanol 70 %, acétone 70 % et méthanol 70 %) ;
- Laisser le mélange en contacte durant 2,5 h à température ambiante ;
- Filtrer le mélange par un tissu ;
- Réextraire les résidus une deuxième fois de la même manière précédente ;
- Centrifuger le filtrat 20 min à 4000 t/min à température ambiante ;
- Filtrer sur papier whatman N° 1 ;
- Conserver le filtrat à 4 °C jusqu'à utilisation.

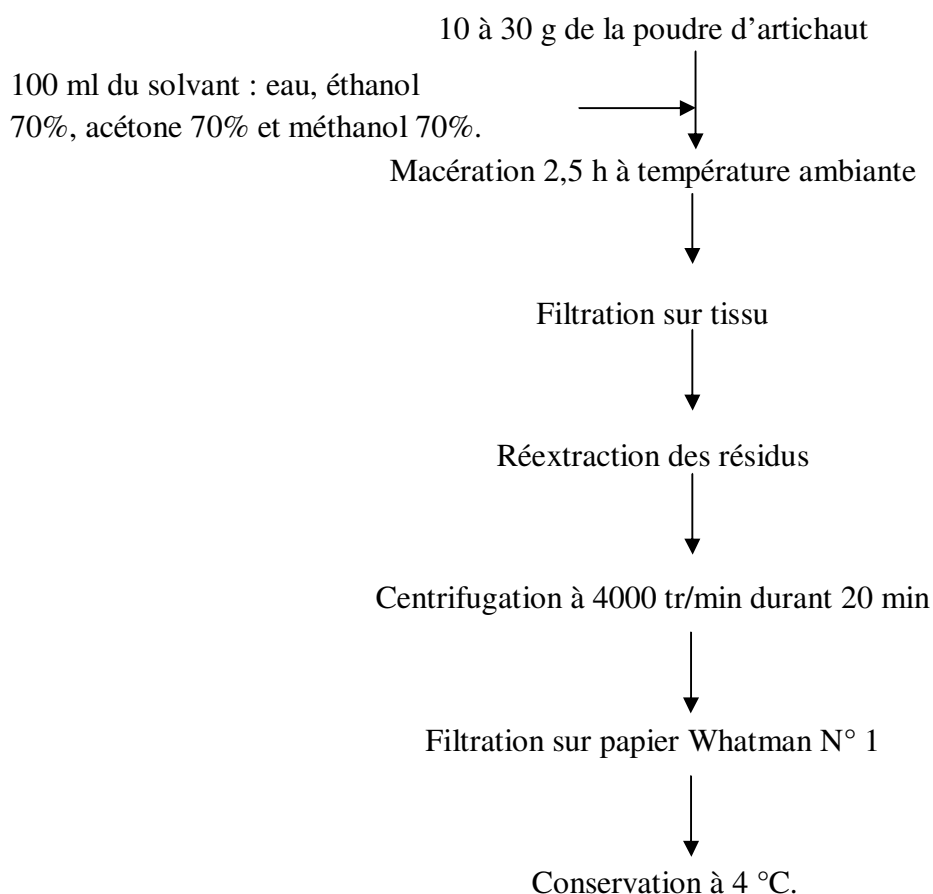


Figure 5.3 : Diagramme d'extraction des polyphénols par macération [17].

☞ La décoction

Dans la technique d'infusion, l'échantillon est bouilli pendant environ 15 minutes dans l'eau. L'extraction avec de l'eau pure, cependant, est rarement employée pour la matière végétale pendant que des composés hydrophiles sont habituellement extraits au moyen mélanges de l'méthanol-eau ou d'eau-éthanol. [191].

Pour extraire les polyphénols des différentes parties de la fleur d'artichaut (bractées, fleurs, tige, réceptacle), par différents solvants (eau, éthanol 70%, acétone 70% et méthanol 70%), nous avons procédé au protocole décrit par Chavane et *al.* [169].

☞ Mode opératoire

- Dans une fiole, introduire 1 à 2 g de la poudre d'artichaut ;
- Ajouter 40 ml du solvant d'extraction qui est de l'eau distillée, de l'éthanol (70% v/v), de l'acétone (70% v/v) et de méthanol (70% v/v) ;

- Placer la fiole dans un bain Marie à température d'ébullition du solvant (100 °C pour l'eau, environ 78 °C pour l'éthanol, environ 56 °C pour l'acétone et environ 65 °C pour le méthanol) durant 30 min ;
- Filtrer à l'aide d'un tissu ;
- Réextraire les résidus de la même manière précédente ;
- Réunir les extraits et centrifuger à 4000 tr/min pendant 20 min ;
- Filtrer l'extrait sur papier Whatman N° 1 ;
- Conserver l'extrait brute 4 °C jusqu'à utilisation.

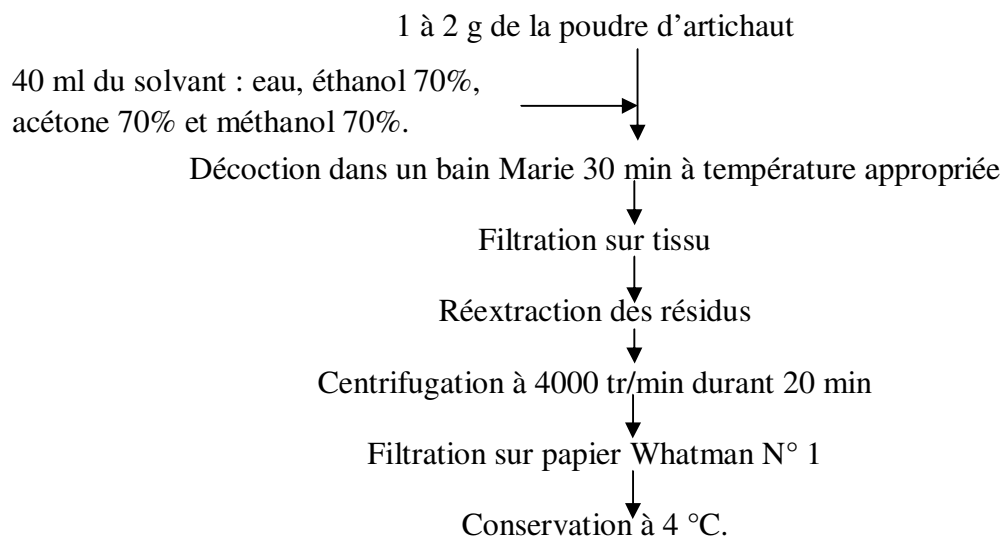


Figure 5.4: Diagramme d'extraction des polyphénols par décoction [169].

Rendement d'extraction

Selon Falleh *et al.* [102], le rendement d'extraction est calculé par la formule suivante :

$$R (\%) = \frac{MR_{ext}}{MR_{éch}} \times 100$$

Où :

R : le rendement en % ;

MR_{ext} : la masse de l'extrait après évaporation du solvant en mg;

MR_{éch} : la masse sèche de l'échantillon en mg.

5.2.3.2 Dosage des composés phénoliques totaux

Le dosage des polyphénols a été effectué selon la méthode décrite par Boizot et Charpentier, [193].

☞ Principe

Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965 par Singleton et Rossi. Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMo_{12}O_{40}$). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (Mo_8O_{23}). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 760 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux [193] (figure 5.5).

☞ Mode opératoire

Préparation de la gamme étalon d'acide gallique

Une gamme de neuf concentrations d'acide gallique allant de 0 à 0,17 mg/ml a été préparée à partir d'une solution mère de 0,2 mg/ml de concentration (tableau 5.2).

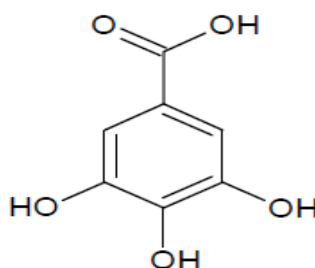


Figure 5.5 : L'acide gallique (Acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque).

Tableau 5.2: La gamme étalon de l'acide gallique

N° de tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Volume pris de la solution mère	0	0,05	0,1	0,25	0,4	0,5	0,65	0,75	0,85
Volume ajouté d'eau distillée	1	0,95	0,9	0,75	0,6	0,5	0,35	0,25	0,15
Concentration finale de l'acide gallique en mg/ml	0	0,01	0,02	0,05	0,08	0,1	0,13	0,15	0,17

La courbe d'étalonnage des polyphénols totaux est en appendice B.1

Analyse des échantillons

- Introduire 100 µl de la solution d'acide gallique à différentes concentrations dans les tubes à essai de la première série et 100 µl de chaque échantillon à analyser dans les tubes de la deuxième série.
- Ajouter 500 µl du réactif Folin-Ciocalteu puis 400 µl de la solution de bicarbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7,5 % dans chaque tube (favoriser un milieu alcalin pour déclencher la réaction d'oxydoréduction).
- Agiter puis incuber à l'obscurité pendant dix minutes ;
- Lecture des absorbances à 760 nm ;
- Le blanc est préparé par la même manière précédente en remplaçant la solution d'acide gallique par 100 µl d'eau distillée.

☞ Expression des résultats

La concentration en composés phénoliques totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique. Exprimer en milligramme équivalent d'acide gallique par millilitre.

5.2.3.3 Dosage des flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes totaux a été effectué selon la méthode décrite par Dehpeur et *al.* [194].

☞ Principe

Le principe de la méthode colorimétrique du chlorure d'aluminium est que le chlorure d'aluminium forme des complexes acides stables avec le groupe cétonique C-4 et avec le groupe d'hydroxyle de carbone C-3 ou C-5 de flavones et de flavonols. En outre, le chlorure d'aluminium forme des complexes acides labiles avec les groupes orthodihydroxyl dans le cycle A ou B de flavonoïdes [195] (figure 5.6).

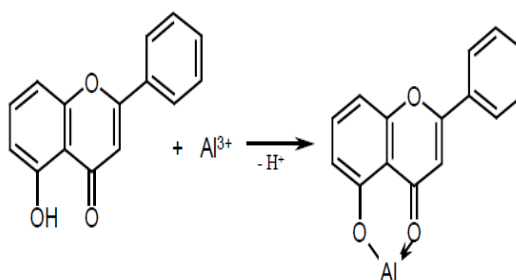


Figure 5.6: Principe de réaction entre les flavonoïdes et AlCl_3 [192].

☞ Mode opératoire

Préparation de la gamme d'étalonnage

Une gamme de 9 concentrations de quercétine ($\text{C}_{15} \text{H}_{10} \text{O}_7$) allant de 0 à 40 $\mu\text{g/ml}$ à été préparée à partir d'une solution mère de 40 $\mu\text{g/ml}$ de concentration (4 mg de quercétine dissoute dans 100 ml de méthanol absolu) (tableau 5.3).

Tableau 5.3 : Gamme d'étalonnage de la quercétine

N° de tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Volume pris de la solution mère (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,4	1,8	2
Volume ajouté de méthanol absolu (ml)	2	1,8	1,6	1,4	1,2	1	0,6	0,2	0
Concentration finale de quercétine ($\mu\text{g/ml}$)	0	4	8	12	16	20	28	36	40

La courbe d'étalonnage des flavonoïdes est en appendice B.2.

Analyse des échantillons

- Introduire 500 μl de la solution de quercétine à différentes concentrations dans les tubes à essai de la première série et 500 μl de chaque échantillon à analyser dans les tubes de la deuxième série.
- Ajouter 1500 μl du méthanol à 95 %, puis 100 μl de la solution de chlorure d'aluminium AlCl_3 à 10 %, 100 μl d'acétate de sodium à 1 M et 2,8 ml d'eau distillée ;
- Agiter puis incubé à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes ;
- Le blanc est réalisé par remplacement de l'extrait par du méthanol à 95% ;
- Lecture des absorbances à 415 nm ;

☞ Expression des résultats

La concentration en flavonoïdes est exprimée en milligramme équivalent de quercétine par millilitre en se référant à la courbe d'étalonnage de la quercétine.

5.2.3.4 Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés sont déterminés par la méthode à la vanilline en milieu acide décrite par Ba et *al.* [196].

☞ Principe

Le réactif vanilline-HCl est spécifique pour les flavane-3-ol et proanthocyanidines. La réaction est basée sur la condensation de l'aldéhyde phénolique (vanilline) avec la structure de phloroglucinol de flavan-3-ol et de proanthocyanidines dans des conditions acides en méthanol ou éthanol [134] (Figure 5.7).

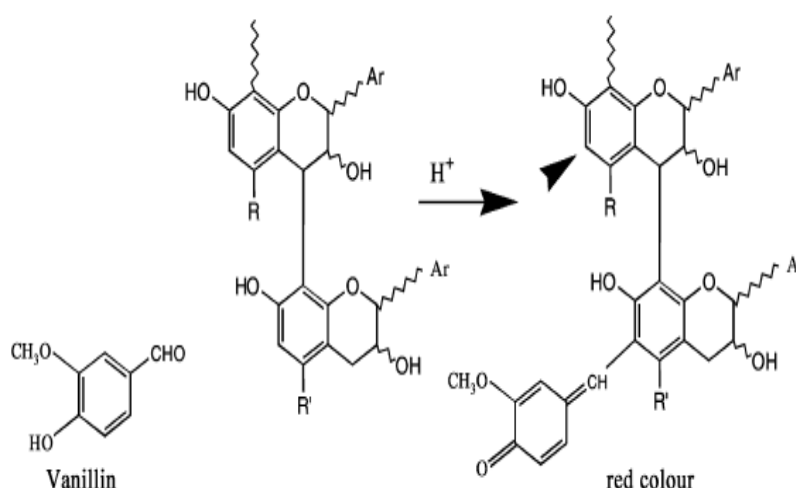


Figure 5.7: Principe de réaction entre la vanilline et les tanins condensés [197].

☞ Mode opératoire

Préparation de la gamme d'étalonnage

Une gamme d'étalonnage de 8 concentrations de catéchol allant de 0 à 0,9 mg/ml a été préparée à partir d'une solution mère de 1,5 mg/ml de concentration (tableau 5.4).

Tableau 5.4 : Gamme d'étalonnage de catéchol.

N° de tube	1	2	3	4	5	6	7	8
V pris de la solution mère (ml)	0	0,005	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	2,4
Volume ajouté d'eau distillée (ml)	4	3,995	3,9	3,8	3,6	3,2	2,4	1,6
Concentration finale de catéchol (mg/ml)	0	0,019	0,037	0,075	0,15	0,3	0,6	0,9

La courbe d'étalonnage de la catéchol est jointe à l'appendice B.3

74

Analyse de standard et des extraits

- Préparer le réactif de vanilline en mélangeant à volume égal : l'HCl à 8 %, le méthanol à 37 % et 4 % de vanilline dans du méthanol, le mélange est maintenu à 30 °C avant le dosage ;
- Introduire 200 µl de la solution de catéchol de différentes concentrations dans les tubes à essais de la première série et 200 µl de chaque extrait à analyser dans les tubes de la deuxième série ;
- Ajouter 1 000 µl de réactif de vanilline dans chaque tube ;
- Agiter les tubes puis les incuber à l'obscurité à 30 °C pendant 20 min ;
- Préparer le blanc en remplaçant le réactif par le mélange méthanol-acide;
- Lire l'absorbance par un spectrophotomètre UV à 500 nm.

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en mg d'équivalent catéchol par 100 mg de matière sèche.

5.2.3.5 Extraction des polyphénols par Soxhlet [27, 192]

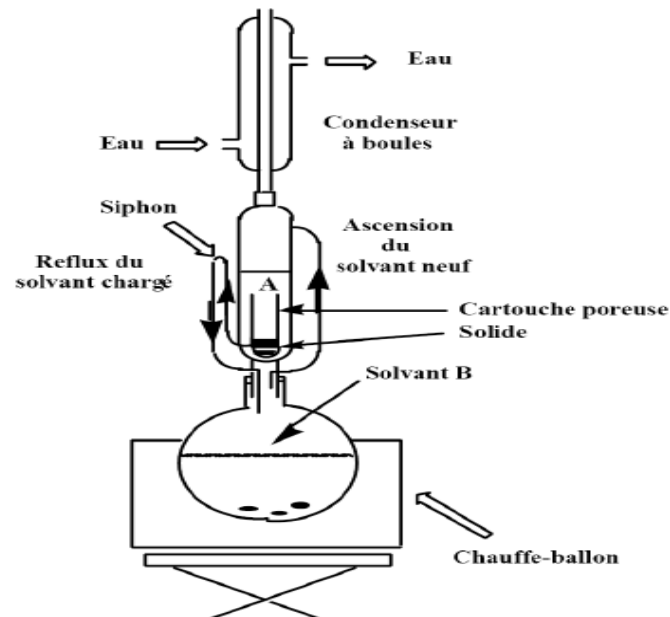


Figure 5.8: Système d'extraction au Soxhlet [151].

☞ Mode opératoire

- Dans un siphon de 250 ml d'un montage Soxhlet, introduire la cartouche qui comporte 10 à 30 g de poudre d'artichaut (figure 5.8) ;
- Dans un ballon de 500ml, introduire 300ml du solvant, éthanol à 70% (v/v) ;
- Placer le ballon dans une source de chaleur à température de 78 °C ;
- L'extraction se poursuit durant six heures pour extraire le maximum de polyphénols ;
- L'extrait obtenu est évaporé sous vide à température de 60 °C.

5.2.3.6 Purification des polyphénols

Les extraits des différentes parties d'artichaut (bractées, fleurs, tige et réceptacle) ont été purifiés selon la méthode décrite par Cherbi et *al.* [198] et Escribano et Santos-Buelga [199].

Les extraits préparés pour ce test, étaient tous extraits par un mélange hydro-alcoolique éthanol/eau (70: 30, V/V) par Soxhlet. Pour la purification des polyphénols, on a procédé à une opération de purification selon les étapes suivantes :

1/ Dépigmentation/Dégraissage :

Après avoir évaporé l'éthanol sous pression à 60 °C, la phase aqueuse obtenue subit une série d'extraction liquide-liquide par des solvants non miscible à l'eau et de polarité croissante, d'abord par l'éther de pétrole qui élimine les pigments chlorophylliens, les caroténoïdes et les lipides et tous composés non phénoliques. Puis par le chloroforme pour plus de purification.

2/ Purification des composés phénoliques :

La phase aqueuse obtenue est extraite trois fois à l'acétate d'éthyle (100 ml), au quel on ajoute 20 % de sulfate d'ammonium et 2 % d'acide métaphosphorique. L'acétate d'éthyle entraîne les composés polaires (composés phénoliques).

Les phases organiques sont regroupées et séchées en ajoutant une quantité suffisante du sulfate de sodium anhydre (environ 10 g), puis elles sont évaporées sous pression à 55°C. Le résidu obtenu est récupéré dans 10 ml d'éthanol 70% (v/v) et filtrer à travers un filtre de 0,22 µm donnant ainsi l'extrait phénolique purifié qui est conservé à 4 °C jusqu'à utilisation.

5.2.3.7 Dosage de la vitamine C [11]

☞ Principe

L'acide ascorbique est facilement oxydé en acide déhydroascorbique (DHAA) et il est donc nécessaire de choisir des solutions qui minimisent les pertes, comme l'acide métaphosphorique oxalique ou acétique et des agents réducteurs tels le dithiothréitol (DTT) pour complexer les ions métalliques [11].

☞ Mode opératoire

- Peser 1 à 5 g d'échantillon ;
- Additionner à cette prise d'essai 25 à 50 ml d'acide métaphosphorique à 0,5% contenant 0,2 % de dithiothréitol (DTT) à l'aide d'un homogénéisateur ou par agitation ;
- Centrifuger l'extrait puis diluer avec un tampon d'acétate à pH 4,8 contenant 0,2% de dithiothréitol (DTT) jusqu'à 100 ml;

- Filtrer à travers un filtre normale puis à travers un autre de 0,45 μ m ;
- Injecter dans une ligne d'HPLC.

Condition d'HPLC

- Colonne : acier inoxydable, 250 \times 4,0 mm C₈;
- Phase stationnaire : Hypersil ODS (shandon), 5 μ m ;
- Phase mobile : tampon acétate/méthanol/eau (15/40/45 v/v) 1,5 ml/l diméthylhexylamine ;
- Débit : 0,8 ml/min
- Pression : 90 bars
- Volume d'injection : 10-20 μ l
- Temps de rétention : environ 6 à 8 min
- Volume d'injection : 10 à 20 μ l
- Détection : 254 nm en UV

☞ Expression des résultats

Calcul : technique de l'étalonnage externe, mesure de la surface ou de la hauteur des pics des chromatogrammes (Appendice C).

5.2.3.8 Chromatographie sur couche mince CCM

☞ Principe

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique de séparation des constituants d'un mélange de principes actifs par entraînement d'une phase mobile (solvant) le long d'une phase stationnaire (gel de silice). Elle permet une analyse qualitative des principes actifs présents dans le mélange.

☞ Mode opératoire

Les analyses de la CCM ont été effectuées sur plaques du gel de silice avec indicateur fluorescent (20 \times 20 cm, 60 F₂₅₄). Dans trois systèmes de migration constitués de

- chloroforme : acétate d'éthyle : acide formique (50 :40 :10, V/V/V) [200].
- n-butanol : acide acétique : eau distillée (4 : 1 : 5, V/V/V) [202].
- acétone : eau distillée (50 : 50, V/V) [201].
- 5 μ l de chaque extrait et standards (5 mg/ml) sont déposés sur les plaques à l'aide d'une micropipette, les plaques sont ensuite introduites dans la chambre de migration préalablement saturée par les vapeurs de la phase

mobile en respectant une distance de 0,5 cm entre le solvant et les spots déposées.

Révélation

Après développement, les plaques sont séchées à 105 °C, puis visualisées par les systèmes de révélations suivants :

- Révélation physique sous UV à 254 nm et à 366 nm;
- Révélation chimique par :
 - Une solution aqueuse de trichlorure de fer et de potassium hexacyanoferrate (FeCl_3 , $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1%/10%, V/V, G/V) pour la détection des composés phénoliques [202].
 - Une solution méthanolique de chlorure d'aluminium AlCl_3 (1%) pour la détection des flavonoïdes [192].
 - La vanilline sulfurique (0,5%) pour la détection des terpenoïdes, des dérivés de type phenylpropane et des phénols [192].
 - une solution méthanolique de DPPH (2,5 mg/100 ml) pour la détection des composés ayant une activité antioxydante [203].

Les rapports frontaux des spots issus de la séparation sont calculés selon la formule suivante :

$$RF = \frac{d}{D}$$

Où :

RF : rapport frontal.

d : distance parcourue par la substance (cm).

D : distance parcourue par le front de l'éluant (cm).

Le nombre, les couleurs et les rapports frontaux sont comparés à ceux des témoins permettant ainsi l'identification des constituants des différents extraits.

5.2.3.9 Détermination de l'activité antioxydante

Pour la détermination de l'activité antioxydante par la méthode de DPPH des extraits purifiés de différentes parties de la fleur d'artichaut nous avons opté au protocole décrit par Popovici et *al.* [152]. Une méthode indirecte, mesurant l'activité de balayage sur un radical libre artificiel stabilisé, le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) [171, 204].

☞ Principe

Le DPPH \cdot (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH \cdot est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH \cdot , qui est proportionnel au pouvoir antiradiécalaire de l'échantillon [151, 156] (figure 5.9).

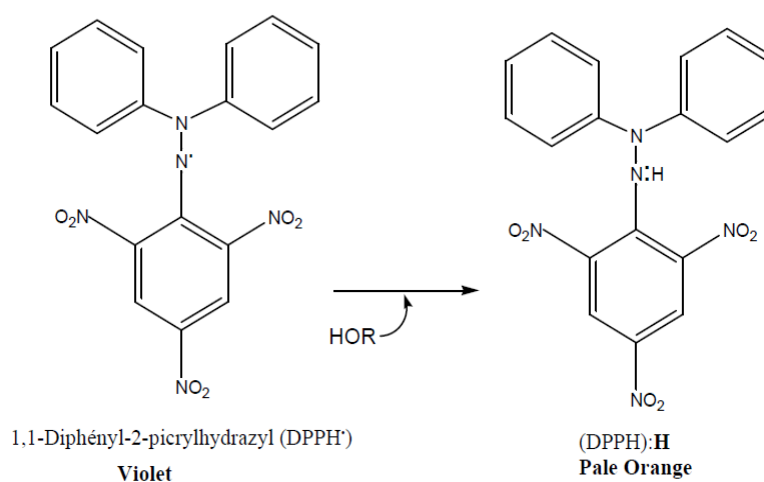


Figure 5.9 : Réduction du radical DPPH [156].

☞ Mode opératoire

- Préparer une solution fraîche du DPPH en solubilisant 2,5 mg du DPPH dans 100 ml du méthanol;
- 0,1 ml de chaque extrait est ajouté à 3,9 ml du DPPH ;
- Agiter fortement le mélange et incubé 30 min à l'obscurité ;
- Effectuer un blanc avec du méthanol et un contrôle avec 3,9 ml du DPPH et 0,1 ml du méthanol ;
- Effectuer un teste de comparaison avec la quercétine et avec l'acide ascorbique à différentes concentrations (appendice D.1) ;

- Lire l'absorbance à 517 nm;
- Les dilutions des échantillons testés sont comprises entre 1 et 100 (appendice D.2) pour un premier test, puis l'intervalle est réduit autour de la CI50 estimée (CI50 de l'échantillon correspond à la concentration permettant 50% d'inhibition) [156].

☞ Expression des résultats

L'activité antioxydante est calculée en utilisant la formule suivante :

$$A_{antiox} (\%) = 100 \times \frac{A_0 - A_s}{A_0}$$

Où :

A_{antiox} : activité antioxydante (%).

A_0 : densité optique du contrôle (nm).

A_s : densité optique de l'échantillon (nm).

5.2.3.9.10 Etude de l'activité antimicrobienne

La méthode utilisée pour la détermination de l'activité antimicrobienne des extraits d'artichaut est celle de diffusion en milieu solide (antibiogramme) selon le protocole décrit par Dash et Murthy [205].

☞ Principe

Cette méthode consiste à déposer les disques d'un papier filtre imprégnés d'extrait à la surface de milieu gélosé, Muller-Hinton pour les bactéries et Sabouraud pour les levures, en boîtes de Pétri préalablementensemencées par inondation de 10^6 (UFC)/ml pour les bactéries. Les résultats sont exprimés par la mesure de diamètre des halos d'inhibitions en cm ou en mm (figure 5.10) [206].

☞ Mode opératoire

- Préparer les suspensions bactériennes par prélèvement de 3 à 5 colonies bien isolées et identiques d'une culture jeune de 18 h pour les bactéries et de 48h pour les levures, les mettre ensuite dans 9 ml d'eau physiologique, puis agiter au vortex pendant quelques secondes;
- Mélanger 1ml de chaque suspension dans 200 ml de milieu de culture Muller-Hinton pour les bactéries;
- Couler les milieux en boîtes de Pétri de manière uniforme environ 4 mm d'épaisseur;
- Les souches de *C. albicans* et *A. fumigatus* sont ensemencées par inondation sur le milieu Sabouraud ;
- Imbiber les disques stériles de 13 mm de diamètre avec 30 µl de différents extraits préparés pour ce test (appendice F) ;
- Placer les disques à la surface des géloses contenant déjà les suspensions microbiennes;
- Incuber les boîtes de *B. subtilis* à 30 °C, de *Geobacillus stearothermophilus* à 55 °C, alors que *S. aureus* et *Escherichia coli* seront incubées à 37 °C, *C. albicans* à 25 °C, quant à *A. fumigatus*, ils sont placés à 27 °C ;
- Réaliser en parallèle des boîtes témoins avec les disques d'antibiotiques et d'antifongiques.

☞ Expression des résultats

Les diamètres des zones d'inhibition apparus sous formes des halos claires autour des disques (où il n'y a pas de développement des souches microbiennes) sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse ou à une règle bien graduée.

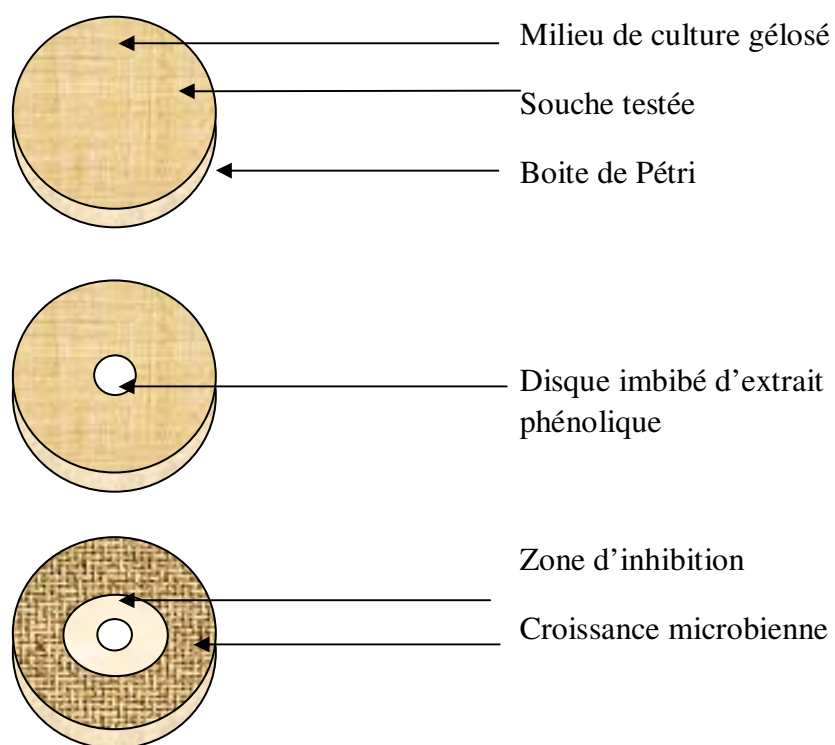


Figure 5.10 : Illustration de la méthode d'antibiogramme sur boîte de Pétri (original).

5.2.4 Analyses statistiques

Les résultats des analyses effectuées en duplicata sont exprimés en moyenne \pm standard errors (SD). Les analyses statistiques sont effectuées par les logiciels statistiques Excel 2007 et Minitab 15. L'analyse de la variance à sens unique a été appliquée pour déterminer la différence significative à $P < 0,05$.

CHAPITRE 6

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à l'extraction, la purification et la caractérisation des protéases des fleurs d'artichaut par la suite à l'évaluation des activités biologiques des polyphénols extraites et purifiés des quatre parties de la fleur (bractées, fleurs, tige et réceptacle). Les résultats obtenus sont représentés par les différents tableaux et figures ci-dessous :

6.1 Résultats des analyses physico-chimiques

6.1.1 Teneur en matière sèche et teneur en cendres

Les résultats obtenus après la dessiccation et la calcination des différents échantillons sont illustrés dans le tableau 6.1 :

Tableau 6.1 : Teneur en matière sèche et teneur en cendres de différentes parties de la fleur d'artichaut (% MS).

Partie	MS%	Cendres %
Bractées	89,94 ± 0,06	6,88 ± 0,10
Fleurs	88,42 ± 0,18	8,72 ± 0,04
Tige	87,32 ± 0,11	13,98 ± 0,06
Réceptacle	87,16 ± 0,10	9,98 ± 0,03

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD

La détermination de la matière sèche dans les quatre parties de la fleur d'artichaut, nous renseigne sur leur degré de séchage dans les mêmes conditions (20 jours à 25 °C en moyenne) et sur leurs taux d'humidités. Les teneurs en matière sèche sont en relation directe avec les teneurs en eau dans les échantillons frais.

Les résultats du tableau 6.1 n'indiquent pas une différence significative ($p > 0,05$) entre les teneurs en matière sèches des parties de la fleur. Les bractées et les fleurs sont les plus riches en MS avec des proportions de 89,94 et 88,42 % respectivement tandis que le réceptacle enregistre la teneur la plus faible soit 87,16 %. Romani et *al.* [17], dans leur étude sur des artichauts frais de la variété *Terom*, confirment ces résultats et indiquent que le réceptacle est plus riche en eau que les autres parties de la plante soit 85,7 % ; alors que Lutz et *al.* [50] enregistrent un taux d'humidité plus faible dans le réceptacle, à savoir 81,24 %. La teneur en matière sèche diffère en fonction de la variété, de la partie de la plante et du degré de maturation des artichauts [17, 50].

La teneur en cendres nous renseigne sur la quantité totale des sels minéraux présents dans l'échantillon analysé.

La tige et le réceptacle sont plus riches en matières minérales, comportant respectivement 13,98 et 9,98 %. Le taux des cendres du réceptacle enregistré dans notre étude est supérieur à celui trouvé par Lutz et *al.* [50] soit 7,17 %. Cette inégalité peut être expliquée par la différence de variété, de stade de maturation et des conditions de culture. Les bractées ont la plus faible teneur en cendres (6,88 %) en comparaison avec les autres parties étudiées ; elle reste légèrement faible à celle trouvée par Romani et *al.* [17] qui indiquent un taux de 7,26 % de la MS (1,17 % de PF) dans les bractées de la variété *Violetto di Toscana*. Selon le même auteur, les bractées et le réceptacle de la fleur d'artichaut sont riches en potassium soient 326 et 375 mg/100 g PF respectivement, et en calcium à savoir 47 et 49 mg/100 g PF en ordre.

6.1.2 Teneur en matière grasse

Les résultats des teneurs en matière grasse des différents échantillons étudiés sont mentionnés dans la figure 6.1.

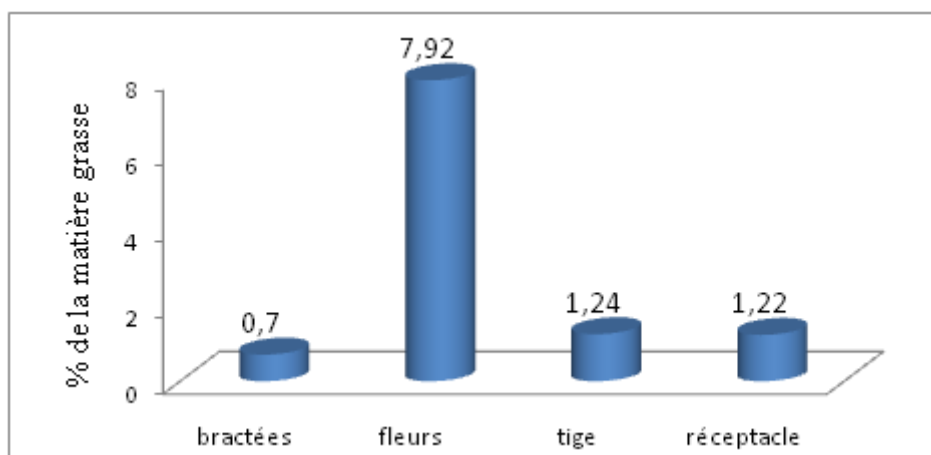


Figure 6.1 : La teneur en matière grasse dans les parties de la fleur d'artichaut (% MS).

Les fleurs, futures graines de la fleur d'artichaut, marquent la teneur la plus élevée en matière grasse soit six fois plus que la tige et onze fois plus que les bractées. La teneur en matière grasse du réceptacle (1,22 % MS) est très proche de celle obtenue par Lutz et *al.* [50] soit 1,15% MS et très loin de celle citée par Dridi [13] à savoir 0,15 %.

La différence en matière grasse entre les parties de la fleur peut être expliquée par la spécificité de certains organes à l'accumulation des réserves lipidiques.

6.2 Extraction, purification et caractérisation des protéases

Afin d'étudier l'application industrielle possible des extraits d'artichaut dans la technologie fromagère, nous avons extrait les protéines de quatre parties de la fleur d'artichaut et évalué leur activité coagulante.

6.2.1 Rendement d'extraction

Les résultats donnés par la figure 6.2 montrent que le réceptacle suivi par les fleurs enregistre les rendements d'extraction de la matière sèche les plus élevés à savoir 20,46 % et 18,07 % respectivement alors que la tige (11,75 %) et les bractées (10,22 %) donnent les rendements les plus faibles.

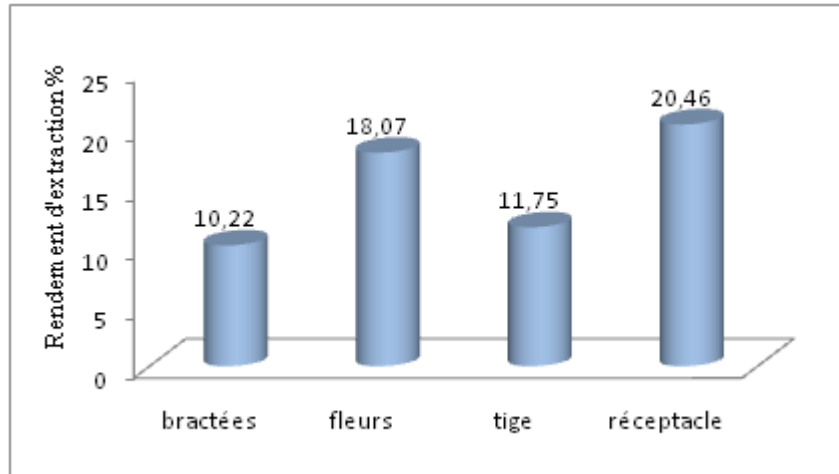


Figure 6.2 : Rendement d'extraction de la matière sèche de différentes parties de la fleur d'artichaut.

Cette différence des rendements d'extraction peut trouver son explication dans la composition de la matière sèche des parties de la fleur, dont la solubilité dans le solvant d'extraction est différente.

6.2.2 Taux protéiques et rendement en protéine brute

Les teneurs en protéines des matières premières (poudre d'artichaut) et des extraits ainsi que les rendements en protéines brutes sont illustrés dans la figure 6.3 :

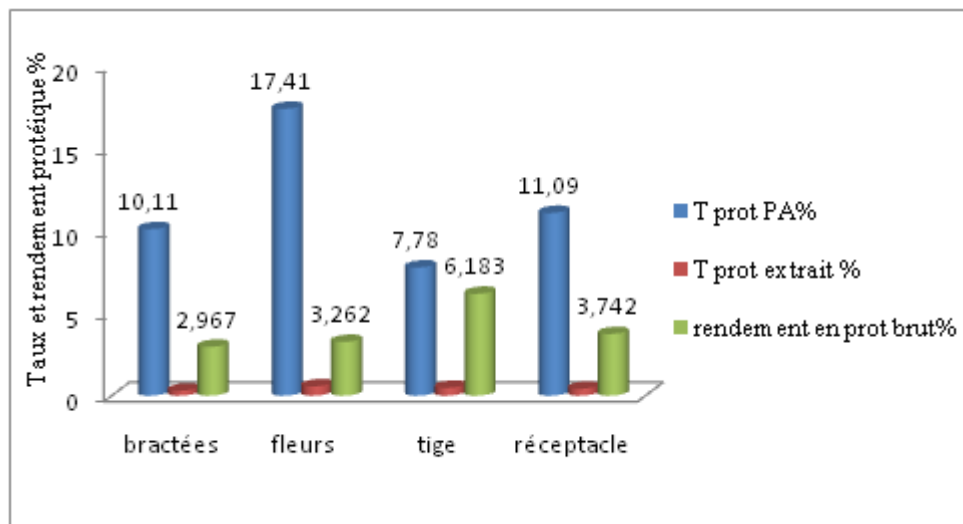


Figure 6.3 : Taux protéiques et rendement en protéine brute de différentes parties de la fleur d'artichaut (%MS).

Les fleurs renferment plus de protéines brutes que les autres parties de la fleur d'artichaut avec 17,41% MS alors que la tige enregistre la plus faible teneur à savoir 7,78 % MS. En outre, les 12,3 % des protéines totaux du réceptacle, trouvées par Lutz et *al.* [50], sont très proches de nos résultats (11, 09 %).

Les analyses statistiques des résultats de la teneur en protéines dans les poudres d'artichaut de différentes parties de la fleur et ceux des rendements d'extraction, confirment qu'il ya une corrélation réversible entre les deux variables ($r^2 = 0,37$). Donc quand la teneur en protéines brutes augmente, le rendement d'extraction diminue. Ces résultats peuvent trouver leur explication par la présence des substances précipitant les protéines et inhibant leur extraction (tanins...), ou par la diffusion des autres substances dans le solvant d'extraction conduisant ainsi à sa saturation.

6.2.3 Forces coagulantes des extraits

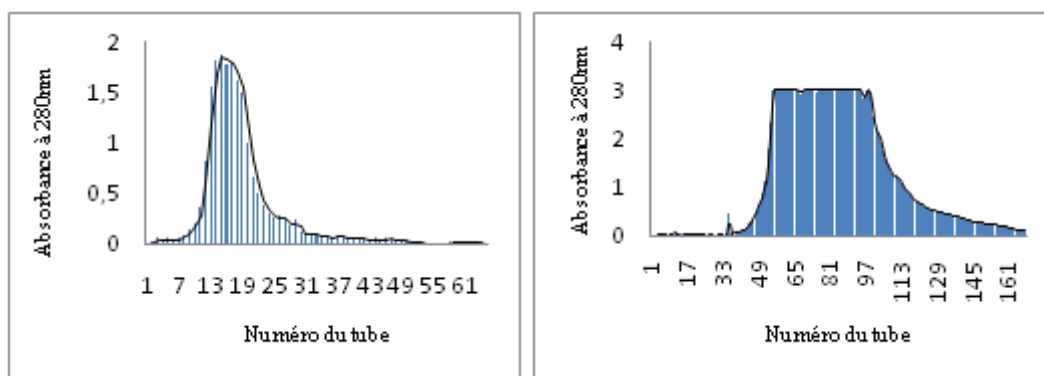
Les extraits de différentes parties de la fleur d'artichaut sont testés pour une évaluation d'une éventuelle activité coagulante ; cependant il ressort que seulement les fleurs qui ont une activité coagulante estimée à 88,88. Concernant les autres parties testées, malgré leur richesse en protéine, elles n'ont aucun effet coagulant du lait.

Ceci peut être en relation avec la spécificité de certaines molécules de nature protéique (protéases) à coaguler le lait et qui ne se trouvent que dans les fleurs. Selon Sidrach et *al.* [7], les protéinases responsables de l'activité coagulante sont des cynarases A, B et C. Les mêmes auteurs affirment que ces substances s'accumulent dans les vacuoles de stockage de protéine dans les papilles des fleurs et leur teneur constitue plus de 0,2% de toutes les protéines dans ce tissu. Ces protéases, d'après Barros et Malcata [207], sont comme les présures capables d'hydrolyser la κ -caséine au niveau de la liaison Phe105 – Met106. En revanche selon Esteves et *al.* [208], elles ont une grande activité protéolytique et une large spécificité pour les caséines α_{s1} et β que la chymosine.

6.2.4 Profil de la purification des protéases et rendement de prépurification

L'extrait brut des fleurs d'artichaut muni d'une activité coagulante a subi une purification partielle en utilisant la chromatographie d'exclusion moléculaire afin d'éliminer les substances indésirables telle que la couleur brune de l'extrait.

La mesure des absorbances de différents tubes obtenus nous a permis de tracer les profils de purification donnés par la figure 6.4.



(1)

(2)

Figure 6.4 : Profil de la purification dans la petite (1) et la grande (2) colonne.

L'observation des profils de purification nous a permis de partager l'extrait purifié en cinq fractions (selon l'absorbance) ; ces fractions sont testées pour évaluer leur activité coagulante dont les résultats obtenus montrent que seulement la première fraction a une activité coagulante. Celle-ci peut être justifiée par le poids moléculaire élevé des protéases des fleurs d'artichaut, c'est ce qui leur permet de passer les premiers dans la colonne.

Le rendement de prépurification est le rapport entre la force coagulante de l'extrait enzymatique prépurifié et celle de l'extrait brut. Le résultat obtenu soit 2,44 % montre que l'extrait purifié perd plus de 97 % de son activité initiale qui est peut être due à la forte dilution de l'extrait lors du processus de purification.

6.2.5 Caractérisation de la solution enzymatique

La fraction active de l'extrait purifié des fleurs d'artichaut a subi une caractérisation vis-à-vis de la température, le pH et la concentration du lait en calcium.

6.2.5.1 Influence de la température du lait

L'observation de la figure 6.5 révèle qu'il y a une augmentation de la force coagulante d'extrait purifié d'artichaut avec l'augmentation de la température ; un optimum de la force coagulante a été constaté à 70 °C soit une force de 23,786. Par ailleurs, à des températures plus élevées il y a une déclinaison de la force coagulante.

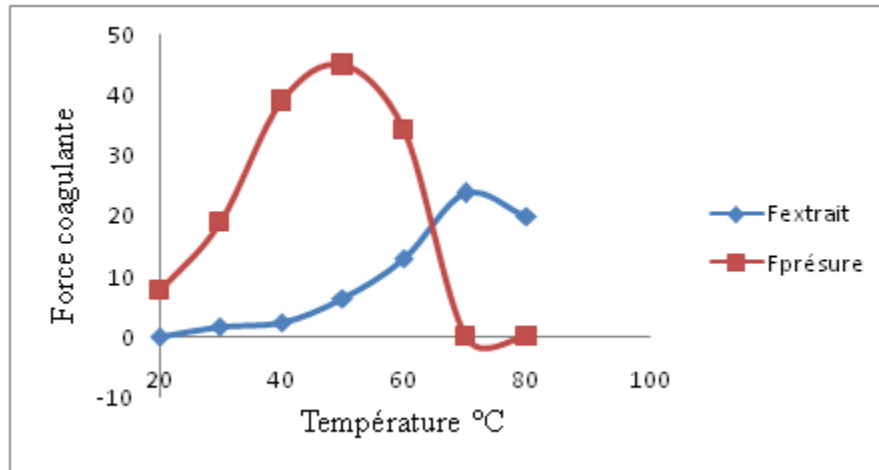


Figure 6.5 : Effet de la température du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié d'artichaut et de la présure

Nos résultats sont similaires à ceux trouvés par Sidrach *et al.* [7] sur les cynarases de *Cynara Scolymus* et Abdalla *et al.* [209] sur les enzymes coagulantes de *Solanum dubium*. En revanche, Nouani *et al.* [186] ont enregistré une température optimale plus élevée (80 °C) pour les coagulases d'artichaut alors que l'optimal de Sales-Gomes et Lima-Costa [210] est beaucoup plus faible (60 °C) pour les cardosines de *Cynara cardunculus* L.

Les protéases d'artichaut semblent être thermorésistantes en comparaison avec la présure commerciale qui est plus sensible à l'augmentation de la température dont elle enregistre une force optimale à 50 °C et à partir de 70 °C la présure devient inactive. Ce résultat diffère à celui trouvé par Nouani *et al.* [186] qui indiquent un optimum d'activité coagulante à 42 °C. Selon Esteves *et al.* [208] pour tous les coagulants, l'augmentation de la température engendre une coagulation du lait plus rapide. A savoir que la force de coagulation dépend du nombre et de la force des liaisons entre les particules de la micelle de caséine et également de la répartition spatiale des caséines dans le réseau du gel [208].

6.2.5.2 Influence du pH du lait

L'extrait purifié des fleurs d'artichaut présente un large profil d'activité autour du pH acide (figure 6.6) alors qu'à pH neutre l'extrait purifié perd son activité coagulante et présente un optimum de force coagulante à pH 5,2.

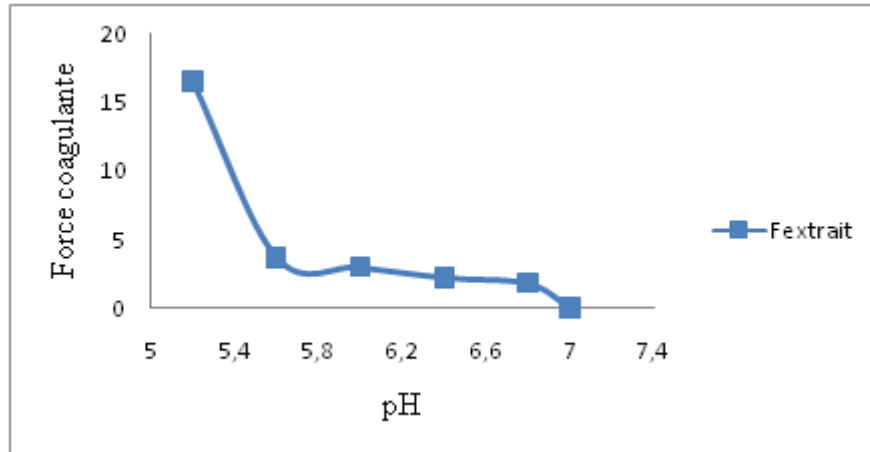


Figure 6.6 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié d'artichaut.

Nos résultats confirment ceux trouvés par Cimino *et al.* [211] qui affirment que la majorité des peptidases aspartiques (EC 3.4.23) de la famille des *Asteraceae* sont actives à des pH acides. Ainsi qu'ils sont similaires de l'optimum d'activité des cardosines trouvé par Silva *et al.* [212] à pH 5,2 et ils sont très proches de celui de Sidrache *et al.* [7] qui ont enregistré un optimum d'activité coagulante des cynarases A de la fleur d'artichaut autour du pH 5. Tandis que, Nouani *et al.* [186] ont repéré l'optimum à un pH plus élevé soit 5,5. Communément, des résultats similaires ont été enregistrés par Sarmiento *et al.* [212] et également par Sales-Gomes et Lima-Costa [210] pour les enzymes coagulantes (cardosines E, F, G et H) de la fleur de *Cynara cardunculus* L. qui sont actives à pH acide avec un maximum d'activité à pH 4,3 et 5 respectivement.

A pH neutre, nos résultats sont en contradiction avec ceux de Nouani *et al.* [186], Chazarra *et al.* [8] et Sidrache *et al.* [7] qui ont montré que ces protéases ont conservé 10 à 20% de leur activité initiale.

En effet et contrairement à tous les résultats cités précédemment, Abdalla *et al.* [209] montrent que l'activité coagulante de *Solanum dubium* s'accroît avec l'augmentation du pH jusqu'à un optimum à pH 10.

La force coagulante de la présure trace une allure semblable à celle tracée par l'extrait d'artichaut. La présure enregistre un maximum de force coagulante à pH 5,2 et elle devient inactive à pH 7 (figure 6.7).

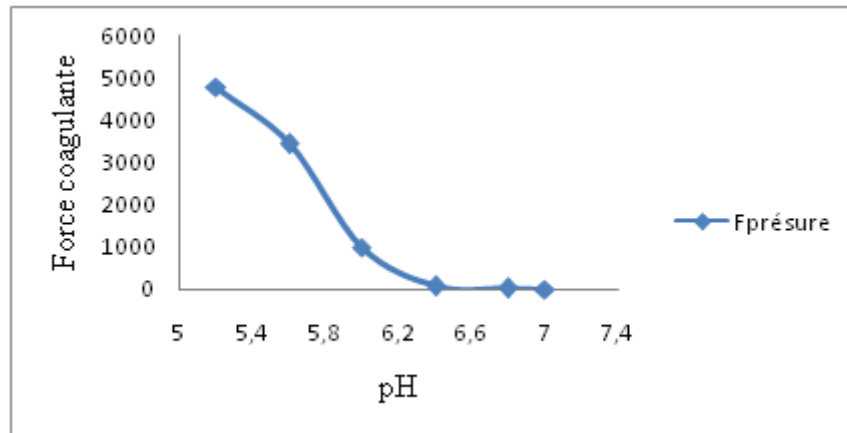


Figure 6.7 : Effet du pH du lait sur l'activité coagulante de la présure.

St-Gelais et Tirard-Collet [65] confirment que le pH optimal de la présure est d'environ 5,5 ; alors qu'elle est inactive à des pH supérieurs à 7. Dans le même sens Thoman [214] explique l'augmentation de l'activité coagulante de la présure en fonction de la diminution du pH par l'augmentation de l'activité de cette enzyme.

6.2.5.3 Influence de la concentration en CaCl_2

Les forces coagulantes de la présure et de l'extrait purifié d'artichaut s'accroissent paraboliquement avec l'augmentation de la concentration du CaCl_2 (figure 6.8). En effet, l'accroissement est plus rapide pour la présure ; mais au delà de 0,03 M du CaCl_2 , la force de la présure s'abaisse alors qu'elle continue la progression jusqu'à une concentration de 0,05 M pour l'extrait coagulant d'artichaut.

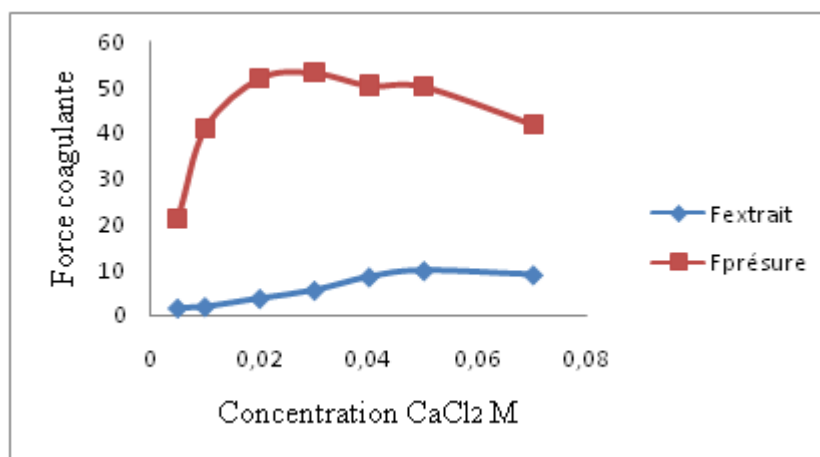


Figure 6.8 : Effet de la concentration de CaCl_2 du lait sur l'activité coagulante de l'extrait purifié d'artichaut et de la présure.

Nos résultats concordent avec ceux trouvés par Nouani et *al.* [186], Cavalli et *al.* [97] et Chazarra et *al.* [8] qui ont constaté que l'effet du CaCl_2 sur la force coagulante est bi-phasique, avec une augmentation de la force suivie par une diminution à des concentrations élevées du CaCl_2 . Selon Chazarra et *al.* [8], ces résultats semblent être en relation avec la baisse du pH du lait lors de l'addition du CaCl_2 . En revanche si le pH du lait est ajusté après l'addition du CaCl_2 , les variations observées avec la concentration en calcium sont dues à un effet direct sur l'agrégation des micelles de la caséine.

1.1 6.3 Extraction des polyphénols

L'extraction des substances bioactives, tels que les polyphénols, des matières végétales est la première étape dans l'utilisation des composés phytochimiques dans la préparation des suppléments diététiques, des ingrédients de nourriture, pharmaceutiques et des produits cosmétiques [149].

Au cours de cette étude, différents extraits ont été préparés à partir des bractées, des fleurs, de la tige et du réceptacle de la fleur d'artichaut, séchés et réduits en poudre. Une extraction solide-liquide a été effectuée par deux modes d'extraction à savoir la décoction et la macération et par quatre solvants de polarités différentes. Les extraits obtenus ont subi une évaluation de leur rendement d'extraction, de leur teneur en polyphénols totaux, en flavonoïdes et en tanins condensés.

6.3.1 Rendement d'extraction de la matière sèche dissoute dans le solvant

○ Par décoction

Les rendements d'extraction de la MS suivant le mode, la partie de la plante et le type de solvant sont illustrés par la figure 6.9 :

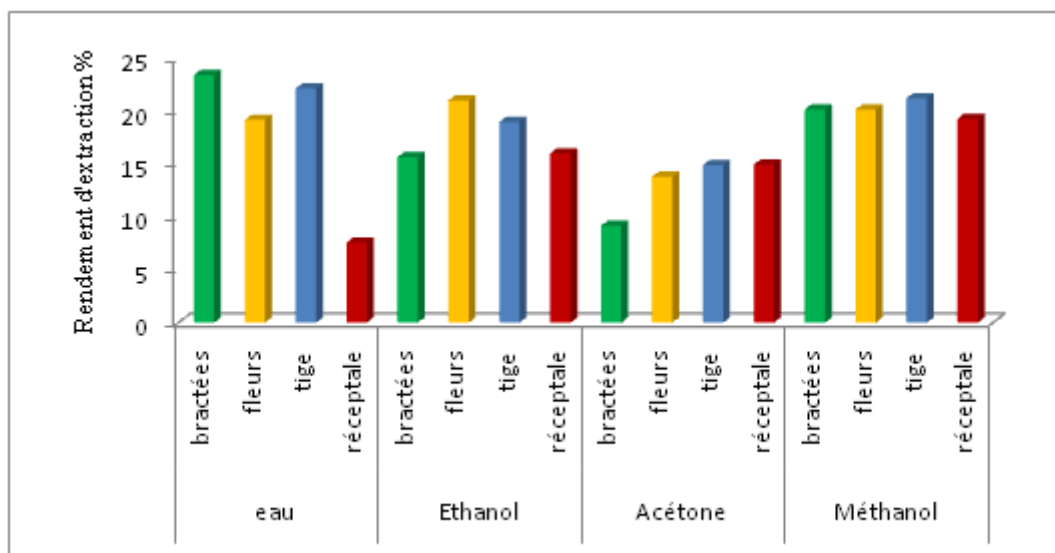


Figure 6.9 : Rendements d'extraction de la MS de différentes parties de la fleur d'artichaut par décoction.

Il ressort à travers l'observation des résultats, de la figure 6.9, issus d'une décoction des extraits, que le méthanol donne le meilleur rendement d'extraction soit une moyenne de 20,13 % sur quatre échantillons (bractée, fleur, tige et réceptacle), alors que l'acétone donne le plus faible rendement (13,192 % en moyenne).

Par ailleurs, les rendements des extraits aqueux et éthanoliques sont similaires à savoir 18 et 17,9 % en moyenne respectivement.

Statistiquement les parties de la plante n'ont pas d'influence significative sur les rendements d'extraction ($p > 0,05$) ; les bractées, la tige, les fleurs et le réceptacle donnent, en moyenne, des rendements très proches qui varient entre 17 et 19 %.

○ Par macération

Contrairement aux rendements d'extraction par décoction, les résultats des rendements obtenus par macération donnés par la figure 6.10 montrent que l'acétone avec un rendement de 19,295 % est considérée comme le meilleur solvant suivi par l'eau et le méthanol soient 16,747 et 14 % respectivement.

De ces résultats, on peut conclure que la température influe considérablement sur le rendement d'extraction de la matière sèche, à noter que les fortes températures (d'ébullition) activent l'extraction par le méthanol en revanche les faibles températures (ambiantes) activent l'extraction par l'acétone tout en augmentant leur rendement.

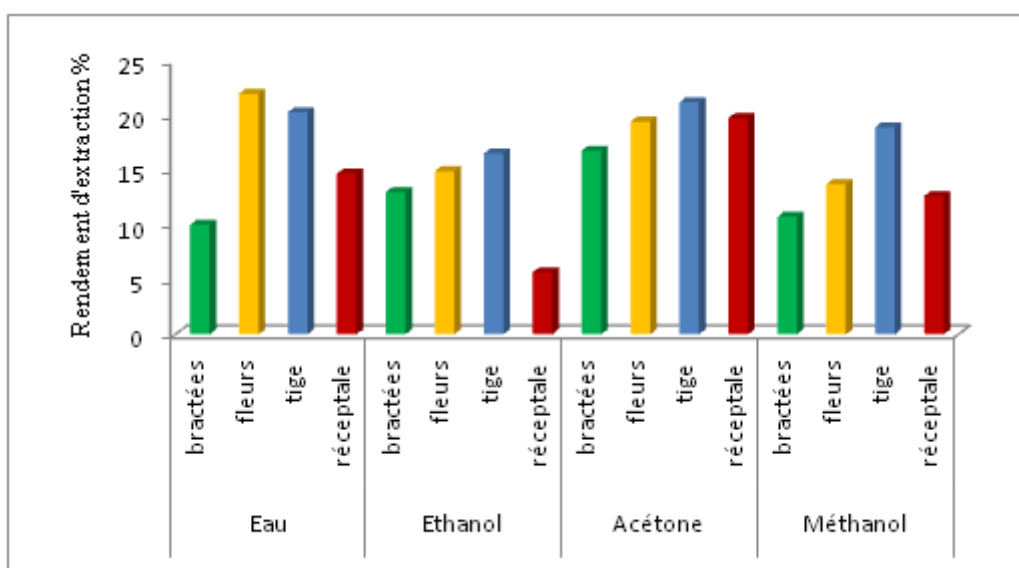


Figure 6.10: Rendements d'extraction de différentes parties de la fleur d'artichaut par macération.

Le rendement d'extraction de la matière sèche des bractées par l'eau à savoir 10% dans notre étude est très proche à celui trouvé par Peschel et *al.* [215] soit 11,5 %, alors que les rendements par les autres solvants sont très supérieurs à ceux trouvés par ces mêmes auteurs.

La tige donne toujours un rendement élevé à savoir 19,24 %, suivie par les fleurs soit 17,515 % en moyenne. En revanche, les rendements du réceptacle et des bractées sont très proches (13,24 et 12,625 % en ordre).

Les analyses statistiques des résultats obtenus par la décoction et la macération en combinaison, montrent une différence significative ($p < 0,05$) entre les rendements obtenus en fonction de la partie de la plante ; où les meilleurs rendements sont enregistrés

respectivement au niveau de la tige et des fleurs (19,268 et 18,02 % en moyenne). En revanche, une étude portée sur *Cynara cardunculus* conduite par Falleh et *al.* [102] a donné un bon rendement avec les feuilles (34,72 %) et un très faible rendement avec les fleurs (7,56 %).

Statistiquement, le mode d'extraction et le type de solvant ne présentent pas une influence significative ($p > 0,05$) sur le rendement d'extraction. Les moyennes de rendements par différents solvants sont très proches et elles sont similaires pour les extraits aqueux et méthanoliques (17,406 et 17,095 % en moyenne par ordre). Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Hadj Salem [151] sur *Nitraria retusa*, qui montre que les extraits aqueux et méthanoliques atteignent des rendements similaires de 18 et 19 % respectivement. Par contre, Ozsoy et *al.* [216] ont obtenu, sur la plante *Smilax excelsa*, un meilleur rendement par l'extraction aqueuse (33,9 %) et un faible rendement avec l'acétate d'éthyle (10 %).

Ainsi, les rendements d'extraction varient en fonction de la matière végétale étudiée, de la nature et des caractéristiques physico-chimiques des solvants utilisés et notamment leur polarité [151]. D'autres paramètres peuvent intervenir pour améliorer le rendement d'extraction tels que la partie de la plante, la température, le pH et le temps de contact de l'échantillon avec le solvant.

6.3.2 pH des extraits polyphénoliques

Les résultats des pH de différents extraits de la fleur d'artichaut sont présentés dans les figures 6.11 (par décoction) et 6.12 (par macération) :

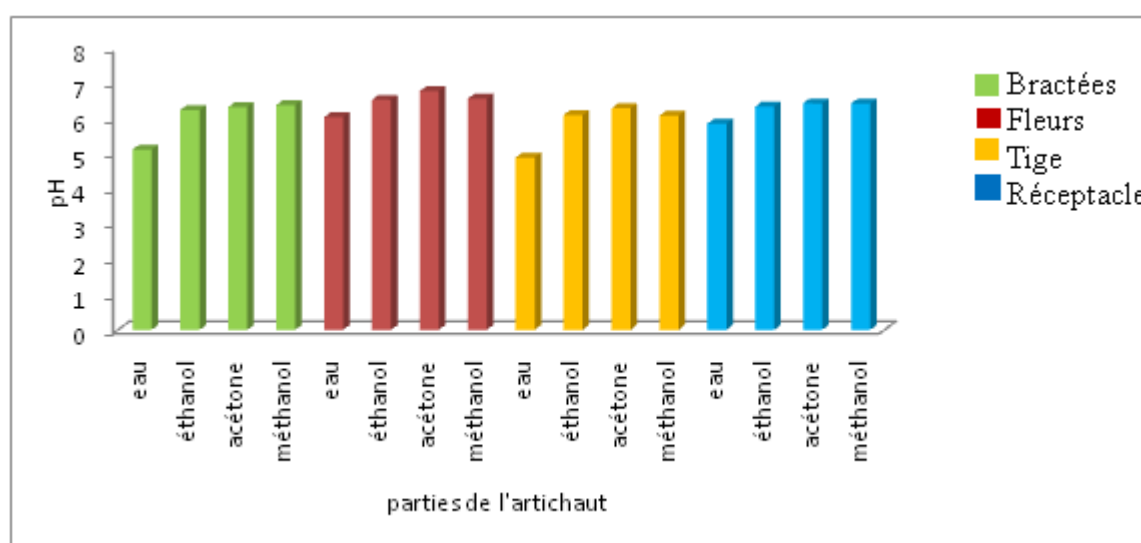


Figure 6.11 : pH des décoctés polyphénoliques d'artichaut.

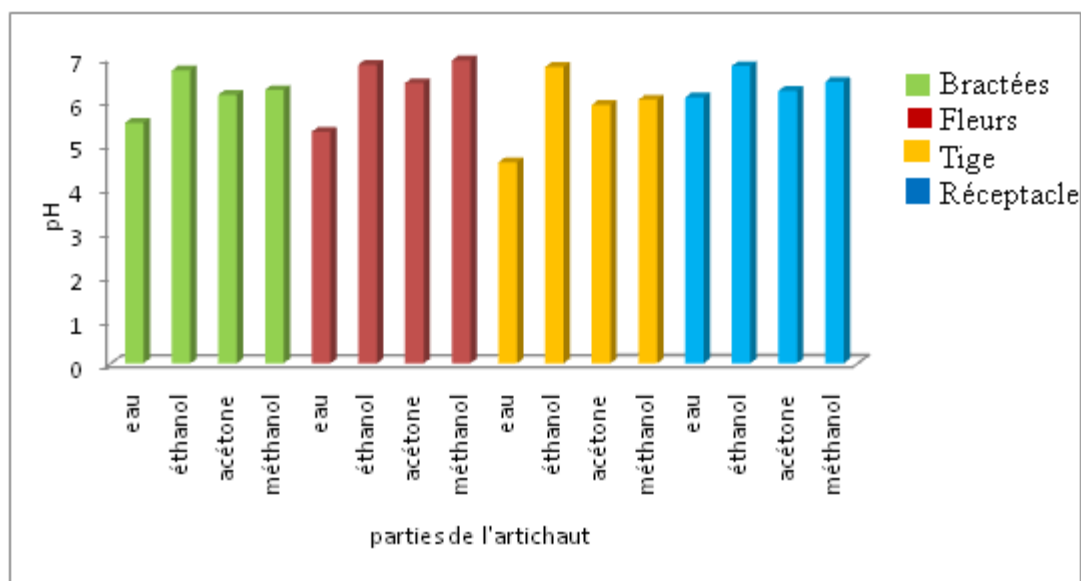


Figure 6.12 : pH des macérats polyphénoliques d'artichaut.

D'après les résultats des figures 6.11 et 6.12, nous constatons que les valeurs du pH trouvées pour les quatre parties de la fleur d'artichaut, comprise entre 5 et 6,85, sont très proches et légèrement acides. Compte tenu de la fragilité des polyphénols, il est recommandé d'éviter les pH excessifs lors de l'extraction de ces substances [26]. L'effet du pH est le premier facteur agissant sur le changement de couleur de quelques polyphénols comme les anthocyanes. Une solution aqueuse d'anthocyane à pH très acide a une forte coloration rouge, coloration qui vire vers le bleu quand le pH augmente vers la neutralité. A pH neutre, l'anthocyane est incolore [217].

6.3.4 Teneur en polyphénols totaux

Pour évaluer la teneur en polyphénols totaux des extraits des bractées, des fleurs, de la tige et du réceptacle de la fleur d'artichaut, nous avons procédé à la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. Cette méthode est simple à mettre en œuvre et très sensible [193].

Le standard utilisé est l'acide gallique, c'est un étalon très utilisé pour le dosage des polyphénols totaux car il est moins chère, très soluble dans l'eau et préférable pour la plus part des matrices végétales [193].

Les résultats de la teneur en polyphénols totaux extraits par différents modes et solvants d'extraction et à partir de différentes parties de la fleur d'artichaut sont donnés par les tableaux 6.2 et 6.3.

○ Par décoction

Les résultats mentionnés dans le tableau 6.2, indiquent que les fleurs renferment plus de polyphénols totaux avec un maximum de 38,702 mg éq AG/g PS, suivi par la tige et le réceptacle à savoir des moyennes de 17,515 et 11,36 mg éq AG/g PS respectivement.

Tableau 6.2: Teneur en polyphénols totaux dans différentes parties de la fleur d'artichaut extraits par décoction (mg éq AG/g PS).

Parties de la fleur	Solvants	Teneur en PT (mg éq AG/g PS)
Bractées	Eau	8,859 ± 0,754
	Ethanol	7,298 ± 0,570
	Acétone	7,155 ± 0,626
	Méthanol	7,753 ± 0,037
Fleurs	Eau	29,960 ± 4,728
	Ethanol	38,702 ± 0,202
	Acétone	35,124 ± 2,502
	Méthanol	28,542 ± 0,184
Tige	Eau	14,492 ± 1,509
	Ethanol	19,201 ± 1,803
	Acétone	21,842 ± 2,410
	Méthanol	16,118 ± 0,092
Réceptacle	Eau	8,872 ± 0,037
	Ethanol	10,758 ± 0,681
	Acétone	13,959 ± 1,527
	Méthanol	11,851 ± 0,092
Moyenne générale		17,530 ± 10,380

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD

Les bractées enregistrent les plus faibles teneurs avec 7,766 mg éq AG/g PS. La variation de la teneur en polyphénols totaux en fonction de la partie de la plante est hautement significative ($p < 0,01$). Ces résultats rejoignent ceux trouvés par Pandino et *al.* [218] qui constatent que la teneur en polyphénols augmente de l'extérieur à l'intérieur de la fleur d'artichaut. Ainsi Kukic et *al.* [103] évoquent de leur part que les polyphénols ne sont pas distribués uniformément dans les parties de la fleur.

Les teneurs en PT ne diffèrent pas significativement en fonction du type du solvant ($p > 0,05$), donc dans cette expérience le solvant d'extraction n'influe pas beaucoup sur la teneur en polyphénols. Les valeurs maximales des polyphénols totaux sont celles obtenues par extraction à l'acétone soit 19,52 mg éq AG/g PS en moyenne, ce solvant est préférable [193] car il a l'avantage de précipiter les protéines et d'extraire faiblement les sucres. L'éthanol enregistre une teneur moyenne très proche à celle de l'acétone soit 18,99 mg éq AG/g PS. Mulinacci et *al.* [10] confirment nos résultats en indiquant que l'éthanol à 70 °C permet une meilleure extraction des polyphénols d'artichaut.

Par ailleurs, les extraits méthanoliques et aqueux enregistrent les plus faibles teneurs en polyphénols totaux à savoir 16,07 et 15,55 mg éq AG/g PS en moyenne respectivement. Comparativement aux résultats de Llorach et *al.* [219], nos teneurs restent légèrement supérieures pour l'extrait méthanolique (15,4 mg éq AC/100g PS) et sont nettement supérieures pour l'extrait aqueux (9,9 mg éq AC/100g PS).

○ Par macération :

En ce qui concerne les teneurs en polyphénols des extraits obtenus par macération, représentés dans le tableau 6.3, les fleurs enregistrent toujours les meilleurs teneurs à savoir une moyenne de 39,528 mg éq AG/g PS. Cette valeur est nettement supérieure à celle trouvée par Falleh et *al.* [102] dans les fleurs de *Cynara cardunculus* L. une plante du même genre que les artichauts qui ont trouvé 6,96 mg éq AG/g PS. Sharaf-Eldin et *al.* [220] ont expliqué la teneur élevée en polyphénols des fleurs par la synthèse de ces substances dans les tissus végétatifs de la plante (feuilles) et leur stockage dans les tissus reproductifs (fleurs).

La tige donne une teneur de 21,546 mg éq AG/g PS en moyenne suivie par le réceptacle et les bractées soient 10,541 et 7,9 mg éq AG/g PS.

Tableau 6.3 : Teneur en polyphénols totaux dans les différentes parties de la fleur d'artichaut extraits par macération (mg éq AG/g PS).

Parties	Solvants	Teneur en PT (mg éq AG/g PS)
Bractées	Eau	5,828 ± 1,177
	Ethanol	9,939 ± 1,214
	Acétone	6,153 ± 2,704
	Méthanol	9,679 ± 0,626
Fleurs	Eau	23,702 ± 0,736
	Ethanol	51,177 ± 2,576
	Acétone	43,502 ± 0,368
	Méthanol	39,729 ± 2,576
Tige	Eau	8,014 ± 1,766
	Ethanol	26,356 ± 0,809
	Acétone	25,224 ± 1,085
	Méthanol	26,590 ± 2,024
Réceptacle	Eau	5,230 ± 0,442
	Ethanol	11,669 ± 2,778
	Acétone	12,150 ± 1,177
	Méthanol	13,113 ± 0,331
Moyenne générale		19,880 ± 14.560

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD

Le réceptacle comporte une teneur en PT plus élevée que celle des bractées soient 10,541 et 7,9 mg éq AG/g PS en moyenne respectivement, c'est ce qui est en concordance avec les résultats trouvés par Fratianni et *al.* [9] qui ont prouvé que le réceptacle, de la variété *Violet de Provence*, est plus riche en PT soit 1,32 mM/g PF que les bractées à savoir 1,13 mM/g PF. Toutefois ces résultats restent faibles par rapport à ceux de Wang et *al.* [153] qui trouvent 14 mg éq AG/g PS dans le réceptacle de la variété Green globe.

En outre, Romani et *al.* [17] ont enregistré 29,8 mg éq AG/g PF dans le réceptacle de la variété *Violetto*, cette différence peut s'expliquer par l'état de l'échantillon, frais ou séché et par la variété.

Par macération, les extraits éthanoliques semblent être les plus riches en polyphénols (24,79 mg éq AG/g PS en moyenne) suivis par le méthanol et l'acétone avec des moyennes très proches soient 22,28 et 21,76 mg éq AG/g PS, tandis que l'extrait aqueux enregistre les plus faibles teneurs soit 10,69 mg éq AG/g PS. Peschel et *al.* [215], qui ont extrait les polyphénols des bractées blanchis par différents solvants, ont trouvé des teneurs en polyphénols totaux de 102,33 et 95,65mg éq AG/g PS par acétone et par méthanol respectivement et 88,15 et 42,75 mg éq AG/g PS par éthanol et par eau. Ces teneurs sont hautement supérieurs à ceux enregistrés dans notre étude soient 6,153 et 9,679 mg éq AG/g PS par acétone et par méthanol respectivement et 5,828 et 9,939 mg éq AG/g PS par eau et par éthanol en ordre. Cette supériorité est en relation avec le temps d'extraction qui est de 8 heures pour Peschel et *al.* [215] et l'effet du blanchiment qui augmente, selon Llorach et *al.* [219] la teneur en PT par inactivation des polyphénoloxydases (PPO).

Chaque solvant possède une spécificité à extraire un composé phénolique déterminé. Selon les résultats de l'étude faite par Mulinacci et *al.* [10] l'eau à température ambiante permet l'extraction des acides caféiques et des esters monocaféoylquinique. Alors que le méthanol [149] est plus efficace pour l'extraction des polyphénols à poids moléculaires faibles et l'acétone [26] est recommandé pour les flavanols à poids moléculaires élevés. Suivant le même auteur les formes hétérosidiques de ces composés phénoliques sont, classiquement, solubles dans l'eau. La solubilité des composés phénoliques est affectée par la polarité du solvant utilisé ; par conséquent, c'est très difficile de développer un procédé d'extraction approprié à l'extraction de tous les composés phénoliques de la plante [127].

En comparant les résultats obtenus pour chaque mode d'extraction, la décoction semble être légèrement déficiente pour extraire les composés phénoliques à partir des parties de la fleur d'artichaut, elle a enregistré en moyenne 17,53 mg éq AG/g PS. Par ailleurs la macération à température ambiante favorise mieux l'extraction de ces composés par une moyenne valant de 19,88 mg éq AG/g PS. Cependant, ces résultats sont en contradiction avec ceux de Lutz et *al.* [50] qui ont trouvé que les artichauts décoctés sont plus riches en PT soit 11,93 mg éq AT/100 g que les autres à savoir 5,4 mg éq AT/100 g.

La teneur en polyphénols est influencée par le temps et la température d'extraction, la température élevée accroît la solubilité et le transfert des substances, en plus elle diminue la viscosité du solvant en augmentant l'arrachement des substances actives de la matrice végétale polyphénolique [149, 221].

En revanche, un temps d'extraction prolongé et une température élevée augmentent, d'après les mêmes auteurs, la chance de dégradation des polyphénols par oxydation et par hydrolyse ce qui engendre une diminution du taux polyphénolique.

L'analyse des résultats des deux tableaux (6.2 et 6.3) révèle que l'éthanol donne les meilleures teneurs en PT (21,89 mg éq AG/g PS en moyenne) suivi par l'acétone et le méthanol qui enregistrent des teneurs proches estimées respectivement à 20,64 et 19,17 mg éq AG/g PS ; ces teneurs sont plus élevées que celles des extraits aqueux (13,12 mg éq AG/g PS mg éq AG/g PS). Nos résultats sont en concordance avec ceux obtenus par Katalinic et *al.* [110] et par Koffi et *al.* [222] qui ont montré que l'éthanol est le meilleur solvant d'extraction des PT avec une moyenne quatre fois plus que celle des extraits acétoniques et aqueux.

La richesse de la fleur d'artichaut en polyphénols, suivant Djeridane et *al.* [223] est caractéristique de la famille des *Asteraceae* qui semble avoir une relation avec les conditions climatiques et pédologiques sévères (température et salinité élevées, sécheresse...) du milieu de culture des artichauts.

L'extraction des composés phénoliques de la matière végétale est influencée par leur nature chimique, la méthode d'extraction, la dimension de l'échantillon, le type de solvant, les interactions avec les autres constituants de la plante, le temps et les conditions de stockage [102, 222, 224].

6.3.5 Teneur en flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent une classe des polyphénols très importante, par le nombre élevé de ses composés et leurs diverses activités biologiques. Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode de trichlorure d'aluminium en utilisant la quercétine comme standard. Les tableaux 6.4 et 6.5 représentent les différentes valeurs obtenues pour chaque mode et solvant d'extraction ainsi que pour chaque partie analysée, exprimées en mg équivalent quercétine / g de poids sec (PS).

○ Par décoction

Les résultats de la teneur en flavonoïdes des décoctés de la fleur d'artichaut par les différents solvants (tableau 6.4) indiquent que le type de solvant n'a pas influencé l'extraction des flavonoïdes ($p > 0,05$). Les moyennes des teneurs en flavonoïdes, pour chaque type de solvant, sont presque similaires, elles varient entre 6,958 mg éq Qu/g PS (extraction par éthanol) et 6,2 mg éq Qu/g PS (extraction par méthanol).

Tableau 6.4 : Teneur en flavonoïdes dans différentes parties de la fleur d'artichaut extraits par décoction.

Parties	Solvants	Teneur en flavonoïdes (mg éq Qu/g PS)
Bractées	Eau	4,083 ± 0,118
	Ethanol	2,317 ± 0,354
	Acétone	2,200 ± 0,141
	Méthanol	2,283 ± 0,306
Fleurs	Eau	14,200 ± 0,707
	Ethanol	18,600 ± 1,933
	Acétone	17,150 ± 1,956
	Méthanol	16,433 ± 1,179
Tige	Eau	4,183 ± 0,495
	Ethanol	4,450 ± 0,589
	Acétone	5,417 ± 0,825
	Méthanol	4,083 ± 0,354
Réceptacle	Eau	3,283 ± 0,071
	Ethanol	2,467 ± 0,330
	Acétone	2,500 ± 0,189
	Méthanol	2,000 ± 0,283
Moyenne générale		6,603 ± 6,092

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD

Statistiquement la différence entre les teneurs en flavonoïdes en fonction de la partie de la fleur est hautement significative ($p < 0,01$). La grande distinction entre les parties apparaît au niveau de la richesse de certaines et la pauvreté des autres ; les fleurs enregistrent un maximum de flavonoïdes (16,596 mg éq Qu/g PS en moyenne) tandis que la tige, les bractées et le réceptacle renferment des teneurs minimales (4,533, 2,721 et 2,563 mg éq Qu/g PS en moyenne respectivement). En effet, Kukic et *al.* [103] ont trouvé des résultats différents à nos résultats et indiquent que le réceptacle d'artichaut est riche en flavonoïdes surtout en apigénine et en lutéoline.

- Par macération

En moyenne, les résultats du tableau 6.5 montrent que l'éthanol et l'acétone donnent les meilleurs teneurs en flavonoïdes soient respectivement 9,929 et 9,338 mg éq Qu/g PS. Mulinacci et *al.* [10] confirment nos résultats en enregistrant une hausse de la teneur en flavonoïdes par une solution éthanolique aqueuse à 70 °C.

Contrairement aux résultats de la décoction, les macérats méthanoliques donnent plus de quantités de flavonoïdes (8,509 mg éq Qu/g PS en moyenne) que les extraits aqueux (5,221 mg éq Qu/g PS en moyenne).

Tableau 6.5 : Teneur en flavonoïdes dans les différentes parties de la fleur d'artichaut extraits par macération.

Parties	Solvants	Teneur en flavonoïdes (mg éq Qu/g PS)
Bractées	Eau	2,583 ± 1,108
	Ethanol	3,433 ± 1,179
	Acétone	3,417 ± 1,061
	Méthanol	3,867 ± 0,377
Fleurs	Eau	12,400 ± 0,471
	Ethanol	25,750 ± 0,306
	Acétone	24,600 ± 0,141
	Méthanol	21,083 ± 1,202
Tige	Eau	3,767 ± 0,896
	Ethanol	7,767 ± 1,226
	Acétone	6,667 ± 1,179
	Méthanol	6,250 ± 1,438
Réceptacle	Eau	2,133 ± 0,141
	Ethanol	2,767 ± 0,283
	Acétone	2,667 ± 0,660
	Méthanol	2,817 ± 0,731
Moyenne générale		8,248 ± 8,199

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD

Du tableau ci-dessus, il apparaît que les fleurs sont très riches en flavonoïdes soit, en moyenne, 20,958 mg éq Qu/g PS. En revanche, la tige est carencée en flavonoïdes, sa teneur est trois fois plus faible que celle des fleurs soit en moyenne 6,112 mg éq Qu/g PS.

Dans les fleurs de *Cynara cardunculus* L. Falleh et al. [102] ont trouvé 5,58 mg éq catéchine/g PS, cette différence est liée à l'espèce différente et aux propriétés du standard utilisé (catéchine au lieu de la quercétine).

Les macérats des bractées enregistrent une légère hausse en flavonoïdes (3,325 mg éq Qu/g PS en moyenne) par rapport aux décoctés de ceux-ci alors que le réceptacle renferme les plus faibles quantités à savoir 2,596 mg éq Qu/g PS en moyenne. Ces valeurs enregistrées confirment que la différence entre les teneurs en flavonoïdes, issues par macération, est hautement significative en fonction des parties de la fleur d'artichaut ($p < 0,01$).

Communément, les résultats des deux tableaux (6.4 et 6.5) montrent que la macération semble être la meilleure méthode d'extraction des flavonoïdes avec une moyenne de 8,248 mg éq Qu/g PS, bien que la décoction ne donne que 6,603 mg éq Qu/g PS en moyenne.

En ce qui concerne le solvant d'extraction, quelque soit le mode d'extraction, l'éthanol et l'acétone restent les meilleurs extracteurs des flavonoïdes avec des moyennes très proches 8,444 et 8,077 mg éq Qu/g PS respectivement ; tandis que au niveau des parties de la fleur, les fleurs sont les plus riches en ces substances et enregistrant une moyenne estimée à 18,777 mg éq Qu/g PS.

6.3.6 Teneur en tanins condensés

Les tanins condensés sont des oligomères de flavan-3-ols et des résidus relatifs de flavanols qui produisent des anthocyanidines [225], ce sont des substances intéressantes pour la santé humaine grâce à leur activité antioxydante et leur désavantage se situe au niveau des interactions tanins-protéines qui affectent la digestibilité des protéines et des hydrates de carbone [196]. Certaines formes de tanins sont facilement extractibles du tissu végétal par les solvants organiques (tanins condensés extractibles), tandis que d'autres formes sont liées aux protéines et/ou aux hydrates de carbone composants la paroi de la cellule [226].

La méthode utilisée pour le dosage des tanins condensés est celle basée sur le réactif de vanilline en milieu acide. Les résultats obtenus, exprimés en mg équivalent catéchol/g du poids sec (PS), sont présentés dans les tableaux 6.6 et 6.7.

○ Par décoction

Les résultats de la teneur en tanins condensés mentionnés dans le tableau 6.6 montrent que ces teneurs sont influencées par le type de solvant dont la différence entre les valeurs est significative ($p < 0,05$) en fonction de ce variable.

A l'exception des décoctés aqueux qui enregistrent des teneurs maximales arrivant à une concentration moyenne de 5,436 mg éq cat/g PS, le reste des solvants (éthanol, acétone et méthanol) semble être légèrement déficients pour extraire les tanins à partir des parties de la fleur d'artichaut, car ils enregistrent des teneurs minimales très proches évaluées respectivement à 2,571, 2,373 et 1,826 mg éq cat/g PS en moyenne.

Tableau 6.6 : Teneur en tanins condensés dans les différentes parties de la fleur d'artichaut extraits par décoction.

Parties	Solvants	Teneur en tanins condensés (mg éq cat/g PS)
Bractées	Eau	3,773 ± 0,574
	Ethanol	2,089 ± 0,086
	Acétone	2,373 ± 0,086
	Méthanol	1,765 ± 0,201
Fleurs	Eau	10,284 ± 0,258
	Ethanol	3,469 ± 0,029
	Acétone	3,043 ± 0,229
	Méthanol	2,110 ± 0,115
Tige	Eau	4,402 ± 0,258
	Ethanol	2,414 ± 0,430
	Acétone	1,927 ± 0,488
	Méthanol	1,460 ± 0,057
Réceptacle	Eau	3,286 ± 0,115
	Ethanol	2,312 ± 0,172
	Acétone	2,150 ± 0,172
	Méthanol	1,968 ± 0,258
Moyenne générale		3,051 ± 2,090

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD.

Contrairement aux polyphénols totaux et aux flavonoïdes, les valeurs des tanins condensés ne se différencient pas significativement en fonction de la partie de la fleur ($p > 0,05$). La tige, les bractées et le réceptacle contiennent des teneurs très proches comprises entre 2,551 et 2,429 mg éq cat/g PS en moyenne. En revanche, les fleurs enregistrent toujours les teneurs maximales avec une moyenne de 4,726 mg éq cat/g PS.

- Par macération

L'analyse des résultats des macérâts de la fleur d'artichaut, indiqués dans le tableau 6.7, montre que le type de solvant n'a pas d'influence sur la teneur en tanins extrait ($p > 0,05$). L'eau, l'éthanol et l'acétone donnent respectivement des moyennes très proches soient 2,743, 2,611 et 2,216 mg éq cat/g PS, alors que le méthanol extrait toujours moins de tanins enregistrant la plus faible concentration à savoir 1,835 mg éq cat/g PS en moyenne.

Tableau 6.7 : Teneur en tanins condensés dans les différentes parties de la fleur d'artichaut extraits par macération.

Parties	Solvants	Teneur en tanins condensés (mg éq cat/g PS)
Bractées	Eau	2,394 ± 0,229
	Ethanol	2,150 ± 0,172
	Acétone	2,819 ± 0,143
	Méthanol	1,988 ± 0,115
Fleurs	Eau	3,529 ± 0,344
	éthanol	3,753 ± 0,488
	acétone	2,738 ± 0,258
	méthanol	2,049 ± 0,201
Tige	Eau	2,170 ± 0,143
	éthanol	2,049 ± 0,430
	acétone	1,501 ± 0,057
	méthanol	1,562 ± 0,143
Réceptacle	Eau	2,880 ± 0,172
	éthanol	2,495 ± 0,258
	acétone	1,805 ± 0,316
	méthanol	1,744 ± 0,344
Moyenne générale		2,352 ± 0,654

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD

Les fleurs constituent la partie la plus riche en tanins condensés avec une moyenne de 3,017 mg éq cat/g PS. Les bractées et le réceptacle présentent des moyennes similaires à savoir 2,337 et 2,231 mg éq cat/g PS dans l'ordre. Contrairement aux décoctés de la tige, les macérâtes de celle-ci enregistrent les teneurs les plus faibles avec une moyenne de 1,82 mg éq cat/g PS. D'après les résultats trouvés par Falleh et *al.* [102] qui ont enregistré 2 et 1,28 mg éq catéchine/g PS dans les grains et les fleurs respectivement de *Cynara cardunculus* L., on peut dire que l'artichaut est plus riche en tanins condensés que le cardon.

L'observation des résultats de la teneur en tanins condensés présentés dans les deux tableaux (6.6 et 6.7), révèle que la décoction est plus efficace dans l'extraction des tanins (3,051 mg éq cat/g PS en moyenne) que la macération (2,352 mg éq cat/g PS en moyenne). Ces résultats peuvent trouver leur explication dans le fait que le solvant, dans le cas de la macération, peut arriver à saturation et perdre progressivement sa capacité d'extraction au cours du procédé d'extraction de la matière végétale [151]. En outre les artichauts sont très riches en polyphénol oxydases (PPO) qui détruit les polyphénols et la décoction détruit ces enzymes [50].

Quelque soit le mode d'extraction, l'eau suivie par l'éthanol et l'acétone sont les meilleurs solvants extracteurs des tanins soient en moyenne par ordre 4,09, 2,591 et 2,295 mg éq cat/g PS. L'acétone est préférable que le méthanol, qui n'extrait que 1,831 mg éq cat/g PS en moyenne, pour extraire les tanins grâce à sa capacité de solubiliser les proanthocyanidines qui ne sont pas solubles dans le méthanol [221, 227, 228]. Mais le problème selon Rosales [226] est que l'acétone extrait aussi les lipides et les colorants non phénoliques ceux qui causent des interférences lors de dosage des tanins. Par ailleurs, l'extraction liquide-liquide avec le chloroforme peut enlever ce problème [227].

L'extraction des tanins condensés dépend de leur nature chimique, le solvant utilisé et les conditions opératoires [169]. En outre, les TC extrait se composent d'une série de composés oligomères et polymères qui diffèrent dans leur sensibilité vers les réactifs utilisés pour le leur quantification. Ce qui rend le choix des méthodes appropriées au dosage des TC une tâche difficile [196].

6.3.7 Extraction des polyphénols par Soxhlet

L'appareil de Soxhlet est désigné généralement pour l'extraction des lipides [215, 229]. C'est une technique couramment utilisée pour isoler des composés actifs d'origine végétale sans les dégrader [229]. Selon Hadj Salem [151] l'efficacité de l'extraction au Soxhlet est liée au fait que le solvant qui se condense et qui vient en contact du végétal est toujours pur, permettant une meilleure extraction.

6.3.7.1 Rendement d'extraction

Les résultats du rendement d'extraction, exprimés en pourcentage, des différentes parties de la fleur d'artichaut sont représentés par la figure 6.13.

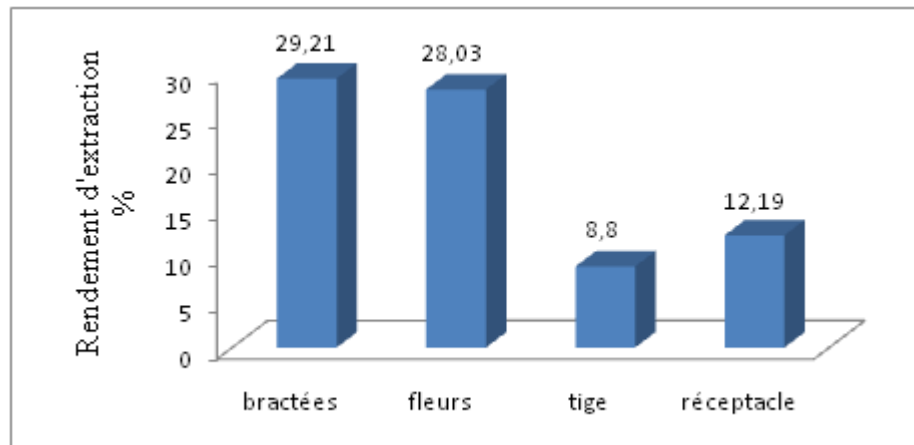


Figure 6.13: Rendement d'extraction par la méthode de Soxhlet

Les meilleurs rendements d'extraction de la matière sèche, par Soxhlet (figure 6.13), sont obtenus au niveau des bractées et des fleurs avec des taux de 29,21 et 28,03 % respectivement. Ces résultats sont nettement supérieurs aux moyennes enregistrées par la décoction et la macération sur les bractées (14,855 %) et les fleurs (18,02 %). Cette différence peut être expliquée par le temps prolongé d'extraction par le Soxhlet et le solvant qui monte pur dans chaque cycle d'extraction. Le réceptacle enregistre un rendement de 12,19 %, une valeur comparable à celle trouvée par la décoction et la macération (13,814 % en moyenne). En revanche, le rendement d'extraction par Soxhlet de la tige, à savoir 8,8 %, est très faible à ceux des deux méthodes précédentes.

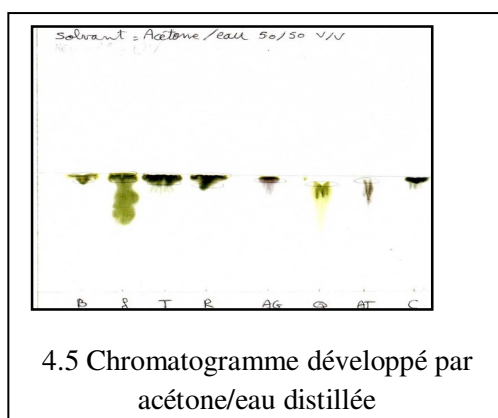
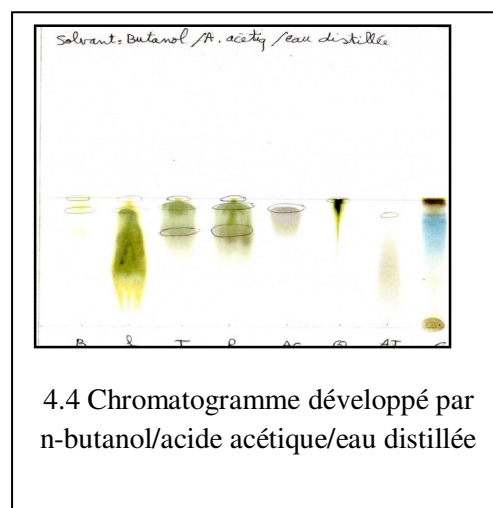
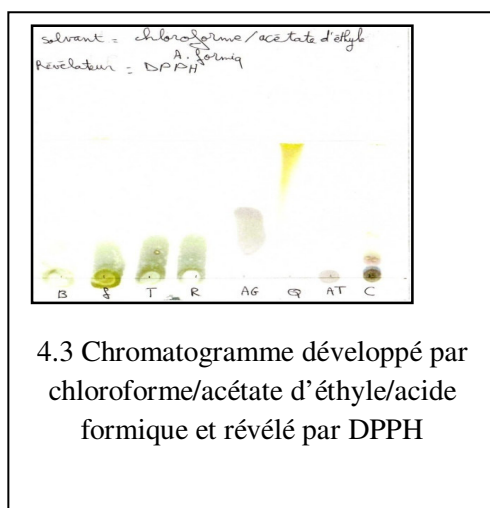
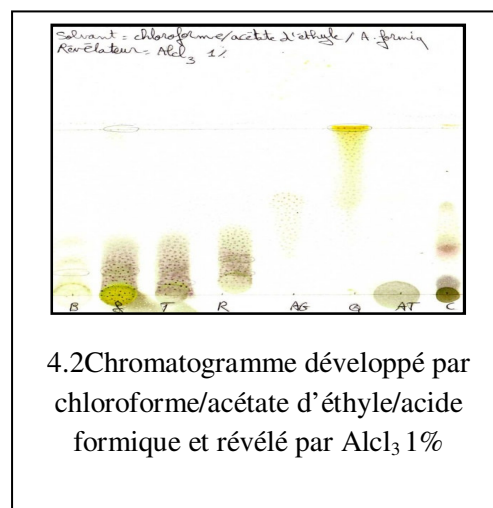
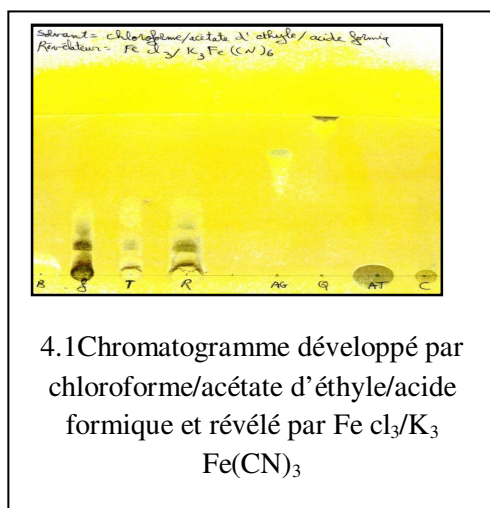
6.3.7.2 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie est aujourd'hui une méthode analytique largement utilisée pour la séparation, l'identification et éventuellement le dosage des constituants chimiques dans des mélanges complexes et purifiés (analyse qualitative et quantitative) [192]. La CCM est efficace et rapide et elle associe la sensibilité et à la simplicité [230]. Pour ce qui est de notre analyse, on se sert de la chromatographie sur couche mince (CCM) pour identifier les substances en fonction de leur façon de migrer dans les conditions données.

Pour avoir une idée sur les bons systèmes de séparation et d'isolement des polyphénols, les extraits phénoliques partiellement purifiés d'artichaut (bractées, fleurs, tige et réceptacle) ont subi une chromatographie analytique sur couche mince. Raison pour laquelle, trois systèmes d'entraînement ont été choisis : chloroforme additionné d'acétate d'éthyle et d'acide formique (50/40/10, V/V/V), n-butanol additionné d'acide acétique et d'eau distillée (4/1/5, V/V/V) et acétone additionné d'eau distillée (50/50, V/V).

Les résultats montrent que le premier et le deuxième système donnent une bonne migration et séparation des constituants des spots (dépôts) et un nombre élevé de taches bien distinctes, tandis que le système acétone/eau entraîne rapidement les spots. Cette différence de migration verticale est en relation, suivant Kolaï et *al.* [230], avec la polarité des substances, la polarité de l'éluant (phase mobile) et avec le pouvoir d'adsorption de la phase stationnaire.

Seuls quatre polyphénols standards disponibles ont été utilisés pour l'identification des constituants des extraits d'artichaut à savoir l'acide gallique qui appartient à la classe des polyphénols simples, la quercétine qui représente les flavonoïdes, l'acide tannique et le catéchol représentant, respectivement, les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Les résultats obtenus se figurent dans les chromatogrammes suivants (figure 6.14) et le tableau (Appendice E).



B : bractée, f : fleur,
T : tige, R : réceptacle.
AG : acide gallique,
Q : quercétine,
AT : acide tannique,
C : catéchol].

Figure 6.14: Chromatogrammes de différents extraits d'artichaut et standards.

Le chromatogramme révélé par une solution aqueuse de trichlorure de fer et de potassium hexacyanoferrate indique la présence de plusieurs taches de couleurs grises à brunes ce qui affirme que tous les extraits de différentes parties d'artichaut comportent des substances phénoliques.

Tous les extraits montrent la présence de l'acide gallique sous forme de taches mauves fluorescentes sous UV à 254 nm et même à 366 nm, de la quercétine en couleur jaune après révélation par une solution méthanolique à 1% d' AlCl_3 et de l'acide tannique (sauf pour l'extrait des bractées) sous forme de taches brunes claires dans le chromatogramme entraîné par le système : n-butanol/ acide acétique/ eau distillée.

La détection des terpenoïdes, des dérivés de type phénylpropane et des phénols par la vanilline sulfurique (0,5 %) est prouvée par la présence des taches de couleurs rose, rouge à brune dans tous les extraits.

L'activité antioxydante des extraits des bractées, des fleurs, de la tige et du réceptacle a été testée sur CCM avec une solution méthanolique du DPPH (2,5 mg/100 ml). Les résultats confirment que les différentes parties de la fleur d'artichaut présentent une aptitude à piéger le DPPH. Cette propriété a été évaluée par la technique de décoloration du DPPH, provoquée par les polyphénols, qui démontrent que le potentiel antioxydant de la plante est avéré.

L'observation sous UV à 254 et à 366 nm montre la présence des autres tâches fluorescentes de couleurs jaune, vert, mauve, bleu et brune ce qui nous informe sur l'existence probable des autres substances qui ne sont pas identifiées (absence des standards). Selon Christelle Chantal et *al.* [231] les spots qui ont tous acquis des teintes bleues sont des anthocyanes.

6.3.7.3 Teneur en polyphénols totaux dans les extraits bruts et purifiés

Les résultats de la teneur en polyphénols totaux, exprimés en mg/g PS, des parties de la fleur d'artichaut sont donnés par la figure 6.15.

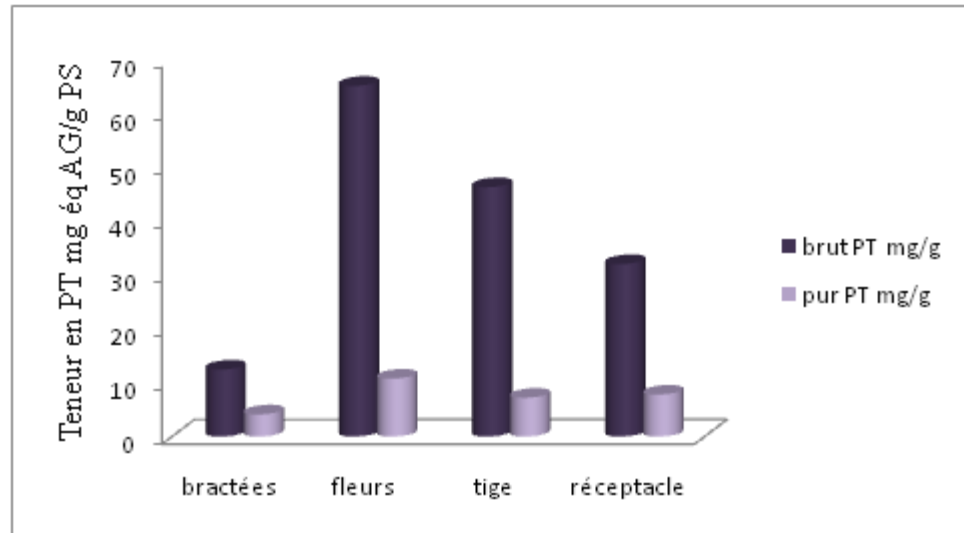


Figure 6.15 : Teneurs en polyphénols totaux des extraits de la fleur d'artichaut avant et après la purification.

Dans les extraits bruts, issus de la méthode de Soxhlet, les fleurs suivies par la tige présentent les teneurs maximales en polyphénols totaux à savoir 65,16 et 46,333 mg éq AG/g PS. Ces valeurs sont presque deux fois supérieures que celles enregistrées par décoction et macération. En concordance avec les résultats des deux premières méthodes, le réceptacle semble être plus riche en polyphénols totaux que les bractées soient 32,04 et 12,453 mg éq AG/g PS. La méthode de Soxhlet peut être, suivant Wan Nurul Bt Wan [229], utilisée pour extraire les polyphénols avec succès.

La purification des extraits par une extraction liquide-liquide baisse les teneurs en polyphénols totaux. L'analyse statistique des résultats montre qu'il y a une forte corrélation négative entre la teneur initiale des extraits en PT et le rendement de purification des extraits ($r = -0,920$), dont ceux qui renferment les teneurs les plus élevées en PT enregistrent des rendements de purification les plus faibles à savoir 16,513 et 15,583 % respectivement pour les fleurs et la tige alors que les bractées les plus pauvres génèrent le meilleur rendement de purification (33,084 %) (Tableau 6.8).

Tableau 6.8 : Rendement de purification des polyphénols de différentes parties de la fleur d'artichaut.

Parties	Bractées	fleurs	Tige	Réceptacle
Rendement (%)	33,084	16,513	15,583	24,345

La perte des PT au cours de la purification peut s'expliquer par la différence de solubilité de ces substances dans les solvants organiques utilisés.

6.3.8 Teneurs en acide ascorbique (vitamine C)

Les teneurs en vitamine C, exprimées en mg/100 g PF, de différentes parties de la fleur d'artichaut fraîche sont illustrées dans la figure 6.16.

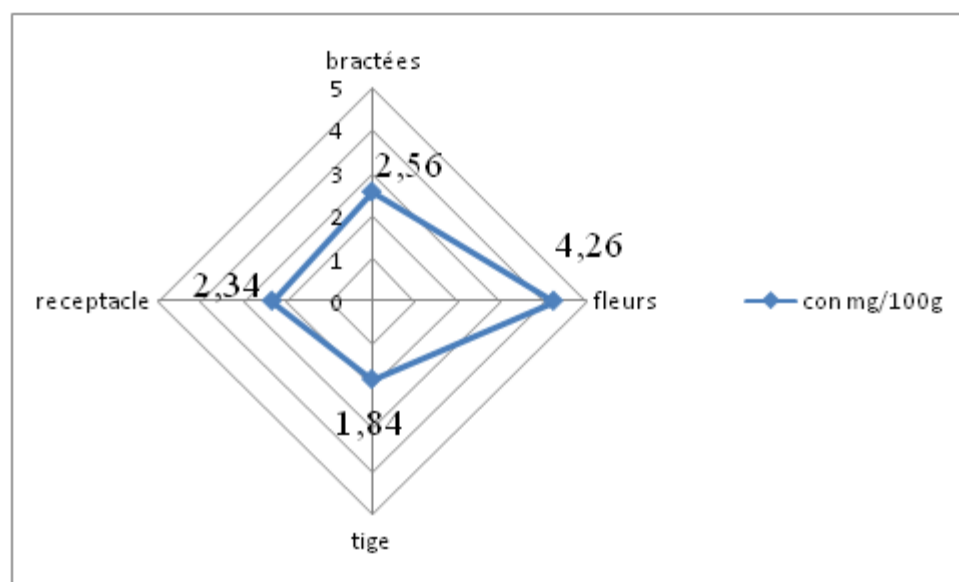


Figure 6.16 : Teneurs en acide ascorbique (vitamine C) de différentes parties de la fleur d'artichaut en mg/100 g PF.

Les résultats de la figure 6.16 révèlent que les fleurs sont la partie la plus riche en vitamine C à savoir 4,26 mg/100 g PF. Les bractées et le réceptacle enregistrent des teneurs très proches soient 2,56 et 2,34 mg/100 g PF, alors que la tige donne une valeur faible avec 1,84 mg/100 g PF. Nos résultats restent très faibles par rapport à ceux trouvés dans la littérature, dont Gil-Izquierdo et *al.* [36] ont enregistré 14,42 mg/100 g PF (bractées) et 19,35 mg/100 g PF (réceptacle) des artichauts de la variété « Blanca de Tudela » et Ihl et *al.* [232] ont trouvé 10,8 mg/100 g PF dans le réceptacle d'artichaut.

Cette faible teneur, par rapport aux résultats de la littérature, peut avoir une relation directe avec la variété différente, ainsi selon Benbrook [233], la teneur en vitamine C est en relation avec la maturité de la plante et les méthodes de culture aussi. La Vitamine C est fragile (photosensible, thermosensible et facilement oxydable), sa perte est probablement occasionnée durant le transport et la période de stockage.

6.3.9 Activité antioxydante

La méthode de DPPH[•] est généralement employée pour évaluer l'activité anti-radicalaire de n'importe quelle substance antioxydante parce que c'est une méthode rapide, fiable et reproductible pour rechercher *in vitro* l'antioxydant, généralement, des composés purs comme des extraits des végétaux [234].

6.3.9.1 Activités antioxydantes de la vitamine C et de la quercétine

Afin de mieux caractériser l'activité anti-radicalaire des extraits d'artichaut, nous avons évalué le pouvoir antioxydant de deux standards de nature vitaminique et polyphénolique, connus pour leur capacité de piéger les radicaux libres. Les résultats, exprimés en pourcentage, de l'activité inhibitrice du DPPH[•] de la vitamine C et de la quercétine sont illustrés par la figure 6.17.

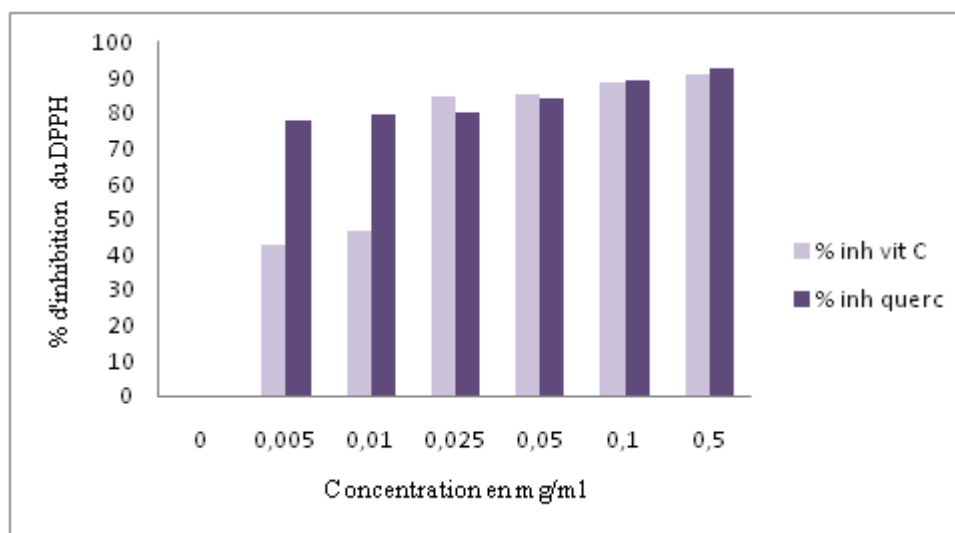


Figure 6.17 : Activités antioxydantes de la vitamine C et de la quercétine

Les résultats obtenus montrent qu'à des concentrations de 0,005 et 0,01 mg/ml, la quercétine enregistre des pourcentages d'inhibition (77,86 et 79,39 % respectivement) nettement supérieurs à ceux enregistrés par la vitamine C (42,47 et 46,56 %).

A partir de 0,025 mg/ml, les taux d'inhibition de la vitamine C et de la quercétine deviennent très proches et se situent entre 80,15 et 92,36 %.

L'analyse des résultats des deux standards indique qu'il y a une faible corrélation positive entre les concentrations de la vitamine C et la quercétine avec leur pouvoir anti-radicalaire soient des coefficients de corrélation respectifs de 0,487 et 0,371.

La moyenne des taux d'inhibition, de toutes les concentrations testées qui varient de 0,005 à 0,5 mg/ml, met en évidence que la quercétine est plus efficace en tant qu'agent antioxydant que la vitamine C à savoir 71,86 et 62,7 % respectivement. Ce résultat est témoigné par Raj Narayana et *al.* [235] qui montrent que la quercétine, grâce à son activité anti-radicalaire, a été utilisée pour stabiliser les lipides de la viande avec succès à une concentration de 200 ppm.

6.3.9.2 Activités antioxydantes des extraits d'artichaut

Le test de l'activité antioxydante de différents extraits d'artichaut a été effectué sur des extraits éthanoliques partiellement purifiés afin d'éliminer au maximum toutes interférences des autres constituants non phénoliques.

Pour mieux caractériser les activités antioxydantes de différents extraits, les extraits ont subi une dilution par l'eau distillée dont les concentrations allant de 0 à 100 % ; ces dernières sont testées et les résultats obtenus sont représentés par les courbes de la figure 6.18.

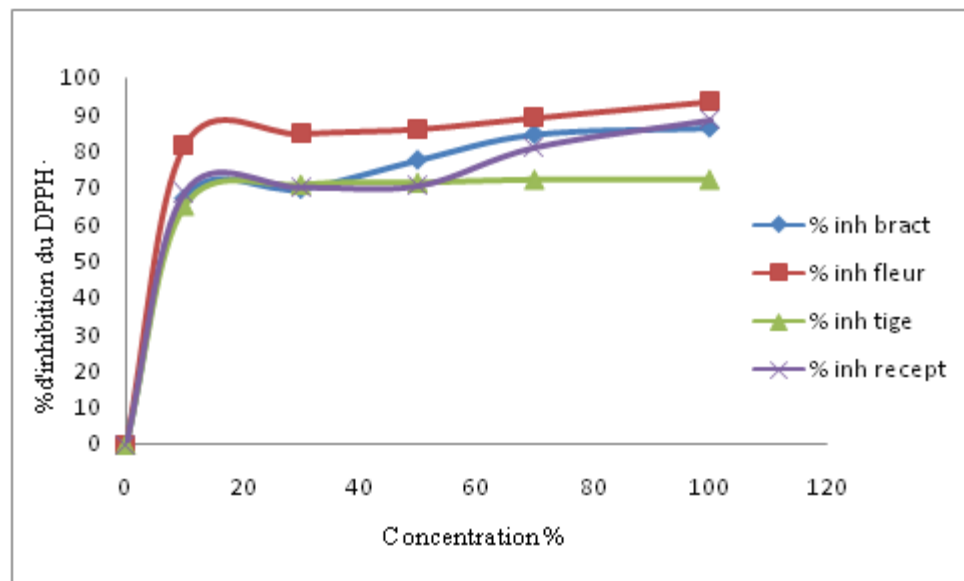


Figure 6.18 : Activités antioxydantes des extraits d'artichaut

Les courbes obtenus (figure 6.18) semblent avoir la même tendance évolutive qui traduit la capacité des polyphénols d'artichaut à piéger le radical libre DPPH[•]. Elles dévoilent que tous les extraits phénoliques de la fleur d'artichaut possèdent des bonnes activités antioxydantes, comprises entre un minimum de 64,91 % enregistré par la tige à 10 % de concentration (90 % de dilution) et un maximum de 93,42 % trouvé au niveau des fleurs sans dilution (100 % concentration).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait phénolique des fleurs, présente la meilleure activité antioxydante avec un pourcentage d'inhibition maximum de 93,42 % suivi par les extraits du réceptacle et des bractées avec des pourcentages maximums valant de 88,59 et 86,4 % respectivement. La tige enregistre le plus faible pouvoir antioxydant à savoir 71,98 %. Le pourcentage d'inhibition du DPPH[•] du réceptacle dans notre étude est nettement supérieur à celui enregistré par Lutz et *al.* [50] qui ont trouvé 69,91% pour l'extrait hydro-alcoolique. Cette différence peut être expliquée par l'état de la matière première, fraîche (pour Lutz) et sèche (pour nous), les artichauts séchés renferment plus de substances antioxydantes. Ce pourcentage reste même élevé à celui trouvé par Falleh et *al.* [102] qui donnent un pouvoir d'inhibition de 64,4 % au niveau des fleurs de *Cynara cardunculus* L. à 2 mg/ml ; par contre, ils trouvent 96,7 % dans les feuilles. Cette différence trouvée en activité antioxydante semble être en relation avec l'espèce, la partie de la plante et la concentration utilisée.

L'analyse des résultats montre qu'il ya une corrélation positive ($0,62 \leq r \leq 0,736$) entre la concentration de chaque extrait et son activité antioxydante, mais avec une différence non significative ($p > 0,05$) entre les pourcentages d'inhibition de chaque extrait. Ces résultats rejoignent ceux trouvés par Wang et *al.* [153].

Malgré la teneur de la tige en polyphénols (0,361 mg/ml) qui est plus élevée que celle des bractées (0,206 mg/ml), l'extrait de la tige présente la plus faible activité antioxydante avec une valeur atteignant 71,98 %. Statistiquement, il existe une faible corrélation ($r = 0,365$) entre le pourcentage d'inhibition du DPPH[•] et la teneur en polyphénols totaux des extraits, ce qui est confirmé par Peschel et *al.* [215] et contrarie par Lutz et *al.* [50] et Falleh et *al.* [102] qui démontrent une forte corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en PT.

Cette différence est en rapport non seulement avec la concentration en polyphénols totaux mais probablement avec leur nature chimique, ainsi que avec, d'après Peschel et *al.* [215], les interactions avec d'autres constituants de la fleur d'artichaut.

En comparant nos résultats (Figure 6.19) avec ceux des antioxydants standards (la quercétine et la vitamine C), tous les extraits semblent avoir des activités antioxydantes inférieures, sauf pour l'extrait des fleurs qui marque un pouvoir antioxydant légèrement supérieur à celui de la quercétine. L'activité antioxydante des bractées (86,4%) est légèrement inférieure à celle enregistrée par Peschel et *al.* [215] qui indiquent un taux de 88,72 %.

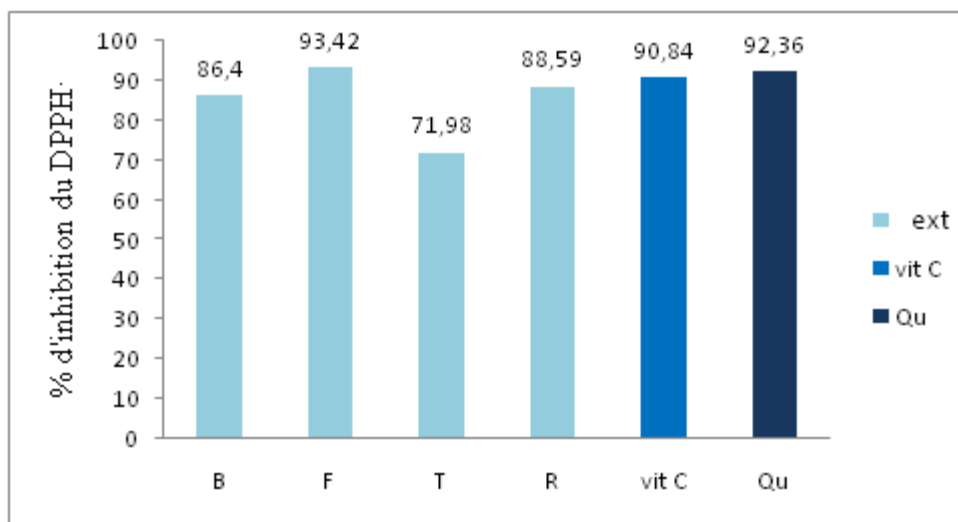


Figure 6.19 : Pouvoir antioxydant des standards et de différents extraits.

Dans leur étude sur les polyphénols du tabac, Wang et *al.* [153], ont trouvé que ces substances enregistrent des pourcentages d'inhibition du DPPH supérieurs à ceux enregistré par la vitamine C.

6.3.10 Activités antimicrobiennes

L'évaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits aqueux de différentes parties de la fleur d'artichaut a été effectuée par la méthode de diffusion sur un milieu solide. Les résultats des antibiogrammes et des antifongigrammes obtenus sont mentionnés dans l'appendice G et les tableaux suivants. Des testes de détermination de la sensibilité des souches utilisées vis-à-vis quelques antibiotique (Appendice H).

6.3.10.1 Extraits purifiés

○ Activité antibactérienne

Les diamètres moyens des zones d'inhibition des extraits purifiés, exprimés en cm, obtenus avec les souches bactériennes, *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* sont mentionnés dans le tableau 6.9.

Tableau 6.9 : Diamètres moyens des zones d'inhibition des extraits purifiés (cm) obtenus avec les souches bactériennes.

Souches \ Parties	GB	BS	ST	EC
Bractées	4,65 ± 0,49	5,15 ± 0,21	2,65 ± 0,21	1,85 ± 0,21
Fleurs	5,20 ± 0,28	5,60 ± 0,14	2,85 ± 0,21	1,60 ± 0,14
Tige	3,85 ± 0,07	5,35 ± 0,21	2,25 ± 0,21	2,05 ± 0,07
Réceptacle	1,85 ± 0,21	3,65 ± 0,07	0,0. ± 0,00	0,00 ± 0,00

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD.

Les résultats illustrés dans le tableau révèlent que les polyphénols des fleurs enregistrent les diamètres d'inhibition maximaux pour la plus part des souches bactériennes testées à savoir une moyenne de 3,81 cm suivis par ceux des bractées et de la tige (3,57 et 3,37 cm en moyenne respectivement) ; alors que le réceptacle présente le plus faible pouvoir antibactérien et n'enregistre aucun effet inhibiteur sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli*.

Les diamètres d'inhibition diffèrent significativement ($p < 0,05$) en fonction des souches. La souche *Bacillus subtilis* apparaît la plus sensibles aux extraits purifiés des différentes parties de la fleur d'artichaut avec un diamètre maximal valant de 5,6 cm suivi par *Geobacillus stearothermophilus* qui enregistre une moyenne de 3,89 cm. En revanche *Escherichia coli* suivie par *Staphylococcus aureus* présentent une résistance vis-à-vis des extraits polyphénoliques et surtout celui du réceptacle.

Plusieurs travaux ont été réalisés sur les diverses classes de polyphénols de différentes plantes montrent que ces substances ont une bonne activité antibactérienne et antifongique. Raj Narayana et *al.* [235] indiquent que les flavonoïdes et les esters des acides phénoliques sont investis pour leur effet antibactérien surtout contre les bactéries à gram positif et antifongique dont 35 flavonoïdes parmi les 182 étudiés enregistrent des activités antibactériennes contre plusieurs bactéries.

Parmi ces flavonoïdes, la quercétine présente une activité anti *staphylococcus aureus* [236] et anti *Bacillus subtilis* [237]. L'activité anti microbiennes est trouvée aussi dans plusieurs plantes notamment les feuilles de thé, du tabac, etc. Sakanaka et *al.* [238] et Silabdi [239] ont montré que les extraits polyphénoliques de thé exercent un effet bactéricide contre la *Geobacillus stéarothermophilus*, une bactérie thermophile de détérioration largement présente dans la nature et contre *Bacillus subtilis*; et Wang et *al.* [153] et Clinton [159] éclairent l'activité antibactérienne des tanins et des polyphénols totaux du tabac contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*. Moroh et *al.* [240] et Jeong et *al.* [241] ont trouvé une activité antibactérienne modérée des extraits polyphénoliques de *Morinda morindoides* et de *Diospyros kaki* sur différentes souches d'*Escherichia coli*. Il faut rappeler que l'activité d'une substance végétale dépend de plusieurs facteurs dont le mode d'extraction et la concentration en principe actif [240]

○ Activité antifongique

Pour démontrer l'activité antifongique, nous avons choisi deux souches fongiques (*Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*) qui sont nocives pour la santé de l'Homme. Suivant Hirasawa et Takada [242], *Candida albicans* fait partie de la flore microbienne autochtone de l'homme, elle se trouve dans la cavité buccale et le tube digestif, c'est un pathogène opportuniste.

Les diamètres moyens des zones d'inhibition des extraits polyphénoliques purifiés, exprimés en cm, obtenus avec les souches (tableau 6.10) montrent que les polyphénols des fleurs enregistrent toujours les meilleurs effets inhibiteurs avec des diamètres de 2,6 cm pour *A. fumigatus* et 1,95 cm pour *C. albicans*. Les extraits polyphénoliques des bractées et de la tige ont un effet inhibiteur similaire (1,775cm en moyenne pour chacun). Toute fois, le réceptacle marque le plus faible diamètre d'inhibition sur *C. albicans* (1,45 cm) et un effet nul sur *A. fumigatus*.

Les cibles des polyphénols, suivant une étude sur *Candida albicans* réalisée par Boochird et Flegel [243] sont la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique et le cytoplasme, ainsi leurs effets sur ces trois sites dépendent de la concentration utilisée.

Tableau 6.10 : Diamètres moyens des zones d'inhibition des extraits purifiés (cm) obtenus avec les souches fongiques.

Souches \ Parties	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. albicans</i>
Bractées	1,85 ± 0,71	1,70 ± 0,14
Fleurs	2,60 ± 0,14	1,95 ± 0,07
Tige	1,80 ± 0,28	1,75 ± 0,07
Réceptacle	0,00 ± 0,00	1,45 ± 0,07

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD.

En écartant l'effet de la partie de la plante, la souche n'a pas d'effet significatif sur les diamètres d'inhibition ($p > 0,05$) dont les deux souches fongiques enregistrent en moyenne des diamètres très proches à savoir 1,71 cm pour *C. albicans* et 1,56 cm pour *A. fumigatus*. C'est ce qui nous permet de dire que les deux souches ont la même sensibilité aux extraits d'artichaut. Plusieurs travaux ont montré l'activité antifongique des extraits polyphénoliques de *Morinda morindoides* sur *A. fumigatus* [240].

6.3.10.2 Fractions aqueuses des extraits purifiés

○ Activité antibactérienne

Les diamètres moyens des zones d'inhibition des fractions aqueuses des extraits purifiés, exprimés en cm, obtenus avec les souches bactériennes, *Bacillus subtilis*, *Geobacillus stearothermophilus* et *Staphylococcus aureus* sont donnés par le tableau 6.11.

Tableau 6.11 : Diamètres moyens des zones d'inhibition des fractions aqueuses (cm) obtenus avec les souches bactériennes.

Souches \ Parties	GB	BS	ST
Bractées	2,15 ± 0,21	1,75 ± 0,07	1,70 ± 0,14
Fleurs	2,55 ± 0,07	1,90 ± 0,14	2,05 ± 0,07
Tige	3,10 ± 0,14	2,05 ± 0,07	2,45 ± 0,77
Réceptacle	3,65 ± 0,21	2,25 ± 0,07	3,00 ± 0,14

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD.

Cette analyse nous permet de constater que contrairement aux résultats des extraits purifiés, la fraction aqueuse du réceptacle suivie par celle de la tige ont les plus grands effets inhibiteurs des souches bactériennes à savoir des diamètres d'inhibition moyens de 2,97 et 2,53 cm respectivement, alors que les fleurs et les bractées enregistrent moins d'effet inhibiteur avec en moyenne 2,17 et 1,87 cm en ordre. Les pertes des substances antibactériennes polyphénoliques dans la fraction aqueuse dans le processus de purification des extraits d'artichaut peuvent expliquer cette différence.

La totalité des souches sont sensibles à l'effet antibactérien des fractions aqueuses de différentes parties de la fleur d'artichaut. Cette fois-ci, *Geobacillus stearothermophilus* et *Staphylococcus aureus* sont apparues plus sensibles aux fractions aqueuses (2,86 et 2,3 cm en moyenne respectivement) que *Bacillus subtilis* (1,98 cm en moyenne). Dans leur étude sur l'effet antibactérien des feuilles de *Cynara cardunculus* L., Falleh et al. [102] constatent aussi un plus grand effet inhibiteur sur *Staphylococcus aureus* soit 2,57 cm de Ø. Ils ont enregistré aussi un meilleur effet antibactérien contre les Gram⁺ que contre les Gram⁻. En revanche, Kukic et al. [103] enregistrent un meilleur effet antibactérien des bractées de *Cynara cardunculus* L. sur *Bacillus subtilis* que sur *Staphylococcus aureus*.

○ Activité antifongique

Les diamètres moyens des zones d'inhibition des fractions aqueuses, exprimés en cm, obtenus avec les souches fongiques : *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* sont représentés dans le tableau 6.12.

Tableau 6.12 : Diamètres moyens des zones d'inhibition des fractions aqueuses (cm) obtenus avec les souches fongiques.

Souches \ Parties	<i>A. fumigatus</i>	<i>C. albicans</i>
Bractées	1,45 ± 0,71	0,00 ± 0,00
Fleurs	1,55 ± 0,14	0,00 ± 0,00
Tige	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Réceptacle	1,50 ± 0,14	0,00 ± 0,00

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD.

Les polyphénols des fractions aqueuses de la fleur d'artichaut montrent une efficacité avec une seule souche fongique, *A. fumigatus*, en enregistrant un maximum (1,55 cm) par les fleurs et un minimum (1,45 cm Ø) par les bractées ; cependant la tige n'a aucun effet sur *A. fumigatus*. Par contre, la souche *C. albicans* est résistante à toutes les fractions aqueuses de la fleur d'artichaut.

CONCLUSION

L'artichaut ainsi que d'autres plantes telles que le thé, le cardon, les raisins, etc. représentent une source inépuisable de substances et des composés bioactifs. Ces biomolécules peuvent être exploitées en industrie agroalimentaire, en cosmétologie et en phytothérapie.

D'un point de vue applicatif, les travaux de ce mémoire se sont articulés autour de deux axes d'investigation :

- La valorisation des protéases des fleurs d'artichaut *Cynara scolymus* L. en fromagerie. Ces fleurs sont déjà utilisées depuis de nombreuses années pour la fabrication des fromages traditionnels. Cette étude se focalise sur l'extraction, la purification et la caractérisation des protéases vis-à-vis de quelques paramètres physicochimiques.
- La valorisation des polyphénols des sous produits de la fleur d'artichaut. Depuis les antiquités, seulement le réceptacle a été consommé comme légume et les feuilles ont été utilisés en médecine traditionnelle pour leurs vertus thérapeutiques attribués aux polyphénols. C'est pourquoi, notre étude a consisté à étudier les polyphénols constitutifs de différentes parties de la fleur d'artichaut, à les doser, à les identifier et à évaluer leurs activités antioxydante et antimicrobienne.

La fleur d'artichaut comporte une part non négligeable de protéines, certaines d'entre elles (cynarases) sont capables de coaguler le lait. La caractérisation de l'extrait purifié d'artichaut indique que ces protéases sont actives à des températures élevées enregistrant ainsi une force coagulante optimale à 70 °C où la présure commerciale est inactive. Comme toutes les protéases aspartiques les cynarases d'artichaut et la présure sont actives à un pH optimal de 5,2 ; les forces coagulantes optimales de ces deux protéases sont largement différentes, valant de 16,472 (à 24min et 17 S) et 4800 (à 5 S) pour les cynarases et la présure respectivement.

L'accroissement de la concentration du CaCl_2 améliore l'activité coagulante des protéases d'artichaut et de la présure. Dans toutes les conditions du travail l'activité coagulante de la présure est nettement supérieure à celle de l'extrait purifié d'artichaut.

En ce qui concerne l'extraction des polyphénols des bractées, des fleurs, de la tige et du réceptacle d'artichaut, différents modes et types de solvants d'extraction sont étudiés pour choisir le meilleur système d'extraction de ces substances. Les résultats des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes montrent que la macération par l'éthanol et par l'acétone sont les meilleurs systèmes d'extraction de ces molécules. En revanche, la décoction aqueuse semble être meilleure pour extraire les tanins. Quelque soit le mode d'extraction et le solvant utilisé, les fleurs représentent la partie la plus riche en polyphénols.

Pour chaque partie de la fleur, modes d'extraction et solvants, les composés phénoliques se comportent différemment. La solubilité des polyphénols dépend de leur polymérisation, de la polarité et du pH du solvant utilisé, ainsi que de la température qui favorise l'extraction de certains composés phénoliques et conduit à la détérioration des autres.

Qualitativement les analyses effectuées, par la chromatographie sur couche mince sur gel de silice, suivant les différents systèmes d'élution ont montré la présence de multitudes composées polyphénoliques tels que les acides phénols, les flavonoïdes et les flavanols qui sont dotées de propriétés anti-radicalaires.

Par ailleurs, nous avons montré que les extraits éthanoliques partiellement purifiés de différentes parties de la fleur d'artichaut présentent des activités antioxydantes vis-à-vis du radical libre du DPPH[•]. Ces activités sont comparables sinon supérieures à celles de la vitamine C et de la quercétine, utilisées comme standards. L'activité anti-radicalaire est dépendante du contenu en polyphénols totaux des extraits des bractées, des fleurs et du réceptacle ; ainsi une forte corrélation positive a été établie ($r = 0,962$) entre la teneur en PT des bractées, des fleurs et du réceptacle, et les taux d'inhibition du DPPH[•] ; Autrement dit, les extraits les plus riches en polyphénols totaux sont les plus actifs.

La faible capacité inhibitrice du radical DPPH[•] par l'extrait de la tige, qui comporte plus de polyphénols que l'extrait des bractées, peut être attribuée à la nature chimique de ces substances. Donc l'intensité de l'activité antioxydante ne dépend pas uniquement de la teneur globale en polyphénols totaux (PT) mais également de leur nature. De ces résultats, on peut conclure que les sous produits de la fleur d'artichaut possèdent un réel potentiel anti-radicalaire susceptible d'être exploité à plusieurs échelles.

L'évaluation de l'activité antibactérienne, des extraits aqueux partiellement purifiés et des fractions aqueuses de différentes parties de la fleur d'artichaut, nous permet de constater que les polyphénols d'artichaut ont des effets antibactériens intéressants, où nous avons enregistré les meilleurs effets inhibiteurs avec les extraits partiellement purifiés des fleurs, des bractées et de la tige. Par ailleurs, les fractions aqueuses inscrivent un faible effet inhibiteur sur les souches testées (bactériennes et fongiques) et ceci nous pouvons l'expliquer par la faible teneur en polyphénols de ces fractions aqueuses.

L'extrait polyphénolique des fleurs partiellement purifié donne le plus grand pouvoir inhibiteur des souches dont *Bacillus subtilis* est la plus sensible aux polyphénols d'artichaut alors qu'*Escherichie coli* est la plus résistante. Par contre, au niveau des fractions aqueuses, le réceptacle enregistre la plus grande activité antibactérienne dont la *Geobacillus stearothermophilus* est la plus sensible aux polyphénols d'artichaut.

Les extraits partiellement purifiés de la fleur d'artichaut se sont révélés actifs vis-à-vis des deux souches fongiques testées (*Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus*) où les fleurs enregistrent le meilleur effet antifongique. Cependant, la fraction aqueuse de la tige n'enregistre aucun effet antifongique alors que les autres fractions aqueuses sont actives seulement contre l'*Aspergillus fumigatus*.

L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* ne constituent qu'une contribution à la recherche des substances de source naturelle à intérêt technologique et munies de propriétés biologiques. Ces résultats permettent une meilleure connaissance de l'activité coagulante des protéases d'artichaut et des pouvoirs antioxydants et antimicrobiens des polyphénols de la partie comestible et des sous produit de la fleur d'artichaut.

Des essais complémentaires approfondies seront nécessaires et devront confirmer les performances mises en évidence. Il serait donc intéressant de mener des études détaillées sur les fractions des extraits démontrant des activités coagulante, antioxydante et antimicrobienne *in vitro*, en vue d'identifier et purifier l'espèce chimique ou les composés responsables de cette activité ainsi que leurs modes d'action. Il serait aussi intéressant de confirmer les résultats de ces études par d'autres études *in vivo*.

LISTE DES ABREVIATIONS

AC : Acide caféique
AG : Acide gallique
AT : Acide tannique
BS : *Bacillus subtilis*
cat : Catéchol
CCM : Chromatographie sur couche mince
CMP : Caséinomacropéptide
Con : Concentration
Da : Dalton
DPPH : 1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl
EC : *Escherichia coli*
éq : Equivalent
ext : Extraits
F : Force coagulante
GB : *Geobacillus stearotherm*
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HPLC : Chromatographie liquide à haute performance
inh : Inhibition
MPCA : Méthodes physico-chimiques d'analyse
MS : Matière sèche
O₂⁻ : Anion superoxyde
PF : Poids frais
PM : Poids moléculaire
PPO : Polyphénols oxydases
PS : Poids sec
PT : Polyphénols totaux
Qu : Quercétine
RF : Rapport frontal
SD : Standard deviation
SOD : Superoxyde dismutase
ST: *Staphylococcus aureus*
t : temps
T : Taux
UP : Unité présure
vit : vitamine

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Dubeuf J-P., L'utilisation de la présure végétale en transformation fromagère, Action de recherches, développement sur *Cynara cardunculus* en transformation fermière, (1999).
- [2] Goursaud J. et Cuvellier G-F., Réacteur enzymatiques à enzyme libre, In : Rene S. Biotechnologie, 5^{ème} édition, Ed. Lavoisier, Paris, (1999), 885p.
- [3] Cuvellier G-F., Production des enzymes, In: Rene S. Biotechnologie, 5^{ème} édition, Ed. Lavoisier, Paris, (1999), 1042p.
- [4] Abi Azar R., Complexassions des protéines laitières par les extraits de gousses vertes de caroubier ; Propriétés technologiques des coagulums obtenus, Thèse de doctorat d'Agro Paris Tech., Ecole doctorale ABIES, France, (2007). 196p.
- [5] Dossou J. et Hounzangbe A., Production et transformation du lait frais en fromage Peulh en Benin, Université d'Abomey-calvi, Faculté de la science agronomique, Groupe de recherche et d'échanges technologiques (GRET), (2006), 16p.
- [6] Travarria F. K., Sousa M. J. and Malcata F. X., Storage and lyophilization effects of extracts of *Cynara cardunculus* L. on the degradation of ovine and caprine caseins, Food Chemistry, V. 72, (2001).79-88.
- [7] Sidrach L., Garcia-Canovas Tudela J. and Rodriguez-Lopez, Purification of cynarases from artichoke (*Cynara Scolymus* L.): Enzymatic properties of cynarase A. Phytochemistry, V. 66, Issue 1, (2005), 41-49.
- [8] Chazarra S., Sidrach L., Lopez-Molina D. et Rodriguez-Lopez J. N., Characterization of the milk - clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus* L.) flowers, International Dairy Journal, V. 17, issue 12, (2007), 1393-1400.
- [9] Fratianni F., Tucci M., De Palma M., Pepe R. and Nazzaro F, Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara*

- cardunculus* L. var. *scolymus* L. Fiori), Food and chemistry, V. 104, (2007), 1282–1286.
- [10] Mulinacci N., Prucher D., Peruzzi M., Romani A., Pinelli P., Giaccherini C. and Vincieri F.F, Commercial and laboratory extracts from artichoke leaves: estimation of caffeoyl esters and flavonoidic compounds content, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, V. 34, (2004), 349–357.
- [11] Bourgeois C., Les vitamines dans les industries agroalimentaires, Ed. Lavoisier, (2003), 708p.
- [12] Lattanzio V., Kroon P., Linsalata V. and Cardinali A, Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients, Journal of functional foods, V. 1, (2009), 131-144.
- [13] Dridi B., Un système intégré de micropropagation de l’artichaut (*Cynara scolymus* L.). Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques et Biologiques Appliquées : Biotechnologie cellulaire et génétique, Université GENT, France, (2003), 175p.
- [14] Lippert W. et Podleche D., Gros plan sur les plantes de méditerranée, Ed : Nathan, Paris, (2008), 254p.
- [15] Mazoyer M., Larousse agricole ; le monde agricole au XXI^{ème} siècle, 2^{ème} édition, Ed. Larousse NUEF, France, (2002), 767p.
- [16] Peron J-Y, Production légumière, 2^{ème} édition, Ed. Lavoisier, France, (2006), 613p.
- [17] Romani A., Pinelli P., Cantini C., Cimato A. and Heimler D., Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.), Food Chemistry, V. 95, (2006), 221–225.
- [18] Depoers P., Ledoux F. et Meurin P., De la lumière à la guérison : la phytothérapie entre science et tradition, Ed. Amyris, Belgique, (2008), 509p.
- [19] Skiredj A., Elattir H., Walali L.D. et Elfadl A, Fiches techniques VII. L’artichaut, le cardon, le maïs doux, l’asperge, le poireau, Bulletin mensuel d’information et de liaison du PNTTA, Maroc, (2003), 4p.

- [20] Chaux Cl. et Foury Cl., Production légumières légumes, feuilles, tiges, fleurs, racine et bulles, Tom 2, Ed. Lavoisier, France, (1994), 548p.
- [21] Bedard A., Coulombe J. et Corneau L., L'artichaut, Institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels (INAF), université Laval, Canada, (2006).
- [22] Favier J-C., Ireland-Ripert J., Toque C. et Feinberg M., Répertoire générale des aliments, table de composition, Ed. Lavoisier, France, (1995).
- [23] Bouchet R. et Bouchet C., Dictionnaire thérapeutique des plantes, Ed. Trajectoir E., (2009), 191p.
- [24] Arnal-Schnebelen B., Goetz P. et Paris M., Phytothérapie : la santé par les plantes. Ed. VIDAL, Canada, (2007) 447p.
- [25] López-Molina D., Dolores Navarro-Martinez M., Melgarejo F.R., Hiner A., Chazarra S. and Rodriguez-Lopez J., Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.), *Phytochemistry*, V 66, (2005), 1476–1484.
- [26] Bruneton J, Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales, 4^{ème} édition, Ed. Lavoisier, Paris, (2009), 1269p.
- [27] Coinu R., Carta S., Urgeghe P. P., Mulinacci N., Pinelli P., Franconi F. and Romani A., Dose-effect study on the antioxidant properties of leaves and outer bracts of extracts obtained from Violetto di Toscana artichoke, *Food Chemistry*, V. 101, (2007), 524–531.
- [28] Wichtl M. et Anton R., Plantes thérapeutiques : tradition, pratique officinale, science et thérapeutique, 2^{ème} édition, Ed. Lavoisier, (2003), 662p.
- [29] Bruneton J., 1999. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. 2nd edition. Ed : Lavoisier. 1119p.
- [30] Sa´nchez-Rabaneda F., Ja´uregui O., Lamuela-Ravento´s R-M., Bastida J., Viladomat F. and Codina C., Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography*, (2003), 57–72.

- [31] Renard C., Baron A., Guyot S. and Drilleau J-F., Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: quantification and some consequences, *International Journal of Biological Macromolecules*, V. 29, (2001), 115–125.
- [32] Goni I., Jimenez-Escrig A., Gudiela M. and Saura-Calixto F., Artichoke (*Cynara scolymus* L.) modifies bacterial enzymatic activities and antioxidant status in rat cecum, *Nutrition Research*, V. 25, (2005), 607–615.
- [33] Meneses M., Megías M.D., Madrid M.J., Martínez-Teruel A. and Hernández F., Ensiling capacity, chemical composition and multiresidue evaluation of fresh artichoke (*Cynara scolymus* L.) by-product to be used in ruminant feeding, *Options Méditerranéennes, Series A*, N°. 67, (2002), 351-354.
- [34] Megias Rivas M.D., Martinez Teruel A., Gallego Barrera J.A. and Sanchez Rodriguez M., Silage of by-products of artichoke: evolution and modification of the quality of fermentation, *Options Méditerranéennes, Série Séminaires*, N°. 16, (1991), 141-143.
- [35] Girre L., *Les plantes et les médicaments, l'origine végétale nos médicaments*, Ed. Delachaux et Nestlé, Paris, (2006), 253p.
- [36] Gil-Izquierdo A., Gil M. I., Conesa M. A. and Ferreres F., The effect of storage temperatures on vitamin C and phenolics content of artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, V. 2, (2001), 199-202.
- [37] Nogaret-Ehrhart A. S., *La phytothérapie : se soigner par les plantes*, Ed. Eyrolles, France, (2006), 183p.
- [38] Calvier V. et Farvacques J., *Herbier médicinal*, Ed. Aubanel, Suisse, (2005), 203p.
- [39] Nogaret-Ehrhart A. S., *La phytothérapie ; se soigner par les plantes*, Ed. Eyrolles, France, (2003), 191p.
- [40] Raynaud J., *Prescription et conseil en phytothérapie*, Ed. Lavoisier, (2005), 215p.

- [41] Wittemer S.M., Ploch M., Windeck T., Muller S.C., Drewelow B., Derendorf H. and Veit M., Bioavailability and pharmacokinetics of caffeoylquinic acids and flavonoids after oral administration of Artichoke leaf extracts in humans, *Phytomedicine*, V. 12, (2005), 28–38.
- [42] Zapolska-Downar D., Zapolski-Downar A., Naruszewicz M., Siennicka A., Krasnodebska B. and Kolcodziej B., Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes, *Life Sciences*, V. 71, (2002), 2897–2908.
- [43] Roseiro L.B., Viala D., Besle J.M., Carnat A., Fraisse D., Chezal J.M. and Lamaison J.L., Preliminary observations of flavonoid glycosides from the vegetable coagulant *Cynara* L. in protected designation of origin cheeses, *International Dairy Journal*, V. 15, (2005), 579-584.
- [44] Li H., Xia N., Brausch I., Yao Y. and Forstermann U., Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) up-regulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells, *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, V. 310, N° 3, (2004), 926–932.
- [45] Bundy R., Walker A. F., Middleton R. W., Wallis C. and Simpson H., Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus* L.) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: A randomized, double blind placebo controlled trial, *Phytomedicine*, V. 15, (2008), 668–675.
- [46] Beloued A., *Plantes médicinales d'Algérie*, Ed. Office des publications universitaires, Algérie, (2001), 277p.
- [47] Ali-Delille, *Les plantes médicinales en Algérie*, Ed. BERTI, Alger, (2010), 289p.
- [48] Albouy V., *Le jardin médicinal*, Ed. EDISUD, Paris, (2008), 95p.
- [49] Elattir H., Skiredj A., Ait-Ben Oussaiden R. et Chtaina N., Comparaison de cultivars d'artichaut multiplies par semis et plantés sous quatre densités dans la région du gharb au Maroc, *Culture, itinéraires techniques et productivité*, (2004), 224-234.

- [50] Lutz M., Henriquez C., Escobar M., Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked, *Journal of Food Composition and Analysis*, V. 24, (2011), 49–54.
- [51] Brule G., Lenoir J. et Reneuf F., La micelle de caséine et la coagulation du lait, In : Andre E., *Le fromage*, 3^{ème} édition, 3^{ème} tirage, Ed. Lavoisier, (2006) 874 p.
- [52] Riahi M. H., Modélisation de phénomènes microbiologiques, biochimiques et physico-chimiques intervenant lors de l'affinage d'un fromage de type pâte molle croûte lavée, Thèse de doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon, Discipline : Sciences des Aliments, France, (2006), 188p.
- [53] Fauconneau J., Aspects technologiques du lait de bovins, Conservation et Transformation, *Options Méditerranéennes, Série Séminaires*, N^o.6, (1989), 181-189.
- [54] Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P. et Brule G., Les produits laitiers, 2^{ème} édition, Ed. Lavoisier, (2008), 181p.
- [55] Pougheon S. et Goursaud J., Lait, caractéristiques physico-chimiques, In : Debry G., *Lait, nutrition et santé*, Ed. Lavoisier, (2001), 566p.
- [56] Banon S. et Hardy J., L'eau dans les produits laitiers, In : Le Maste M., Lorient D. et Simatos D., *l'eau dans les aliments*, Ed. Lavoisier, (2002), 674p.
- [57] Mietton B., Graucheron F. et Salaiin-M F., Minéraux et transformation Fromagères, In : Gaucheron F., *Minéraux et produits laitiers*, Ed. Lavoisier, (2004), 922 p.
- [58] Vierling E., *Aliments et boissons : filières et produits*, Ed. doin, (2003), 271p.
- [59] Larcher I., *La fabrication fromagère fermière*, Ed. Centre Fromager de Carmejjane, (2002), 47p.
- [60] Desmazeaud M., Les enzymes utilisées en industrie laitière, In Luquet F. M., *Lait et produits laitiers vaches, Brebis, chèvre*, V. 2, Ed. Lavoisier, (1990), 637p.
- [61] Jouan P., *Lactoprotéines et lactopeptides; propriétés biologiques*, Ed. INRA., (2002), 127 p.

- [62] Leonil J., Bos C., Maubois J et Tome D., Protéines, In : Debry G., lait, nutrition et santé, Ed. Lavoisier, (2001), 566p.
- [63] Croguennec T., Jeantet R. et Brule G., Fondements physicochimiques de la technologie laitière, Ed. Lavoisier, (2008), 161p.
- [64] Famelart M-H., Environnement minéral et propriété de gélification des caséines, In : Gaucheron F., Minéraux et produits laitiers, Ed. Lavoisier, (2004), 922 p.
- [65] St-Gelais D. et Tirard C. P., Le fromage, In : Vignola C., Science et technologie du lait : transformation du lait, Ed. Presse Internationale Polytechnique Québec, Canada, (2002), 600 p.
- [66] Everett D. and Auty M., Cheese structure and current methods of analysis, International Dairy Journal, V. 18, (2008), 759–773.
- [67] Ramet J-P., L'égouttage de coagulum, In: Eck A. et Gillis J-C., Le fromage, 3^{ème} édition, 3^{ème} tirage, Ed. Lavoisier, (2006), 891p.
- [68] Cayot P.H. et Lorient D., Structures et technofonctions des protéines du lait, Ed. Lavoisier, Paris, (1998), 363p.
- [69] Lenoir J., Remeuf F. et Schneid N., L'aptitude du lait à la coagulation par la présure, In: Eck A. et Gillis J-C., Le fromage, 3^{ème} édition, Ed. Lavoisier, (2006), 891p.
- [70] Wangoh J., Farah Z. and Puhan Z., Extraction of camel rennet and its comparison with calf rennet extract, Milchwissenschaft-Milk Science International, V. 48, (1993), 322-325.
- [71] Siboukeur O., MATI A. et HESSAS B., Amélioration de l'aptitude à la coagulation du lait cameline (*Camelus dromedarius*) : utilisation d'extraits enzymatiques coagulants gastriques de dromadaires, Cahiers Agricultures, V. 14, (2005), 473-478.
- [72] Meyer C. et Duteurtre G., Equivalents lait et rendements en produits laitiers : modes de calculs et utilisation, Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop., V. 51, (1998), 247-257.

- [73] Alais C., Science du lait, principes des techniques laitières, Ed. SEPAIC, Paris, (1984), 814p.
- [74] Pougheon S., Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière, Thèse de doctorat, Vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse, (2001), 102p.
- [75] Ménard O., Camier B. and Guyomarc H F., Effect of heat treatment at alkaline pH on the rennet coagulation properties of skim milk, INRA, EDP Sciences, V. 85, (2005), 515–526.
- [76] Reneuf F., Cossin V., Dervin C. et Lenoir J., Relation entre les caractéristiques physico-chimiques des laits et leur aptitude fromagère, INRA., (1991).
- [77] Sbdio O.A., Tercero E.J., Coutaz R. and Revelli G.R., Effect of rennet and sodium chloride concentration on milk coagulation proprieties, CIENCIA Y TECHNOLOGIA ALIMENTARIA, V. 5, (2006),182-188.
- [78] Joo H-S., Park G-C., Kim K., Paik S. R. and Chang C-S., Simple methods for alkaline protease purification from the polychaeta, *Periserrula leucophryna*, Process Biochemistry, V. 37, (2001), 299–303.
- [79] Merheb-Dini C., Gomes E., Boscolo M. and Silva R., Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31), Food Chemistry, V. 120, (2010), 87–93.
- [80] Germonville A., Agents coagulants, Techniques de l'Ingénieur, traité Agroalimentaire, F 4 700, (2010), 1-11.
- [81] Giacomo F., Del Signore A. and Giaccio M., Farindola sheep cheese, Commodity Sci. Technol. Quality, V. 48, (2009), 177-197.
- [82] Choisy C. Desmazeaud M. Gripon J.C. Lambert G et Lenoir J., La biochimie de l'affinage, In: Eck A. et Gillis J-C., Le fromage, 3^{ème} édition, Ed. Lavoisier, (2006), 891p.

- [83] Pereira C I., Gomes E O., Gomes A. M.P. and Malcata F. X., Proteolysis in model Portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture, *Food Chemistry*, V. 108, Issue 3, (2008), 862-868.
- [84] Hesari J., Ehsani M., Khosroshahi A. and Mcsweeney P., Contribution of rennet and starter to proteolysis in Iranian UF white cheese, *INRA, EDP Sciences*, V. 86, (2006), 291–302.
- [85] Mahaut M., Jeantet R. et Brule G., *Initiation à la technologie fromagère*, Ed. Lavoisier, (2000), 194p.
- [86] Cakmakci S. and Boroúglu E., Some Quality Characteristics of Commercial Liquid Rennet Samples, *Turk. J. Vet. Anim. Sci. T. BÜTAK*, V. 28, (2002), 501-505.
- [87] Linden G., *Transformation des produits alimentaires par les enzymes*, Techniques de l'Ingénieur, traité Génie des procédés, F 3 700, (2010), 1-13.
- [88] Libouga D.G., Étude comparative des coagulations du lait par actions de l'extrait des écorces de l'*Ongokea gore* et des enzymes coagulants bien connus. *Tropicultura*, V. 26, (2008), 43-47.
- [89] Guerard F., Une utilisation des enzymes protéolytiques extraites des viscères de poissons : la coagulation du lait. *Reo. Trou. Inst. Peches Maril.*, V. 49, (1987), 199-203.
- [90] Etayo I., Pérez Elortondo F., Gil P., Albisu M., Virto M., Conde S., Rodriguez Barron L., Nájera A., Gómez-Hidalgo M., Delgado C. and Guerra A., Hygienic quality, lipolysis and sensory properties of Spanish Protected Designation of Origin ewe's milk cheeses manufactured with lamb rennet paste, *INRA, EDP Sciences*, V. 86, (2006) 415–434.
- [91] Boughellout H. et Zidoune M.N., Etude de la Coagulation de Lait par la Pepsine de poulet, 2nd international conference of nutrition, ATSN et ESSTST, Tunisia, (2008), 5p. [92] Seker S., Beyenal H. and Tanyolaç A., Milk clotting activity in the continuous production of microbial rennet from *Mucor miehei*, *Journal of food science*, V. 64, (1999), 525-529.

- [93] Abreu Da Silva A., Clonage et expression des prochymosines bovines A, B et B S79N chez *Escherichia coli* et *Pichia pastoris*. Etude de la mutation S79N, Thèse de doctorat de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, Discipline : Biochimie, (2004), 193p.
- [94] Desmazeaud M., Pourquoi des microorganismes transgéniques dans les aliments. INRA, (1997).
- [95] Baba-Moussa F., Baba-Moussa L., Ahissou H., Bokossa I., Capo-Chichi B., Toukourou F. et Sanni A., Propriétés coagulantes de *calotropis procera* et ses possibilités d'utilisation en industrie agro alimentaire, Rev. Cames, Série A, V. 5, (2007), 7-12.
- [96] Bivar Roseiro L., Barbosa M., Ames J. and Wilbey R., Cheesemaking with vegetable coagulants the use of *Cynara L.* for the production of ovine milk cheeses, International Journal of Dairy Technology, V. 56, N^o. 2, (2003), 76-85.
- [97] Cavalli S., Silva S., Cimino C., Malcata F. X. and Priolo N., Hydrolysis of caprine and ovine milk proteins, brought about by aspartic peptidases from *Silybum marianum* flowers, Food Chemistry, V. 106, Issue 3, (2008), 997-1003.
- [98] Reis P., Lourenço P., Domingos A., Clemente A., Pais S. and Malcata X., Applicability of extracts from *Centaurea calcitrapa* in ripening of bovine cheese, International Dairy Journal, V. 10, (2000), 775-780.
- [99] Pino A., Prados F., Galán E., Mcsweeney P. and Fernández-Salguero J., Proteolysis during the ripening of goats' milk cheese made with plant coagulant or calf rennet, Food Research International, V. 10, (2009), 1-7.
- [100] Rubino R., Morand-Fehr P. and Sepe L., Atlas of goat products a wide international inventory of whatever things the goat can give us, Ed. la biblioteca diCaseus, Italy, (2004), 381p.
- [101] Fernandez J., Curt M. and Aguado P., Industrial applications of *Cynara cardunculus L.* for energy and other uses, Industrial Crops and Products, V. 24, (2006), 222–229.

- [102] Falleh H., Ksouri R., Chaieb K., Karray-Bouraoui N., Trabelsi N., Boulaaba M. and Abdelly C., Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities, *Comptes Rendus Biologies*, V. 331, (2008), 372–379.
- [103] Kukic J., Popovic V., Petrovic S., Mucaji P., C' Iric A., Stojkovic D. and Sokovic M., Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts, *Food Chemistry*, V. 107, (2008), 861–868.
- [104] Ben Amor B., Maitrise de l'aptitude technologique de la matière végétale dans les opérations d'extraction de principes actifs ; texturation par détente instantanée contrôlée DIC., Thèse de doctorat, Université de la Rochelle, Génie des Procédés Industriels, (2008), 187p.
- [105] Macheix J-J., Fleuriet A. et Sarni-Manchado P., Composés phénoliques dans la plante – structure, biosynthèse, répartition et rôles, In : Sarni-Manchado P. et Cheynier V., les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier, (2006), 398p.
- [106] Garcia-Ruiz A., Bartolome B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E. and Martin-Alvarez P.J., Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine, *Food Control*, V. 19, (2008), 835–841.
- [107] Laurent C. et Oostveldt K. V., Impact des polyphénols de raisin sur des marqueurs physiologiques et biochimiques du vieillissement intestinal, Ed. howest, (2008), 78p.
- [108] O'connell J.E. and Fox P.F., Proposed mechanism for the effect of polyphenols on the heat stability of milk, *International Dairy Journal*, V. 9, (1999), 523-536.
- [109] Scalbert A., Morand C., Manach C. and Rémésy C., Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, V. 56, (2002), 276–282.

- [110] Katalinic V., Mozina S., Skroza D., Generalic I., Abramovic H., Milos M., Ljubenkovic I., Piskernik S., Pezo I., Terpinc P. and Boban M., Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia), *Food Chemistry*, V. 119, (2010), 715–723.
- [111] Bruneton, J., *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 3^{ème} édition, Ed. Lavoisier, Paris, (1999), 1269p.
- [112] Alberto M. R., Rinsdahl Canavosio M. A. and Manca De Nadra M. C., Antimicrobial effect of polyphenols from apple skins on human bacterial pathogens, *Journal of Biotechnology*, V. 9, N°. 3, Special Issue, (2006), 205-209.
- [113] Beta T., Nam S., Dexter J. E. et Sapirstein H. D., Phenolic content and antioxidant activity of pearled wheat and roller-milled fractions, *Cereal Chem.*, V. 82, N°. 4, (2005), 390-393.
- [114] Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C. and Jimenez L., Polyphenols: food sources and bioavailability, *The American journal of clinical nutrition*, V. 79, (2004), 727– 747.
- [115] Portet B., Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d'une plante guyanaise *Piper hostmannianum* var. *berbicense*, Thèse de doctorat, Chimie – Biologie – Santé, Université Paul Sabatier Toulouse, (2007), 270p.
- [116] Havsteen B. H., The biochemistry and medical significance of the flavonoids, *Pharmacology & Therapeutics*, V. 96, (2002), 197– 202.
- [117] Milane H., La quercétine et ses dérivés: molécules à caractère prooxydant ou capteurs de radicaux libres; études et applications thérapeutiques, Thèse de Doctorat, Option Pharmacochimie, Université Louis Pasteur, France, (2004), 159p.
- [118] Ohshima T., Quel avenir pour les antioxydants naturels ? In : Graille J., *Les lipides et corps gras alimentaires*, Ed. Lavoisier, (2003), 469p.
- [119] Atkins P., *Le parfum de la fraise, mystérieuses molécules*, Ed. DUNOD, (2005), 263p.

- [120] Espin J., Garcia-Conesa M. and Tomas-Barberan F., Nutraceuticals: Facts and fiction, *Phytochemistry*, V. 68, (2007), 2986–3008.
- [121] Mhd Jalil A. and Ismail A., Polyphenols in Cocoa and Cocoa Products: Is There a Link between Antioxidant Properties and Health? *Molecules*, V. 13, (2008), 2190-2219.
- [122] Hilal Y. and Engelhardt U., Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea, *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, V. 2, (2007), 414 – 421.
- [123] Alais C. et Linden G., *Abrégé de biochimie alimentaire*, 4^{ème} édition, Ed. Masson, (1997), 248p.
- [124] Guirnaed J-P., Cosson L. et Henry M., *Abrégé de phytochimie*, Ed. Masson, (1985), 224p.
- [125] Brunet S., *Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestifs des ruminants*, Doctorat de l'université de Toulouse, spécialité : pathologie et nutrition, France, (2008), 246p.
- [126] Cheynier V. et Sarni-Manchado P., Structures phénoliques et goût. In : Sarni-Manchado P. et Cheynier V., *Les polyphénols en agroalimentaire*, Ed. Lavoisier, (2006), 398p.
- [127] Naczk M., Amarowicz R., Zadernowski R. and Shahidi F., Protein precipitating capacity of condensed tannins of beach pea, *Canula hulls, evening primrose and faba bean*, *Food Chemistry*, V. 73, (2001), 467-471.
- [128] Cai K., Hagerman A., Minto R. and Bennick A., Decreased polyphenol transport across cultured intestinal cells by a salivary proline-rich protein, *Biochemical pharmacology*, V. 71, (2006), 1570 – 1580.
- [129] Makkar H.P.S., Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds, Elsevier Science, *Small Ruminant Research*, V. 49, (2003), 241–256.
- [130] Min B. R. and Hart S. P., Tannins for suppression of internal parasites, *American Society of Animal Science*, V. 81, (2003), 102–109.

- [131] Haslam E., Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime, *Phytochemistry*, V. 68, (2007), 2713–2721.
- [132] Champagne A., Toxicologie végétale et troubles urinaires chez les ruminants, Thèse de doctorat, Ecole nationale vétérinaire de Lyon, (2004), 150p.
- [133] Zhang L. L. And Lin Y. M., Hplc, Nmr and Maldi-Tof MS analysis of condensed tannins from *Lithocarpus glaber* leaves with potent free radical scavenging activity, *Molecules*, V. 13, (2008), 2986-2997.
- [134] Reed J. D., Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes, *Journal of animal science*, V. 73, (1995), 1516-1528.
- [135] Bagchi D., Lau F.C. and Ghosh D.K., *Biotechnology in functional foods and nutraceuticals*, Ed. CRC Presse, United States of America, (2010), 573p.
- [136] Atefeibu E. S. I., Contribution à l'étude des tanins et de l'activité antibactérienne de *Acacia nilotica* var *adansonii*, Thèse de docteur d'Etat en pharmacie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, Sénégal, (2002).
- [137] El Hattab M., Contribution à l'étude chimique des extraits lipidiques et huiles essentielles d'algues méditerranéennes et de l'océan Atlantique : isolement, détermination structurale de nouveaux métabolites et modélisation mathématique des procédés d'extraction, Thèse de doctorat, Blida, Algérie, (2005), 325p.
- [138] Moll M. et Moll N., *Additifs alimentaires et auxiliaires technologiques*, Ed. DUNOD, France, (1998), 218p.
- [139] Delteil D., Utilisation de tanins œnologiques sur les raisins et les vins rouges méditerranéens et rhodaniens, *Revue Française d'Œnologie*, (2000), 9p.
- [140] Zern T. L. and Fernandez M. L., Cardioprotective Effects of Dietary Polyphenols, *Journal of Nutrition*, V. 135, (2005), 2291-2294.
- [141] Bahorun T., Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle, Food and Agricultural Research Council, (1997), 83-94.

- [142] Bersset C., Antioxydants phénoliques, structure, propriétés, sources végétales, In: Sarni-Manchado P. et Cheynier V., Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier, France, (2006), 381p.
- [143] Parkar S., Stevenson D. and Skinner M., The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health International, Journal of Food Microbiology, V. 124, (2008), 295–298.
- [144] Lachman J., Šulc M., Sus J. and Pavlikova O., Polyphenol content and antiradical activity in different apple varieties, Hort. Sci. (Prague), V. 33, (2006), 95–102.
- [145] Morelle J., L'oxydation des aliments et la santé (prévention des dangers de l'agression oxydative alimentaire par le bon usage des fruits et des légumes), Ed. Office d'Édition Impression Librairie, France, (2003), 257.
- [146] Favier A., Le stress oxydant : Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique, L'actualité chimique, (2003), 108-115.
- [147] Pelli K. et Lyly M., Les antioxydants dans l'alimentation, Projet européen FLAIR FLOW EUROPE 4, Project N°. QLK1-CT-2000–00040, (2003), 17p.
- [148] Demanze C. et Karleskind A., Actualités scientifiques et techniques en industries agro-alimentaires, analyse des anti-oxygènes dans les corps gras alimentaires, Ed. Lavoisier, (1997), 125p.
- [149] Dai J., and Mumper R. J., Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, Molecules, V. 15, (2010), 7313-7352.
- [150] Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne JO., Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine, Medisphere, (1998), 73-76.
- [151] Hadj Salem J., Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoides de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyle de ses molécules par voie enzymatique, Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Lorraine, (2009), 270p.
- [152] Popovici C., Saykova I. et Tylkowski B., Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH, Revue de génie industriel, V. 4, (2009), 25-39.

- [153] Wang H., Zhao M., Yang B., Jiang Y. and Rao G., Identification of polyphenols in tobacco leaf and their antioxidant and antimicrobial activities, *Food Chemistry*, V. 107, (2008), 1399–1406.
- [154] Parkar S., Stevenson D. and Skinner M., The potential influence of fruit polyphenols on colonic microflora and human gut health International, *Journal of Food Microbiology*, V. 124, (2008), 295–298.
- [155] Silva E.M., Pompeu D.R., Larondelle Y. and Rogez H., Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology, *Separation and Purification Technology*, V. 53, (2007), 274–280.
- [156] Chaabi M., Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines : *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae), Thèse de doctorat, Université Mentouri de Constantine en cotutelle avec L'université Louis Pasteur Strasbourg, faculté de pharmacie, (2008), 266p.
- [157] Beauhaire J., Es-Safi N., Boyer F., Kerhoas L., Le Guerneve C. and Ducrota P., Synthesis of modified proanthocyanidins: introduction of acyl substituents at C-8 of catechin. Selective synthesis of a C-4 →O□□→ C-3 ether-linked procyanidin-like dimer, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, V. 15, (2005), 559–562.
- [158] Nawaz H., Shi J., Mittal G. and Kakuda Y., Extraction of polyphenols from grape seeds and concentration by ultrafiltration, *Separation and Purification Technology*, V. 48, (2006), 176–181.
- [159] Clinton C., Plant tannins: A novel approach to the treatment of ulcerative colitis, *Natural Medicine Journal*, V. 1, N°. 3. (2009), 1-4.
- [160] Medina-Remon A., Barrionuevo-Gonzalez A., Zamora-Ros R., Andres-Lacueva C., Estruch R., Martinez-Gonzalez M., Diez-Espino J. and Lamuela-Raventos R., Rapid Folin–Ciocalteu method using microtiter 96-well plate cartridges for solid phase extraction to assess urinary total phenolic compounds, as a biomarker of total polyphenols intake, *Analytica Chimica Acta.*, V. 634, (2009), 54–60.

- [161] Scalbert A., Johnson I. and Saltmarsh M., Polyphenols: antioxidants and beyond, *American Journal of Clinical Nutrition*, V. 81, (2005), 215–217.
- [162] Zhang L. L. and Lin Y. M., Hplc, Nmr and Maldi-Tof MS analysis of condensed tannins from *Lithocarpus glaber* leaves with potent free radical scavenging activity, *Molecules*, V. 13, (2008), 2986-2997.
- [163] Rolland, R., Antioxydants naturels végétaux. Oléagineux Corps Gras et Lipides, V.11, N°. 6, (2004), 419-424.
- [164] Tosi E., Ré E., Ortega M. and Cazzoli A., Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*, *Food Chemistry*, V. 104, (2007), 1025–1029.
- [165] Hatano T., Kusuda M., Inada K., Ogawa T., Shiota S., Tsuchiya T. and Yoshida T., Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Phytochemistry*, V. 66, (2005), 2047–2055.
- [166] Laparra J.M. and Sanz Y., Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals, *Pharmacological Research*, V. 10, (2009), 1016-1023.
- [167] Khan N. and Mukhtar H., Tea polyphenols for health promotion, *Life Sciences*, V. 81, (2007), 519–533.
- [168] Rodriguez H., Curiel J. A., Landete J. M., Rivas B., Felipe F. L., Gómez-Cordovés C., Mancheño J. M. and Muñoz R., Food phenolics and lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, V. 132, (2009), 79–90.
- [169] Chavan U.D., Shahidi F. and Naczk M., Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents, *Food Chemistry*, V. 75, (2001), 509–512.
- [170] He Q., Lv Y. and Yao K., Effects of tea polyphenols on the activities of α -amylase, pepsin, trypsin and lipase, *Food Chemistry*, V. 101, (2006), 1178–1182.
- [171] Rossi M., Giussani E., Morelli R., Lo Scalzo R., Nani R. and Torreggiani D., Effect of fruit blanching on phenolics and radical scavenging activity of high bush blueberry juice, *Food Research International*, V. 36, (2003), 999–1005.

- [172] Muller M., Polyphenol cytotoxicity induced by the bacterial toxin pyocyanin: role of NQO1 Free Radical Biology & Medicine, V. 47, (2009), 84–91.
- [173] Hervert-Hernandez D., Pintado C., Rotger R and Goñi I., Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth, International Journal of Food Microbiology, V. 136, Issue 1, (2009), 119-122.
- [174] Davalos A., Fernandez-Hernando C., Cerrato F., Martinez-Botas J., Gomez-Coronado D., Gomez-Cordoves C. and Lasuncion M., Red Grape Juice Polyphenols Alter Cholesterol Homeostasis and Increase LDL-Receptor Activity in Human Cells in *Vitro*, Journal of Nutrition, V. 136, (2006), 1766-1773.
- [175] Mutabaruka R., Hairiah K. and Cadisch G., Microbial degradation of hydrolysable and condensed tannin polyphenol–protein complexes in soils from different land-use histories, Soil Biology & Biochemistry, V. 39, (2007), 1479–1492.
- [176] Cheynier V. Guyot S. et Fulcrand H., Composés phénoliques des boissons fermentés, In : Sarni-Manchado P. et CHEYNIER V., Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier, (2006), 398p.
- [177] Dangles O., Propriétés chimiques des polyphénols. In: Sarni-Manchado P. et Cheynier V., Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier, (2006), 398p.
- [178] Remesy C. Lopez H. Lavrat-Verny M. A. Demigne C. et Rayssiguier Y., Influence des produits végétaux et de divers glucides fermentescibles sur la biodisponibilité des minéraux, In : Roberfroid M., Aliments fonctionnels, Ed. Lavoisier, Paris, (2002), 484p.
- [179] Hagerman A.E., Tannin Chemistry. Department of chemistry and biochemistry, Miami University, USA., (2002), (www.users.muohio.edu/hagermae).
- [180] Shoji T., Akazome Y., Kanda T. and Ikeda M., The toxicology and safety of apple polyphenol extract, Food and Chemical Toxicology, V. 42, (2004), 959–967.

- [181] Psotová J., Lasovský J. et Vicar J., Metal-chelating properties, electrochemical behavior, scavenging and cytoprotective activities of six natural phenolics, *Biomed. Papers*, V. 147, N°. 2, (2003), 147-153.
- [182] Del Rio D., Costa L.G., Lean M.E.J. and Crozier A., Polyphenols and health: What compounds are involved? *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, V. 20, (2010), 1-6.
- [183] Nwabueze T.U., Effect of process variables on trypsin inhibitor activity (TIA), phytic acid and tannin content of extruded African breadfruit–corn–soy mixtures: A response surface analysis, *Food Science and Technology*, V. 40, (2007), 21-29.
- [184] Bernalier A., Dore J. et Rabot S., Structure et fonctions métaboliques de la microflore gastro-intestinale de l'homme. In: Reberfroid M., *Aliments fonctionnels*, Ed. Lavoisier, Paris, (2002), 484p.
- [185] Masson O., *Biochimie, bases biochimiques de la diététique*, Ed. Lavoisier, France, (2008), 330p.
- [186] Nouani A., Dako E., Morsli A., Belhamiche N., Belbraouet S., Bellal M. M. and Dadie A., Characterization of the purified coagulant extracts derived from artichoke flowers (*Cynara scolymus*) and from the fig tree (*Ficus carica*) in light of their use in the manufacture of traditional cheeses in Algeria, *Journal of food technology*, V. 7, N°. 1, (2009), 20-29.
- [187] Burgot G. et Burgot J-L., *Méthodes instrumentales d'analyse chimique et application: méthodes chromatographiques, électrophorèses et méthodes spectrales*, 2^{ème} édition, Ed. Lavoisier, (2006), 320p.
- [188] Deynié B., Multon J-L. et Simon D-T., *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agroalimentaires*, Ed. Lavoisier, V. 4, (1981), 409p.
- [189] Edward A., *A biologist guide to principals and technics of biochemistry*, 3^{ème} édition, Ed. USA., (1986), 254p.
- [190] Silva S. V., Allmere T., Malcata F. X. and Andrén A., Comparative studies on the gelling properties of Cardosins extracted from *Cynara cardunculus* and chymosin on cow skim milk, *International Dairy Journal*, V. 13, (2003), 559–564.

- [191] Yrjönen T., Extraction and planar chromatographic separation techniques in the analysis of natural products, Conference Room 513 at Viikki Infocentre (Viikinkaari 11), University of Helsinki, Faculty of Pharmacy, (2004), 64p.
- [192] Lagnika L., Etude phytochimique et activité biologique de substances naturelles isolées de plantes béninoises, Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur, sciences pharmaceutiques, (2005), 268p.
- [193] Boizot N. et Charpentier J-P., Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier, Le Cahier des Techniques de l'Inra Numéro spécial, (2006), 79-82.
- [194] Dehpour A. A., Ibrahimzadeh M. A., seyed Fazel N. et Seyed Mohammad N., Antioxydant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition, *Grasas Y Aceites*, V. 60, N°. 4, (2009), 405-412.
- [195] Chang C-C., Yang M-H., Wen H-M. and Chern J-C., Estimation of total flavonoid Content in propolis by two complementary colorimetric methods, *Journal of Food and Drug Analysis*, V. 10, N°. 3, (2002), 178-182.
- [196] Ba K., Tine E., Destain J., Cisse N. et Thonart P., Étude comparative des composés phénoliques, du pouvoir antioxydant de différentes variétés de sorgho sénégalais et des enzymes amylolytiques de leur malt, *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, V. 14, (2010), 131-139.
- [197] Schofield P., Mgugua D.M. and Pell A.N., Analyzed of condensed tannins: a review, *Animal feed science and technology*, V. 91, (2001), 21-40.
- [198] Cherbi R., Yousfi M., Saidi M., Dendouguir H., Belfar M. L., Kendour Z. et Tekha M., Etude de l'activité biologique de polyphénols des feuilles d'une *Lawsonia inermis*, (2004), 2p.
- [199] Escribano-Bailon M. T. and Santos-Buelga C., Polyphenol extraction from foods, (2003), 16p.
- [200] Riov, J. et Gottlieb, H.E., Métabolism of auxin in pine tissues: Indole-3-acetic acid conjugaison, *Physiologia Plantarum*, V. 50, (1980), 347-352.
- [201] Mohammedi Z., Etude du pouvoir antimicrobien et antioxydant des huiles essentielles et des flavonoïdes de quelques plantes de la région de Tlemcen, Mémoire de magister, Université de Tlemcen, (2006), 155p.

- [202] Wettasinghe M., Characterisation of natural antioxydants of meals of borage and evening primrose, Thèse de Doctorat, Département de Biochimie, Memorial University of Newfoundland, Canada, (1999).
- [203] Juma B.F. et Majinda R.R.T., Erythrimaline alkaloids from the flowers and pods of *Erythrina lysistemon* and their DPPH radical scavenging properties, *Phytochemistry*, V. 65, (2004), 1397-1404.
- [204] Mansouri A., Embarek G., Kokkalou E. et Kefalas P., Phenolic profile and antioxydant activity of the Algerian ripe date palm fruit (*Phoenix dactylifera*), *Food chemistry*, V. 89, (2005), 411-426.
- [205] Dash G. K. and Murthy P. N., Antimicrobial activity of few selected medicinal plants, *International Research Journal of Pharmacy*, V. 2, (2011), 146-152.
- [206] Haddouchi F. et Benmansour A., Huiles essentielles, utilisations et activités biologiques. Application à deux plantes aromatiques, *Les technologies de laboratoire*, N°. 8, (2008), 1-8.
- [207] Barros R. and Malcata F. X., Modelling the kinetics of whey protein hydrolysis brought about by enzymes from *Cynara cardunculus*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, V. 50, (2002), 4347– 4356.
- [208] Esteves C. L. C., Lucey J. A, Hyslop D. B. and Pires E. M. V., Effect of gelation temperature on the properties of skim milk gels made from plant coagulants and chymosine, *International Dairy Journal*, V. 13, Issue 11, (2003), 877-885.
- [209] Abdalla M.O.M., Kheir S.E.O. and El Owni O.A.O., Effect of Extraction Method, Ammonium Sulphate Concentration, Temperature and pH on Milk-Clotting Activity of *Solanum dubium* Fruit Extract., *Journal of Food Science and Technology*, V. 3, N°. 1, (2011), 40-44.
- [210] Sales-Gomes M. and Lima-Costa M.E. Immobilization of Endoproteases from Crude Extract of *Cynara cardunculus* L. Flowers, *Food Science and Technology*, V. 14, N°. 3, (2008), 271-276.
- [211] Cimino C. V., Liggieri C. S., Priolo N. S., Bruno M. A. and Vairo-Cavalli S. E., *Arctium minus* (Hill) Bernh. (*Asteraceae*) aspartylendopeptidases with

potential application in the formulation of nutraceutical products, *Molecular Medicinal Chemistry*, V. 21, (2010), 11-16.

- [212] Silva S. V., Allmere T., Malcata F. X., and Andrén A., Comparative studies on the gelling properties of Cardosins extracted from *Cynara cardunculus* and chymosin on cow skim milk, *International Dairy Journal*, V. 13, (2003), 559–564.
- [213] Sarmento A., Lopes H., Oliveira C., Vitorino R., Samyn B., Debyser G., Van Beeumen J., Domingues P. and Amado F., Multiplicity of aspartic proteinases from *Cynara cardunculus* L., *Planta*, V. 230, N°. 2, (2009), 429-439.
- [214] Thomann S., The Impact of Milk Properties and Process Conditions on Consistency of Rennet-coagulated Curd and Syneresis of Rennet Curd Grains, Thèse de doctorat. Fakultät Naturwissenschaften Universität Hohenheim, Suède, (2007), 169p.
- [215] Peschel W., Sa´nchez-Rabaneda F., Diekmann W., Plescher A., Gartzı I., Jimenez D., Lamuela-Raventos R. , Buxaderas S. and Codina C., An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes, *Food Chemistry*, V. 97, (2006), 137–150.
- [216] Ozsoy N., Can A., Yanardag R. and Akev N., Antioxidant activity of *Smilax excels* L. leaf extracts, *Food chem.*, V. 110, (2008), 571-583.
- [217] Gomez C., Etude des mécanismes de stockage des anthocyanes dans la baie de raisin caractérisation fonctionnelle des gènes impliqués dans ces mécanismes, Thèse de doctorat, Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques Montpellier SUPAGRO, Ecole doctorale: sciences des procédés – sciences des aliments, (2009).
- [218] Pandino G., Lombardo S., Mauromicale G. and Williamson G., Profile of polyphénols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm, *J. Food Compos. Anal.*, (2011), doi: 10.1016/j.
- [219] Llorach R., Espín J. C., Tomás-Barberán F. A., and Ferreres F., Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Byproducts as a Potential Source of Health-Promoting

Antioxidant Phenolics, J. Agric. Food Chem., (2002), V. 50, N°. 12, 3458–3464.

- [220] Sharaf-Eldin M.A., Schnitzler W.H., Nitz G., Razin A.M., I.I. El-Oksh. The effect of gibberellic acid (GA3) on some phenolic substances in globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* (L.) Fiori), Scientia Horticulturae, V. 111, (2007), 326–329.
- [221] Naczk M. and Shahidi F., Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, V. 41, (2006), 1523–1542.
- [222] Koffi E., Sea T., Dodehe Y. and Soro S., Effect of solvent type on extraction of polyphénols from twenty three Ivorian plants. Journal of Animal & Plant Sciences, V. 5, (2010), 550- 558.
- [223] Djeridane M., Yousfi B., Nadjemi D., Boutassouna P. and Stocker N., Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds, Food Chem., V. 97, (2006), 654–660.
- [224] Galvez C.J., Martin-Cordero P. and Houghton A.M., Antioxidant Activity of methanol extracts obtained from *Plantago* species, J. Agric. Food Chem., V. 53, (2005), 1927–1933.
- [225] Getachew G., Pittroff W., Putnam D.H., Dandekar A., Goyal S. and DePeters E.J., The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on *in vitro* rumen fermentation and microbial protein synthesis, Animal Feed Science and Technology, V. 140, (2008), 444–461.
- [226] Rosales R., Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. Thèse de doctorat, Kansas State University, (1999), 400p.
- [227] Kennedy J. A. Proanthocyanidins: Extraction, Purification and Determination of Subunit Composition by HPLC., Current Protocols in Food Analytical Chemistry, (2002), I1.4.1-I1.4.11.

- [228] Wiley J., Proanthocyanidins: Extraction, Purification and Determination of Subunit Composition by HPLC., *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, (2002), 11.4.1-11.4.11.
- [229] Wan Nurul Bt Wan A. Z., Extraction of antioxidant compounds from red Pitaya using Soxhlet extraction method, Thèse de doctorat, Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering, Universiti Malaysia Pahang, (2009).
- [230] Kolaï N., Berkani A. et Lotmani B., Analyse chromatographique (CCM) des flavonoïdes des feuilles des *Citrus* en relation avec le taux de contamination de *Phyllocnistis citrella* Staint (*Lepidoptera* ; *Gracillariidae*), Laboratoire de la protection des végétaux, Université de Mostaganem, (2004), 8p.
- [231] Christelle Chantal N., Yves-Alain B., Janat Akhanovna M. and Anoubilé B., Sur la Composition en Métabolites Secondaires et L'activité Anti-Oxydante D'extraits Bruts de *Gmelina Arborea* Roxb. (*Verbanaceae*) de Côte d'Ivoire, Afrique del'Ouest: Analyse par Chromatographie en Couche Mince, Gooré Bi Stéphane *European Journal of Scientific Research*, V. 36, N°. 2, (2009), 161-171.
- [232] Ihl M., Monsalves M. and Bifani V., Chlorophyllase inactivation as a measure of blanching efficacy and color retention of artichokes *Cynara scolymus* L., *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, V. 31, (1998), 50-56.
- [233] Benbrook C., Elevating Antioxidant Levels in Food through Organic Farming and Food Processing, The Organic Center for education and promotion, (2005), 81p.
- [234] Marcel K. K., Janat Akhanovna M.-B., Yves-Alain B., Gabin D. and Jérôme Z., *In vitro* antioxidant activities of total flavonoids extracts from leaves and stems of *Adenia lobata* (Jacq.) Engl. (*Passifloraceae*), *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, V. 3, N°. 1, January (2011), 8-12.
- [235] Raj Narayana K., Sripal Reddy M., Chaluvadi M.R. and Krishna D.R. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian journal of pharmacology* 2001; 33: 2-16

- [236] Kujumgier A., Tsvetkova J., Serkedjieva Y., Bankova V., christov R. and Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin, *J Ethno Pharmacol*, V. 64, (1999), 235-240.
- [237] Ran SS., Lee CK., Kim YS., Characteristics and occurrence of plant polyphenols. *Yak Hak Hoechi*, V. 36, (1992), 407-414.
- [238] Sakanaka S., Raj Juneja L., and Taniguchi M., Antimicrobial Effects of Green Tea Polyphenols on Thermophilic Spore-Forming Bacteria, *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, V. 90, N°. 1, (2000), 81-85.
- [239] Silabdi S., Extraction, purification et caractérisation d'antioxydants naturels en vue d'une valorisation nutritionnelle, Mémoire du magister, Nutrition et transformation des aliments, Université SDB Blida, (2010), 160p.
- [240] Moroh J.-L. A., Bahi C., Dje K., Loukou Y. G. et Guede-Guina F., Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétatique (EAC) de *Morinda morindoides* (Baker) milne-redheat (*rubiaceae*) sur la croissance *in-vitro* des souches d'*Escherichia coli*, *Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège*, V. 77, (2008), 44 – 61.
- [241] Jeong E-Y., Jeon J., Lee C. and Lee H., Antimicrobial activity of catechol isolated from *Diospyros kaki* Thunb. Roots and its derivatives toward intestinal bacteria, *Food Chemistry*, V. 115, (2009), 1006–1010
- [242] Hirasawa M. and Takada K., Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, V. 53, (2004), 225-229.
- [243] Boochird C. and Flegel M.W., In vitro antifungal activity of Eugenol and Vanillin against *candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*, *Can.J. Microbiol.*, V. 28, (1982), 1235-1241.

APPENDICES

-A-

➤ Appareillage

- Agitateur
- Bain-Marie
- Balance (de précision KERN max 200 g)
- Centrifugeuse de Hettich EBA3S
- Rota-vapeur
- Etuve (Memmert max 255°C)
- pH mètre
- Thermomètre
- Appareil de Kjeldahl (Bloc digest Selecta et un distillateur)
- HPLC chromatographie liquide à haute performance
- Chromatographie d'exclusion sur colonne
- Appareil de Soxhlet
- Spectrophotomètre UV visible type Perkin Elmer
- Lampe UV 254-366 nm
- Bec-benzène
- Vortex (Oheidolph)
- Autoclave
- Four à moufles
- Lyophilisateur
- Stomacher (Laboratory Blender)

➤ Matériels utilisés

- Becher
- Burette graduée
- Eprouvette
- Erlenmeyere
- Fioles
- Pipettes graduées de 1, 10 et 20 ml
- Micropipette
- Micro-seringue
- Micro-filtre
- Cuve de la CCM
- Boîtes de Pétris
- Pincés
- Tubes à essai
- Ampoule de décantation

➤ Composition des milieux de culture

Mueller-Hinton

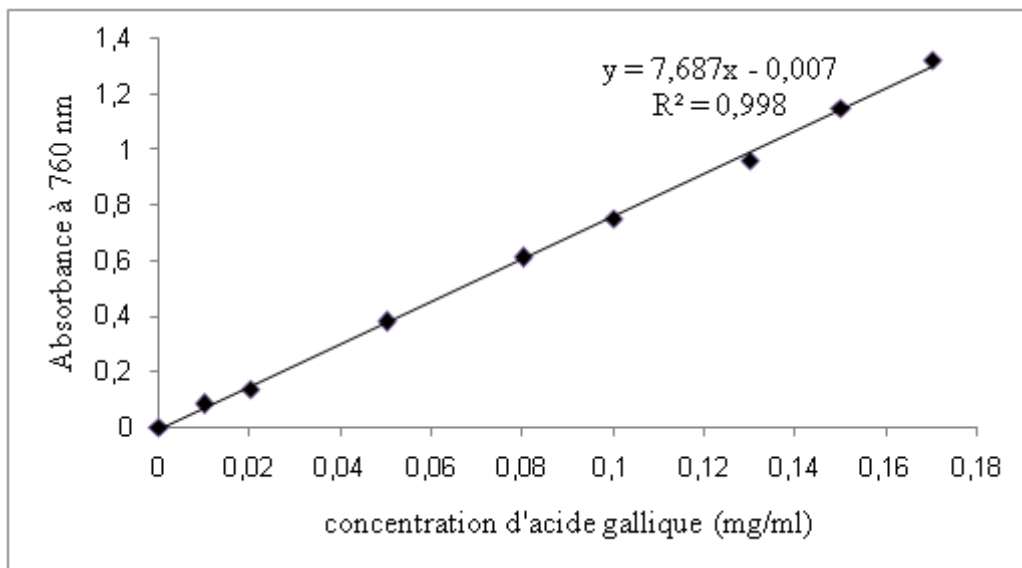
- Infusion de viande 4 g/l
- Hydrolysate de caséine 17,5 g/l
- Agar 15 g/l
- Amidon 1,5 g/l
- pH= 7,4

Milieu Saboraud

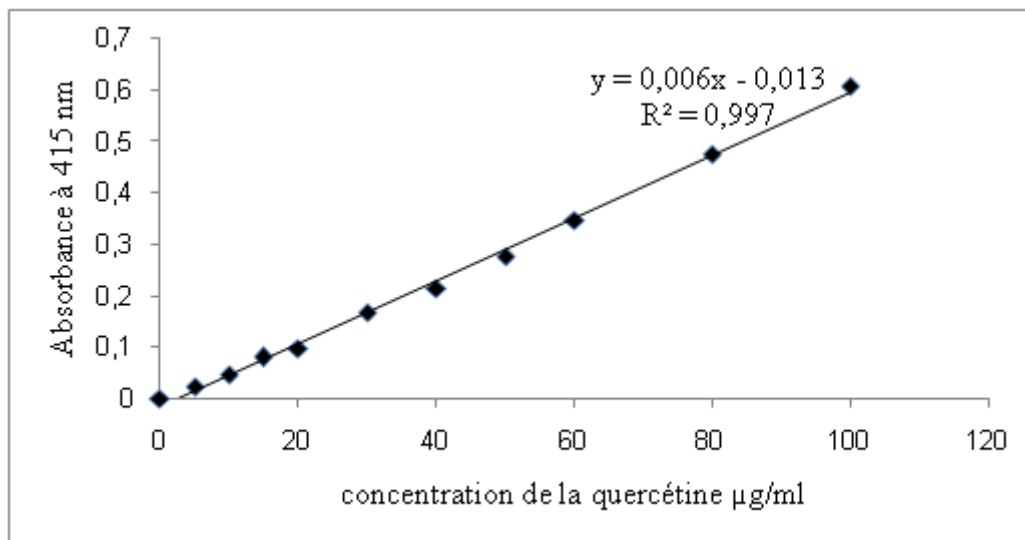
- Peptone de caséine 3 g/l
- Peptone de viande 3 g/l
- D(+) glucose 10 g/l
- Maltose 10 g/l
- Agar 15 g/l
- pH= 5,4

-B-

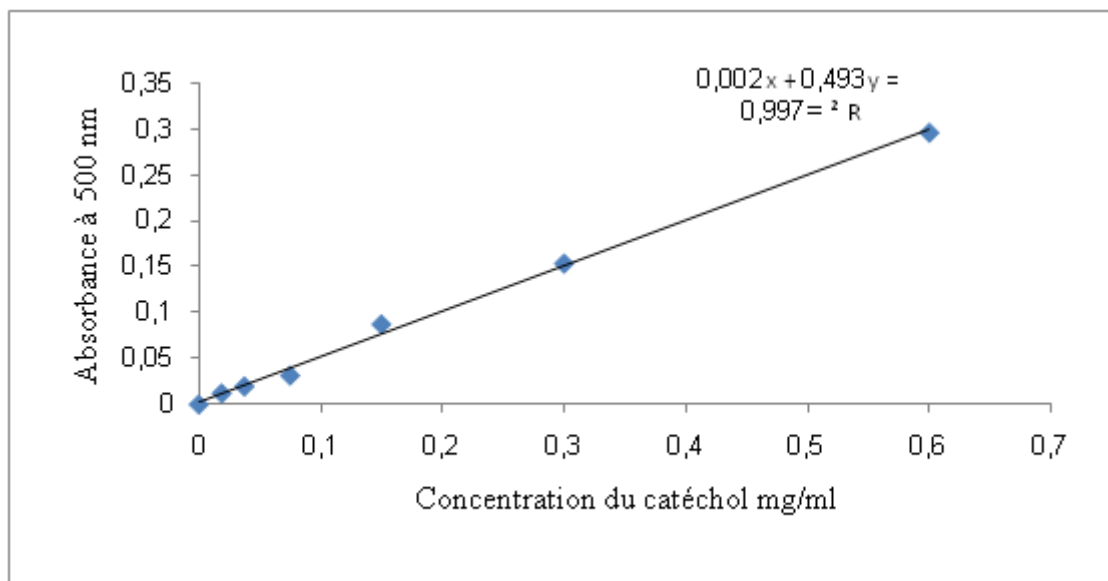
B.1 Courbe d'étalonnage des polyphénols totaux



B.2 Courbe d'étalonnage des flavonoïdes

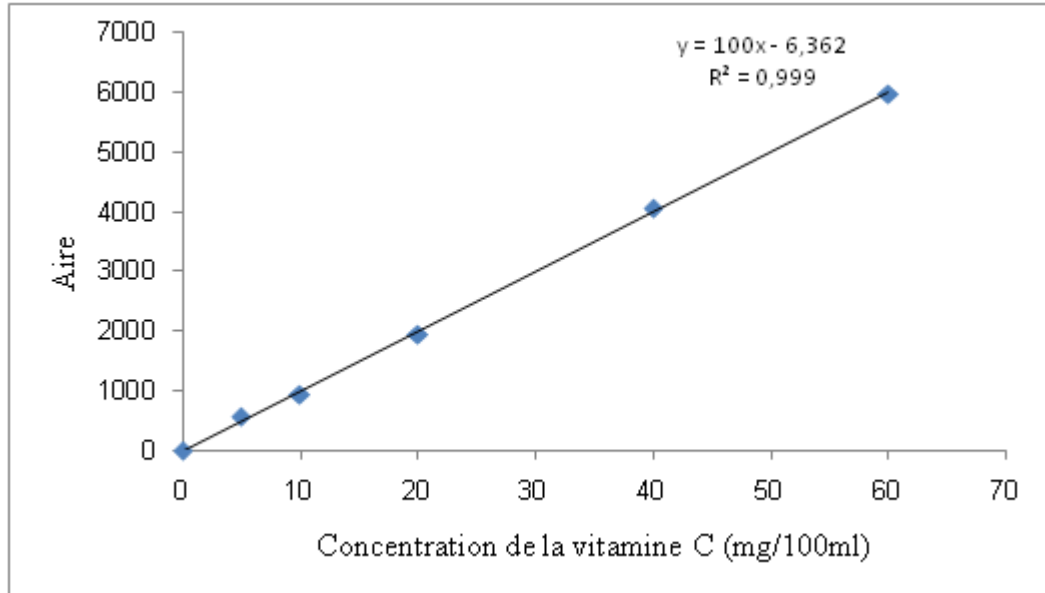


B.3 Courbe d'étalonnage du catéchol

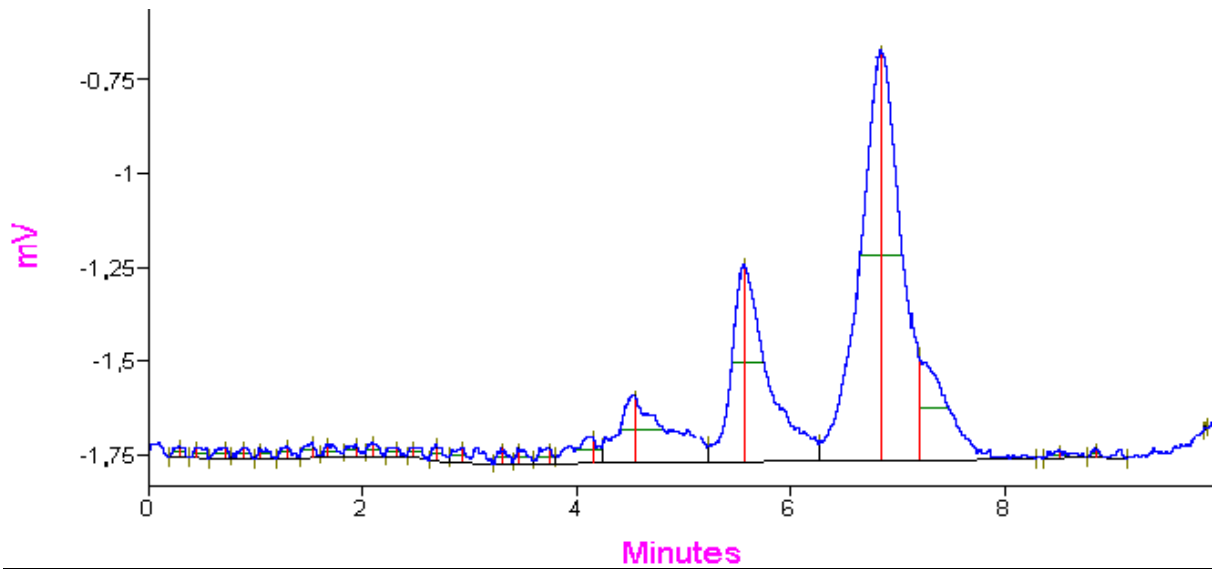


-C-

C.1 Courbe d'étalonnage d'acide ascorbique



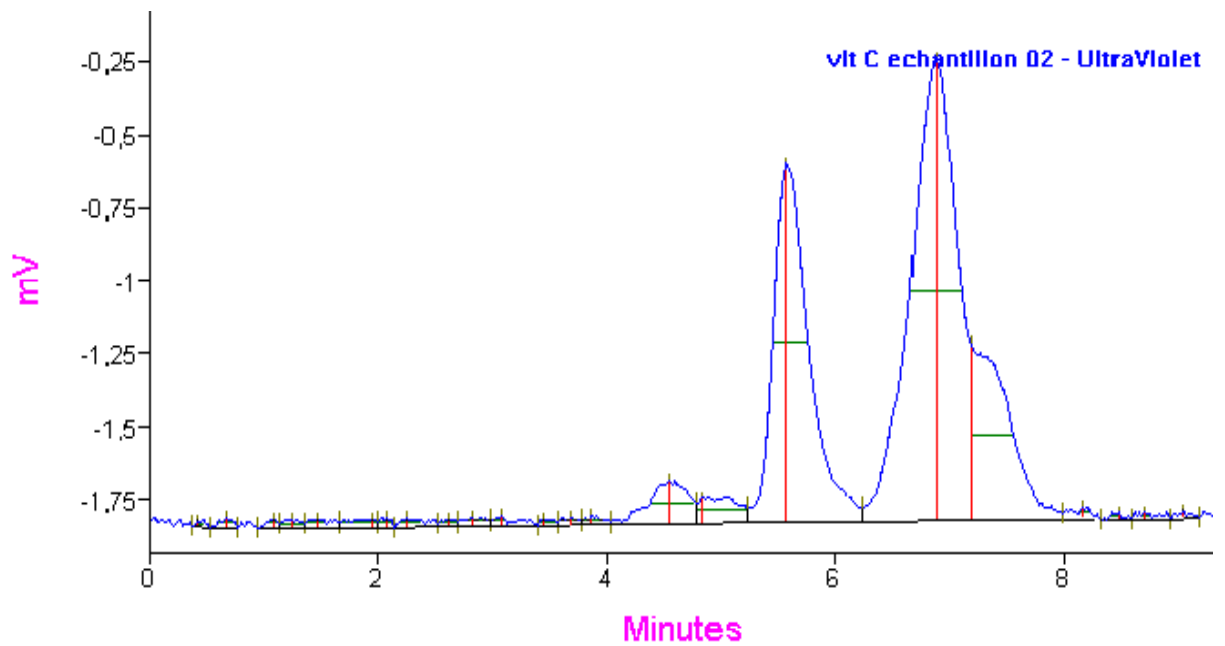
C.2 Chromatogramme du dosage de la vitamine C des bractées



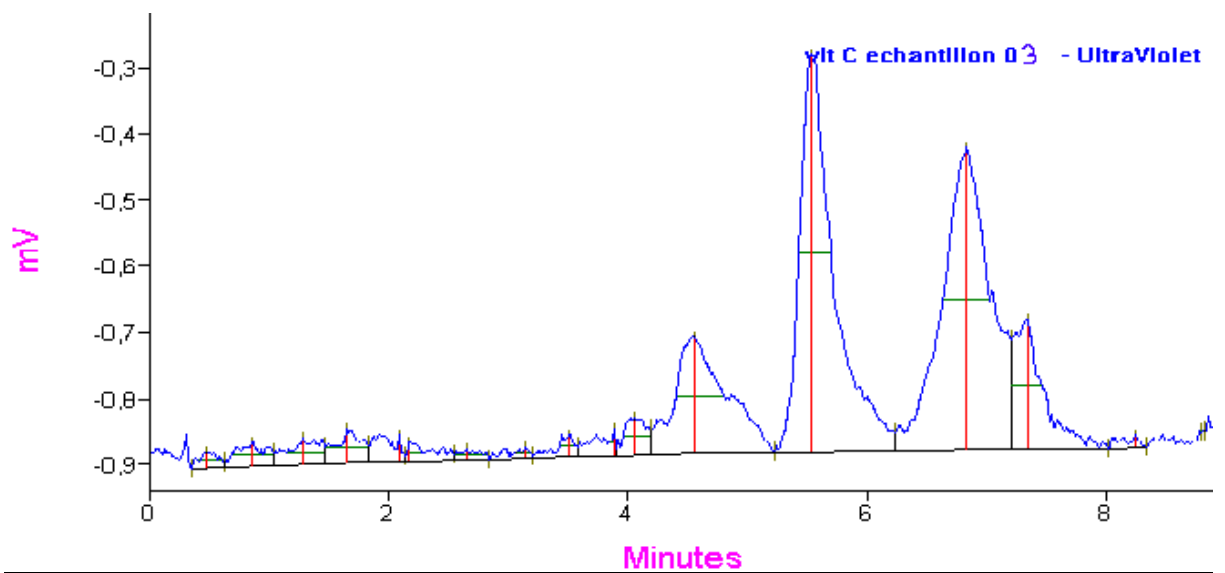
Temps de rétention (minutes)

Intensité optique (millivolts).

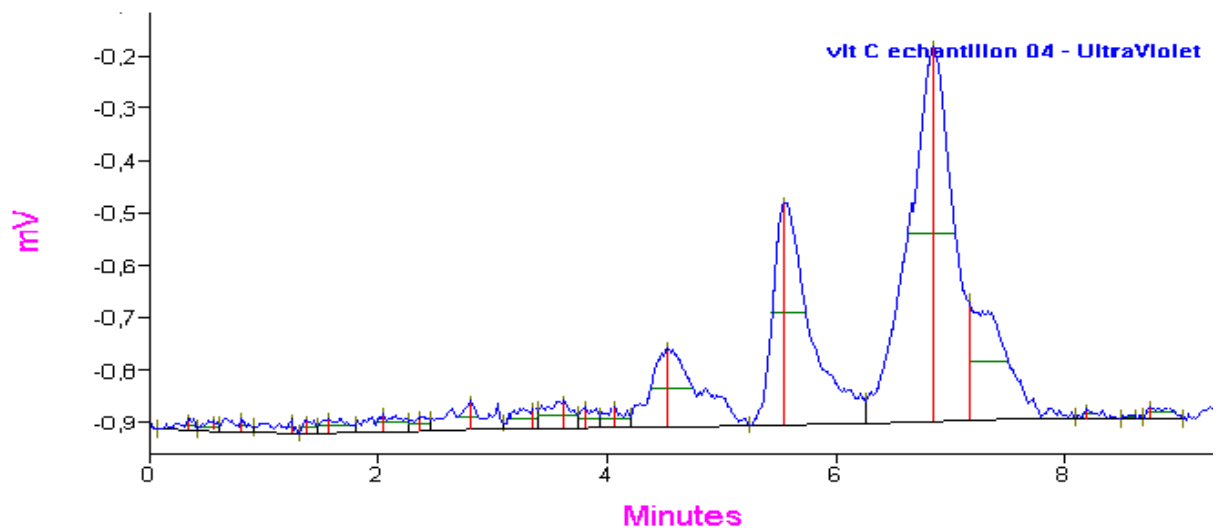
C.3 Chromatogramme du dosage de la vitamine C des fleurs



C.3 Chromatogramme du dosage de la vitamine C de la tige



C.4 Chromatogramme du dosage de la vitamine C du réceptacle



-D-

D.1 Tableau des concentrations de la quercétine et de la vitamine C

A partir des solutions mères de 0,5 mg/ml de la quercétine et de la vitamine C, nous réalisons des dilutions allant de 0 à 0,5 mg/ml.

Solution mère (ml)	0	0,1	0,2	0,5	1	2	10
Méthanol absolu (ml)	10	9,9	9,8	9,5	9	8	0
Concentration de la quercétine mg/ml	0	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,5
Concentration de la vitamine C mg/ml	0	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,5

D.2 Tableau des dilutions de différents extraits

Solution mère (ml)	0,3	0,9	1,5	2,1	3
Eau distillée (ml)	2,7	2,1	1,5	0,9	0
Concentration d'extrait (% v/v)	10	30	50	70	100

-E-

Tableau : Rf et caractéristiques des taches présentes dans les chromatogrammes des extraits d'artichaut

Extraits et polyphénols standards	Nombre de taches	Couleurs des taches	Rf
Acide gallique		Mauve	0,89
Quercétine		Jaune	0,95
Acide tannique		Brune	0,84
Catéchol		Mauve foncé	0,96
Extrait des bractées	3	Jaune	0,72 0,95 0,89
Extrait des fleurs	5	De jaune au brun	0,3 0,42 0,84 0,89 0,95
Extrait de la tige	6	De jaune au brun	0,6 0,65 0,71 0,84 0,89 0,95
Extrait du réceptacle	5	De jaune au brun	0,6 0,72 0,84 0,89 0,95

-F-

Les extraits polyphénoliques utilisés dans les testes d'antibiogramme

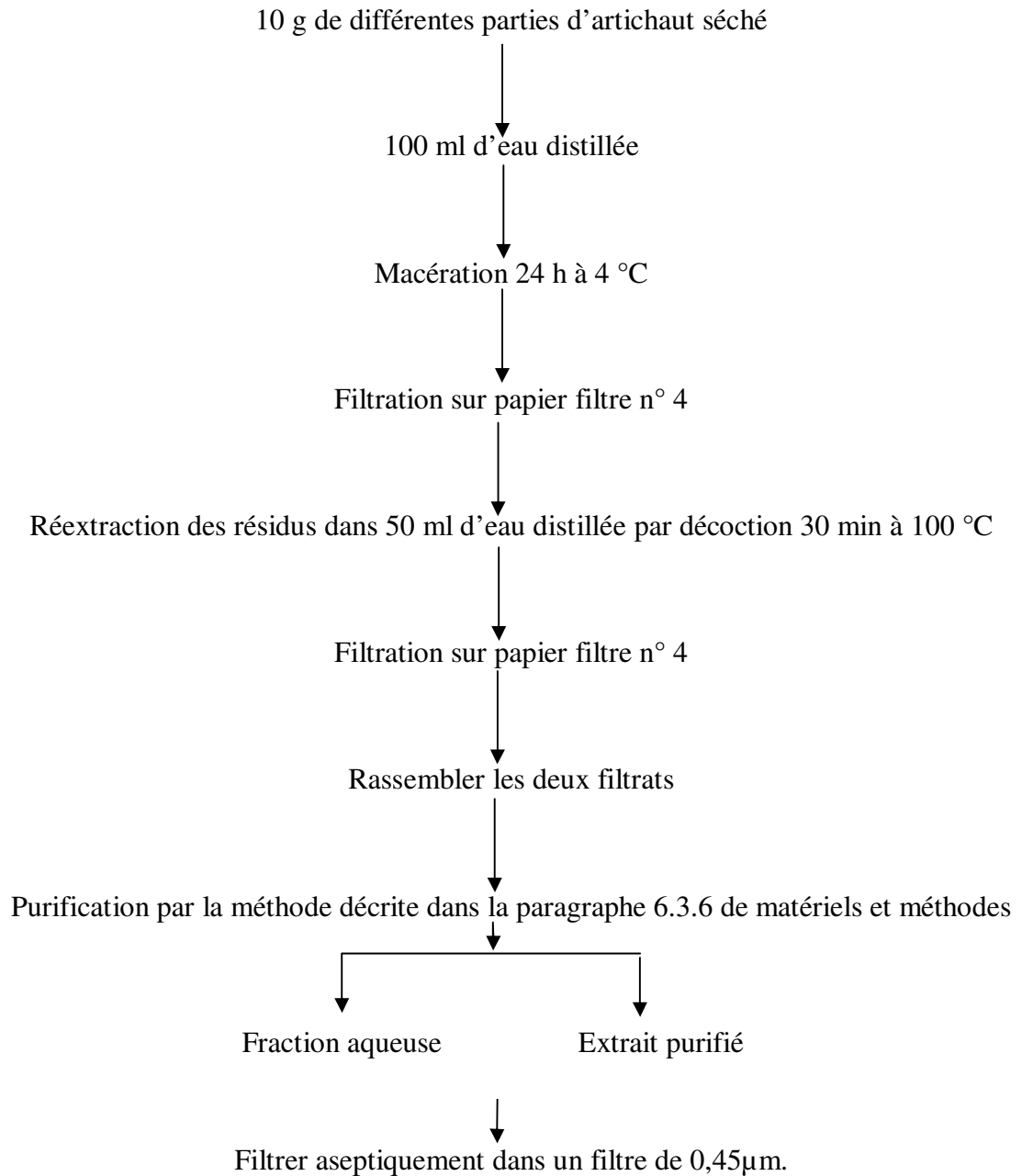
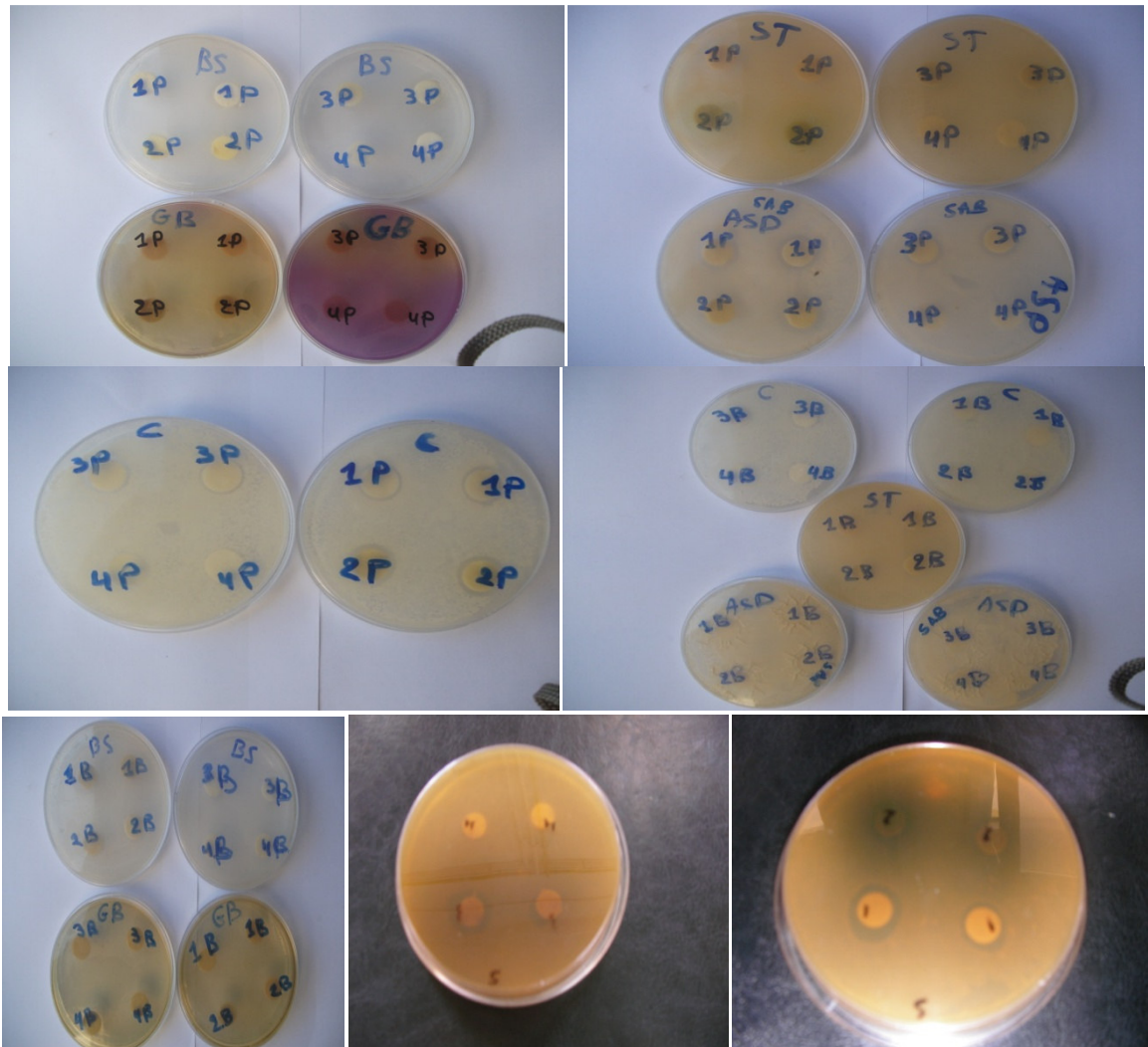


Figure F : Diagramme d'extraction et purification des polyphénols d'artichaut (original).

Résultats des testes d'antibiogramme



C : *Candida albicans*

BS: *Bacillus subtilis*

GB: *Geobacillus stearothermophilus*

ST: *Staphylococcus aureus*

S : *Escherichia coli*

ASP : *Aspergillus fumigatus*

1p : extrait purifié des bractées

2p : extrait purifié des fleurs

3p : extrait purifié de la tige

4p : extrait purifié du réceptacle

B : fraction aqueuse

Figure G : Résultats des antibiogrammes des extraits phénoliques purifiés et des fractions aqueuses.

-H-

Tableau H : Diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques (cm) obtenus avec les souches fongiques

Antibiotiques Souches	Spiromycine (15)	Erythromycine (100)	E. conazole
<i>Bacillus subtilis</i>	2,5	2,8	Nd
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	3,5	3	Nd
<i>Aspergillus fumigatus</i>	nd	Nd	3
<i>Candida albicans</i>	nd	Nd	0

nd : non déterminé.