

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Université SAAD DAHLAB de Blida
Faculté des Sciences Agro-Vétérinaires
Département des Sciences Agronomiques

MÉMOIRE DE MAGISTER

En Sciences Agronomiques

Spécialité : Biopesticides et gestion phytosanitaire

CARACTÉRISATION DES MÉTABOLITES SECONDAIRES DES CRUCIFÈRES. EFFETS SAISONNIERS ET RÉGIONAL SUR L'EXPRESSION DES MOLÉCULES BIOACTIVES

Par

Kamel MOUSSAOUI

Devant le jury composé de :

S.A. SNOUSSI	Professeur U.S.D.BLIDA	Président
Z.E. DJAZOULI	MCA U.S.D.BLIDA	Promoteur
A. GUENDOZ-BENRIMA	Professeur U.S.D.BLIDA	Examinatrice
Z. KRIMI	Professeur U.S.D.BLIDA	Examinatrice
F. BOUNACEUR	MCB U.I.K.TIARET.	Examineur

Blida, novembre 2011

Caractérisation des métabolites secondaires des crucifères : Effet saisonnier et régional sur l'expression des molécules bioactives

Résumé

Des examens ciblés ont évalué les glucosinolates dans la famille des Brassicacées touchant des aspects spécifiques de leur biologie, la structure chimique et les groupes de composés en fonction de leurs similitudes structurales. La présente étude s'est intéressée à la teneur en glucosinolates des divers organes d'*Hirschfeldia incana* et de *Raphanus raphanistrum*, et ont été analysée lors des phases critiques de leurs cycles à savoir la floraison et la nouaison. Une divergence d'accumulation est très marquée entre espèces d'une part et entre les stades phénologiques d'autres part. *Hirschfeldia incana* se démarque par rapport à *Raphanus raphanistrum* par un supplément en terme de capacité d'accumulation en molécules de glucosinolates. Il en ressort qu'*Hirschfeldia incana* présente un fort pouvoir d'accumulation en phase de floraison en comparaison avec celui de *Raphanus raphanistrum*. Au stade nouaison, on note un dédoublement des quantités en glucosinolates accumulées, ce qui traduit une certaine égalité dans les capacités productives des deux espèces. La fluctuation des quantités de glucosinolates affiche un penchant à la hausse du stade floraison vers le stade nouaison. Nous signalons un remaniement très important de la majeure partie des molécules caractérisées (3 molécules sur 4 molécules) à savoir, la Sinigrine, la Glucoberverine et la Glucoberteroïne. L'évolution importante des taux de la Sinigrine (61,21%) et de la Glucoberverine (51,77%) a été signalée en passant du stade floraison vers le stade nouaison. Les taux de la Glucoberteroïne sont revus à la baisse (18,02%) pour *Raphanus raphanistrum*. Quant à *Hirschfeldia incana*, nous enregistrons aussi un remaniement très important d'un nombre mineur des molécules caractérisées (3 molécules sur 7 molécules) à savoir, la Sinigrine, la Glucoberverine et la Pentenyl

Mots clés

Brassicacées, *Raphanus raphanistrum*, *Hirschfeldia incana*, Glucosinolates, accumulation, Teneurs

Characterization of secondary metabolites of crucifers: seasonal and regional expression of bioactive molecules

Abstract

Focused reviews have specifically examined the glucosinolates in the Brassicaceae family regarding specific aspects of their biology, structure and chemical groups of compounds according to their structural similarities. This study is interested in the glucosinolate content of various organs of *Hirschfeldia incana* and *Raphanus raphanistrum*, and were analyzed during the critical phases of their cycle ie flowering and fruit set. A difference of accumulation is very marked between species and between phenological stages other hand. *Hirschfeldia incana* differs from *Raphanus raphanistrum* by a supplement in terms of storage capacity in molecules of glucosinolates. It appears that *Hirschfeldia incana* has a significant storage capacity in the flowering stage compared with the potential for accumulation of *Raphanus raphanistrum*. Fruit set stage, there is a duplication of accumulated amounts of glucosinolates, which reflects a certain equality in productive capacity of the two species. Fluctuating amounts of glucosinolates shows a tendency to higher flowering stage to fruit set stage. We note a very significant overhaul of most of the molecules characterized (3 molecules of 4 molecules) namely, sinigrin, and the Glucoberverine Glucoberveroine. Changes in the rates of sinigrin (61.21 %) and Glucoberverine (51.77 %) has been reported from the flowering stage to fruit set stage Glucoberveroine the rates are scaled down (18, 02 %) with respect *Raphanus raphanistrum*. For *Hirschfeldia incana*, we also note a very significant overhaul of a minor number of molecules characterized (3 molecules of 7 molecules) ie sinigrin, the Glucoberverine and pentenyl

Keywords

Brassicaceae, *Raphanus raphanistrum*, *Hirschfeldia incana*, glucosinolate accumulation Makers

توصيف الأيضات الثانوية الصليبيات : التعبير الموسمية والإقليمية من الجزئيات الحيوية النشطة

ملخص

درسات دقيقة تركز تحديدا على glucosinolates في الأسرة Brassicaceae بشأن جوانب محددة من الأحياء وهيكلها ومجموعات من المركبات الكيميائية وفقا لأوجه التشابه بينها الهيكلية. هذه الدراسة تهتم في المحتوى glucosinolate من مختلف أجهزة و *incana Hirschfeldia* و *raphanistrum Raphanus*، وحلت خلال المراحل الحاسمة من دورة المزهرة إلى مجموعة والفاكهة ويتميز جدا والفرق بين الأنواع من تراكم المراحل الفيزيولوجية وبين من جهة أخرى *incana Hirschfeldia* يختلف من *Raphanus raphanistrum* بواسطة ملحق من حيث السعة التخزينية من جزئيات glucosinolates. يبدو أن *Hirschfeldia incana* لديها قدرة تخزين كبيرة في المرحلة المزهرة مقارنة مع احتمال تراكم *raphanistrum Raphanus*. مجموعة الفواكه المرحلة، هناك ازدواجية المبالغ المتراكمة من glucosinolates، مما يعكس بعض المساواة في القدرة الإنتاجية لهذين النوعين. تذبذب كميات من glucosinolates يظهر الميل إلى مرحلة أعلى من مرحلة الإزهار إلى مجموعة الفاكهة. نلاحظ إصلاح كبيرة جدا لمعظم الجزئيات المتميز (جزئيات 3 من 4) وهي sinigrin، و Glucoberteroine و Glucoberverine. وقد تم الإبلاغ عن التغييرات في معدلات ارتفاع في الجزئيات sinigrin و Glucoberverine (61.21%) و Glucoberverine (51.77%) من مرحلة ازدهار لمجموعة الفاكهة أم Glucoberteroine معدلاتها في الانخفاض (18، 02%) فيما يتعلق *Raphanus raphanistrum* في ما يتعلق *Hirschfeldia incana*، نلاحظ أيضا إلى إصلاح كبير جدا من عدد صغير من جزئيات المتميز (3 جزئيات من 7) هما sinigrin، و Glucoberverine و pentenyl.

الكلمات الرئيسية

Brassicaceae، Raphanus raphanistrum، *Hirschfeldia incana*، محتويات و تراكم glucosinolate

REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie Dieu de m'avoir donné la force, le courage et la volonté pour réaliser ce travail.

Mes profonds respects, toute ma gratitude et ma reconnaissance vont à mon promoteur **D^r DJAZOULI Z.E.** pour son bon encadrement, son aide précieuse et sa disponibilité tout au long de ma formation. Merci aussi pour sa rigueur scientifique, ses précieux conseils et surtout sa patience et ses encouragements qui m'ont permis de mener à bien cette étude.

J'adresse toute ma gratitude et mon profond respect au **P^r SNOUSSI S A** qui me fait l'honneur de présider le jury. Je tiens à la remercier particulièrement pour tous ses conseils, ses encouragements et surtout sa bonne humeur.

J'exprime ma grande considération et mes vifs remerciements au **P^r KRIMI Z.** d'avoir accepté de faire partie du jury et d'apporter un plus à ce travail en l'examinant.

Mes respects et mes sincères remerciements vont au **P^r GUENDOZ-BENRIMA A.** d'avoir bien voulu accepter d'être membre du jury pour examiner et enrichir ce travail.

Je remercie fortement **D^r BOUNACEUR F.** d'avoir accepté d'être membre du jury et d'examiner ce travail.

Un grand merci à mon professeur **M^r AROUN M.E.F.** que je respecte beaucoup.

Je tiens à remercier mon ami, le **D^r MERAH.O** pour ses encouragements, son envie de m'aider et surtout pour avoir répondu présent à chaque fois que j'ai eu besoin de ses conseils.

Mes remerciements vont sans doute à ma famille en particulier à ma chère et tendre épouse **KARIMA** qui a cru en moi et n'a cessé de m'encourager et de me soutenir pendant les moments difficiles et à ma fille **MARYA** que j'adore.

A tous mes enseignants et professeurs qui ont assuré ma formation sans oublier les personnels du département d'agronomie de Blida en particulier **SLIMANE**

Je tiens à remercier aussi toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Kamel.

DÉDICACES

*C'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail à tous ceux que j'aime. A ceux qui malheureusement ne sont plus là aujourd'hui pour partager ma joie ; mes **chers parents** ainsi que mon beau frère **MESSAOUD** et à tous ceux que je porte dans mon cœur en particulier*

*Mon adorable femme **KARIMA***

*Ma fille chérie **MARYA**,*

*Mes **frères** et **sœurs***

*Toute **ma famille** et **belle famille***

*Tous **mes enseignants**.*

*Tous **mes amis (es)**.*

Kamel

LISTES DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

Figure 1.1. : Réduction des surfaces cultivables par habitant [9].	21
Figure 1.2. : Evolution du nombre d'espèces d'insectes résistants [4].	23
Figure 3.1. <i>Bunias erucago</i>	39
Figure 3.2. <i>Cakile maritima Scop</i>	39
Figure 3.3 <i>Crambe maritima L.</i> , le Chou marin. Dissection montrant la position des étamines et des nectaires	40
Figure 3.4 Fruit de <i>Erysimum cheiri (L.) Crantz</i> , à gauche fruit entier, à droite fruit ouvert découvrant les graines et la "fausse cloison" .	41
Figure 3.5 Coupe transversale de la silique de <i>Erysimum c.</i> au niveau de 2 graines	41
Figure 3.6 <i>Brassica species</i>	41
Figure 3.7 <i>Sinapis alba L</i>	41
Figure 3.8 <i>Matthiola tricuspidata (L.)</i>	42
Figure 3.9 <i>Matthiola tricuspidata (L.)</i>	42
Figure 3.10 <i>Erysimum cheiri (L.) Crantz</i> , la Giroflée. Un des carpelles de la silique a été enlevé. On distingue la "fausse cloison" et des graines	42
Figure 3.11 <i>Alyssum montanum (L)</i>	42
Figure 3.12 <i>Biscutella auriculata (L).</i>	42
Figure 3.13 <i>Biscutella auriculata (L).</i>	43
Figure 3.14 <i>Capsella bursa-pastoris (L.)</i>	43
Figure 3.15 <i>Capsella bursa-pastoris (L.)</i> .	43
Figure 3.16 <i>Camelina sativa (L.) Crantz</i>	43
Figure 3.17 <i>Iberis amara (L)</i>	43
Figure 3.18 <i>Iberis pinnata (L)</i>	43
Figure 3.19 <i>Bunias erucago (L)..</i>	43

Figure 3.20 <i>Thlaspi arvensis</i> (L).	43
Figure 3.21 <i>Cakile maritima</i> Scop..(L) Silique à deux articles superposés, chacun à une seule graine. L'article supérieur est caduc	44
Figure 3.22 <i>Crambe maritima</i> (L.)	44
Figure 3.23 <i>Raphanus raphanistrum</i> (L).	44
Figure 4.1. Structure générale des glucosinolates	47
Figure 4.2. Voies de biosynthèse des glucosides cyanogénétiques dans dhurrine <i>Sorghum bicolor</i> (à gauche) et p-hydroxybenzylglucosinolate dans <i>Sinapis alba</i> (à droite). Les points d'interrogation représentent des réactions proposées. TPS, la glutathion-S-transférase; HMNGT, glucosyltransférase p-hydroxymandelonitrile; PAPS-ST, 3'-5'-phosphoadénosine phosphosulphate (PAPS): sulfotransférase desulphoglucosinolate; S-GT, glucosyltransférase UDPG-thiohydroximate.	49
Figure 4.3. L'analyse immunohistochimique de l'expression myrosinase dans <i>Brassica napus</i> feuilles utilisant des anticorps monoclonaux 3D7 anticorps anti-myrosinase. A, dans le mésophylle; B, le phloème. les cellules contenant des myrosinases sont indiquées par des flèches. Bar = 10 μ m	50
Figure 4.4. Les noms et les structures des produits de dégradation des glucosinolates. Myrosinase catalyse la formation aglycone tandis que les produits finaux sont formés non-enzymatique ou par une protéine epithio spécifique.	51
Figure 4.5. Proposition de l'AAI et l'indole voie de biosynthèse des glucosinolates avec l'indole-3-acétaldoxime comme [97]. [96], intermédiaire commun.	54
Figure 5.1 : courbe des précipitations annuelles de 2000 à 2010 dans la wilaya de Blida	59
Figure 5.2 : Courbe des températures moyennes mensuelles des minimas et des maximas de la période 2000-2010 dans la wilaya de Blida	60
Figure 5.3: localisation de l'étage bioclimatique de la Mitidja sur le climagramme d'Emberger	62

Figure 5.4 : diagramme ombrothermique Bagnouls et Gaussen relatif à la région d'étude (a : décade 2000 -2010, b : année 2010).	64
Figure 6.1 : Accumulation globale des molécules chez <i>Raphanus raphanistrum</i> (L) et <i>Hirschfeldia incana</i> (L)	71
Figure 6.2 : Accumulation globale des molécules par stade phénologique chez <i>Raphanus raphanistrum</i> (L) et <i>Hirschfeldia incana</i> (L)	72
Figure 6.3 : Composition et quantités globale en glucosinolates de <i>Raphanus raphanistrum</i> (L) et <i>Hirschfeldia incana</i> (L)	73
Figure 6.4 : Composition et quantités globale en glucosinolates de <i>Raphanus raphanistrum</i> (L) et d' <i>Hirschfeldia incana</i> (L) en fonction des stades phénologiques	74
Figure 6.5 : Variation des quantités globale en glucosinolates des différents organes de <i>Raphanus raphanistrum</i> (L) et <i>Hirschfeldia incana</i> (L)	76
Figure 6.6. : Variation des quantités globale en glucosinolates des différents organes de <i>Raphanus raphanistrum</i> (L) et d' <i>Hirschfeldia incana</i> (L) en fonction des stades phénologique	77
Figure 6.7. : Caractérisation des glucosinolates des différents organes de <i>Raphanus raphanistrum</i> (L) et <i>Hirschfeldia incana</i> (L) en fonction des stades phénologiques	79
Figure 6.8. : Analyse multivariée représentant le remaniement des molécules bioactives des différents organes de <i>Raphanus raphanistrum</i> (L) en phase de floraison et de nouaison	80
Figure 6.9. : Classification hiérarchique ascendante des molécules bioactives des différents organes de <i>Raphanus raphanistrum</i> (L) en phase de floraison et de nouaison (calculée par le biais des distances euclidiennes)	81
Figure 6.10. : Analyse multivariée représentant le remaniement des molécules bioactives des différents organes d' <i>Hirschfeldia incana</i> (L) en phase de floraison et de nouaison	82
Figure 6.11. : Classification hiérarchique ascendante des molécules bioactives des différents organes d' <i>Hirschfeldia incana</i> (L) en phase de floraison et de nouaison (calculée par le biais des distances euclidiennes)	83

Figure 6.12. : Analyse multivariée représentant le remaniement des 84 molécules bioactives des différents organes de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L) en phase de floraison et de nouaison

Figure 6.13. : Classification hiérarchique ascendante des molécules 85 bioactives des différents organes de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L) en phase de floraison et de nouaison)

Figure 7.1 : Fluctuation des taux des glucosinolates lors du passage de la 88 phase floraison à la phase nouaison chez *Raphanus raphanistrum*

Figure 7.2: Fluctuation des taux des glucosinolates lors du passage de la 89 phase floraison à la phase nouaison chez *Hirschfeldia incana*

Figure 7.3 : Fluctuation des taux des molécules communes de 92 glucosinolates lors du passage de la phase floraison à la phase nouaison chez les deux espèces étudiées

Figure 7.4 : Fluctuation des taux des glucosinolates lors du passage de la 94 phase floraison à la phase nouaison au niveau des siliques chez les deux espèces étudiées

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1. Coûts sociaux et environnementaux de l'utilisation des pesticides aux Etats-Unis	25
Tableau 1.2. Stratégies d'application de la lutte biologique	27

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ

ABSTRACT

ملخص

REMERCIEMENTS

DÉDICACES

LISTE DES ILLUSTRATIONS ET GRAPHIQUES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

16

CHAPITRE 1 LUTTE ET PROTECTIONS DES PLANTES

20

1.1. Les pesticides, utilisation et limites

22

1.1.1. Résistance :

23

1.1.2. Impact sur la disponibilité faunistique

24

1.2. La lutte biologique

26

CHAPITRE 2 LES BIOPESTICIDES

28

2.1. Diversité des produits biologiques

29

2.1.1. Les biopesticides à bases des microorganismes pathogènes et des ennemis naturels

29

2.1.2. Les biocides d'origine botanique (Biocide inerte)

31

2.1.2.1. Les huiles essentielles

31

2.1.2.2. Les glucosinolates

32

2.1.2.3. Extraits aqueux

33

2.2. Action des crucifères et des composées dérivés des glucosinolates

33

2.2.1. Effets nématocides

35

2.2.2. Effets acaricides

36

2.2.3. Effets herbicides

36

2.2.4. Effets bactéricides

36

2.2.5. Effets fongicides

37

CHAPITRE 3 LA FAMILLE DES CRUCIFÈRES	39
(BRASSICACEAE)	
3.1. Les fleurs	39
3.2. Les étamines.	40
3.3. Nectaires	40
3.4. Le fruit des Crucifères	40
3.4.1. Variations des fruits	41
3.4.1.1. La silique.	41
3.4.1.2. La silicule	41
3.4.1.3. Fruit composé d'un ou plusieurs articles.	44
3.4.1.4. Caractères de la graine et de l'embryon.	44
CHAPITRE 4 LES GLUCOSINOLATES	45
4.1. Diversité structurale et distribution des glucosinolates	45
4.2. Biosynthèse des glucosinolates	46
Les systèmes enzymatiques impliqués dans la formation aldoxime	47
4.3. Dégradation de glucosinolates	48
4.3.1. La compartimentation de myrosinases et en glucosinolates	48
4.3.2. Produits de dégradation en glucosinolates	51
4.4. Régulation du métabolisme des glucosinolates	51
4.4.1. Régulation de la biosynthèse	52
4.4.2. Règlement de la dégradation	53
4.5. Métabolisme des glucosinolates dans le règlement de croissance et de la défense	54
4.6. Quelques isothiocyanates et indoles étudiés pour leurs propriétés anticancéreuses	56
CHAPITRE 5 MATÉRIEL ET MÉTHODES	57
5.1. Présentation de la région d'étude	57
5.1.1. Présentation de la région de Mitidja	57
5.1.1.1. Situation géographique	57
5.1.1.2. Bioclimat des régions d'étude	58
5.1.1. 2.1. La pluviométrie	58
5.1.1.2. 2. Les températures	59
5.1.1.2.3..Les vents, la grêle et la gelée	60

5.1.2. Climatologie des régions d'étude	61
5.1.2.1. Étage bioclimatique (Climagramme d'EMBERGER)	61
5.1.2.2. Synthèse climatique	62
5.1.3. Présentation du site d'étude	63
5.2. Matériel d'étude	65
5.2.1. Description d' <i>Hirschfeldia incana subsp. Incana L</i>	65
5.2.1.1 Classification	65
5.2.1.1.1. Description	65
5.2.1.1.2 Habitat	65
5.2.1.2 Description <i>Raphanus raphanistrum L</i>	65
5.2.1.2.1 Classification	65
5.2.1.2.2 Description	66
5.3. Méthodologie du travail	66
Récolte et conservation du matériel végétal	66
5.4. Extraction et dosage des glucosinolates par HPLC	67
5.4.1. Matériel:	67
5.4.2. Manipulation:	67
5.4.3. Analyses HPLC-UV	68
5.5. Analyses multivariée (PAST vers. 1.37,	68
CHAPITRE 6 RÉSULTATS ET INTERPRÉTATIONS	69
6.1. Composition chimique en glucosinolates de <i>Raphanus raphanistrum</i> et d' <i>Hirschfeldia incana (L)</i>	69
6.2. Accumulation globale en glucosinolates chez <i>Raphanus raphanistrum</i> (L) et <i>Hirschfeldia incana (L)</i>	71
6.3. Accumulation globale en glucosinolates des différents stades phénologiques de <i>Raphanus raphanistrum (L)</i> et d' <i>Hirschfeldia incana (L)</i>	71
6.4. Caractérisation des glucosinolates de <i>Raphanus raphanistrum (L)</i> et d' <i>Hirschfeldia incana (L)</i>	72
6.5. Caractérisation des glucosinolates de <i>Raphanus raphanistrum (L)</i> et d' <i>Hirschfeldia incana (L)</i> en fonction des stades phénologiques	73
6.6.. Accumulation globale en glucosinolates dans les des différents organes de <i>Raphanus raphanistrum (L)</i> et d' <i>Hirschfeldia incana (L)</i>	75

6.7. Accumulation globale en glucosinolates des différents organes de <i>Raphanus raphanistrum</i> (L) et d' <i>Hirschfeldia incana</i> (L) en fonction des stades phénologiques	76
6.8. Caractérisation des glucosinolates des différents organes de <i>Raphanus raphanistrum</i> (L) et d' <i>Hirschfeldia incana</i> (L) en fonction des stades phénologiques	78
6.9. Evaluation de l'accumulation des molécules bioactives	80
CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE	86
7;1. Cinétique d'accumulation des glucosinolates chez les deux espèces entre la phase floraison et la phase nouaison	87
7.2. Cinétique d'accumulation des molécules communes chez les deux espèces entre la phase floraison et la phase nouaison	91
7.3. Cinétique d'accumulation des molécules de glucosinolates au niveau des siliques pour les deux espèces	93
CONCLUSION GÉNÉRALE	98
APPENDICES	101
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	119

INTRODUCTION

Les problèmes de lutte phytosanitaire qui se posent à l'humanité en ce début du XXI^{ème} siècle sont aussi nombreux et divers qu'ils ont pu l'être tout au long de l'histoire de l'agriculture. Il suffit de s'attarder sur les peintures des cavernes chinoises datant de 4 000 ans avant notre ère, les dessins rupestres du Tassili n'Ajjer dans le Sahara ou d'examiner des fresques et papyrus égyptiens datés de 2 300 ans avant J.-C. Les invasions des criquets migrateurs sont atemporelles et universelles, que ce soit dans l'Égypte de l'époque des pharaons, dans les états américains du sud de 1874 à 1876 ou dans le Sahel. Elles sont récurrentes, comme celle qui a débuté à la fin de l'été 2004, et elles montrent toujours la même intensité destructrice. Ces exemples illustrent que la survie de l'espèce humaine est en grande partie fonction de sa capacité à protéger les végétaux essentiels à son alimentation, dans les champs ou après la récolte. La mise en œuvre, par les hommes du néolithique, de moyens pour mettre cette nourriture à l'abri des ravageurs phytophages, remonte, elle aussi, loin dans le temps puisque des fouilles archéologiques en font foi [1]

La préservation des cultures et des récoltes s'inscrit comme « *un phénomène de compétition entre consommateurs au premier rang desquels s'affrontent l'Homme, l'Insecte et le Rongeur* ». En effet, une part considérable de ce que l'agriculture produit est perdue du fait des maladies et des ravageurs qui se développent aux dépens de plantes que l'homme cultive et des denrées qu'il entrepose. Ils deviennent ainsi des « ravageurs », concurrents de l'homme pour la consommation de la production végétale. Ce dernier a longtemps

toléré (et les tolère encore dans certains pays) les pertes diverses, faute d'armes pour les combattre et habitué qu'il était à la fatalité de récoltes faibles et très variables en quantité et en qualité. Très inventifs, nos prédécesseurs surent mettre à profit les connaissances de leur époque. L'avènement, au XIX^e siècle d'une agriculture spéculative et les progrès de l'agronomie ont amené à rechercher les moyens de réduire autant que possible les déprédations des insectes, acariens, nématodes, oiseaux et autres rongeurs.

Ainsi, la protection des cultures s'inscrit dans l'histoire de l'humanité et de l'agriculture. Son évolution est intimement liée à notre passé et sans doute orientera de manière décisive notre futur. Aussi est-il temps de dresser un bilan de la situation qui prévaut maintenant et d'avancer des propositions pour l'avenir.

L'agriculture biologique est un mode de production respectueux des équilibres naturels. Elle connaît depuis les années 1990 un fort développement au niveau mondial et européen, même si ce développement semble moins marqué en France, par rapport à d'autres pays européens. Ce mode de production a fait l'objet d'un plan de développement en Algérie pour la période 1997-2003, auquel vient de succéder en février 2004 un plan de relance¹, affichant la volonté des pouvoirs publics de développer ce mode de production agricole.

L'emploi de produits chimiques de synthèse est normalement interdit. La priorité est donnée à la recherche de l'autosuffisance de l'exploitation en matière de fertilisation et à la maîtrise des adventices, des maladies et des ravageurs par des pratiques culturales appropriées et le maintien de la biodiversité. Cependant, les agriculteurs biologiques peuvent être amenés à utiliser et à s'approvisionner en fertilisants et en produits phytosanitaires (produits phytopharmaceutiques naturels, micro-organismes, macro-organismes), à l'extérieur de l'exploitation, particulièrement en maraîchage, en arboriculture et en viticulture.

Trois mouvements fondateurs de l'agriculture biologique sont nés en Europe dans la première moitié du vingtième siècle : l'agriculture biodynamique, l'agriculture organique et l'agriculture biologique. Ces trois mouvements pionniers

se fondaient, avec des nuances particulières à chacun, sur les principes suivants : le lien entre agriculture et nature et le respect des équilibres naturels, l'importance du sol et de sa préservation par des matières organiques compostées, le concept d'agriculture durable, l'autonomie de l'exploitation agricole en particulier vis-à-vis des énergies non renouvelables. Ces mouvements se sont développés également en parallèle aux Etats Unis

Du point de vue de la fertilisation et de la protection phytosanitaire, les trois mouvements prônent principalement le recours aux matières organiques compostées, aux rotations adaptées, aux variétés appropriées et au maintien de la biodiversité. L'agriculture biodynamique se distingue par l'emploi de préparations à base de plantes et d'extraits animaux. [2]

L'utilisation des produits phytosanitaires (organiques et de synthèse) a «explosé» depuis la fin de la 2^{ème} guerre mondiale et a engendré un essor considérable des productions agricoles et alimentaires. Les produits phytosanitaires ont donc participé à la révolution agricole de la 2^{ème} moitié du 20^{ème} siècle.

Ce n'est qu'à partir des années 1960 que l'on prend conscience de l'impact environnemental négatif de ces produits phytosanitaires. On s'est d'abord rendu compte de la modification de la faune et de la flore du sol, de la contamination de l'air et de l'eau sous l'effet des intrants chimiques utilisés. Ces derniers ont induit des phénomènes de résistance aux pesticides chez les nuisibles (plantes, insectes, champignons). Et pour finir, l'utilisation inconsidérée de ces produits de synthèse a généré de la toxicité à long terme directement ou indirectement pour l'homme *via* les animaux.

Les extraits de plantes ont joué un rôle important très tôt dans les activités thérapeutiques et par la suite agricoles de l'humanité et sont à la base de plusieurs observations anciennes qui ont structuré les disciplines naissantes de la biologie au XVII^{ème}, XVIII^{ème} et début du XIX^{ème} siècle. Mieux cernés à la fin du XX^{ème} et au début du XXI^{ème} siècle, ils sont de nouveau d'actualité en ce début du XXI^{ème} siècle en raison des choix de société qui se posent aujourd'hui à

l'ensemble de notre planète : notamment la mondialisation, le développement durable, les exigences de consommateurs plus avertis et la préservation de la biodiversité. Il est donc temps de dresser un bilan de leur utilisation passée et des perspectives qui s'ouvrent à eux dans le cadre de l'agriculture durable. [3]

Notre objectif, c'est d'évaluer le potentiel des Brassicaceae et leur teneur en glucosinolates (GLS) donc leur capacité de lutter contre les maladies et ravageurs des plantes.

Dans le cadre du développement durable, la principale approche de ce travail consiste à déterminer la composition et la teneur en GLS de deux espèces de crucifères *Raphanus raphanistrum L* et *Hirschfeldia incana L*, largement répandues en Algérie, cette étude à porter sur la caractérisation des molécules bioactives, l'évaluation des teneurs en GLS et la répartition dans les différents organes au cours des phases critique de la plante a savoir la phase de floraison et la phase de nouaison.

CHAPITRE 1

LUTTE ET PROTÉCTIONS DES PLANTES

Les plantes, comme tous les organismes vivants, subissent l'action de divers parasites. Qu'ils soient végétaux ou animaux (champignons, insectes...), ces organismes nuisibles s'attaquent directement aux tissus des plantes où indirectement par la concurrence pour les ressources (eau, éléments nutritifs du sol...). Pour des raisons pratiques et économiques, les cultures végétales ont été développées sur des surfaces relativement grandes réservées à la monoculture. Cela simplifie les systèmes écologiques, le plus souvent au détriment de la complexité inhérente au milieu naturel d'origine. Les populations d'organismes nuisibles ont alors tendance à augmenter ce qui accentue la gravité des dommages potentiels infligés aux cultures [4].

Les dommages causés par les insectes sont parfois si sévères que la récolte est complètement perdue [5]. A titre exemple, la contamination incontrôlée des champs de pomme de terre par le champignon pathogène *Phytophthora infestans* est la cause directe de la famine qui a frappé l'Irlande au milieu du XIXe siècle. La compétition entre les plantes cultivées et les mauvaises herbes entraîne de grandes pertes de rendement allant de 24 % à 99 % [6]. Globalement, les pertes avant récolte sont de l'ordre de 20 à 40 % tandis que les pertes post-récolte (denrées stockées) représentent 10 à 20 % [7].

Les impératifs de rentabilité qui imposent l'obtention de rendements élevés en produits végétaux de qualité, associés à la spécialisation des cultures par région, font de la protection des plantes une activité vitale en agriculture et en foresterie.

La lutte contre les ennemis des cultures a fait d'énormes progrès au cours du 20^e siècle. Ces progrès ont été rendus possibles par des percées scientifiques et techniques notamment en chimie (analytique et de synthèse) et en biologie (dynamique des populations, analyse des écosystèmes, théorie et pratique de la lutte biologique, biotechnologie).

Ajouté à la lutte contre les ennemis des cultures, la croissance démographique qui caractérise cette fin du deuxième millénaire pose le problème de la sécurité alimentaire. La population mondiale était évaluée à 5,7 milliards en 1995 et devrait se stabiliser entre 7,9 et 11,9 milliards vers 2050. Cette croissance de la population sera le facteur principal d'accroissement de la demande alimentaire mondiale avec pour résultat un besoin accru de méthodes de protection des plantes de plus en plus performantes [8]. La réduction des surfaces cultivables en raison de l'urbanisation et de l'érosion des sols vient amplifier le problème (Figure. 1.1).

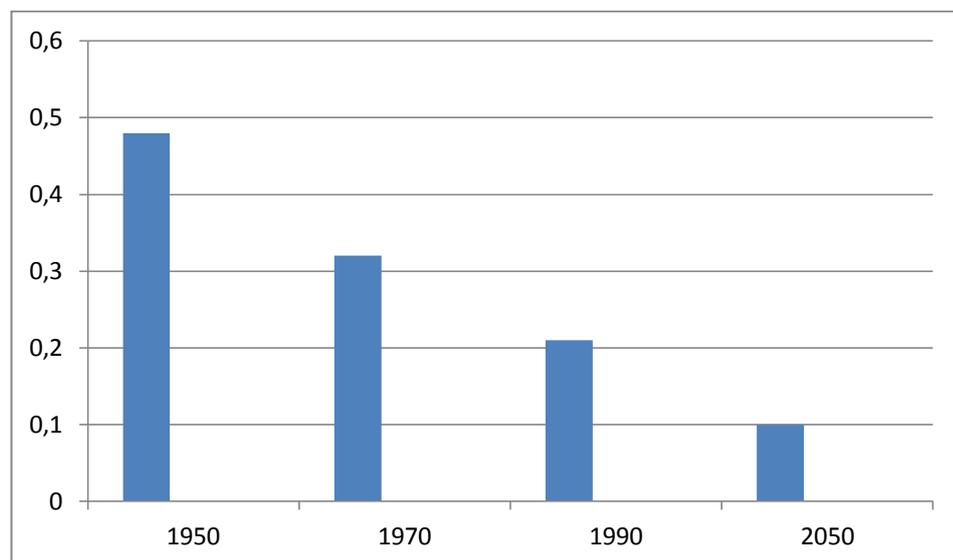


Figure 1.1. : Réduction des surfaces cultivables par habitant [9].

Les facteurs agissant sur l'équilibre entre l'approvisionnement agro-alimentaire et la demande en aliments sont nombreux et complexes. Cela ouvre de nombreux axes d'action pour créer et maintenir cet équilibre. Toutefois, il y a aujourd'hui consensus autour de l'idée que «*l'augmentation de la production agricole et alimentaire est la clé d'un approvisionnement alimentaire suffisant. La*

sécurité alimentaire exige une action soutenue. Cette action doit viser la mise au point et la diffusion de nouvelles technologies respectueuses de l'environnement» [10].

1.1. Les pesticides, utilisation et limites

Avec l'apparition des pesticides de synthèse il y a environ 50 ans, certains ont imaginé que les ennemis des cultures seraient battus en brèche et éliminés [11]. De toute évidence, cela ne s'est pas produit. Toutefois, l'augmentation de la quantité et de la qualité des denrées agricoles produites n'est certainement pas étrangère à l'utilisation des pesticides et les agriculteurs ayant accès aux pesticides de synthèse sont rarement victimes d'infestations dévastatrices [12].

Selon METCALF [13], les avantages des pesticides se résument par les qualités suivantes : facilité de mise en œuvre, simplicité d'emploi, efficacité, flexibilité d'utilisation et coût économique raisonnable. Ils représentent le seul moyen d'intervention efficace sur des populations de ravageurs dont la densité dans la culture s'approche du seuil économique des dégâts. Il faut agir vite, sans perte de temps, et il faut que l'effet soit immédiat, sous peine de dépasser ce seuil. Ils ont une action curative rapide et sont susceptibles de stopper la dynamique d'une population de ravageurs ou l'infestation par des pathogènes en quelques jours, voire en quelques heures.

Le rapport coût/bénéfice du traitement pesticide est en général très avantageux du fait que ces molécules sont produites en quantités importantes à moindre coût pour une utilisation mondiale. Néanmoins, leur coût de production augmente du fait de la synthèse de molécules plus complexes et d'une réglementation d'homologation plus contraignante (évaluation de la toxicologie, ecotoxicologie...).

Toutefois, la recherche de nouvelles molécules continue pour répondre à de nouvelles exigences sociétales de respect de l'environnement et aussi du fait de l'adaptation des ennemis des cultures à ces molécules.

1.1.1. Résistance :

La résistance aux pesticides touche l'ensemble des ennemis des cultures. Le phénomène n'est pas nouveau. La résistance aux insecticides a été signalée pour la première fois en 1914 [4]. La résistance aux fongicides est un problème préoccupant depuis la mise sur le marché des fongicides modernes [14]. Par ailleurs, on avait déjà signalé quelques cas de résistance aux herbicides avant la découverte de la résistance de *Senecio vulgaris* L. aux triazines en 1968 [15]. Le taux de croissance du nombre d'insectes ou de mauvaises herbes ayant développé une résistance aux pesticides est édifiant (Figure. 1.12.). Depuis les années 70, ces taux sont relativement constants malgré la prise de conscience du phénomène et les efforts pour mettre en pratique des stratégies visant à freiner le développement de populations résistantes.

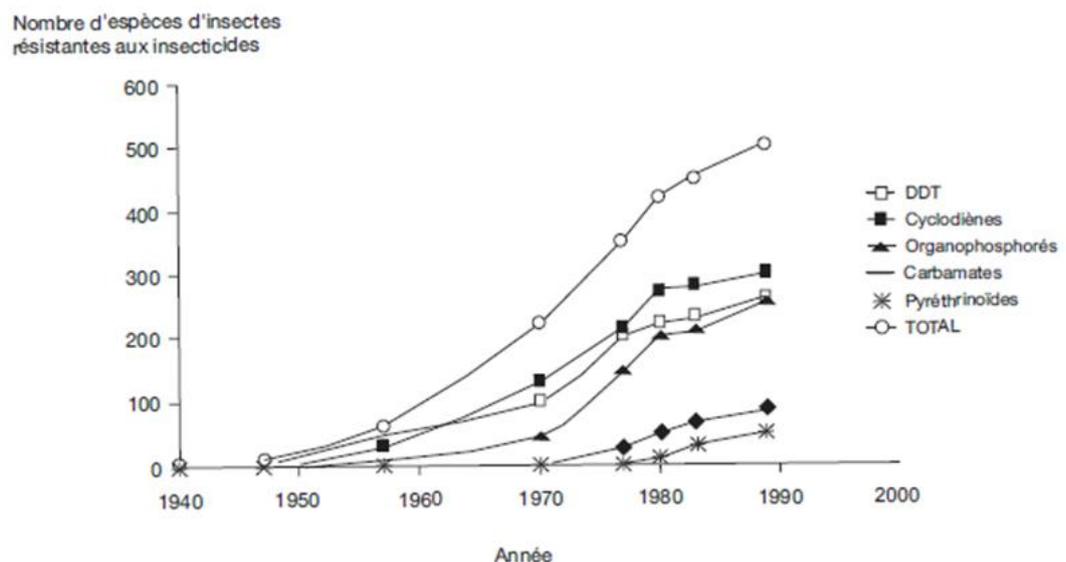


Figure 1.2. : Evolution du nombre d'espèces d'insectes résistants [4].

Entre 1980 et 1990, le taux de croissance moyen de la résistance a été de 7 espèces d'insectes par an (fig. 1.12) et de 10 mauvaises herbes par an [15]. Il est aujourd'hui clair que la résistance peut se développer à l'égard de tout produit phytosanitaire. L'apparition de cas de résistance croisée à des substances actives à cibles physiologiques différentes, heureusement plus rare, constitue néanmoins un facteur d'aggravation du risque d'échec. Cela limite les possibilités d'un usage prolongé des matières actives nouvelles en protection des plantes [14]. En

conséquence, cet usage ne peut plus être envisagé en dehors des programmes de lutte intégrée qui vont contrecarrer l'apparition de résistance. Ce contexte est favorable au développement et à l'intégration des outils de lutte physique et des molécules naturelles végétales ou animales venant enrichir ces programmes qui ne peuvent en aucun cas être basés sur le tout-pesticide pour les raisons évoquées ci-dessus [4], [14].

1.1.2. Impact sur la disponibilité faunistique

Les effets secondaires de l'utilisation des pesticides sont nombreux; effets sur la santé des personnes, de la faune et de la flore, contaminations des eaux, du sol et de l'air. PIMENTEL *et al.* [16], avancent le chiffre impressionnant de 3 millions d'empoisonnements par an dans le monde par les pesticides avec 220 000 morts au total, chiffres officiels de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

Ainsi, si les effets sur les cultures paraissent immédiats, l'impact sur la faune et la flore et la santé de l'homme apparaissent plus tardivement. Cela complique considérablement l'évaluation de l'impact de ces molécules en termes de santé et de coût sur l'environnement d'une manière générale.

En 1969, Simmons cité par Bouguerra [17], estimait déjà à 150 000 le nombre annuel d'empoisonnements par les insecticides et avec, au bout du compte, 150 morts recensés par an. Ces chiffres sont légèrement inférieurs aujourd'hui. Néanmoins, les estimations les plus fiables ne concernent que les pays industrialisés. Ailleurs, les accidents fatals sont probablement plus nombreux. En 1991 en France, plus de 8 500 intoxications par les produits phytosanitaires ont été enregistrées [18].

Les indicateurs économiques rassemblés par Pimentel *et al.* [16], permettent de comparer l'importance des différents effets secondaires (tableau 1.2).

Tableau 1.1. Coûts sociaux et environnementaux de l'utilisation des pesticides aux Etats-Unis [16].

Impact	Coût relatif (%) Coût total : \$US 8123 000 000/ année
Oiseaux sauvages	25,8
Contamination des eaux souterraines	22,2
Coûts de la résistance aux pesticides	17,2
Pertes de récolte	11,6
Santé publique	9,7
Pertes d'ennemis naturels	6,4
Abeilles et impact sur la pollinisation	3,9
Encadrement par les services publics	2,5
Autres	<1

Les coûts environnementaux dominent alors que les coûts ayant un impact direct sur la production agricole représentent 39,1 % (résistance, pertes de récolte, pertes d'ennemis naturels et pollinisation). Les coûts en santé publique représentent près de 10 %.

Bien que les indicateurs économiques soient toujours en baisse, ils ont l'avantage de permettre une réévaluation de la rentabilité de l'usage des pesticides. Aux États-Unis, on utilise pour une valeur de 4 milliards \$ de pesticides pour récupérer 16 milliards \$ en produits agricoles. Cela semble très rentable, par contre, si les coûts sociaux et environnementaux sont pris en compte, la marge bénéficiaire se réduit considérablement [16].

Au cours des dernières décennies, l'attention portée aux effets secondaires des pesticides a profondément modifié la perception à l'égard de ceux-ci. De produits quasi-miraculeux, ils sont devenus, pour certains, des produits dangereux que l'on devrait bannir ou, au mieux, un mal nécessaire. L'industrie des pesticides réagit pour modifier cette perception en diffusant des informations montrant les effets secondaires. Par exemple, on fait valoir qu'un verre de jus de pomme provenant de fruits traités avec de l'Alar™ représente un risque 58 fois moins

élevé que les éléments cancérigènes que l'on retrouve dans un seul champignon comestible [17].

L'industrie réagit aussi en développant de nouveaux produits satisfaisant aux normes de plus en plus sévères visant la protection de la santé et de l'environnement. Ces critères écotoxicologiques plus exigeants amènent une augmentation importante des coûts de développement de nouveaux produits phytosanitaires. Pour une nouvelle molécule soumise à l'homologation, le coût des études d'impact sur l'environnement a triplé entre 1982 et 1992 [19]. Il résulte de l'augmentation des coûts l'homologation d'un faible nombre de pesticides pour des cultures pratiquées sur des superficies restreintes pour cause de marché global insuffisant ou, lorsque l'augmentation de profit associé à l'usage des pesticides ne compense pas son utilisation. Pour ces cultures, les outils de lutte physique pourraient bientôt représenter une alternative intéressante [20]. Cette situation a été favorable au développement de la culture biologique qui fait appel à des méthodes respectueuses de l'environnement.

1.2. La lutte biologique

Dans un contexte d'agriculture durable, la lutte biologique, prise dans son sens large peut offrir de nombreuses méthodes de lutte alternatives aux insecticides de synthèse [21], [20], [22], [23]. Plusieurs théories sont fondamentales en lutte biologique, notamment la théorie de la dynamique des populations et la théorie de la quête optimale de nourriture (*Optimal foraging*). En pratique, l'application de la lutte biologique repose souvent sur une multitude d'actions et d'informations complexes et fines. Cette lutte a soulevé beaucoup d'enthousiasme au début du XX^{ème} siècle en raison du succès obtenu par *Rodolia cardinalis* en Californie [24]. Elle bénéficie d'une image séduisante sur le plan scientifique et écologique au sein de la société. Toutefois, le développement et le recours à cette lutte restent lents [25].

On distingue plusieurs stratégies d'application en lutte biologique (tableau 1.3). La première stratégie visant l'exploitation de biocides inertes, est l'approche « biopesticide ». La seconde stratégie est l'exploitation de biocides autonomes, que l'on peut relâcher selon une stratégie de lutte classique, inoculative ou inondative. Il est également possible de favoriser la lutte biologique en intervenant sur le milieu [21].

Tableau 1.2. Stratégies d'application de la lutte biologique [26].

Exploitation de biocides inertes (biotoxines d'origine microbiologique)
Exploitation de biocides autonomes (agent de lutte microbien ou animaux)
Manipulation d'entomophages démontrés efficaces
Libération inoculative (lutttes préventive)
Libération inondative (lutte curative)
Contrôle de <i>Lythrum salicaria</i> L à l'aide de <i>Galeucella culmariensis</i> L.
<i>Trichoerma</i> spp. sur pourriture des racines
Manipulation indirecte par modification du milieu
Protection des ennemis naturels par des mesures spécifiques
Obtention de suppléments nutritifs ou de niches favorables
Rotation des cultures (mauvaises herbes, nématodes, maladies)
Stimulation chimique de l'activité des agents de lutte

CHAPITRE 2

LES BIOPESTICIDES

La lutte biologique correspond à l'utilisation d'organismes et/ou composés naturels pour détruire ou contrôler d'autres organismes nuisibles sur le plan agronomique ou au niveau d'espaces naturels. Ces agents sont regroupés sous l'appellation de « biopesticides ». On distingue des organismes prédateurs (insectes, nématodes, plantes, mammifères, etc....) mais également des protistes (bactéries, virus, champignons) ou des molécules naturelles (phéromones, roténones, etc....) [27]

Les bioinsecticides peuvent se définir au sens large comme des pesticides d'origine biologique, c'est-à-dire, organismes vivants ou substances d'origine naturelle synthétisée par ces derniers, et plus généralement tout produit de protection des plantes qui n'est pas issu de la chimie. [28]. Sous ce vocable, les biopesticides comprennent les agents de contrôle des insectes (auxiliaires) comme les arthropodes entomophages (ex. trichogrammes), les champignons hyphomycètes pathogènes pour les lépidoptères ou coléoptères (ex. *Beauvaria*), les baculovirus responsables des polyédroses nucléaires (NPV) ou des granuloses (GV) chez les lépidoptères, les bactéries (*Bacillus*), etc... , les insecticides d'origine végétale et les molécules de synthèse biologique (phéromones, molécules allélochimiques) .

La faible utilisation des biopesticides peut s'expliquer par l'inconsistance des résultats sur le terrain, la durée d'entreposage très courte, le coût élevé par rapport aux formulations chimiques et le nombre limité de pestes visées Les avantages liés à l'utilisation de biopesticides devraient, par contre, en favoriser

le développement commercial. Ils sont biodégradables, très spécifiques aux pestes et sont sans danger pour les plantes, les animaux et les humains [29]

Les biopesticides sont connus depuis de longue date. Toutefois, la recherche de nouvelles sources s'est accrue avec la prise de conscience de l'impact des molécules chimiques sur l'environnement et la santé humaine. Ces sources ont permis de diversifier non seulement les produits mais également les effets recherchés

2.1. Diversité des produits biologiques

2.1.1. Les biopesticides à bases des microorganismes pathogènes et des ennemis naturels

Les microorganismes pathogènes (virus, champignons, bactéries et protozoaires) et les ennemis naturels (parasitoïdes et prédateurs) sont des antagonistes naturels des insectes et des animaux.

En 1986, Khachatourians reconnaissait environ 650 espèces de virus pathogènes d'insectes. Les infections virales sont généralement mortelles dans un délai assez court. Les plus connus sont les baculovirus et affectent principalement les lépidoptères et les hyménoptères phytophages [30],[31]. Le principal désavantage des virus entomophages demeure la difficulté de les propager en masse à faible coût, compte tenu du caractère obligatoire de leur multiplication à partir de tissus intacts d'insectes [32].

Les bactéries sont les micro-organismes les plus souvent associés aux insectes [33]. Une centaine d'espèces sont spécifiquement entomopathogènes mais seulement quelques types ont été considérés pour la production de biopesticides [31]. Le bacille le plus connu est sans contredit le *Bacillus thuringiensis* (Bt) qui accapare environ 90% du marché actuel des biopesticides [34]. Deux souches sont largement exploitées sous forme de bioinsecticides : le *B.t. israelensis* (contre les diptères (maringouins et mouches noires)) et *kurstaki* (contre les chenilles de lépidoptères) [26]. Actuellement, une dizaine de variétés de *B.t.* sont offerts sur le marché ou exploitables pour réprimer des ravageurs

importants [21]. Ceci a permis aussi le développement de solutions biotechnologiques chez plusieurs espèces végétales médiatement connues sous l'appellation des organismes génétiquement modifiés (OGM).

Environ 700 espèces de champignons sont capables d'infecter des insectes [28]; [31]. *Beauvaria bassiana* est sans contredit le champignon le plus exploité considérant la grande diversité de ravageurs visés : doryphore de la pomme de terre, pyrale du maïs, piéride du chou, thrips des petits fruits, etc... [35],[36] et des recherches intéressantes sont également menées avec *Verticillium lecanii* pour la répression des homoptères ou des thrips en serre et *Metarhizium anisopliae* contre les acridiens [37]

Les ennemis naturels regroupent les parasitoïdes et les prédateurs. Le terme «parasitoïde» fait référence à des entomophages intermédiaires entre les parasites et les prédateurs tandis que les «auxiliaires de lutte» font référence aux insectes parasitoïdes et aux arthropodes prédateurs.

Plus de 15 000 espèces d'insectes sont parasitiques et la majorité d'entre elles le sont pour d'autres insectes [38]. Les parasitoïdes sont caractérisés par un adulte actif ayant de fortes capacités d'orientation et de repérages d'hôtes potentiels. Une vingtaine d'insectes parasitoïdes sont développés contre des ravageurs importants. Parmi ceux-ci, *Encarsia formosa*, contre l'aleurode des serres, est sans contredit la plus largement commercialisée avec les trichogrammes [39]; [40]; [41]. Les arthropodes prédateurs sont les plus fréquemment cités en lutte biologique [42]; [43]. Ces prédateurs ne font pas dans la dentelle; ils tuent la proie capturée. Leur voracité étant un indice utile de son potentiel de répression [44].

Une trentaine de prédateurs polyphages sont actuellement exploités ou en développement. Parmi les plus importants mentionnons les acariens phytoséiides (*Phytoseiulus persimilis*, *Amblyseius fallacis*, *A. cucumeris*, *Hypoaspis* spp., etc...) [45]; [46]; [47]; [41].

Dans les productions serricoles, la lutte biologique contre les insectes et les acariens, de même que l'utilisation des bourdons ont fait diminuer considérablement l'utilisation des insecticides. Les résultats positifs générés par cette lutte biologique incitent les chercheurs à développer davantage d'autres produits, principalement dans les productions ornementales et les espaces verts

2.1.2. Les biocides d'origine botanique (Biocide inerte)

La pharmacopée est en grande partie issue des plantes, même si les laboratoires ont par la suite isolé les molécules intéressantes et appris à les synthétiser. De même, des substances biocides issues du monde végétal ou animal ont supplanté des produits très toxiques utilisés auparavant en réduisant drastiquement les effets secondaires. Plusieurs milliers d'espèces végétales dotées de propriétés pesticides ont été répertoriées [48].

2.1.2.1. Les huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des substances ou extraits de certains végétaux extrêmement puissants. Elles se forment dans un grand nombre de plantes comme sous produits du métabolisme secondaire. Les huiles essentielles sont extraites des plantes par divers procédés dont l'entraînement à la vapeur d'eau et l'hydrodistillation [49] ; [50] et la pression mécanique à froid [51] ; [52] ; [53]. Le choix de la méthode d'extraction dépend de la qualité recherchée et de la nature du matériel végétal à extraire, les huiles essentielles sont de véritables concentrés de substances aromatiques et de principes actifs, d'où leur administration à des doses extrêmement faibles. Quelques gouttes suffisent pour agir sur l'ensemble de l'organisme ou sur un système ou un organe spécifique [19], [54].

Les huiles essentielles des plantes font partie ces dernières années des voies les plus explorées dans la régulation des ravageurs et des pathogènes [55], [56].

Les huiles essentielles sont des complexes naturels de molécules volatiles et odorantes, synthétisées par les cellules sécrétrices des plantes aromatiques. Celles-ci les conservent dans des poches au niveau de certains organes [75]. Les huiles essentielles ont une composition assez complexe. On y trouve généralement de nombreux constituants appartenant principalement à deux grandes familles chimiques : les composés terpéniques et les composés aromatiques dérivés du phénylpropane [58].

La composition des huiles essentielles est très complexe. Terpènes, aldéhydes, cétones, phénols, lactones, esters, en sont les composants principaux (Alilou, 2008). Plus récemment il a été démontré que de nombreux constituants terpénoïdes d'huiles essentielles végétales sont toxiques au contact, pour un large éventail d'insectes et peuvent être utilisés comme insecticides d'origine végétale [59]. Un nombre important de composés chimiques sont connus. De ce type, les plus puissants figurent le thymol, extrait de thym (*Thymus vulgaris*, Lamiacées), la pulégone, extraite de menthe pouliot (*Mentha pulegium*, Lamiacées) et l'eugénol, extrait du clou de girofle (*Eugenia caryophyllus*, Myrtacées) [60].

2.1.2.2. Les glucosinolates

Les glucosinolates, de formule (1'-Thio- β -D-glucopyranosyl-alkyl-Z-N-hydroximin sulphate esters), sont des métabolites secondaires des plantes de l'ordre des *Capparales*, en particulier les *Brassicaceae* [61] [62].

Une grande variété de parasites telluriques a été ciblée pour le contrôle par l'utilisation de glucosinolates (biofumigants), entre autres les insectes, nématodes, champignons pathogènes et les mauvaises herbes, montrant pour l'ensemble une sensibilité à l'inhibition par les produits d'hydrolyse de glucosinolates [63], [64].

Ces molécules semblent prometteuses pour lutter contre les maladies post-récolte surtout *Penicillium expansum* et *Monilinia laxa*. En particulier, allyl-isothiocyanate (AITC) de *Brassica carinata*, butenyl-isothiocyanate de

gluconapine de *Brassica rapa*, le 2-phényléthyl isothiocyanate de gluconasturtine de *Barbarea verna* et le 4-méthyl-thiobutyl isothiocyanate de glucoerucine extrait d'*Eruca sativa* qui ont été testés et inoculés sur les poires et les fruits à noyaux. Les traitements ont été efficaces 24 h et 48 h après l'inoculation de poires [65]. Ainsi, un effet anti-appétant de la sinigrine a été rapporté pour les pucerons, *Aphis fabae*, *Acyrtosiphon solani* et *Aphis pisum*, et même pour un criquet très polyphage comme *Melanopus sanguinipes* qui consomme moins de feuilles de Crucifères en rapport avec leur taux de glucosinolates [66].

2.1.2.3. Extraits aqueux

Les substances d'origine végétale ont toujours constitué une source majeure pour l'élaboration de nouvelles substances aux propriétés thérapeutiques. Dans cette optique, l'utilisation d'extraits de plantes dotées d'activités insecticides offre une certaine potentialité [67]; [68].

Actuellement, on rapporte que plusieurs milliers d'espèces de plantes possèdent des propriétés de lutte antiparasitaire [69].

A l'origine, cette démarche visait la réduction du nombre d'interventions avec des pesticides tout en minimisant leurs effets secondaires. Par conséquent, le développement des futurs biopesticides d'origine végétale, est une méthode plus saine et écologique pour la protection des plantes [70].

2.2 Action des crucifères et des composés dérivés des glucosinolates

Les actions négatives des glucosinolates et des composés qui en sont issus, essentiellement les ITC, regroupent, comme pour les substances des *Allium*, des actions comportementales et physiologiques, en particulier la répulsion des adultes, antiappétence larvaire et la toxicité.

Un effet toxique de certains glucosinolates, gluconapine et gluconasturtine, a été mentionné chez *P. xylostella* [71]. Ainsi, un effet antiappétant de la sinigrine a été rapporté pour les pucerons, *Aphis fabae*,

Acyrtosiphon solani et *A. pisum*. Même un criquet très polyphage comme *Melanopus guinipes* consomme moins de feuilles de crucifères en rapport avec leur taux de GLS. L'effet toxique de la sinigrine a été bien démontré pour les larves de *Papilio polyxenes* et moins nettement pour *Spodoptera eridania*. Ces différences de sensibilité à la sinigrine se constatent également entre *A. fabae*, très sensible, et *M. persicae*, peu sensible [72]. Ce résultat est sans doute à rapprocher du fait que ce puceron est un ravageur connu des crucifères.

Comparativement aux effets négatifs, les effets positifs sur les insectes inféodés aux crucifères ont été de loin les plus étudiés [73]. Là encore les études ont montré, à partir des résultats obtenus en attraction, la possibilité de réaliser des pièges efficaces par émission de ITC, particulièrement de AITC. C'est le cas dans des cultures de colza, *B. napus* var. *oleifera*, en avertissement agricole pour les petites altises, *Phyllotreta* spp., la mouche du chou *D. radicum* -et des Coléoptères, tels la cécidomie du colza, *Dasyneura brassicea*, le charançon des siliques *Ceuthorrynchus assimilas*, le charançon de la tige, *Ceuthorrynchus Napi* et des *Meligethes* sp. C'est le cas également dans des cultures de rutabaga de nombreuses altises du genre *Phyllotreta* [74].

Pourtant les travaux les plus récents tendent à identifier comme inducteurs du dépôt des oeufs de chaque espèce d'autres GLS plus spécifiques que la sinigrine. ainsi. la Lucobrassicine, un GLS indolique, est considérée comme équivalent à extrait de chou pour la piéride au chou, *P. brassicae*. et pour la piéride de la rave, *P. rapae* [75]. Ce GLS est même le plus actif alors que la Sinigrine l'est peu et la Glucoibérine est totalement inactive [76].

Signalons enfin les effets de quelques rares composés soufrés n'appartenant pas aux deux classes précédentes. Ainsi, l' α -terthiénylyle des *Asteraceae* est très toxique pour les larves de moustiques, de simulies et de lépidoptères phytophages, ainsi que pour des nématodes [77],.

2.2.1 Effets nématocides

La plupart des études sur les effets nématocides des *Allium* et des composés soufrés issus de la cystéine ont eu pour cible le nématode *Meloidogyne incognita*. Isolés des extraits nématocides d'*Allium gravi* et d'*Allium fistulosum*, le TSMP, le DSP₂, le DSA₂, le TiP₂, le TiMPE et le ToP₂ se révèlent les plus actifs [78]. Parallèlement, il a été montré que les extraits d'ail sont actifs, allicine pouvant être utilisée pour protéger les plants de tomate en plongeant les racines dans une solution d'allicine à 25 ppm pendant 5 minutes. Des études en cours (Groupe de Recherche en Agriculture Biologique, GRAS) indiquent que le DSM₂ et surtout le DSP₂, plus faciles à utiliser que les Ti, ont des effets ovicides et larvicides importants sur *M. incognita*. Enfin, signalons que l'acide asparagique a été cité comme possédant une puissante activité nématocide.

Concernant les crucifères, l'usage d'engrais verts à base de nombreuses plantes sauvages et cultivées a souvent été recommandé pour lutter contre les nématodes à galles ou à kystes des racines par biofumigation. C'est aussi un argument important pour l'introduction ou le maintien de certaines crucifères dans les rotations de cultures sensibles [79].

L'activité nématocide des ITC a été montrée sur de nombreuses espèces comme les méloïdogynes, tel *Heterodera schachtii* ou encore divers *Pratylenchus* [79]. Une démarche d'amélioration variétale a été initiée afin d'augmenter la quantité de 2-phényléthyl GLS dans les racines de canola, *Brassica napus*. On peut s'interroger à ce sujet sur l'incidence de l'amélioration des variétés de colza à teneur minimale en GLS sur la prolifération des nématodes. Le MITC est depuis longtemps utilisé en fumigation du sol avec une efficacité intéressante contre les nématodes, aussi bien associé aux solvants chlorés (Trapex) que généré *in situ* à partir de précurseurs solides ou liquides (dazomet et métham sodium). Une étude comparative avec le bromure de méthyle a montré sur un nématode à kyste *Globodera* sp. (Fritsh, communication personnelle) que le MITC était vingt fois plus actif que le bromure de méthyle selon la méthode des Probits.

2.2.2 Effets acaricides

Très peu d'études ont été publiées sur le pouvoir acaricide des *Allium*, des crucifères et de leurs composés soufrés. Un travail démontre cependant que des extraits d'ail et des préparations à partir de ces extraits présentent des effets répulsifs contre l'acarien *Tetranychus urticae* [80]. Bien que ne s'intéressant pas directement à la protection des végétaux, signalons un brevet de 1994, concernant l'effet d'extraits d'ail sur l'acarien *Varroa jacobsoni* nuisible aux abeilles.

2.2.3 Effets herbicides

Peu de travaux relatifs à l'action des composés des *Allium* ou des composés dérivés de la cystéine sur d'autres végétaux ont été publiés. Des composés de la famille de l'acide asparagique inhibent complètement la croissance des racines et de l'hypocotyle de la laitue. Les composés volatils de l'ail et du raifort, DSM₂, DSA₂ et DSP₂ provoquent l'arrêt de la dormance chez le glaïeul, *Gladiolus* spp., chez des pivoines, *Paeonia suffruticosa* et chez des *Prunus* ornementaux [81].

Les plantes productrices de GLS, par contre, ont montré une nette activité herbicide déjà suspectée par Bell et Müller [71] qui avaient remarqué l'inhibition de la germination des graines à proximité de *Brassica nigra*. Le MITC montre la même propriété puisqu'on préconise un long délai de remise en culture après fumigation des sols avec ce principe actif.

2.2.4. Effets bactéricides

Les effets toxiques des *Allium* et de leurs composés soufrés sont connus depuis longtemps chez les bactéries pathogènes pour l'homme, mais encore trop peu de travaux ont été réalisés sur les bactéries pathogènes des végétaux. On peut noter les résultats obtenus en cultures associées sur *Pseudomonas solanacearum*. Dans les cultures de tomate associées à la ciboulette chinoise, il y a une diminution du développement de la flétrissure de la tomate due à *P.*

solannacearum. Comme pour les champignons plusieurs bactéries sont sensibles à divers *Allium* et à leurs extraits [48]. Par exemple, *Erwinia carotovora* et *Agrobacterium tumefaciens* sont sensibles à *Allium tricoccum*, *Allium cernurum* et *A. sativum*. Ce dernier agit par ailleurs sur plusieurs espèces de *Pseudomonas* et de *Xanthomonas*.

Bien qu'un effet de la sinigrine et de l'AITC correspondant sur le virus de la mosaïque du navet ait été décrit [82], il n'y a pas d'autres références concernant une éventuelle activité sur les bactéries phytopathogènes.

2.2.5 Effets fongicides

Les effets toxiques des *Allium* sur les champignons ont été étudiés surtout les champignons pathogènes pour l'humain. Plusieurs travaux se sont intéressés aussi aux champignons pathogènes des plantes. KADOTA, H. et Y. ISHIDA [83] rapportent que les thiols et les sulfures sont toxiques pour *Botrytis allii* et que le DSM, empêche la germination d'*Aphanomyces euteiches*, champignon responsable de la pourriture des racines du pois. À l'inverse, ces substances et surtout leurs analogues à groupement P et A induisent la multiplication des sclérotés de *Sclerotium cepivorum*, la pourriture blanche des *Allium*. Dans leur imposante revue sur les propriétés phytosanitaires des plantes, GRAINGE, M. et S. AHMED [48] citent de nombreux champignons phytopathogènes sensibles aux *Allium* et à leurs extraits.

Citons par exemple *Alternaria tenuis*, *Aspergillus niger*, divers *Fusarium* dont *F. oxysporum* et *F. poae* ou *Verticillium albo-atrum*, qui sont sensibles à l'oignon et l'ail, alors que *Phytophthora infestans* est sensible à la ciboulette chinoise, *Allium tuberosum*.

Parallèlement, l'utilisation des crucifères en amendement (biofumigation), soit sous forme d'engrais vert, soit sous forme de tourteaux est censée réduire les populations de pathogènes des racines comme *A. euteiches* [84] et *F. oxysporum* ainsi que les champignons de conservation [85].

Les ITC sont responsables de cette activité fongicide et l'AITC semble être le plus efficace [86], si bien qu'un programme d'amélioration variétale des moutardes orienté vers l'augmentation des concentrations racinaires et foliaire en AITC a été développé [87] en corrélation avec le niveau de population de *Helminthosporium solani*, *Verticillium dahliae*, deux pathogènes importants de la pomme de terre [86]. Cette activité correspond à l'un des principaux objectifs de la fumigation des sols.

CHAPITRE 3

La famille des Crucifères (*Brassicaceae*)

Cette grande famille comprend environ 380 genres et 3.000 espèces, qui se croissent pour la plupart des les régions méditerranéennes, tempérées et froides de l'hémisphère nord. Les Brassicacées sont le plus souvent des herbes à feuilles presque toujours alternes et dépourvues de stipules, souvent en rosette basale.

La structure de la fleur est la caractéristique principale des Brassicacées. Elle est constituée de 4 sépales libres, de 4 pétales libres opposés en croix (d'où leur nom de Crucifères), de 6 étamines et d'un ovaire supère formé de 2 carpelles soudés, divisés en 2 loges par une fausse cloison. Les fleurs sont disposées en grappes terminales denses, s'allongeant considérablement après la floraison, parfois en corymbe. Normalement, le fruit mûr, divisé en 2 loges, s'ouvre de bas en haut par 2 valves qui laissent s'échapper les graines. Une silique est un fruit allongé, plus de trois fois plus long que large, et une silicule, dans le cas contraire. Le fruit est parfois indéhiscent, éventuellement avec des articles se séparant transversalement. Le style peut aussi renfermer des graines et se transformer en bec. La grande diversité des fruits ainsi que la couleur de la fleur facilitent considérablement leur identification. Presque toutes les adventices de cette famille sont annuelles ou bisannuelles, plus rarement vivaces. [88]

3.1 Les fleurs



Figure 3.1. *Bunias erucago*[88]



Figure .3.2. *Cakile maritima* Scop., [88]

Cette homogénéité se retrouve aussi dans la couleur des pétales : souvent jaunes ou blancs, moins fréquemment mauves (d'autres couleurs peuvent se présenter).

3.2 Les étamines.

En général, 6 étamines dont 4 plus grandes. L'androcée est alors dite tétradyname.

3.3 Nectaires

Les étamines présentent à leur base des glandes appelées nectaires

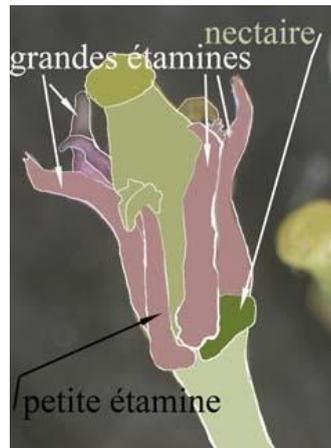


Figure 3.3 *Crambe maritima* L., le Chou marin. Dissection montrant la position des étamines et des nectaires. [88]

3.4 Le fruit des Crucifères

Le fruit des Brassicaceae est lui aussi très homogène. Le pistil est composé de deux carpelles soudés. Il se termine par un bec court. Les ovules s'insèrent sur la paroi de l'ovaire. La placentation est pariétale. Cet ovaire est séparé par une cloison mince non vascularisée. Elle résulte du développement de la zone placentaire. Il est généralement composé de deux carpelles à placentation pariétale.



Figure 3.4 Fruit de *Erysimum cheiri* (L.) Crantz, à gauche fruit entier, à droite fruit ouvert découvrant les graines et la "fausse cloison" [88].



Figure 3.5 Coupe transversale de la silique de *Erysimum c.* au niveau de 2 graines[88]

3.4.1 Variations des fruits.

3.4.1.1 La silique.

Fruit sec allongé, à deux loges, au moins trois fois plus long que large = silique



Figure 3.6 *Brassica species* [88]



Figure 3.7 *Sinapis alba* [88]L.

3.4.1.2 La silicule

Fruit sec moins de trois fois plus long que large = silicule

Le fruit des Brassicaceae est lui aussi très homogène. **Un exemple : la Giroflée (*Erysimum cheiri* (L.) Crantz (= *Cheiranthus cheiri* L.).**

Le pistil est composé de deux carpelles soudés. Il se termine par un bec court.



Figure 3.8 *Matthiola tricuspidata* (L.) [88]



Figure 3.9 *Matthiola tricuspidata* (L.) [88]



Figure 3.10 *Erysimum cheiri* (L.) Crantz, la Giroflée. Un des carpelles de la silique a été enlevé. On distingue la "fausse cloison" et des graines [88]



Figure 3.11 *Alyssum montanum* (L) [88]



Figure 3.12 *Biscutella auriculata* (L.), [88]



Figure 3.13 *Biscutella auriculata* (L.). [88]



Figure 3.14 *Capsella bursa-pastoris* (L.) [88]



Figure 3.15 *Capsella bursa-pastoris* (L.). [88]



Figure 3.16 *Camelina sativa* (L.) Crantz [88]



Figure 3.17 *Iberis amara* (L.) [88]



Figure 3.18 *Iberis pinnata* (L.) [88]



Figure 3.19 *Bunias erucago* (L.). [88]



Figure 3.20 *Thlaspi arvensis* (L.) [88].

3.4.1.3 Fruit composé d'un ou plusieurs articles.

Par extension on appelle ces types de fruits des siliques.



Figure 3.21 *Cakile maritima* Scop..(L) Silique à deux articles superposés, chacun à une seule graine. L'article supérieur est caduc[88]



Figure 3.22 *Crambe maritima* (L.), [88] **Figure 3.23** *Raphanus raphanistrum* (L). [88]

3.4.1.4 Caractères de la graine et de l'embryon.

Les cotylédons sont repliés de différentes manières par rapport à l'axe hypocotyle (l'axe situé en dessous des cotylédons) et la radicule.

La forme du fruit, de l'embryon permettent de classer les différentes espèces dans différents genres et tribus. C'est un élément indispensable pour la détermination des espèces. Cependant les critères de coupures des genres ne sont pas toujours bien tranchés. Le recours à l'analyse de séquences des gènes devraient permettre de lever des situations ambiguës et permettre un classement qui se rapproche de la phylogénie. [88] [89]

CHAPITRE 4

LES GLUCOSINOLATES

Les glucosinolates sont des thioglucosides qui se trouve principalement chez les membres de l'ordre, *Capparales* où ils coexistent avec thioglucosidases endogènes appelés myrosinases [90];[91], [92]. La désorganisation tissulaire apporte des glucosinolates en contact avec les myrosinases, entraînant la libération de nombreux composés avec diverses activités biologiques. Dans certains légumes du genre Brassica comme le chou-fleur, choux de Bruxelles, chou et le brocoli, les produits de dégradation en glucosinolates, en particulier les isothiocyanates ont des propriétés anti-cancérigènes [93] [94]. Certains produits de dégradation des glucosinolates peuvent être impliqués dans la régulation de croissance [95] [96] [97], par exemple indole-3-acétonitrile (IAN) est un précurseur de l'acide indole hormone de croissance-3-acétique (IAA). En général, les glucosinolates et leurs produits de dégradation sont considérés comme des éléments potentiels dans le système de défense des plantes contre les insectes et les herbivores, ainsi que servir comme appâts pour les insectes se nourrissant de crucifères [98], [99], [100]. La rotation des cultures qui inclut des crucifères est une façon naturelle et pratique d'utiliser des produits de dégradation de glucosinolates pour contrôler les pathogènes transmis par le sol.

Dans ce qui suit, nous présenterons la diversité chimique des glucosinolates et leur distribution, la voie de leur biosynthèse et leur dégradation.

4.1. Diversité structurale et distribution des glucosinolates

Les glucosinolates sont une classe homogène de thioglucosides avec une structure bien établie de base (figure 4.1). À ce jour, plus de 110 glucosinolates ont été identifiés Elles sont dérivées à partir de seulement sept acides aminés

(alanine, la leucine, l'isoleucine, la valine, la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane) et un certain nombre d'homologues à chaîne allongée. Sur la base de la structure des différents acides aminés précurseurs, les glucosinolates sont regroupées en types aliphatiques, aromatiques et indolye. La diversité des glucosinolates se pose à partir des : alkyle ramifié simple et des chaînes latérales ainsi que ω -méthylthioalkyle, aryle ou hétérocyclique; également de précurseur l'allongement de la chaîne des acides aminés, en particulier la méthionine qui est largement modifiée, et enfin d'un large éventail de modifications secondaires, y compris l'oxydation, hydroxylation, méthylation, désaturation, sulfatation et glucosylation à la structure de base après la synthèse de la molécule mère [92].

Divers glucosinolates sont présents chez la famille de plantes dicotylédones, montrant un modèle de distribution inégale [101]. Par exemple, benzylglucosinolate n'a pas été trouvé dans la plupart des plantes produisant des glucosinolates, alors que methylglucosinolate dérivés de l'alanine se produit rarement en dehors de la famille Capparaceae. Chez les Brassicaceae, une importante variabilité de glucosinolates a été observé, par exemple chez le *B. napus* plus de trente glucosinolates différents ont été détectés [102]; chez *Arabidopsis thaliana*, 23 glucosinolates ont été rapportés [103] et moins de 34 sont présents si les différents écotypes sont pris en compte [104]. .

4.2. Biosynthèse des glucosinolates

La voie de biosynthèse des glucosinolates proposé comprend l'élongation de la chaîne d'acides aminés de la protéine, décarboxylation oxydative de l'acide aminé correspondant à ses aldoxime, la conversion de l'oxime dans la structure de base en glucosinolates, et les modifications secondaires (figure 4.1).

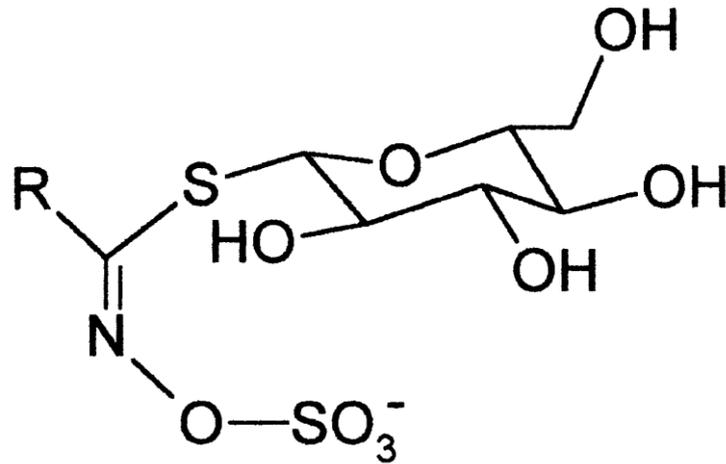


Figure 4.1. Structure générale des glucosinolates [105]

Les systèmes enzymatiques impliqués dans la formation aldoxime

Les glucosides cyanogènes sont un autre groupe de métabolites secondaires des plantes étroitement liée aux glucosinolates. La voie de biosynthèse de l'ensemble des glucosides cyanogènes a été élucidée (Figure 4.1) [105] [106] [107] [108]. La conversion de l'acide aminé à aldoxime est catalysée par le cytochrome P450 unique, qui catalyse deux NADPH consécutifs et O₂ dépend N-hydroxylations, conduisant à la formation de N, les acides aminés qui N-dehydrox spontanément déshydrater et décarboxyler pour donner des oximes [105] [107]., [108]]. Bien que l'aldoximes ont été identifiés [109], [110] [111] [112] [97], l'intermédiaire commun dans la biosynthèse des glucosinolates est différents, il n'existe aucune preuve directe biochimiques supportant un mécanisme catalytique similaire à ce jour.

Trois systèmes enzymatiques, le cytochrome P450 dépendante, la flavine contenant monooxygénases et les peroxydases membrane plasmique a été démontré indépendamment de catalyser la conversion de l'acide aminé en aldoxime. Les microsomes isolés de *S. alba*, *Tropaeolum majus* et *Papaya carica* ont été en mesure de convertir les aromatiques, les acides aminés, le tyrosine et la phénylalanine à leurs oximes correspondantes. Les activités ont été soumises à l'inhibition du monoxyde de carbone photoreversible ainsi que son inhibition par des inhibiteurs du cytochrome P450 [110], [111] indiquant le cytochrome P450

dépendante de la formation d'oxime. Le rôle des flavines contenant des monooxygénases dans la formation d'aldoxime a été établi par mesure de la libération de $^{14}\text{CO}_2$ homophénylalanine [105] [114] et la dihomophénylalanine catalysée par les microsomes isolés à partir des feuilles de *B. napus*. La réaction a été inhibée par l'inhibiteur de flavoprotéine spécifiques DPI et sels de cuivre [115] [116] [117]. La participation de la flavine monooxygénases contenue dans la formation des aldoximes de homophénylalanine et dérivés méthionine chaîne allongée a été caractérisé dans une variété de glucosinolates des espèces productrices [115], [117], mais aucun mécanisme catalytique n'a été proposé. Le troisième système est la peroxydase de la membrane plasmique, qui est capable de catalyser la conversion du tryptophane en indole acétaldoxime impliqués dans la biosynthèse des glucosinolates et éventuellement IAA [118]. Des études sur les semis et les plants matures de chou chinois (*B. campestris ssp. Pekinensis*) a montré une corrélation entre le profil glucosinolate indole et le mécanisme peroxydase de la membrane plasmique, ce qui implique une oxydation de l'azote aminé par le peroxyde d'hydrogène, suivie par déshydrogénation et décarboxylation [118].

4.3. Dégradation de glucosinolates

4.3.1. La compartimentation de myrosinases et en glucosinolates

Les myrosinases sont localisées dans les cellules myrosinées idioblastic dispersés dans la plupart des organes [119] En utilisant l'anticorps anti-3D7 myrosinase, des cellules contenant la myrosinase ont été identifiées dans le phloème et le mésophyle des feuilles de *B. napus* (figure 4.2). Les cellules contiennent des protéines riches en myrosine dans les structures vacuolaires appelées grains myrosinés, dans lequel sont logés les myrosinases [119], [120]. Les glucosinolates sont également stockés dans les vacuoles avec de l'acide ascorbique [121], qui est capable de moduler l'activité de la myrosinase d'une manière dépendante de la concentration, c'est à dire l'inhibition à une concentration plus élevée et l'activation à faible concentration [90].

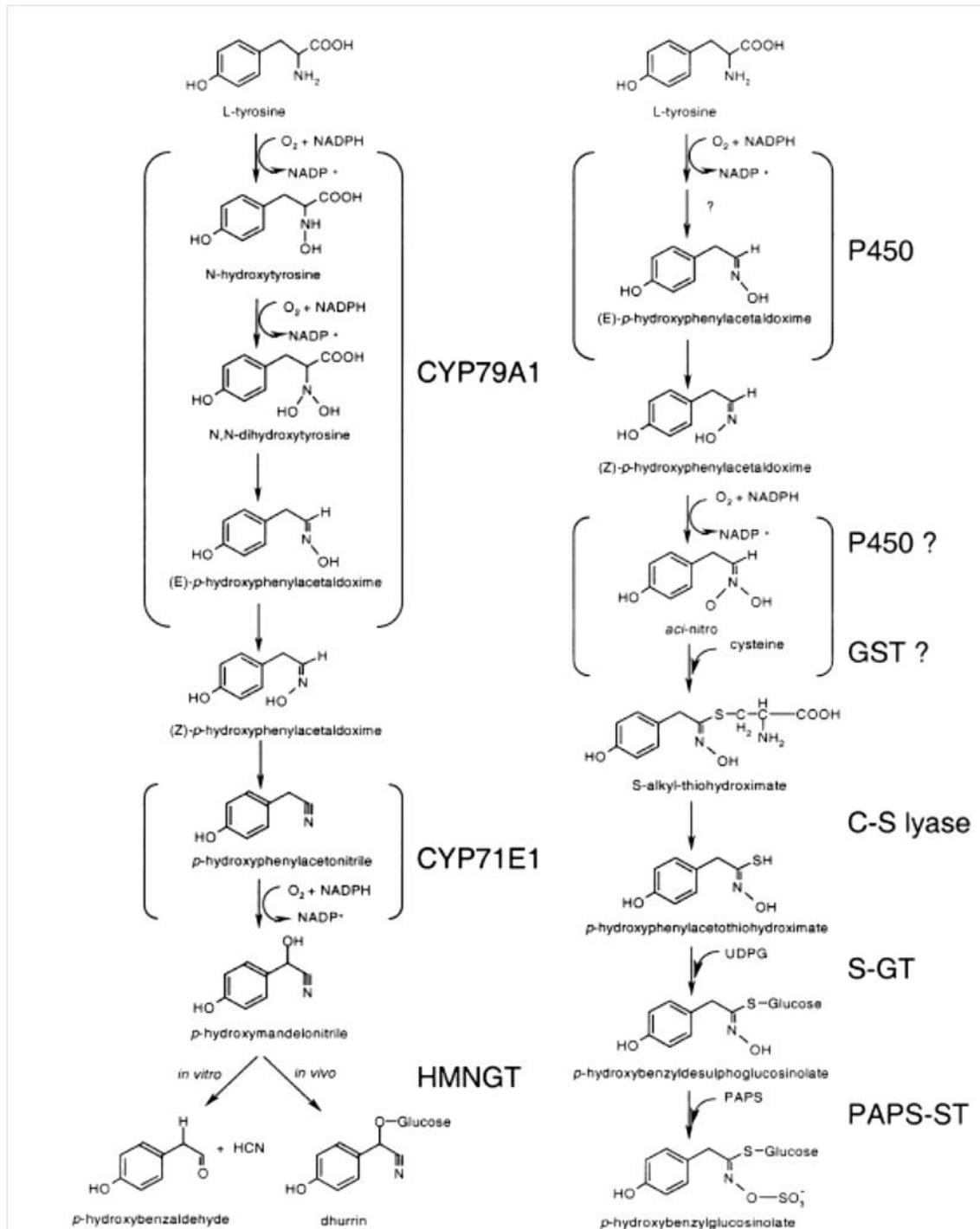


Figure 4.2. Voies de biosynthèse des glucosides cyanogénétiques dans dhurrine *Sorghum bicolor* (à gauche) et p-hydroxybenzylglucosinolate dans *Sinapis alba* (à droite). Les points d'interrogation représentent des réactions proposées. TPS, la glutathion-S-transférase; HMNGT, glucosyltransférase p-hydroxymandelonitrile; PAPS-ST, 3'-5'-phosphoadénosine phosphosulphate (PAPS): sulfotransférase desulphoglucosinolate; S-GT, glucosyltransférase UDPG-thiohydroximate. [90].

La double fonction de l'acide ascorbique met en lumière la possibilité de co-localisation des glucosinolates et des myrosinases. Une seule espèce *Koeberlinia spinosa* a été signalé à contenir des cellules myrosines mais manque de glucosinolates [91]. Les analyses immunohistochimiques récentes ont montré que les glucosinolates sont localisés dans les cellules non myrosine [122], ce qui indique que l'enzyme et ses substrats ne sont pas cloisonnés dans la même cellule. La séparation physique du substrat et l'enzyme suggère un rôle dans la prévention de la formation de produits toxiques *in vivo*, mais constitue une question de savoir comment les glucosinolates ou les myrosinases sont transportés à moins d'interagir à un dommage tissulaire. Récemment, Koroleva et al. [123] ont trouvé dans les fleurs et les tiges d'*Arabidopsis* un groupe de cellules (cellules S-) situé entre le phloème des faisceaux vasculaires et l'endoderme contenant des concentrations élevées de glucosinolates (> 100 mM). Les cellules myrosines adjacentes aux S-cellules ont été détectées, indiquant transport possible de myrosinase *via* des plasmodesmes.

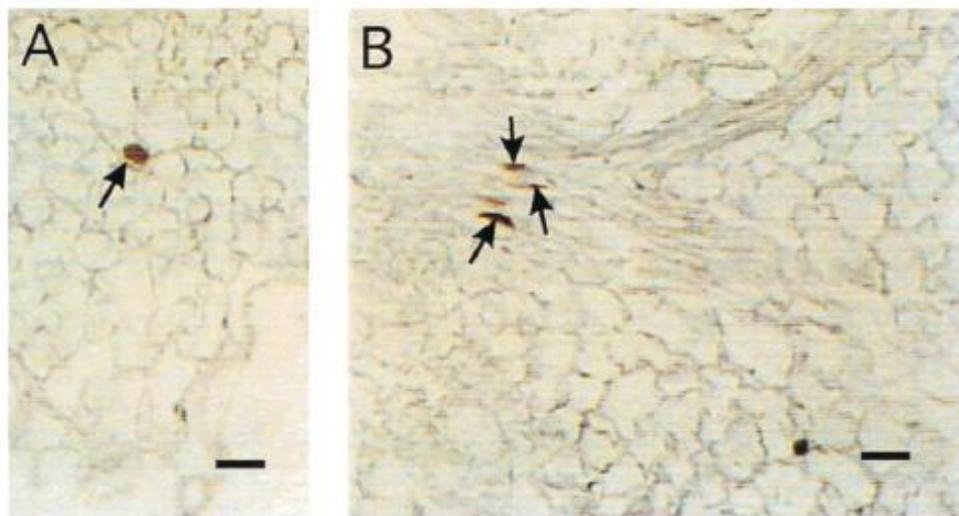


Figure 4.3. L'analyse immunohistochimique de l'expression myrosinase dans *Brassica napus* feuilles utilisant des anticorps monoclonaux 3D7 anticorps anti-myrosinase. A, dans le mésophylle; B, le phloème. les cellules contenant des myrosinases sont indiquées par des flèches. Bar = 10 μ m. [122]

4.3.2. Produits de dégradation en glucosinolates

Les lésions tissulaires déclenchent une «bombe de moutarde», où les glucosinolates sont hydrolysés par les myrosinases pour produire une large gamme de produits de dégradation. Il s'agit notamment d'un glucose et une fraction d'aglycone instable, qui se réarrange ensuite pour former des produits différents, en fonction de la structure aglycone, du pH, de la concentration en ions ferreux et des protéines epithiospecifier (ESP) [124]. Habituellement, le réarrangement de l'aglycone se traduira par la formation d'un isothiocyanate à pH neutre tandis que le dérivé nitrile est le produit dominant à pH acide. Les glucosinolates contenant une double liaison terminale produiront un epithionitrile quand ils sont dégradés en présence de l'ESP et des ions ferreux [125].

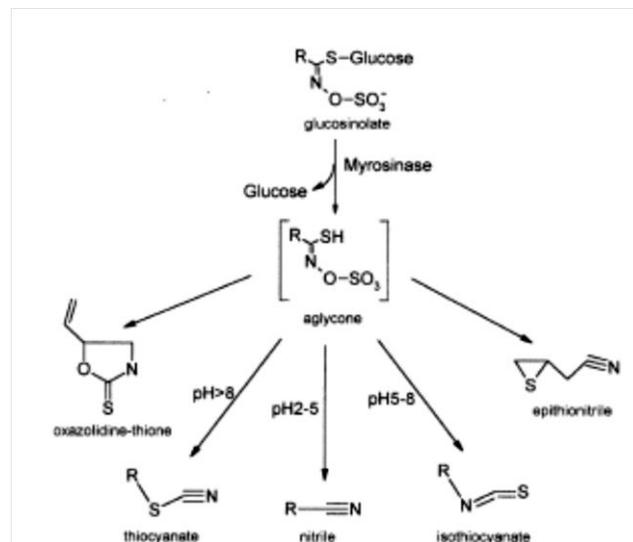


Figure 4.4. Les noms et les structures des produits de dégradation des glucosinolates. Myrosinase catalyse la formation aglycone tandis que les produits finaux sont formés non-enzymatique ou par une protéine epithio spécifique. [125]

4.4. Régulation du métabolisme des glucosinolates

Les profils des Glucosinolates des différentes espèces varient considérablement et dans la même espèce leurs fluctuations dépendent de l'âge [126], [127]. En outre, le niveau des glucosinolates est affectée par des facteurs environnementaux comme la lumière [95], les infections fongiques [128], les blessures [129], [130], les attaques d'insectes [130], [131] et d'autres formes de

stress [129], [132]. Les changements dynamiques de la teneur en glucosinolates dans un tissu donné dépendent de la réglementation de la biosynthèse des nouvelles dégradation et ou de la mobilisation des glucosinolates.

4.4.1. Régulation de la biosynthèse

En général, les activités de biosynthèse sont élevées dans les jeunes feuilles [116], [133], [134], les pousses et les siliques murs [135] et diminuent à mesure que le tissu est âgé [126], [127]. Par exemple, durant les 7 premiers jours de l'imbibition des graines de *B. napus*, la concentration des glucosinolates, principalement de type aliphatique, diminue de façon spectaculaire. Dans le même temps, il y a une nouvelle synthèse des glucosinolates indoliques et gluconasturtine. Au cours de la période de croissance rapide des glucosinolates supplémentaires s'accumulent [126]. A la floraison, il y a une diminution de la concentration de glucosinolates dans les deux tissus végétatifs et inflorescences [126], [127]. Bien qu'il ait été démontré que les activités enzymatiques impliquées dans la formation des oximes de deux acides aminés à chaîne allongée et d'une diminution du tryptophane avec la maturité croissante des feuilles [116] la réduction de la teneur en glucosinolates peut être imputée à la dégradation et la translocation [126].

Plusieurs molécules biologiquement actives sont impliquées dans la biosynthèse de certains glucosinolates. Ainsi les glucosinolates indoliques s'accumulent systématiquement dans les plantes traitées avec jasmonate, une molécule signal associé à des réactions relatives à la blessure ou a des herbivores, ce qui suggère un rôle important des glucosinolates indoliques dans ce contexte [129], [136], [128]. [137]. De même, la concentration de gluconasturtine (2-phenylethylglucosinolate) est particulièrement accrue par l'acide salicylique, un composé phénolique impliqué dans les réponses aux agents pathogènes [138]. Fait intéressant, une induction de glucosinolates se produit après privation d'azote [132], ce qui peut impliquer à court terme un "réglage fin" de stockage ou de la nutrition en fonction de la balance. Depuis de grandes variations dans le profil des glucosinolates existent entre les différents tissus à différents stades de développement, il serait intéressant de déterminer dans quelle

mesure les comptes de nouvelles biosynthèse de ces variations dans la régulation de la biosynthèse des glucosinolates.

4.4.2. Régulation de la dégradation

Les analyses moléculaires des extraits protéiques de différents organes *B. napus* à différents stades de développement ont clairement montré que les gènes myrosinase sont exprimés dans un tissu régulée par le développement de manière spécifique [100]. Il a été proposé que les myrosinases sont responsables de la rotation naturelle des glucosinolates dans les tissus intacts à certains stades du développement, par exemple la germination [126] et dans la régulation de croissance en générale. La diminution spectaculaire de la teneur en glucosinolates pendant la phase de développement précoce de *B. napus*, de concert avec l'expression de la myrosinase [100] et la réduction du niveau de glucosinolates dans les feuilles à maturité [127] pourrait être due à l'hydrolyse myrosinase.

Il a été rapporté que les myrosinases sont soumises à la modulation nutritionnelle [132], [139], l'induction par un éclairage bleu [95] et la régulation négative par un traitement acide salicylique [140]. Bien que les mécanismes de régulation impliqués dans l'expression et la dégradation des glucosinolates myrosinase *in vivo* ne soient pas clairs, la dégradation accrue des glucosinolates en vertu de stress abiotiques et biotiques pourrait conduire à une remobilisation du rapport soufre/azote et des réponses efficaces à des conditions de stress.

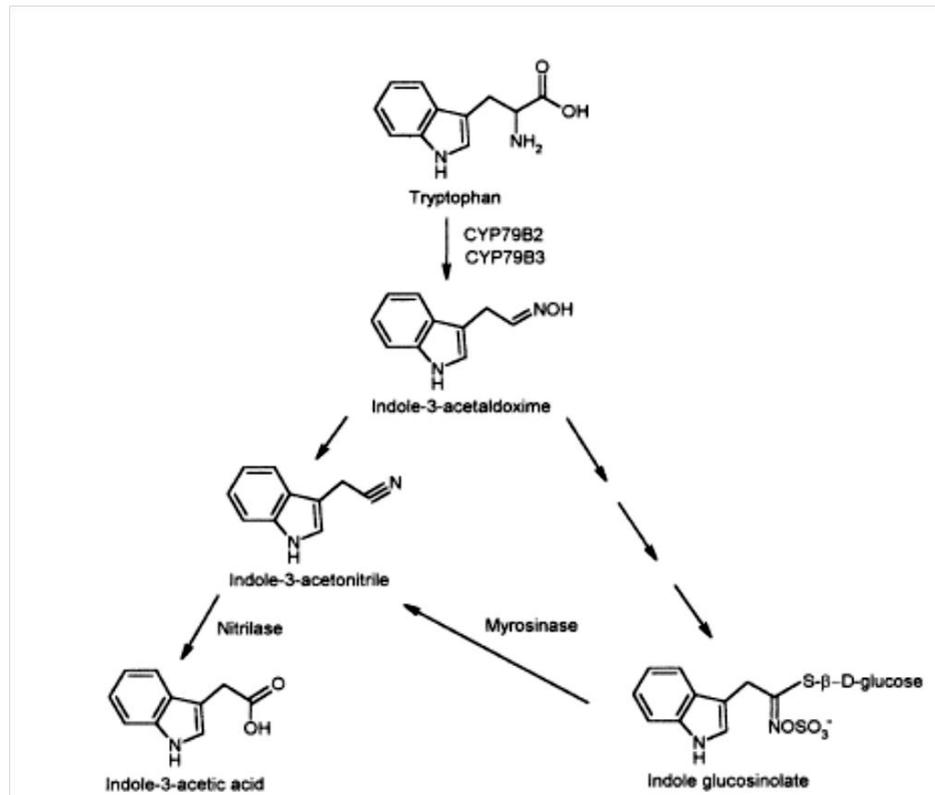


Figure 4.5. Proposition de l'AAI et l'indole voie de biosynthèse des glucosinolates avec l'indole-3-acétaldoxime comme [97]. [96], intermédiaire commun.

4.5. Métabolisme des glucosinolates dans la régulation de croissance et de la défense

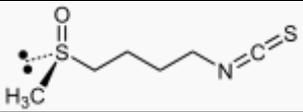
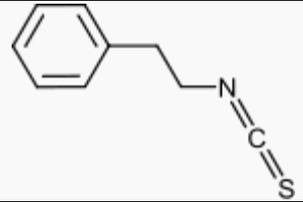
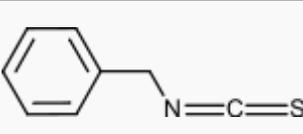
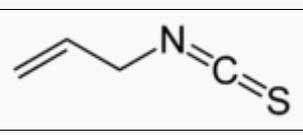
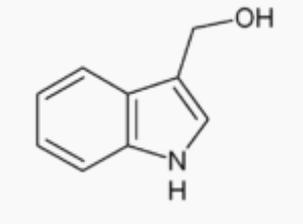
Ces dernières années, il a été généralement admis que la biosynthèse de l'acide indole-3-acétique (AIA) est le produit de deux voies de tryptophane (trp)-dépendants dans la plupart des plantes supérieures, c'est à dire l'indole-3-acétonitrile (IAN) voie (trp → indole-3-acétaldoxime (IAOx) → IAN IAA) (figure 7) et l'acide indole pyruvique (IPA) voie (trp → IPA indole-3-acétaldéhyde → IAA). Cependant, chez les espèces de *Brassicaceae*, les glucosinolates indoliques peuvent être convertis par les myrosinases dans IAN, en outre hydrolysé par l'AAI nitrilases [141].

En plus de l'AAI, les différents inhibiteurs de la croissance naturelle ont été étudiés dans la croissance des plantes phototropique. Récemment, Hasegawa *et al.* [95] ont rapportés que la lumière bleue unilatérale a tendance à promouvoir l'activité myrosinase dans le côté lumineux des hypocotyles *Raphanus*, conduisant à la dégradation des glucosinolates 4-méthylthio-3-butényle en inhibiteurs de la croissance naturelle (isomères du 3-méthylthiométhylène-2-pyrrolidinéthione), qui ont été impliqués dans la croissance phototropique. Fait intéressant, l'AAI a été réparti également sur les côtés lumineux et ombragé de l'hypocotyle mais n'a pas participé.

Le système glucosinolate-myrosinase est pensé pour être un système chimique binaire dans la défense, qui est activé lors des dommages des tissus et peut servir parmi les premières barrières chimiques pour dissuader un large spectre de pathogènes potentiels. La localisation de la myrosinase idioblastic dans le phloème et la présence de S-cellules enrichies en glucosinolates [123] sont envisagés pour composer «une bombe moutarde » qui est déclenchée lors de l'invasion, par exemple, les insectes se nourrissant du phloème. Produits de dégradation des glucosinolates ont été proposés pour agir en tant qu'allélochimiques et jouer un rôle dans la défense de la plante [100].

Par exemple, les isothiocyanates naturels possèdent une gamme de antifongiques, antibactériennes et des activités antimicrobiennes, et donc une pouvoir a repousser les micro-organismes, insectes et mollusques [99], mais il ya très peu d'exemples d'études in vivo. Les glucosinolates et leurs produits de dégradation sont, toutefois, clairement impliqués dans la reconnaissance des plantes-hôtes par les parasites spécialisés. Certains isothiocyanates volatils attirent les ravageurs des crucifères, qui utilisent ces composés comme stimuli de l'alimentation et de la ponte [99], [100]. Les Indole glucosinolates et de leurs produits d'hydrolyse jouent un rôle dans le développement de la maladie de la hernie, causée par le *Plasmodiophora brassicae*, biotrophe obligatoire [131].

4.6 Quelques isothiocyanates et indoles étudiés pour leurs propriétés anticancéreuses [142]

Isothiocyanates	Formules	Le glucosinolate précurseur	Sources alimentaires
ISOTHIOCYANATES			
Sulforaphane		Glucoraphanine R=4-(Méthylsulfiny)butyle	Brocoli, chou de Bruxelles, choux-fleurs
Isothiocyanate de phénéthyle		Gluconasturtiine R=2-Phényléthyle	Cresson (<i>Nasturtium officinale</i>), racine de raifort (<i>Armoracia rustica</i>)
Isothiocyanate de benzyle		Glucotropaeoline R=Benzyle	Choux, cresson alénois (" <i>Lepidium sativum</i> "), capucine (" <i>Tropaeolum</i> ")
Isothiocyanate d'allyle		Sinigrine R=2-Propényle	Choux, racine de raifort (" <i>Armoracia rustica</i> "), moutarde
INDOLE			
Indole-3-carbinol		Glucobrassicine	Brocoli, chou-fleur

CHAPITRE 5

MATERIÉL ET MÉTHODES

Les biopesticides d'origine végétale peuvent constituer une solution alternative au «tout chimique» de ces dernières décennies. Leurs propriétés pesticides et leur relative innocuité environnementale en font des composés très intéressants pour les traitements phytosanitaires à venir

Des études ont été faites à travers le monde. A nos jours aucune étude n'a été réalisée sur les espèces et écotypes Algérienne. Notre objectif est donc de faire une étude prospective sur deux espèces de crucifères *Hirschfeldia incana* et *Raphanus raphnistrum*

D'étudier leurs contenus et diversités en glucosinolates a deux stades de développement différent en pleine floraison et en fructification

5.1. Présentation de la région d'étude

5.1.1. Présentation de la région de Mitidja

5.1.1.1. Situation géographique

La Mitidja est une vaste plaine littorale étroite du Nord. Elle s'étend sur une longueur de 100 kilomètres et une largeur de 5 et 20 kilomètres, elle couvre une superficie de 150 000 ha. Elle correspond à une dépression allongée d'Ouest en Est. Elle est limitée à l'Ouest par l'Oued Nador et à l'Est par l'Oued Boudouaou et bordée par deux zones élevées : le Sahel au Nord et l'Atlas au Sud (Figure 5.1) [143].

La Mitidja se situe à une latitude Nord moyenne de 36 à 48° et une altitude moyenne de 30 et 50 mètres [143]. La plaine ne s'ouvre que sur quelques kilomètres sur la mer Méditerranée.

Le climat est de type méditerranéen à tendance continentale (étage humide à hiver frais), favorable à l'activité agricole avec une pluviométrie majoritairement hivernales et printanières, sont caractérisées par une grande irrégularité inter annuelle et inter-mensuelle avec une moyenne de 660 mm/an et une évapotranspiration (ETP) moyenne de l'ordre de 1 400 mm/an. Toutefois, on observe un climat qui tend de plus en plus à l'aridité : depuis 30 ans, la zone n'a connu que huit années humides. [143].

5.1.1.2. Bioclimat des régions d'étude

L'Algérie est un pays soumis à l'influence conjuguée de la mer, du relief et de l'altitude. Le climat est de type méditerranéen extra-tropical tempéré. Il est caractérisé par une longue période de sécheresse estivale variant de 3 à 4 mois sur le littoral, de 5 à 6 mois au niveau des Hautes Plaines, et supérieure à 6 mois au niveau de l'Atlas Saharien. [143].

5.1.1.2.1. La pluviométrie

L'eau est un facteur écologique d'importance fondamentale pour le fonctionnement et la répartition des écosystèmes terrestres afin d'assurer un équilibre biologique [144].

Les précipitations annuelles en Mitidja ont un régime typiquement méditerranéen avec un maximum en hiver et un minimum en été [143]. Elles varient de 600 mm à 900 mm en fonction de la région considérée (localisation géographique et l'altitude) [144]. Cette distribution inégale des précipitations au cours d'un cycle annuel et l'alternance saison humide et saison sèche conditionnent les activités biologiques des ravageurs. Les données ont été recueillies au niveau de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière (I.T.A.F.) de

Tessala El Merdja. La figure 5.1, présente la courbe des précipitations annuelles de 2000 à 2010 dans la wilaya de Blida.

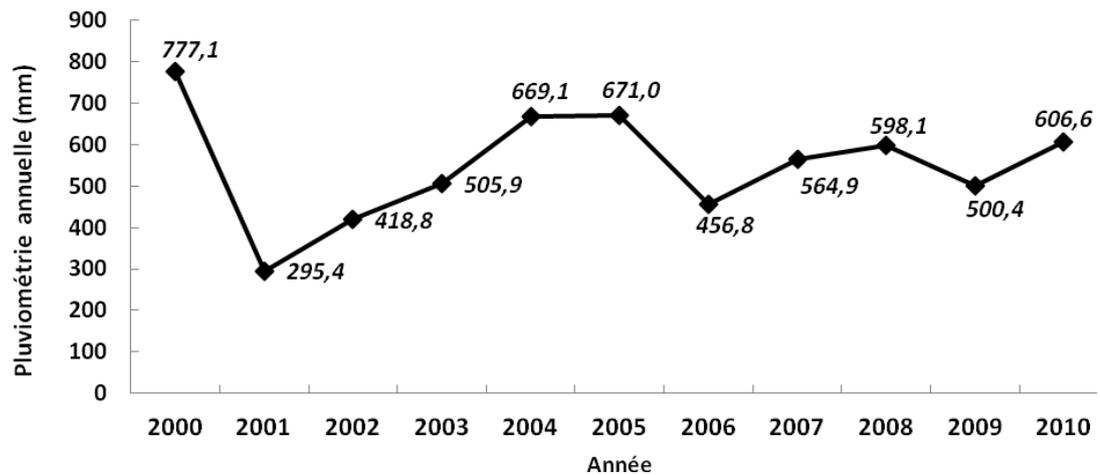


Figure 5.1 : Courbe des précipitations annuelles de 2000 à 2010 dans la wilaya de Blida

La pluviométrie dans la wilaya de Blida est marquée par une grande irrégularité interannuelle (Figure 5.1) et inter-mensuelle. Les précipitations annuelles ont lieu principalement durant l'hiver et le printemps, c'est en été, saison sèche que les plus faibles précipitations sont enregistrées.

5.1.1.2.2. Les températures

La température représente un facteur limitant de toute première importance, car elle contrôle l'ensemble des phénomènes métaboliques et conditionne de ce fait la répartition de la totalité des espèces et des communautés d'êtres vivants dans la biosphère.

Les relevés des températures minimales (m), maximales (M) ont été recueillis auprès de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière (I.T.A.F.) de Tessala El Merdja pour la décade 2000-2010. (Figure 5.2)

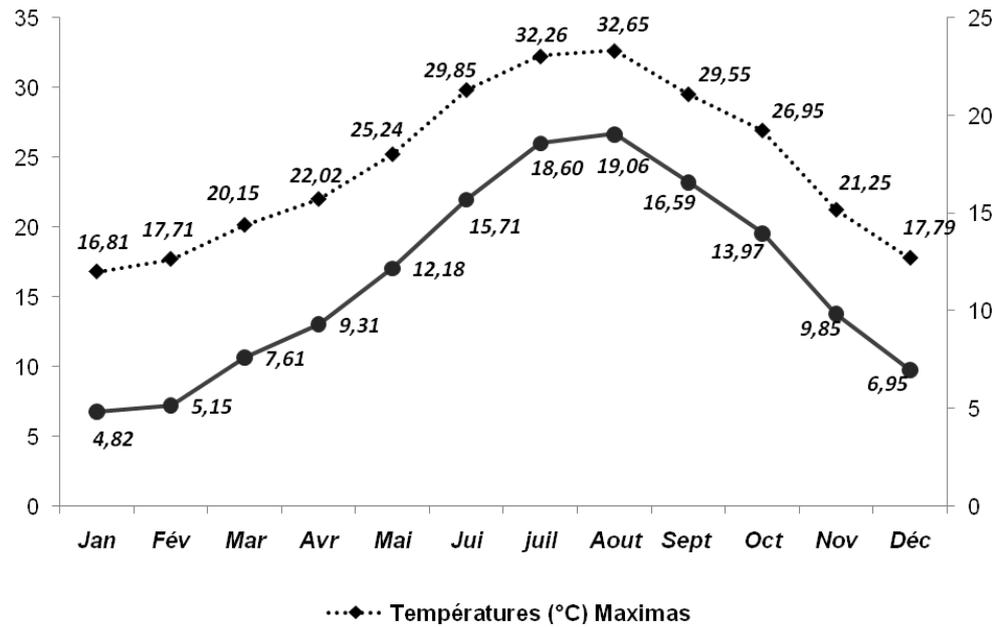


Figure 5.2 : Courbe des températures moyennes mensuelles des minimas et des maximas de la période 2000-2010 dans la wilaya de Blida.

L'analyse des températures de cette décennie fait ressortir que les basses températures sont enregistrées de décembre à janvier. Les hautes températures sont observées durant les mois de juillet et d'août.

5.1.1.2.3..Les vents, la grêle et la gelée

Le vent a un effet très important sur la vie agricole ils soufflent toute la saison, avec cependant une légère prédominance printanière et estivale, il dur rarement plusieurs jours de suite, ce qui l'empêche pas d'être très contraignant. C'est un facteur de réduction des récoltes qui est très important, notamment lorsque il souffle au moment de la floraison des arbres fruitiers ou à la nouaison de fruit.

Les grêles sont hivernales particulièrement au mois de novembre, janvier, mars avec une durée variable, l'abaissement de la température au dessous de 0°C à la suite duquel, l'eau se prend en glace. Elles sont fréquemment signalées en hiver, elles causent de graves dommages sur les feuilles des jeunes rameaux et les poussent donnant un aspect de brûlures. [144].

5.1.2. Climatologie des régions d'étude

5.1.2.1. Étage bioclimatique (Climagramme d'Emberger)

L'indice d'Emberger permet la caractérisation des climats et leurs classifications dans les différents étages bioclimatiques. L'indice d'Emberger où coefficient pluviométrique (Q_2) est calculé selon la formule modifié par STEWART [145].

$$Q_2 = 3,43 \frac{P}{M-m}$$

Avec : **p** : pluviométrie annuelle (mm) ; **M** : moyenne des températures maximales du mois le plus chaud ; **m** : moyenne des températures minimales du mois le plus froid.

En plaçant les valeurs (T_{\min} et Q_2) sur le diagramme d'Emberger, l'étage bioclimatique de notre zone d'étude correspond à l'étage sub-humide à hiver doux pour la période de 2000 à 2010, ainsi que pour l'année 2010 (Figure 5.3).

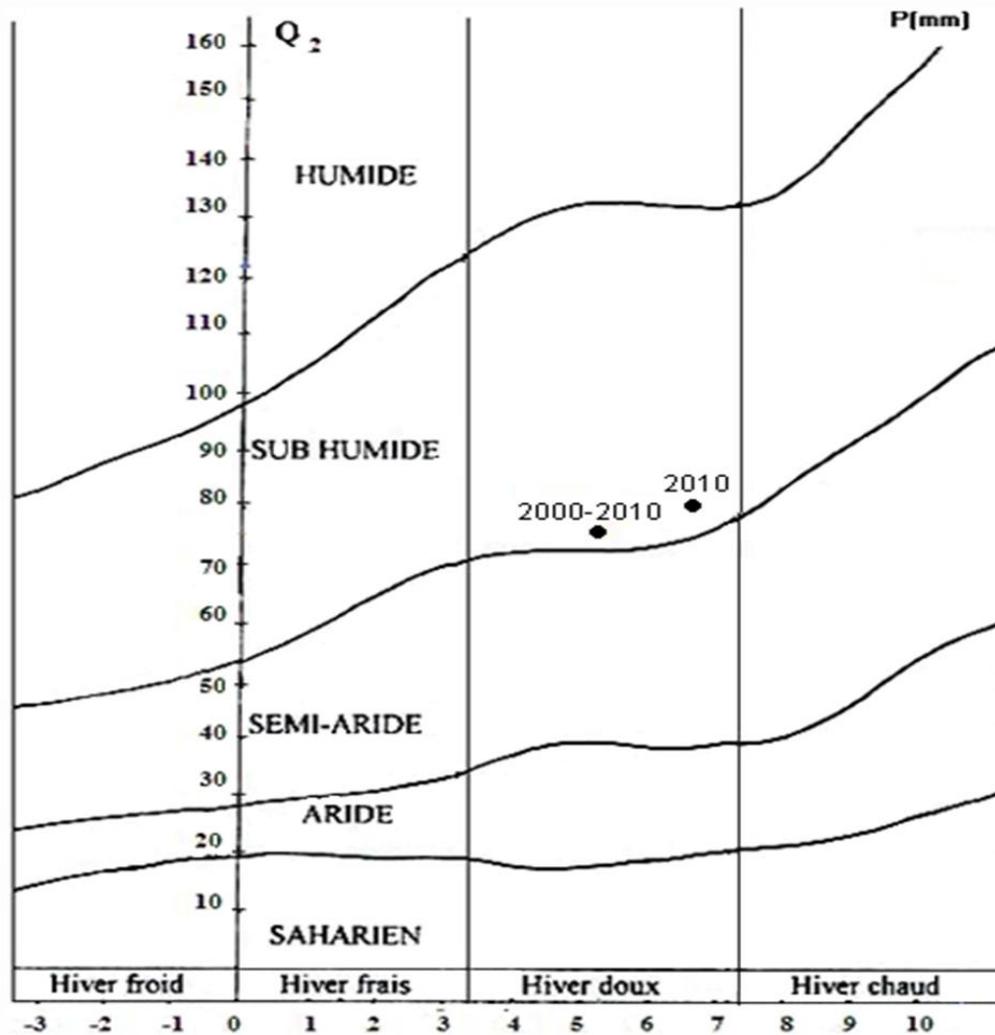


Figure 5.3: Localisation de l'étage bioclimatique de la Mitidja sur le climagramme d'Emberger.

5.1.2.2. Synthèse climatique

Bagnouls et Gaussen [146], Dajoz [147], définissent un mois sec lorsque la somme des précipitations moyennes exprimées en (mm) est inférieure au double de la température de ce même mois ($P < 2 T$). Ils ont proposé un diagramme où sont juxtaposés les précipitations et le double des températures.

Lorsque la courbe des précipitations rencontre celle des températures et passe en dessous de cette dernière, nous avons une période sèche. Le diagramme ombrothermique de la décade 2000–2010 établis dans la Figure 5.4_a ci-dessous met en évidence une période sèche de huit mois de mars à Octobre et une période humide de quatre mois de novembre à février.

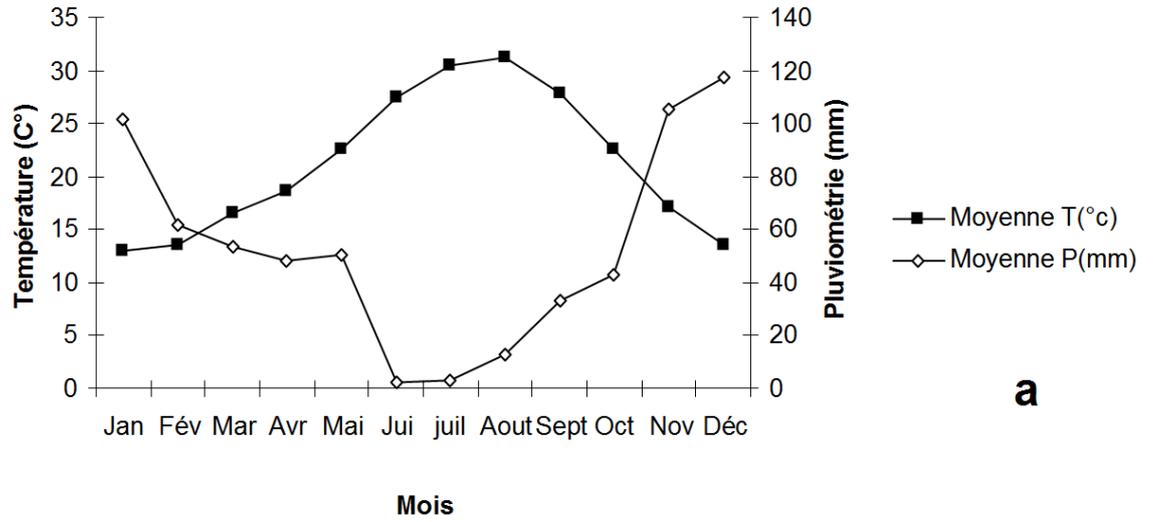
L'année 2010, en Figure 5.4_b est caractérisée par une saison sèche dont sa durée est deux fois la saison humide. Avec une saison humide de quatre mois (novembre-février) et une saison sèche de huit mois (mars-octobre) et l'apparition de pics de précipitations de février à avril et des précipitations d'août à octobre, ces derniers, sans aucune influence sur les cultures maraîchères qui par leur nature sont très exigeantes en eaux.

5 1.3.Présentation du site d'étude

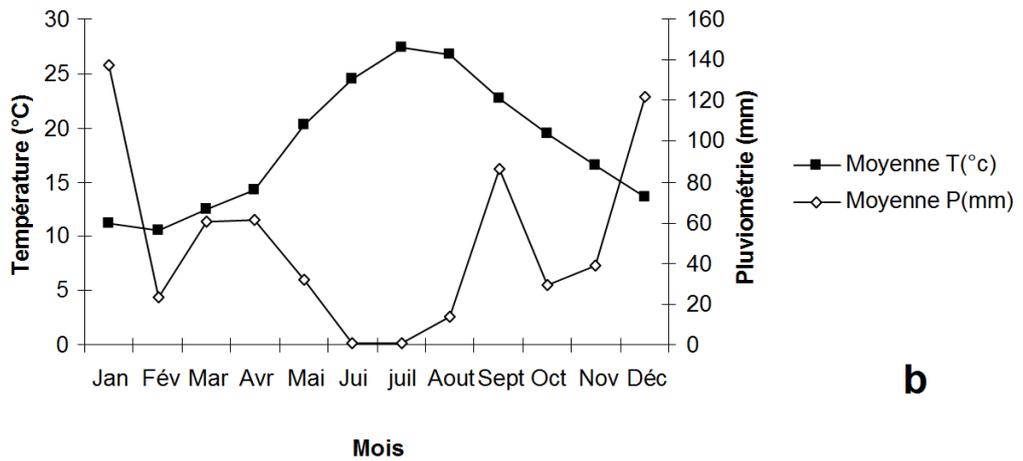
Nos échantillons ont été prélevés au niveau de la station expérimentale de l'Université SAAD DAHLEB de Blida sur deux espèces de crucifères *Hirshfeldia incana* et *Raphanus raphanistrum* (Figure 5.4).

La récolte a été réalisé au stade floraison et au stade fructification plante entière

Lieu	Espece	Altitude	N	E
Université de Blida	<i>Raphanus Raphanistrum</i>	199	36°30.5668'	002°52.5819
Université de Blida	<i>Hirshfldia incana</i>	199	36°30.5668'	002°52.5819



a



b

Figure 5.4 : Diagramme ombrothermique Bagnouls et Gausсен relatif à la région d'étude (a : décade 2000 -2010, b : année 2010).

5.2. Matériel d'étude

5.2.1. Description d'*Hirschfeldia incana*

5.2.1.1. Classification

L'espèce appartient au règne des *Plantae*, à la famille des *Brassicaceae*, au genre *Hirschfeldia*, et à l'espèce *H. incana subsp. Incana L*

5.2.1.2 Description

Plante bisannuelle, velue-blanchâtre, à poils réfléchis ; tige de 40-80 cm., rude, à rameaux étalés-dressés ; feuilles toutes pétiolées, les inférieures lyrées-pennatifides, les supérieures lancéolées entières ; fleurs petites ; pédicelles courts, épais, appliqués contre l'axe ; siliques appliquées, courtes, cylindracées, grêles, bosselées, pubescentes ou glabres ; valves à 1 nervure ; bec rétréci à la base, renflé en boule et à 1 graine au milieu, plus court que la silique ; graines ovoïdes, brunes, presque lisses [148].

5.2.1.3 Habitat

Lieux vagues et cultures, dans le Midi et le Sud-Ouest ; adventice dans les autres régions. Europe centrale et méridionale; Asie occidentale ; Afrique septentrionale [148].

5.2.2 Description *Raphanus raphanistrum*

5.2.2.1 Classification

L'espèce appartient au règne des *Plantae*, à la famille des *Brassicaceae*, au genre *Raphanus*, et à l'espèce *R. raphanistrum L.*

5.2.2.2 Description

Sur la plantule les Cotylédons en forme de cœur au sommet. et les Feuilles divisées.

Sur la plante adulte la Hauteur: 30 à 60 cm, la tige hérissée de poils rudes dirigés vers le bas et les feuilles pennatifides formées de 3 à 5 lobes latéraux ovales, devenant plus grands vers la pointe et un lobe terminal de très grande taille. Les fleurs blanches ou jaunes, à veines violettes apparentes. Sépales dressés verticalement, garnis de soies. Les fruits: siliques à articles, plus longs à la maturité que les pédoncules et se divisant en fragments. Les siliques à articles, plus longs à la maturité que les pédoncules et se divisant en fragments. C'est une plante annuelle.

5.3. Méthodologie du travail

Récolte et conservation du matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude, comprend *Hirschfeldia incana* (L) et *Raphanus raphanistrum* (L) qui ont été récoltées d'une façon aléatoire aux stades critiques (floraison, nouaison), durant la période mi Avril et mi Mai 2009. Les espèces vivent à l'état spontané sous forme libres ou parfois en petits peuplements accompagnant ou non des cultures. Les échantillons collectés (les plantes entières) sont séchées à une température ambiante dans un endroit sec à l'abri de la lumière, après séchage, une opération de séparation des parties aériennes (feuilles, tiges et fleurs) des parties souterraines (racines) est effectuée.

Après le séchage les différentes parties de la plantes sont broyées individuellement dans un moulin à café à hélice opposée jusqu'à obtention d'une poudre fine, puis mis dans des tubes à essais préalablement désinfectés.

5.4 Extraction et dosage des glucosinolates par H.P.L.C.

5.4.1 Matériel:

Matériel végétal : broyat (dans les piluliers) ou parties entières de Brassicacées.

- Broyeur Ultra-Turrax
- Centrifugeuse
- Papier filtre Whatmans No.1
- Seringue filtrante 0,2 µm
- Colonne Prevail C18 pour la HPLC

5.4.2 Manipulation:

Peser 0,59 g. de matériel végétal (selon l'espèce et la partie végétale) et faire bouillir pendant 5 minutes dans un bécher en pyrex avec 10 ml d'eau, cela dans le but d'inactiver la myrosinase qui pourrait dégrader les glucosinolates.

La solution est homogénéisée avec l'Ultra-Turrax pendant 2 minutes et centrifugée pendant 15 minutes à 13000 rpm. Le surnagent est récolté et filtré dans une éprouvette, à travers un papier filtre Whatmans N°1; On pourra humidifier préalablement le papier filtre avec de l'eau distillée pour accélérer le processus de filtration.

Le volume du filtrat est ramené à 20ml avec de l'eau distillée (à rajouter à travers le filtre usité) et refiltré à travers une seringue filtrante 0,2µm pour être finalement collecté dans un petit pilulier en plastique.

Ces échantillons seront correctement marqués et déposés dans le congélateur à -20°C.

Les glucosinolates des surnagent sont analysés par HPLC-UV et HPLC-MS en utilisant une colonne Prevail *C₁₈*. La phase mobile est un gradient

linéaire de 100% d'acétate d'ammonium à 50 mM à du méthanol d'acétate d'ammonium à 50mM (80:20) durant 40 minutes. La colonne est mise en marche à température ambiante avec un débit d'écoulement de 1ml/min. L'identification du pic préliminaire est basée sur le poids moléculaire de l'anion [M-H] émis pendant FAR (Fast Atour Bombardement). La quantification individuelle des glucosinolates est basée sur le degré de pureté de l'étalon : Sinigrine pure à 99,3%.

5.4.3 Analyses HPLC-UV

Une chromatographie Liquide à Haute Pression a été utilisée pour les dosages des glucosinolates. Elle est de la marque Alliance 2690 (Waters, Milford, MA, Etats-Unis). La colonne exploitée dans le cadre des analyses pour cette étude est une Prevail C18, 5 um, 25034,6 mm (Alltech Associates, Deerfield, IL, Etats-Unis). La phase mobile était un gradient linéaire de 100% acétate d'ammonium 50 mM à 50 mM d'ammonium acétate-méthanol (80:20) en 40 min. La colonne a été opérée à température ambiante avec un débit de 1,0 ml / min. Le volume d'injection était de 10 ml. La longueur d'onde pour la détection de glucosinolates dans tous les cas était de 235 nm et les données ont été traitées avec un intégrateur HP3396 Series II. La quantification a été basée sur les allyles glucosinolates; une technique utilisée par d'autres [150]. Dans notre étude le standard était de la sinigrine (126µmol.g-1 de matière sèche).

5.5. Analyses multivariée (PAST vers. 1.37, [151])

Dans le cas de variables de type présence-absence, les relations multivariées sont étudiées à l'aide d'une analyse factorielle des correspondances en composantes principales (A.C.P.). Dans cette analyse, les parties de la plantes sont regroupées selon leurs caractères moléculaires en substances bioactives. A partir des trois premiers axes de l'analyse factorielle, une classification ascendante hiérarchique des espèces est réalisée dans le but de détecter des rapprochements d'accumulation dans les différents organes des plantes.

CHAPITRE 6

RÉSULTATS

Les glucosinolates obtenues par extraction solide-liquide des crucifères sélectionnées ont été caractérisées par analyse HPLC-UV et HPLC-CM. Une quantification individuelle des glucosinolates a été établie en se basant sur le degré de pureté de l'étalon (sinigrine pure à 99.3%).

6.1. Composition chimique en glucosinolates de *Raphanus raphanistrum* et d'*Hirschfeldia incana* (L)

Les analyses chimiques ont permis de décrire le profil en glucosinolates des extraits de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L). Les résultats analytiques sont regroupés dans l'annexe1.

Les glucosinolates est un complexe mixte très diversifié, parmi eux 9 composés ont été identifiés (Tableau 6.1). *Hirschfeldia incana* (L), est caractérisée par 7 molécules à savoir : Pentenyl, Sinigrine, Glucoiberverine, Gluconasturtiine, Progoitrine, Gluconapine et l'hydroxybutenyl. *Raphanus raphanistrum* (L) est caractérisée par 4 molécules à savoir : Pentenyl, Sinigrine, Dehydroerucine et Glucoberteroine. Les Sinigrine et Glucoiberverine étant des molécules communes pour les deux espèces. De crucifères étudiées, alors que les Pentenyl, Gluconasturtiine, Progoitrine, Gluconapine et l'hydroxybutenyl sont caractéristiques d' *Hirschfeldia incana* (L) et Dehydroerucine et Glucoberteroine caractérisent *Raphanus raphanistrum* (L). La Sinigrine constitue la majorité de la composition des glucosinolates, puis viennent les Glucoiberverine pareillement chez les deux espèces.

6.2.. Accumulation globale en glucosinolates chez *Raphanus raphanistrum* (L) et *Hirschfeldia incana* (L)

La figure 6.1 présente les quantités globales des glucosinolates de deux espèces de crucifères évoluant dans la pleine sublittorale de la Mitidja. La figure dénote des accumulations assez importantes chez les deux espèces étudiées. En revanche, *Hirschfeldia incana* (L) se démarque par rapport à *Raphanus raphanistrum* (L) par un supplément en terme de capacité d'accumulation en molécules de glucosinolates

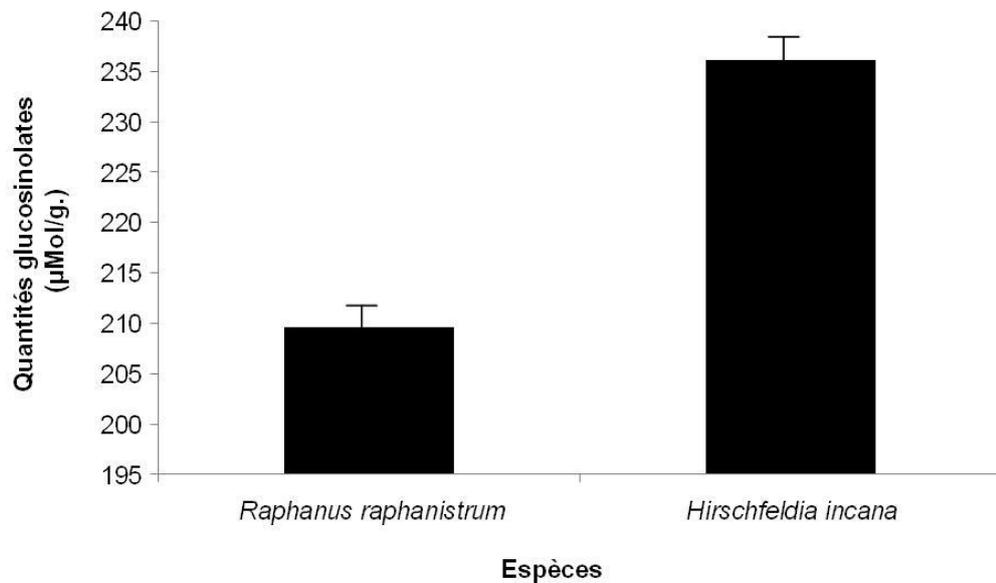


Figure 6.1: Accumulation globale des molécules chez *Raphanus raphanistrum* (L) et *Hirschfeldia incana* (L)

6.3. Accumulation globale en glucosinolates des différents stades phénologiques de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L)

La figure 6.2, présente la capacité d'accumulation des quantités en glucosinolates sous l'effet du cycle phénologique des deux espèces de crucifères étudiées. La figure désigne une divergence d'accumulation très marquée entre espèces d'une part et entre stade phénologique d'autres part. Il ressort qu'*Hirschfeldia incana* (L) présente une

importante capacité d'accumulation en phase de floraison en comparaison avec les potentialités d'accumulations de *Raphanus raphanistrum* (L). Au stade nouaison, on note un dédoublement des quantités en glucosinolates accumulées, ce qui traduit une certaine égalité dans les capacités productives des deux espèces.

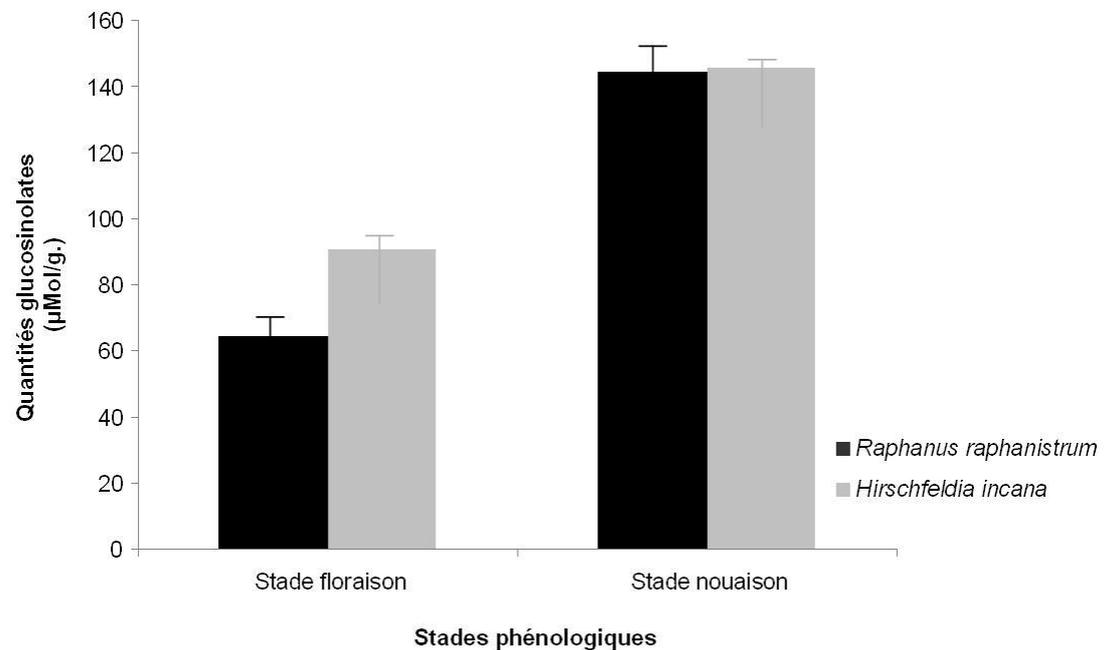


Figure 6.2 : Accumulation globale des molécules par stade phénologique chez *Raphanus raphanistrum* (L) et *Hirschfeldia incana* (L)

6.4.. Caractérisation des glucosinolates de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L)

Les résultats d'analyse font ressortir une richesse en molécules au profit d'*Hirschfeldia incana* (L) (7 molécules) par rapport à *Raphanus raphanistrum* (L) (4 molécules) (Figure 6.3).

Les principaux composés chimiques qui constituent la fraction majoritaire des glucosinolates d'*Hirschfeldia incana* (L) sont la Glucoberverine (30,53%), la Sinigrine (29,44 %) et le Pentenyl (25,73%), alors que la fraction minoritaire des glucosinolates sont

la Gluconasturtiine (8,11%), la Progoitrine (2,72%), la Gluconapine (2,57%) et l'Hydroxybutenyl (0,89%). Concernant la fraction majoritaire des glucosinolates de *Raphanus raphanistrum* (L) on signale la Sinigrine (39,06 %), la Glucoberteroïne (28,61%) et la Glucoberverine (22,60%). Une seule molécule représente la fraction minoritaire il s'agit de la Dehydroerucine (9,74%), Un chevauchement de synthèse de la Sinigrine et la Glucoberverine est enregistré chez les deux espèces, où on note une différence de capacité d'accumulation de 9,62 % de Sinigrine au profit de *Raphanus raphanistrum* (L), alors qu'une dénivellation d'accumulation de 7,93 % de Glucoberverine a marqué *Hirschfeldia incana* (L)

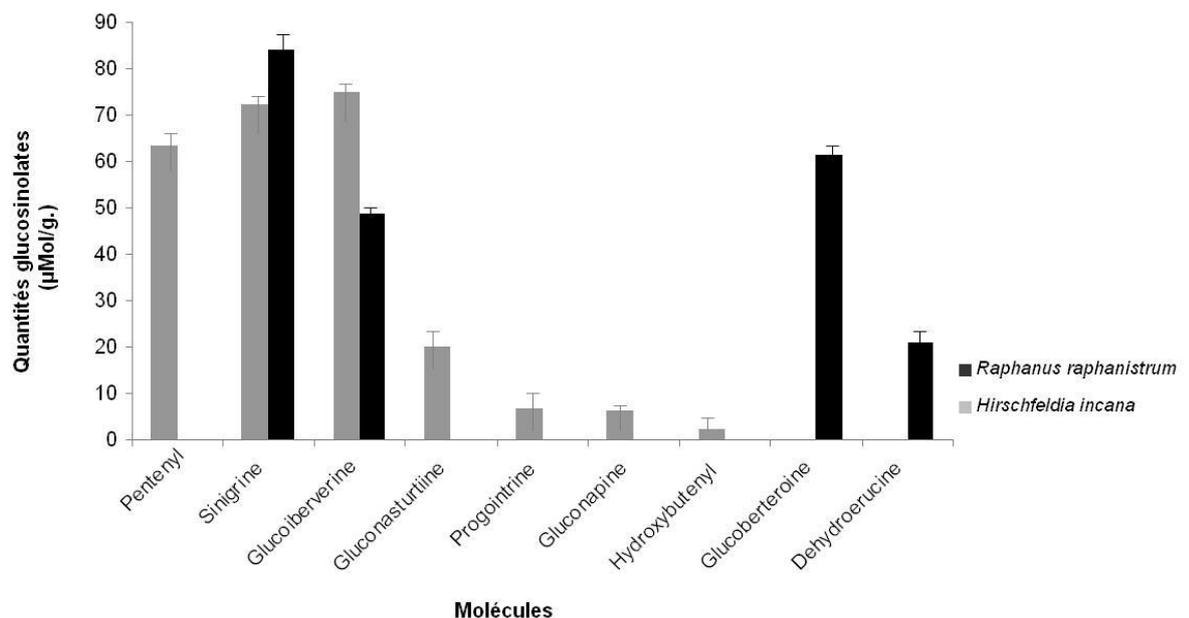


Figure 6.3 : Composition et quantités globale en glucosinolates de *Raphanus raphanistrum* (L) et *Hirschfeldia incana* (L)

6.5. Caractérisation des glucosinolates de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L) en fonction des stades phénologiques

La production des glucosinolates chez les crucifères étudiées, semble avoir une certaine divergence entre le stade de floraison et le stade de nouaison. La fluctuation des quantités de glucosinolates affiche un penchant à la hausse du stade floraison vers le stade nouaison.

Chez *Raphanus raphanistrum* (L), nous signalons un remaniement très important de la majeure partie des molécules caractérisées (3 molécules sur 4 molécules) à savoir, la Sinigrine, la Glucoberverine et la Glucoberteroïne. L'évolution importante des taux de la Sinigrine (61,21%) et de la Glucoberverine (51,77%) a été signalée en passant du stade floraison vers le stade nouaison, par contre dans le même sens d'évolution temporelle, les taux de la Glucoberteroïne sont revus à la baisse (18,02%) (Figure 6.4).

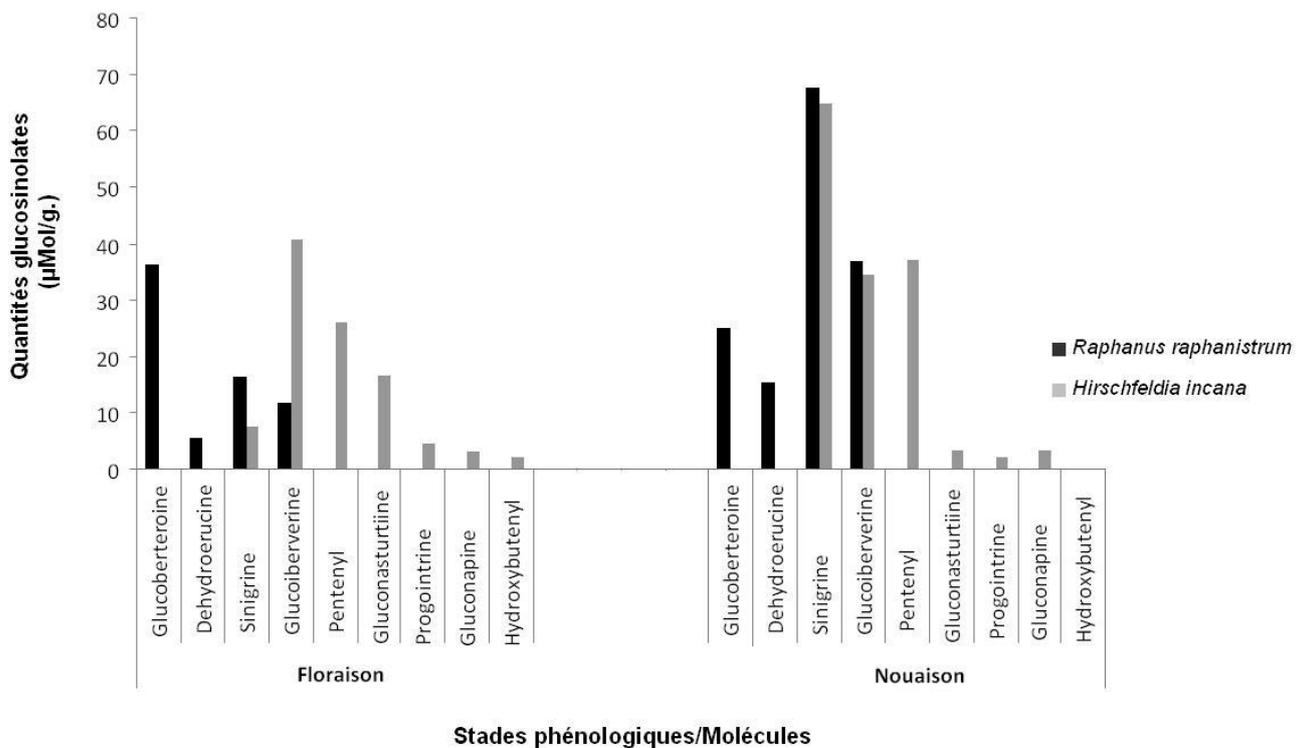


Figure 6.4 : Composition et quantités globale en glucosinolates de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L) en fonction des stades phénologiques

Par contre chez *Hirschfeldia incana* (L), nous signalons aussi un remaniement très important d'un nombre mineur des molécules caractérisées (3 molécules sur 7 molécules) à savoir, la Sinigrine, la Glucoberverine et la Pentenyl. L'évolution importante des taux de la Sinigrine (79,22%) et d'un degré moins ceux de la Pentenyl (17,83%) a été signalée en passant du stade floraison vers le stade nouaison, en revanche, les taux de la Glucoberverine sont revus à la baisse (8,65%) (Figure 6.4).

D'une manière générale les taux d'accumulation les plus importants sont signalés en phase de nouaison, avec un avantage plus prononcé pour *Raphanus raphanistrum* (Figure. 6.4).

En phase de nouaison les taux d'accumulation reste les plus importants avec un avantages prononcés chez *Raphanus raphanistrum* (L)

6.6.. Accumulation globale en glucosinolates dans les des différents organes de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L)

La variation des quantités globales en glucosinolates accumulées aux niveaux des différents compartiments de *R. raphanistrum* (L) et d'*H. incana* (L) affiche des taux très contrastés. Les fleurs et les gousses s'accaparent des taux les plus importants par rapport aux autres compartiments (Figure 6.5).

La projection des quantités globales en glucosinolates des deux espèces fait ressortir les potentialités intrinsèques des différents compartiments. Les racines, les tiges et les gousses de *R. raphanistrum* (L) ont une capacité d'accumulation plus que ceux d'*H. incana* (L) avec des taux d'écart en glucosinolates respectives de 31,95%, 16,59% et 16,04%. Par contre, *H. incana* (L) s'individualise par une capacité d'accumulation au niveau des feuilles (48%) et des fleurs (27,62%) qui dépassent largement les quantités accumulées au niveau des mêmes compartiments de *R. raphanistrum* (L).

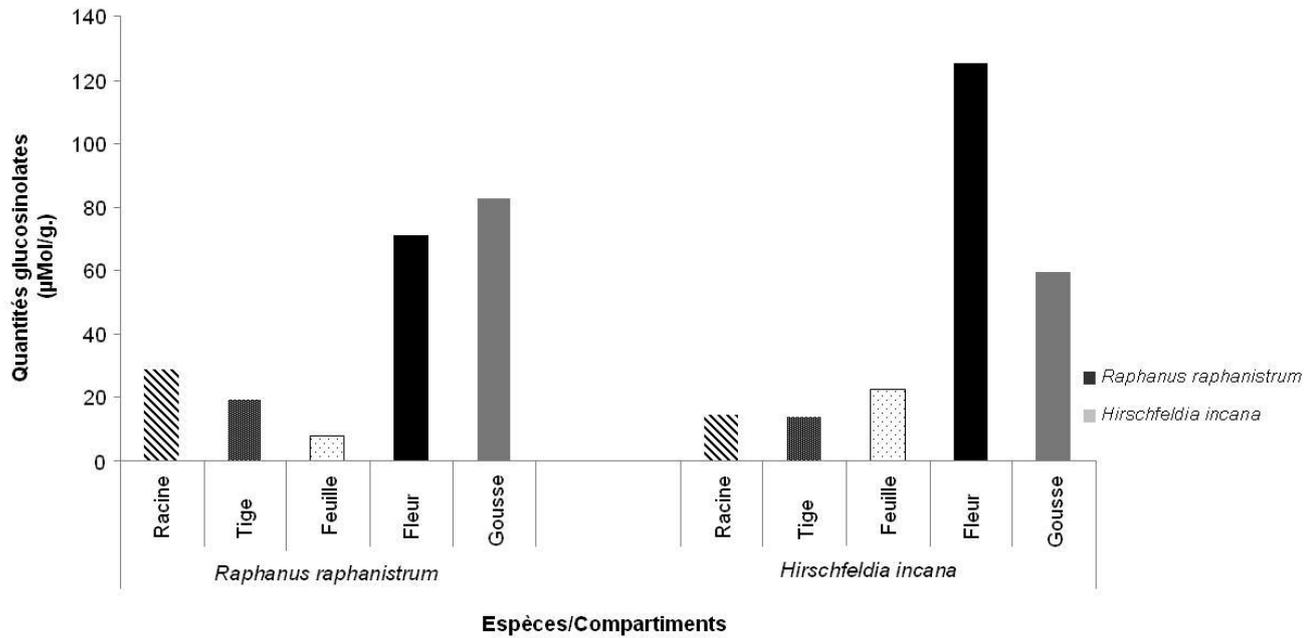


Figure 6.5 : Variation des quantités globale en glucosinolates des différents organes de *Raphanus raphanistrum* (L) et *Hirschfeldia incana* (L)

6.7.. Accumulation globale en glucosinolates des différents organes de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L) en fonction des stades phénologiques

Les dénivellations des quantités des glucosinolates mentionnées au niveau des différents compartiments montrent une évolution progressive de la capacité d'accumulation de la phase de floraison à la phase de nouaison (Figure 6.6).

En phase de floraison, pareillement, chez les deux espèces des accumulations croissantes en glucosinolates sont signalés depuis les racines vers les fleurs. Alors que durant la phase de nouaison, cette tendance d'accroissement en glucosinolates s'affiche d'une manière très accusée de la fleur vers la silique. A l'exception de ces deux organes, des accumulations divergentes sont signalés sur les autres organes (racine et feuille). Enfin, nous signalons que les grandes quantités accumulées sont au profit d'*H. incana* (L) et *R. raphanistrum* (L) respectivement pour la phase de floraison et la phase de nouaison

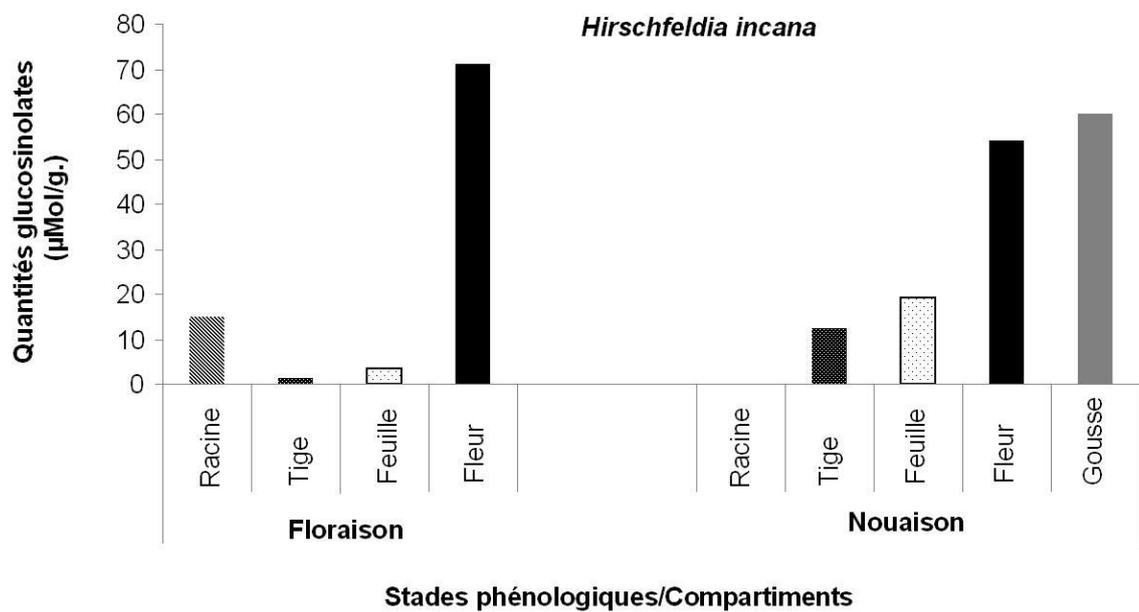
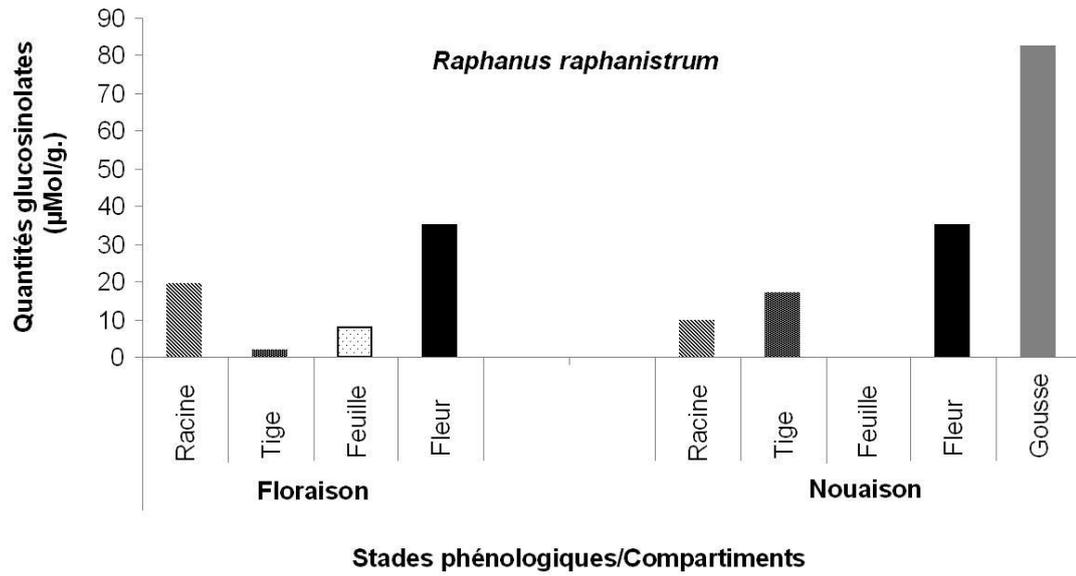


Figure 6.6. : Variation des quantités globale en glucosinolates des différents organes de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L) en fonction des stades phénologique

6.8. Caractérisation des glucosinolates des différents organes de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L) en fonction des stades phénologiques

Notre approche à travers la caractérisation des composés des différents organes de *R. raphanistrum* (L) et d'*H. incana* (L) nous a permis de distinguer la cinétique des capacités accumulatrices de chaque organe. En phase de floraison, une différence quantitative plus ou moins accentuée apparaît sur les teneurs en molécules de glucosinolates selon un gradient phénologique allant de la racine vers la tige, les feuilles puis les fleurs. Une distribution quantitative en glucosinolates a été identifiée en phase de nouaison obéissant au même gradient avec une accumulation nettement prononcée au niveau des siliques comme indiqué dans la Figure 6.8.

La comparaison de la composition chimique et des quantités accumulées dans les organes durant les deux phases d'évolution nous montre l'existence de différence qualitative et quantitative en glucosinolates entre les tiges et les fleurs de la phase de floraison et ceux de la phase de nouaison chez *R. raphanistrum* (L). Au niveau des tiges, les taux de la Dehydroerucine, la Glucoberveroine, la Sinigrine et la Glucoberverine affichent des accroissements respectifs de 64,28%, 69,30%, 78,86% et de 100% au profit de la phase de nouaison. Il en est de même pour les fleurs, où des augmentations assez comparables sont signalées chez la Sinigrine, la Glucoberverine, Dehydroerucine et la Glucoberveroine avec des taux respectifs de 23,24%, 63,55%, 71,50% et de 88,70% toujours en faveur de la phase de nouaison. En pleine phase de nouaison, la formation des gousses s'accorde avec des amplifications des taux d'accumulation en Dehydroerucine, Glucoberverine et en Sinigrine respectifs de 19,64%, 59,61% et de 71,85%.

Chez *H. incana* (L), de la phase floraison vers la phase nouaison nous avons noté la même cinétique en terme de modification qualitatives et quantitatives des glucosinolates. Des réductions mineurs sont enregistrées dans l'accumulation de la Pentenyl, la Progoitrine, la Gluconapine et la Glucoberverine, avec des taux respectifs de 9,26%, 9,85%, 9,96% et de 10,08%, néanmoins, les fortes baisses sont signalées chez l'Hydroxybutenyl (48,27%) et la Sinigrine (51,51%). De même que chez *R. raphanistrum* (L), la formation des gousses s'accorde avec des amplifications assez importantes du taux d'accumulation en Sinigrine (92,76%).

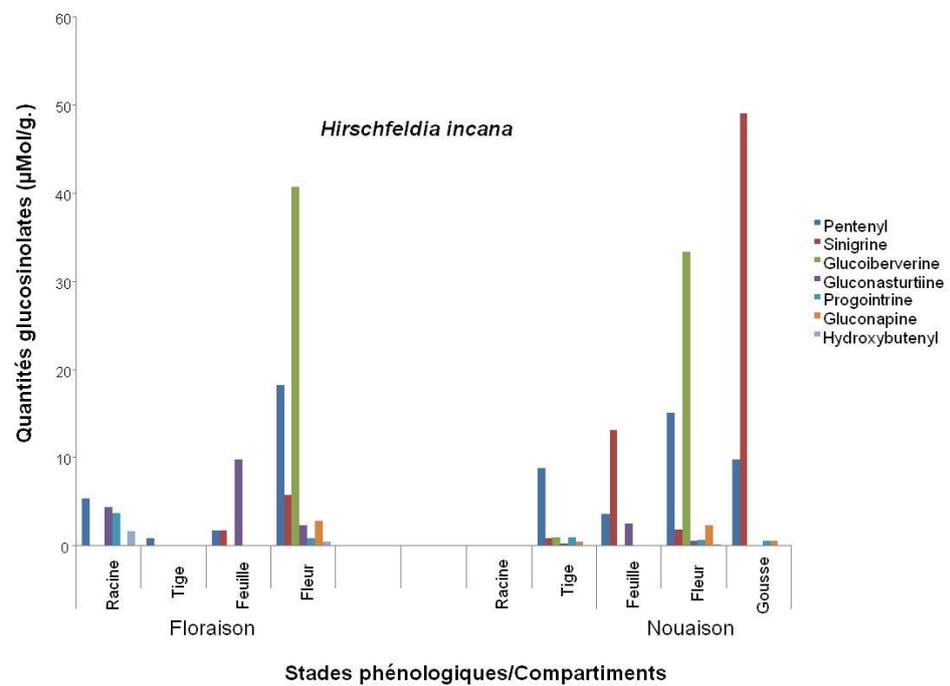
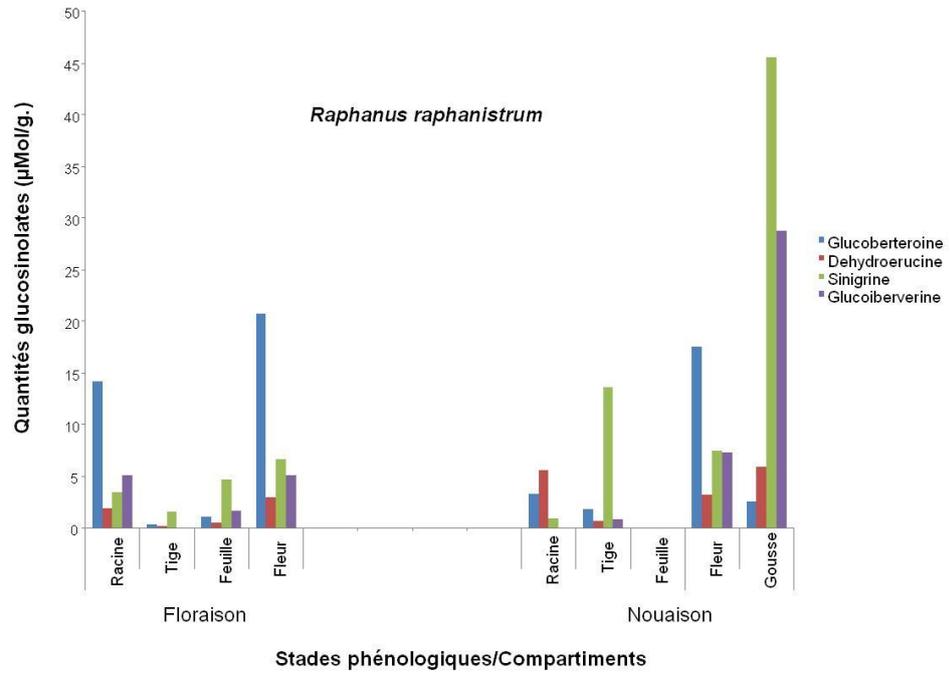


Figure 6.7. : Caractérisation des glucosinolates des différents organes de *Raphanus raphanistrum* (L) et *Hirschfeldia incana* (L) en fonction des stades phénologiques

6.9. Evaluation de l'accumulation des molécules bioactives

La caractérisation des molécules bioactives de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L) au court de deux phases critiques du cycle phénologique des plantes à savoir la phase de floraison et la phase de nouaison, nous a permis de constater l'existence d'un important remaniement des taux des molécules bioactives.

Les taux des molécules biochimiques de *Raphanus raphanistrum* (L) ont été soumises à une Analyse en Composantes Principales (ACP), le test été très positif du moment que le pourcentage de contribution des variables aux axes 1 et 2 dépassait largement les 80%. L'analyse multivariée montre que les organes accumulent d'une manière divergente les différentes molécules. Cette tendance est vérifiée par les coefficients de corrélations qui sont proches de +1 (Figure 6.8).

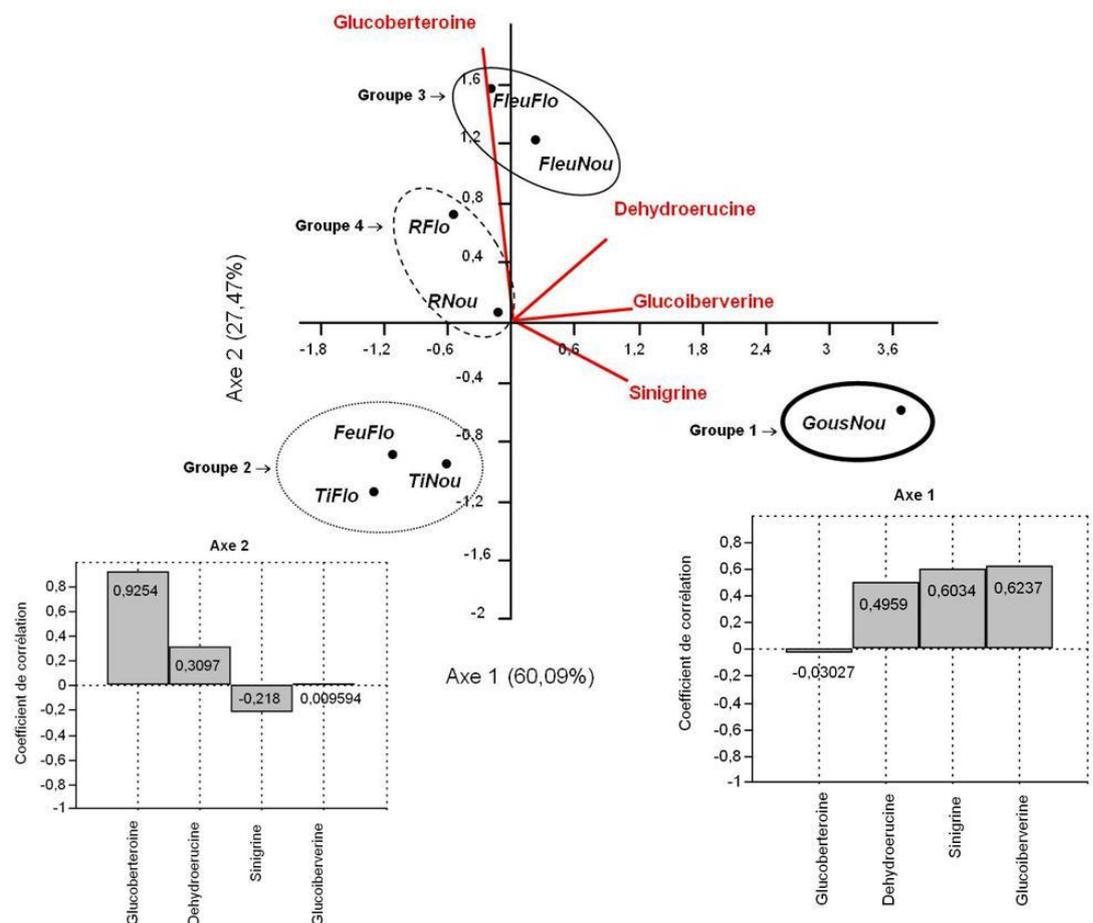


Figure 6.8.: Analyse multivariée représentant le remaniement des molécules bioactives des différents organes de *Raphanus raphanistrum* (L) en phase de floraison et de nouaison

La projection des vecteurs des molécules bioactives sur l'axe 1, nous a permis de constater la présence d'une forte corrélation positive entre le couplet Sinigrine/ Glucobervérine, et d'un degré moins la Sinigrine, Glucobervérine/ Dehydroerucine. Par le biais de la Classification Hiérarchique Ascendante (C.H.A.) et sur la base d'une distance euclidienne de -1 (Figure 6.9), nous pouvons estimer que les fortes accumulations des molécules bioactives notamment la Sinigrine, la Glucobervérine et la Dehydroerucine sont concentrées préférentiellement au niveau des gousses durant la phase de nouaison

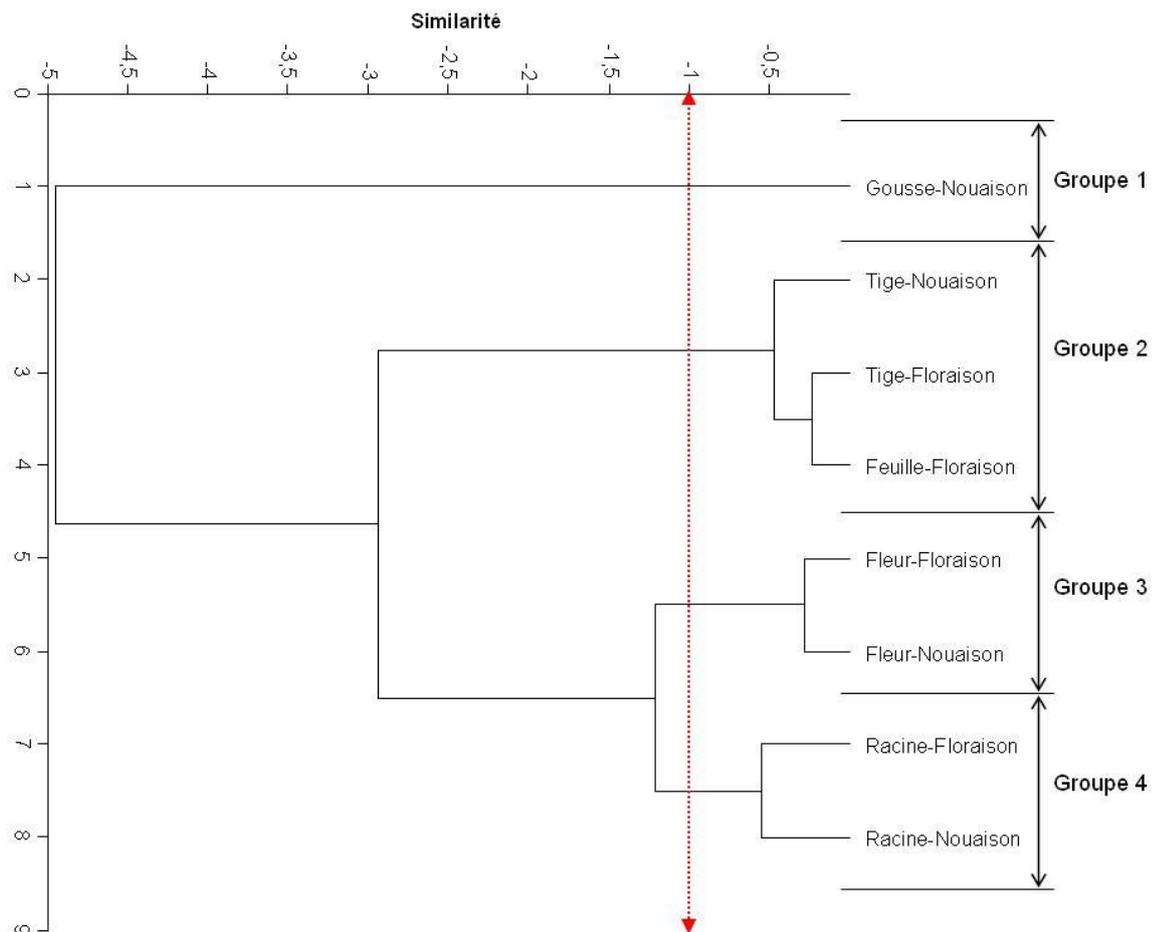


Figure 6.9. : Classification hiérarchique ascendante des molécules bioactives des différents organes de *Raphanus raphanistrum* (L) en phase de floraison et de nouaison (calculée par le biais des distances euclidiennes)

Les taux des molécules biochimiques d'*Hirschfeldia incana* (L) ont été soumises aussi à une Analyse en Composantes Principales (ACP), le test été satisfaisant du moment que le pourcentage de contribution des variables aux axes 1 et 2 est très proche des 80%. L'analyse multivariée montre que les organes accumulent d'une manière divergente les différentes molécules. Cette tendance est vérifiée par les coefficients de corrélations qui sont proches de 1 (Figure 6.11).

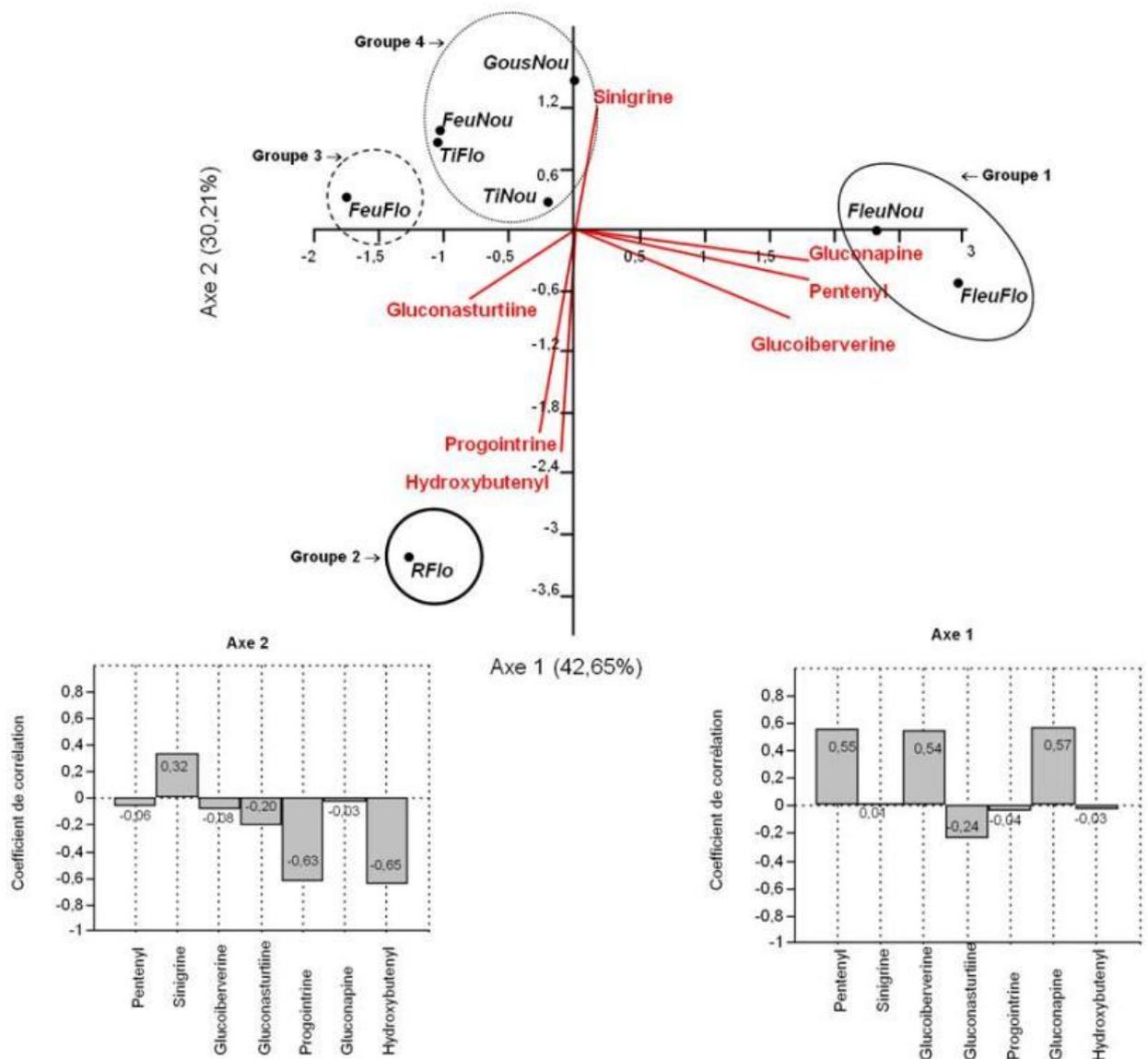


Figure 6.10. : Analyse multivariée représentant le remaniement des molécules bioactives des différents organes d'*Hirschfeldia incana* (L) en phase de floraison et de nouaison

La projection des vecteurs des molécules bioactives sur les axes 1 et 2, nous a permis de constater la présence d'une certaine disparité des vecteurs des molécules bioactives avec les organes selon leurs stades phénologiques. De fortes corrélations sont signalées entre la Gluconapine, la Glucoiberverine, le Pentyl et les fleurs, entre la Progointrine, l'hydroxybutenyl et les racines, et la sinigrine et les gousses.

Les nuages de points obtenus par C.H.A. (Figure 6.11), font apparaitre la présence d'une voie d'accumulation des molécules bioactives diversifiée, prenant son origine les racines pendant la phase de floraison, puis les fleurs durant les phases de floraison et de nouaison et en fin les gousses en phase de nouaison.

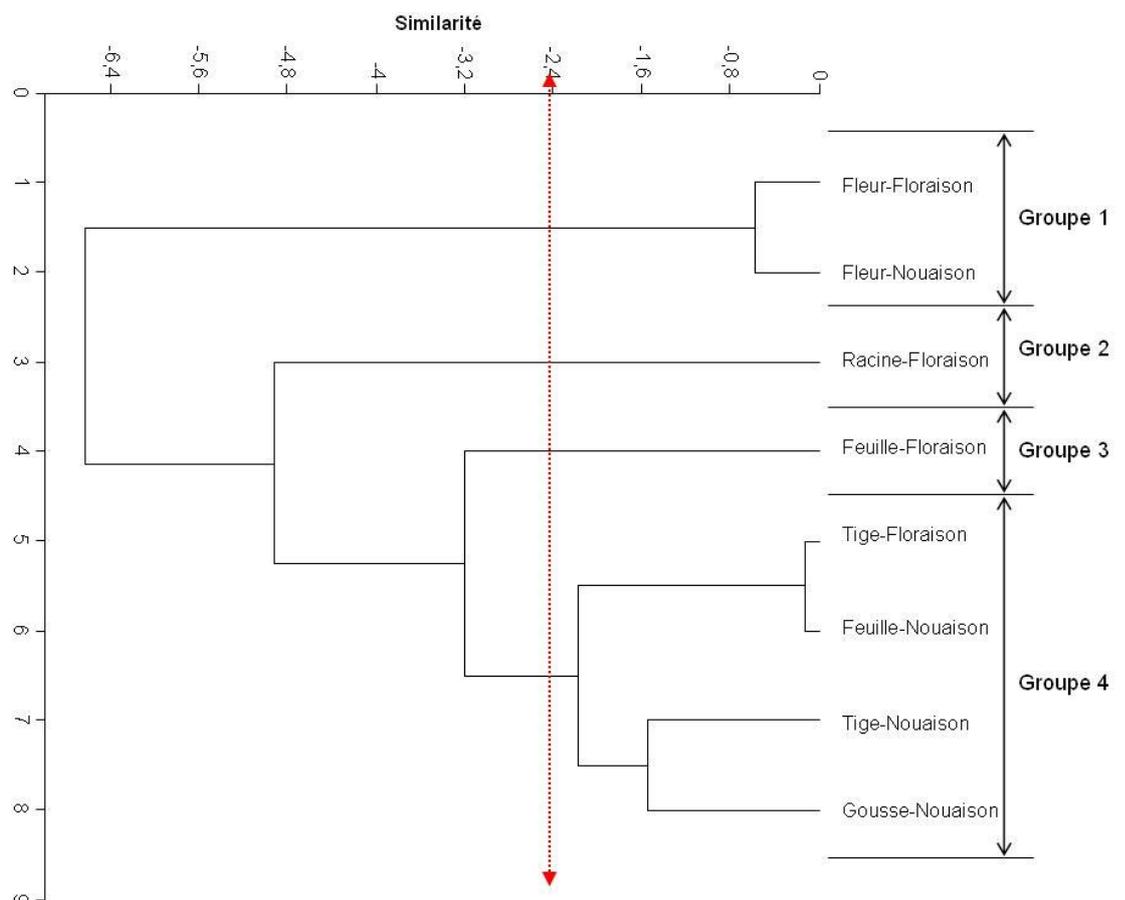


Figure 6.11. : Classification hiérarchique ascendante des molécules bioactives des différents organes d'*Hirschfeldia incana* (L) en phase de floraison et de nouaison (calculée par le biais des distances euclidiennes)

Cette trajectoire d'accumulation et caractérisée par une diversité en molécules bioactives de la racine (Progointrine, hydroxybutenyl) vers les fleurs (Gluconapine, Glucoiberverine, Pentyl), pour s'individualiser par une seule molécule au niveau des gousses (Sinigrine).

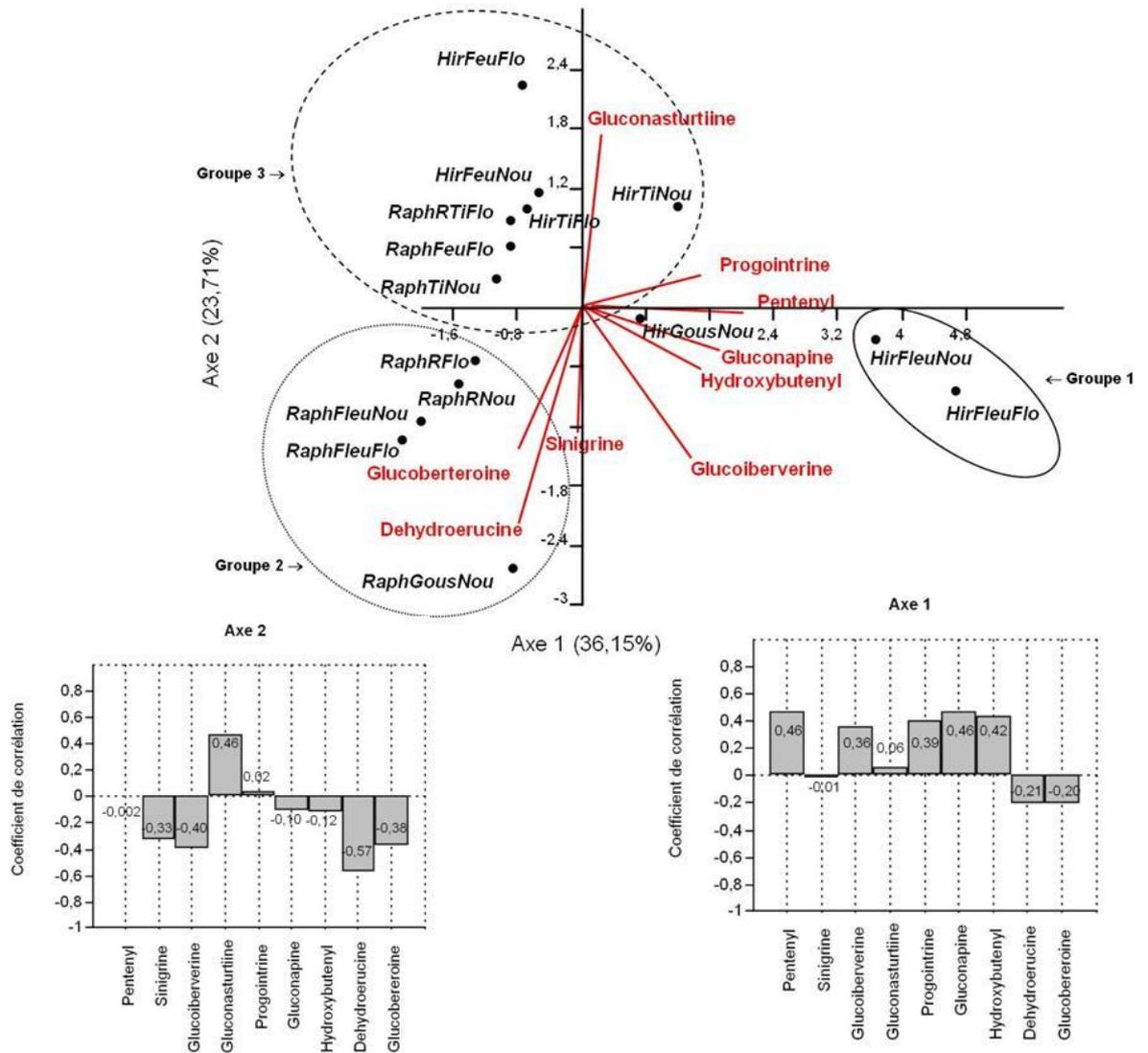


Figure 6.12. : Analyse multivariée représentant le remaniement des molécules bioactives des différents organes de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L) en phase de floraison et de nouaison

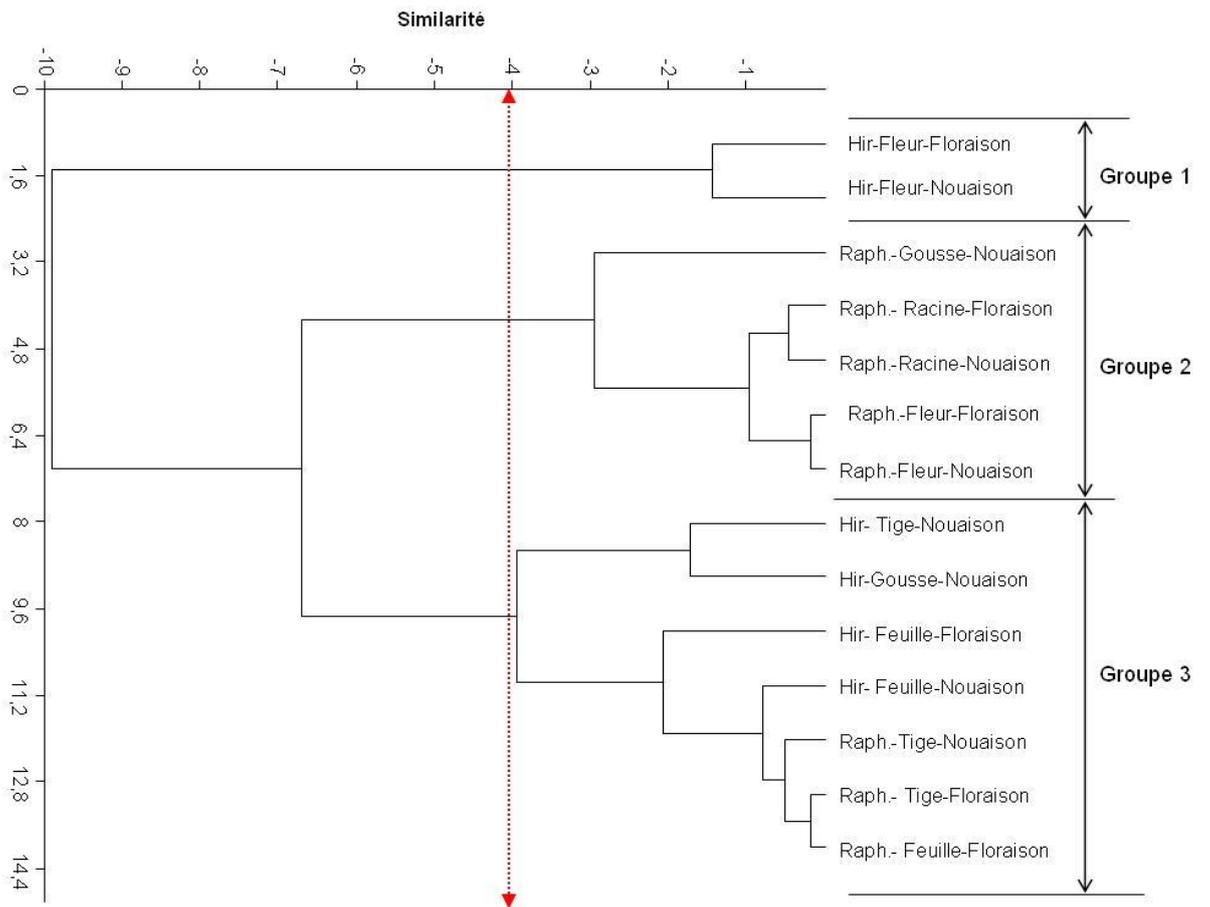


Figure 6.13. : Classification hiérarchique ascendante des molécules bioactives des différents organes de *Raphanus raphanistrum* (L) et d'*Hirschfeldia incana* (L) en phase de floraison et de nouaison

CHAPITRE 7

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les glucosinolates ont depuis longtemps un intérêt pour la société humaine en raison de leur présence dans certains légumes de crucifères (chou, chou-fleur, brocoli) et condiments (moutarde, le raifort, le wasabi). Le goût et les saveurs distinctes de ces aliments sont dus principalement aux produits d'hydrolyse de l'isothiocyanate. Dans la dernière décennie, certains glucosinolates ont été identifiés comme des agents cancerprevention puissant chez une large gamme de modèles animaux en raison de la capacité de certains produits de leur hydrolyse d'induire des enzymes de détoxification de phase II, telles que la quinone réductase, la glutathion- S-transférase, et glucuronosyl transférases. Le sulforaphane, dérivé de 4-isothiocyanate methylsulfinylbutyl glucosinolates, trouvé dans le brocoli, a fait l'objet de beaucoup de ces études. Le sulforaphane et les isothiocyanates peuvent empêcher la croissance des tumeurs en bloquant le cycle cellulaire et la promotion de l'apoptose. Par ailleurs, ces résultats sont motivants et ont suscité beaucoup d'efforts pour augmenter la teneur en sulforaphane du brocoli et de promouvoir les bienfaits de ce légume [90].

Plusieurs études récentes ont rapporté que les plantes réagissent aux attaques des bioagresseurs par l'accumulation systémique des niveaux plus élevés de glucosinolates, qui augmente vraisemblablement leur résistance par toxicité en inhibant la croissance ou encore par la dissuasion de la prise alimentaire d'un large éventail d'ennemis des plantes potentielles. [152,153] ..

D'autres travaux ont porté sur les brassicacées avec des plantes référence comme *Brassica thaliana* qui a la capacité d'exprimer une gamme très diversifiée de glucosinolates. Dans cette optique nous avons essayé de caractériser et quantifier les molécules de glucosinolates de deux espèces spontanées *Raphanus raphanistrum* et *Hirschfeldia incana*, très répandues en Algérie et considérées comme des mauvaises herbes alors que les brassicacées sont maintenant reconnues pour leur pouvoir biocide.

L'aspect d'étude qui a été consacré à la cinétique d'accumulation des glucosinolates chez *Raphanus raphanistrum* (L) et *Hirschfeldia incana* (L), nous a permis de retracer les fluctuations majeures des molécules bioactives. A travers les hypothèses qui vont être soulevées nous avons essayé de discuter les résultats phares aux quels nous avons abouti en mettant en diapason la caractérisation et la diversité des glucosinolates des différents organes durant les phases critiques des plantes. Les données ont été confrontés à la littérature, cependant nous avons retracé les connaissances déjà documentées sur les teneurs en glucosinolates ainsi que leurs transport depuis la racine jusqu'à la silique (avec illustration graphique sur les figures 7.1 et 7.2.

7 ;1. Cinétique d'accumulation des glucosinolates chez les deux espèces entre la phase floraison et la phase nouaison

Nos résultats soulignent que chez *R. raphanistrum* (L), les différences entre la quantité et la qualité des glucosinolates sont par ailleurs accrues par l'effet de variation d'organes à travers le passage de la phase de floraison à la phase de nouaison. En effet, la Sinigrine accuse une baisse d'accumulation au niveau des tiges par contre elle affiche un gain d'accumulation de plus de 60% au niveau des feuilles et aux environs de 10% au niveau des fleurs. Pour la Glucobervérine, elle note une disparition totale au niveau des tiges, suivi d'une diminution d'accumulation de façon considérable qui peut aller jusqu'à plus de 50% au niveau des feuilles, par contre elle se reconforte par une augmentation d'accumulation de plus de 20% au niveau des fleurs.

La molécule de Dehydroerucine augmente son accumulation de pratiquement 100% au niveau des tiges et des fleurs avec un ratio en faveur des tiges, alors que les feuilles perdent environ 20 % lors de leur passage au stade nouaison. Enfin, la Glucobertrone augmente son accumulation de plus de 80% au niveau des tiges et renforce son capitale de plus 40% au niveau des feuilles, alors qu'elle laisse près de 20% de son capital cumulé dans les fleurs (Figure 7.1).

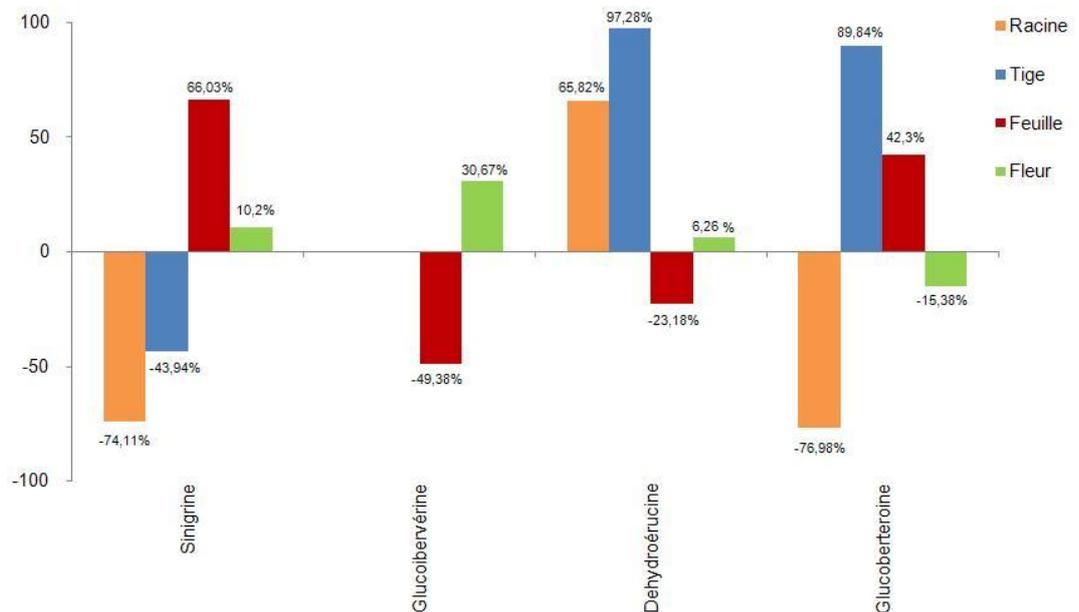


Figure 7.1 : Fluctuation des taux des glucosinolates lors du passage de la phase floraison à la phase nouaison chez *Raphanus raphanistrum*

Chez *H. incana* (L), il semblerait que les capacités accumulatrices des organes apportent une marginalité du fait que le passage de la phase floraison vers la phase nouaison incrimine certains organes par rapport aux autres. Dans cette logique, durant la transition entre les deux phases critiques, le Pentynyl connaît une perte en accumulation au niveau des feuilles, des tiges et des fleurs, alors que la Sinigrine s'accumule préférentiellement au niveau des tiges et des feuilles mais en nette régression au niveau des fleurs. Pour la Glucoberverine, elle disparaît complètement des feuilles et diminue au niveau des fleurs. Parallèlement, elle s'accumule au niveau des tiges jusqu'à plus de 90%. A noté aussi que la Gluconasturtiine diminue sur feuilles et fleurs alors qu'elle s'accumule très faiblement au niveau des tiges. La Progoitrine et la Gluconapine ne sont plus accumulées aux niveaux des feuilles, elles diminuent au niveau des fleurs mais

elles affichent un accroissement d'accumulation de plus de 90 % au niveau des tiges. Enfin, l'Hydroxybutenyl disparaît des feuilles et des tiges, mais diminue considérablement avec une perte de plus de 50% au niveau des fleurs (Figure 7.2.).

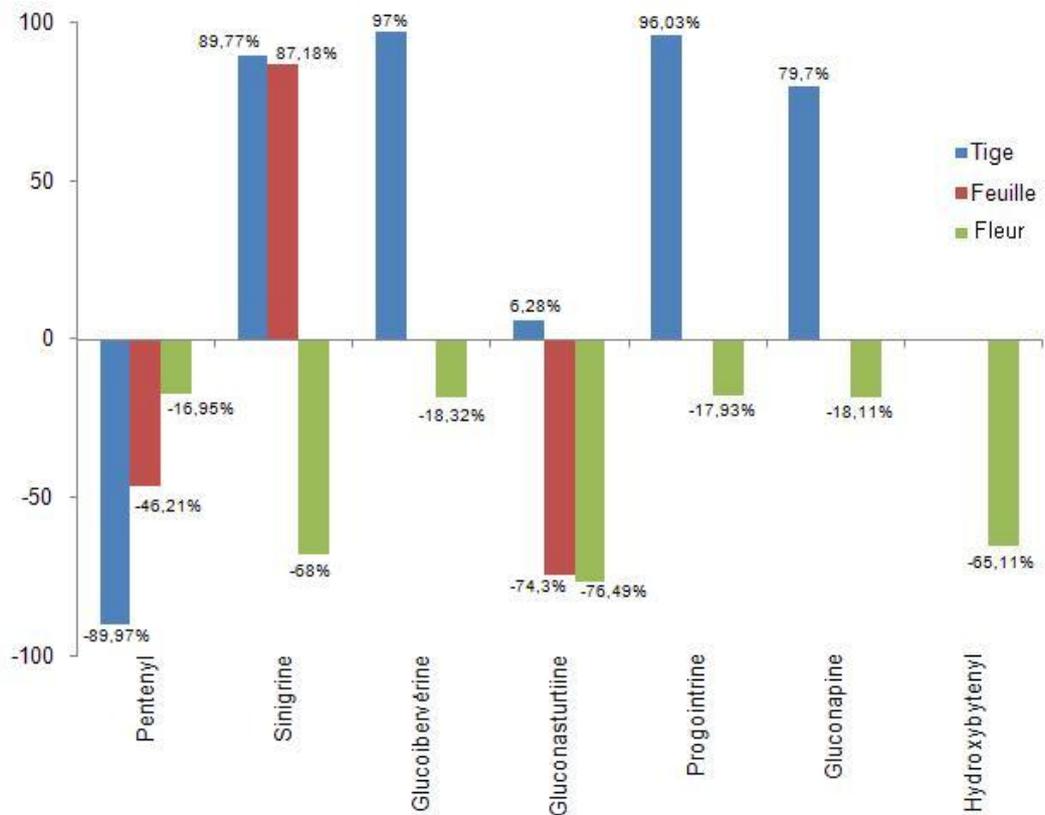


Figure 7.2: Fluctuation des taux des glucosinolates lors du passage de la phase floraison à la phase nouaison chez *Hirschfeldia incana*

De ce qu'il vient d'être avancé, les glucosinolates varient considérablement dans le temps du fait que chaque phase phénologique accumule des quantités différentes en molécules bioactives et également selon les capacités intrinsèques des organes; ceci rejoint l'idée que les molécules bioactives (Glucosinolates) sont les plus utilisées par les crucifères pour répondre à leurs exigences physiologiques. Dans cette même logique, Futuyma [154], Begon *et al* [155]; avancent que la spécialisation écologique induit donc une évolution des traits d'histoire de vie des organismes. Ces adaptations dans leurs traits d'histoire de vie permettent aux individus de mieux répondre en termes de valeur sélective aux pressions de sélection qu'ils subissent dans leur habitat, que ces pressions

proviennent des ressources utilisées ou des interactions interspécifiques existant au sein de leur communauté.

L'hypothèse de la migration des molécules bioactives a été fortement documentée. La littérature signale que la teneur en glucosinolates dans les plantes est d'environ 1 % du poids sec dans certains tissus des légumes du genre *Brassica* [156], même si le contenu est très variable [157], il peut se rapprocher des 10% dans les graines de certaines plantes, où les glucosinolates peuvent représenter la moitié de la teneur en soufre des graines [158]. La plupart des espèces contiennent un nombre limité de glucosinolates (généralement moins d'une douzaine), bien que pas moins de 23 glucosinolates différents ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* [159] Leur répartition varie selon les organes de la plante, avec des différences quantitatives et qualitatives entre les racines, feuilles, tiges et les graines. A titre d'exemple, les graines ou les jeunes pousses de brocoli (*Brassica oleracea var. Italica*) peut contenir 70 ± 100 μmol de glucosinolates totaux par gramme de poids frais, avec une augmentation de plus de 1% apportée par l'indole glucosinolates et le reste étant constitué presque entièrement de glucosinolates aliphatiques, glucoraphanine, glucoerucine et glucoiberine [160]. Fahey *et al.*, [160] et. Farnham *et al.*, [161]. stipule que l'âge de la plante est un facteur déterminant de la composition qualitative et quantitative en glucosinolates. Néanmoins, les facteurs environnementaux tels que la fertilité des sols [162,160], le défi des bioagresseurs [163], les blessures [164] ou les régulateurs de croissance végétale [165] ont aussi des effets significatifs sur les taux d'accumulations et peuvent affecter leur répartition entre les organes.

En supposant que l'implication des fonctions glucosinolates dans la défense contre les herbivores et les pathogènes argumente fortement le schéma des différences d'accumulation entre les organes chez les crucifères, ceci étant compatible avec les prédictions des théories actuelles sur la répartition optimale des substances de défense. Zangerl et Bazzaz [166], signalent que les organes de reproduction, y compris les graines, les fleurs et les fruits, qui contribuent le plus à la formation des plantes, sont censés avoir les plus fortes concentrations en composés de défense. La comparaison de la composition en glucosinolates de

différents organes d'*Arabidopsis thaliana*, les graines et les fruits ont exprimé la plus grande diversité de composés individuels qui peuvent aussi refléter le potentiel défensif de ces organes de reproduction. Les glucosinolates majeur, y compris les composés avec des chaînes latérales et des substituants ester methylthioalkyl benzoate, sont également très différents de leurs homologues dans d'autres organes, ceci peut-être considéré comme une conséquence de la physiologie spécialisés ou des besoins de défense des graines et des fruits. Quant aux racines, ils affichent des niveaux plus élevés en glucosinolates indole et des niveaux très bas en glucosinolates aliphatiques comparé aux autres organes, ceci reste une tendance générale observée chez les espèces *Brassica*. [167,168]

7.2. Cinétique d'accumulation des molécules communes chez les deux espèces entre la phase floraison et la phase nouaison

Les changements dans le profil des deux molécules de glucosinolates communes pour les deux espèces étudiées nous ont permis de retracer les fluctuations des taux de la Sinigrine et la Glucoberverine.

En comparant les deux molécules, nous distinguons une baisse d'accumulation de la Sinigrine de près de 50% au niveau des tiges de *R. raphanistrum*, alors que cette dernière et au niveau du même organe, elle augmente de plus de 90% chez *H. incana*. Quant à la Glucoberverine, elle disparaît complètement chez *R. raphanistrum* tandis que chez *H. incana* son taux d'accumulation augmente jusqu'à près de 100%. Au niveau des feuilles, seule la Sinigrine est accumulée avec plus de 50% pour *R. raphanistrum* et plus de 90% pour *H. incana*, cependant la Glucoberverine enregistre une perte d'accumulation de près de 10% pour *R. raphanistrum*, alors que chez *H. incana* elle diminue jusqu'à sa disparition complète. Enfin au niveau des fleurs, *R. raphanistrum* s'individualise par l'accumulation des deux molécules (Figure 7.3).

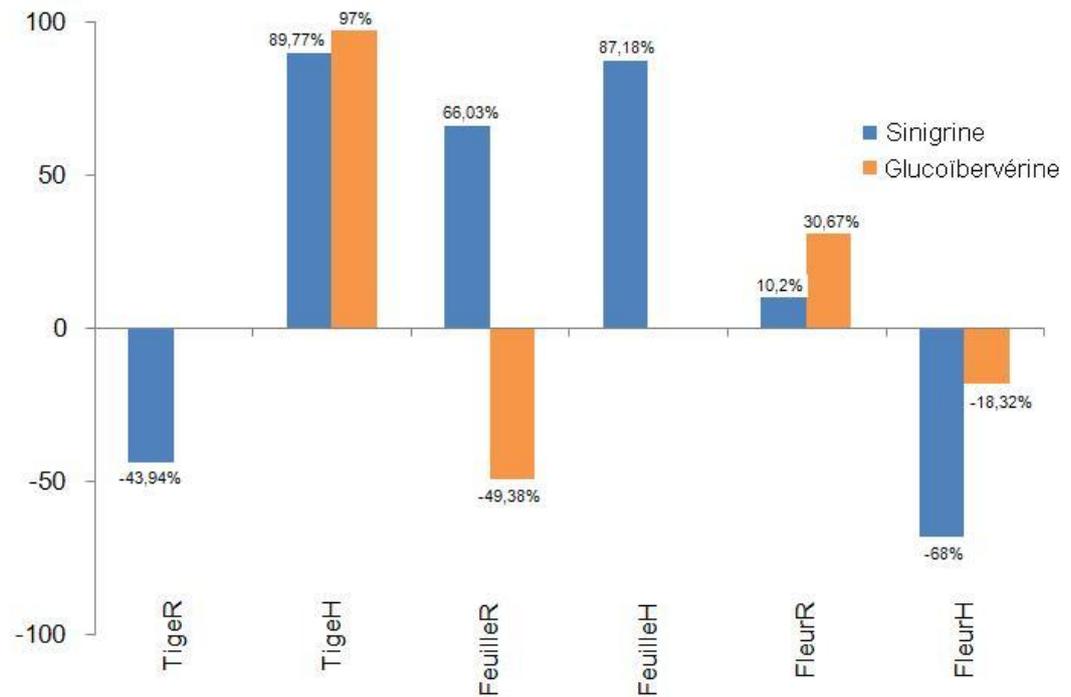


Figure 7.3 : Fluctuation des taux des molécules communes de glucosinolates lors du passage de la phase floraison à la phase nouaison chez les deux espèces étudiées

Du moment que les deux molécules Sinigrine et Glucoberverine sont considérées comme des molécules aliphatiques, cela suggère que le changement de profil des taux de ces derniers est contrôlé par voie enzymatique, ou encore par des variantes génétiques de longueur de chaîne latérale de glucosinolates. Cette théorie est soutenue par les travaux de Fahey *et al.* [160], qui ont fourni des preuves solides que l'allongement de chaînes latérales d'acides aminés (par exemple des acides aminés homologues, issus des acides aminés communs par addition d'acétate d'acide céto- et décarboxylation), interviennent avant S-glycosylation, tandis la modification de la chaîne latérale (par exemple, désaturation, hydroxylation) se produit probablement après l'addition de la fraction glycone.

La première étape de la biosynthèse des glucosinolates passe, par la N-hydroxylation d'un acide aminé précurseur, suivie d'une décarboxylation pour former une aldoxime. En bref, le modèle largement accepté pour la biosynthèse des glucosinolates comporte trois grandes étapes: (i) allongement de la chaîne latérale, (ii) la biosynthèse Glucône, et (iii) modification de la chaîne latérale.

Des études sur l'*Arabidopsis thaliana* et de *Brassica napus* ont examiné des variantes génétiques de longueur de chaîne latérale. Cela a conduit à la cartographie d'un certain nombre de loci "GSL- long", variation allélique au cours de laquelle a été proposée pour déterminer la longueur de la chaîne latérale en glucosinolates et à l'isolement d'un clone du chromosome artificiel de levure qui s'hybride avec les marqueurs RFLP près du gène GSL-Elong chez *Arabidopsis* [169].

La biosynthèse glycone est initiée par la conversion des acides aminés des protéines (par exemple, l'alanine, la méthionine, la valine, la leucine ou l'isoleucine pour les glucosinolates aliphatiques; phenylalanine ou tyrosine pour les glucosinolates aromatiques et tryptophane pour les glucosinolates indole) ou une chaîne allongée d'acides aminés (par exemple, de nombreux les précurseurs de glucosinolates aliphatiques tels que homométhionine, dihomométhionine, trihomométhionine) pour aldoximes [170].

7.3. Cinétique d'accumulation des molécules de glucosinolates au niveau des siliques pour les deux espèces

Pour mieux visualiser la relation de changement de profil d'accumulation des glucosinolates au niveau des siliques nous avons présenté les secteurs dont les proportions sont fonctions des taux d'accumulations de chaque molécule (Figure 7.4)

Au niveau des siliques, seules quatre molécules sont présentes, avec une dominance pour la Sinigrine qui dépasse les 50% pareillement chez les deux espèces.

R. raphanistrum à conserver ses quatre molécules (Sinigrine, Glucoberverine, Dehydroérucine et Glucoberteroïne) durant les phases critiques étudiés, alors qu'*H. incana* a perdu au cours ce développement trois molécules (Glucoberverine, Gluconasturtiine et Hydroxybutenyl) par rapport au sept molécules capitalisées en phase de floraison. De l'ensemble des molécules accumulées au niveau des siliques aucune d'elles n'étant aromatiques.

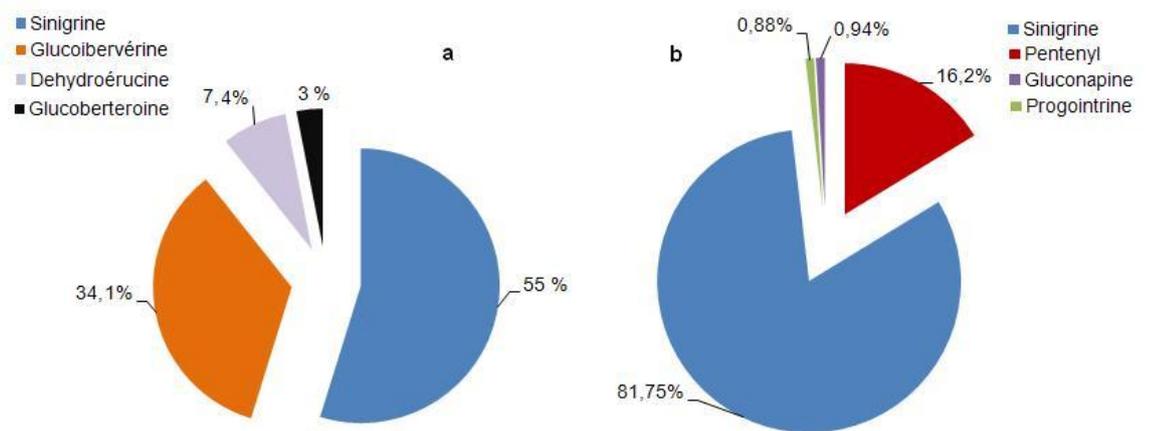


Figure 7.4 : Fluctuation des taux des glucosinolates lors du passage de la phase floraison à la phase nouaison au niveau des siliques chez les deux espèces étudiées

Du fait que la forte accumulation des glucosinolates dans les siliques présente un niveau élevée en comparaison avec les autres organes, ce qui suggère d'une part la capacité des organes reproducteurs de synthétiser également au moins certains de leurs glucosinolates propre fondée sur des études d'alimentation précurseurs [171] et l'expression des gènes de biosynthèse de glucosinolates dans ces organes [172,173]. La composition en glucosinolates divergentes des graines et le fait que la quantité absolue des glucosinolates dans les graines peuvent être plus élevée que dans le reste entier de la plante soutient également une nouvelle synthèse dans ces organes. [174].

D'autre part, la présence d'un système d'importation dans ce tissu. Plusieurs éléments de preuve indiquent le transport à longue distance des glucosinolates des différents organes vers les siliques. Premièrement, les glucosinolates possèdent les propriétés physico-chimiques nécessaires à voyager dans le phloème [175], remplissant une des conditions préalables pour le transport de longue distance. Deuxièmement, les fortes concentrations en glucosinolates existant dans la sève du phloème [176]

Enfin, la plus forte indication de transport à longue distance des glucosinolates provient d'une étude menée par Chen *et al.* [177], qui avance que les glucosinolates sont également suggéré d'être transporté activement dans les plantes. Des quantités élevées de benzylglucosinolate, qui est principalement synthétisée dans des feuilles de *T. majus*, ont été accumulés dans d'autres tissus tels que les graines en développement, indiquant ainsi le processus de la translocation [178]. Par ailleurs l'analyse du profil en glucosinolates des graines et des tissus de la feuille d'hybrides F1 de *B. napus* provenant de croisements réciproques entre les cv. Cobra et une ligne de synthèse a montré que le profil des glucosinolates aliphatiques dans la graine était identique au profil dans les feuilles de la plante [179]. Cela suggère que la biosynthèse des glucosinolates (hydroxylation ou à la sulfatation) n'ont pas lieu dans l'embryon, et que les glucosinolates entièrement formé est transféré à partir de tissus maternels dans les graines en développement.

Une récente enquête quantitative détaillée de la variation en glucosinolates parmi 39 écotypes *A. thaliana* a montré une corrélation positive significative entre les teneurs en glucosinolates aliphatiques dans les feuilles et les graines, ce qui suggère que les glucosinolates sont transportés à partir des feuilles aux graines [180].

Par ailleurs, Brudenell *et al.* [175] ont trouvé que les glucosinolates et les desulphoglucosinolates avaient adapté des propriétés physico-chimiques afin de permettre la mobilité dans phloème.

A l'appui de transport du phloème, les expériences d'alimentation de pucerons sur la moutarde noire *B. nigra* ont montré qu'il y avait plus de 10 μM de Sinigrine dans la sève du phloème des jeunes feuilles, tandis que il y avait seulement environ 1-2 μM de glucosinolates dans les feuilles matures présenescent et sénescents [181].

Ces données confirment que le transport à longue distance des glucosinolates suit le principe de l'assimilation de translocation, à savoir le débit massique de la source aux siliques. Pour tester cette hypothèse, le p-OHBG radiomarké a été alimenté sur une feuille de rosette d'*A. thaliana* pour vérifier le transport et la distribution. Après 24 h, les glucosinolates radiomarkées ont été trouvé dans d'autres feuilles de la rosette, racines, tige, jeunes feuilles, les boutons floraux et des siliques.

Il est donc proposé que les glucosinolates synthétisés dans les feuilles matures sont facilement chargé et transporté par le phloème, avec la participation de son photoassimilats dans le flux de translocation osmotique depuis les racines jusqu'aux siliques.

En plus des fonctions nutritionnelles, sous régime de stress environnemental il est possible que le transport phloémique des glucosinolates peut aider la plante à se défendre contre bioagresseurs du phloème et aussi acquérir la capacité de coordonner la synthèse et l'utilisation des ressources entre les divers sites de protection. Gijzen *et al.* [182,183] ont entrepris une étude de l'absorption de glucosinolates dans les embryons excisés de *B. napus* et a montré que l'absorption a été saturable, energydependent, et varié avec le stade de développement de l'embryon, mais en corrélation avec le temps d'accumulation de glucosinolates *in situ*. Les données indiquent que les embryons prennent les glucosinolates par un système de transporteur à médiation.

L'étude de la cinétique d'accumulation des molécules bioactives de *Raphanus raphanistrum* et d'*Hirschfeldia incana* a conduit à une augmentation remarquable de nos connaissances sur la fluctuation des glucosinolates, qui sont l'une des principales classes de métabolites secondaires dans ces plantes

modèle. La disponibilité d'informations sur les sites de synthèse et les diverses voies de transports des glucosinolates ont grandement ouvert les voies de valorisation dans le domaine agronomique. Toutefois, la capitalisation de connaissances sur les facteurs qui régulent l'efflux par les voies de biosynthèse et la dégradation sont nécessaires si nous voulons apprécier pleinement la manière dont l'accumulation de glucosinolates est contrôlée. Ceux-ci seront inestimables pour tester rigoureusement les rôles physiologiques et écologiques des glucosinolates dans la nature. Enfin, la manipulation du métabolisme glucosinolates va aussi aider à exploiter le potentiel de ces composés appliqués pour améliorer la résistance aux bioagresseurs et les avantages nutritionnels des plantes cultivées ou de générer des produits de haute valeur pour l'industrie.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Au terme de ce travail consacré essentiellement à la caractérisation des glucosinolates au niveau des différents organes de *Raphanus raphanistrum* et *Hirschfeldia incana* durant les phases critiques de leurs cycles phénologiques il nous a paru intéressant de dégager les principaux résultats auxquels nous avons aboutis

Hirschfeldia incana, est caractérisée par 7 molécules à savoir: Pentenyl, Sinigrine, Glucoiberverine, Gluconasturtiine, Progoitrine, Gluconapine et l'hydroxybutenyl. Tandis que *Raphanus raphanistrum* est caractérisée par 4 molécules à savoir : Pentenyl, Sinigrine, Dehydroerucine et Glucoberteroine. Les Sinigrine et Glucoiberverine étant des molécules communes pour les deux espèces. de crucifères étudiées.

La Sinigrine constitue la majorité de la composition des glucosinolates, puis viennent les Glucoiberverine pour chez les deux espèces.

Hirschfeldia incana se démarque par rapport à *Raphanus raphanistrum* par un supplément en terme de capacité d'accumulation en molécules de glucosinolates. Une divergence d'accumulation est très marquée entre espèces d'une part et entre les stades phénologiques d'autres part. Il ressort qu' *Hirschfeldia incana* présente une importante capacité d'accumulation en phase de floraison en comparaison avec les potentialités d'accumulations de *Raphanus raphanistrum*. Au stade nouaison, on note un dédoublement des quantités en glucosinolates accumulées, ce qui traduit une certaine égalité dans les capacités productives des deux espèces.

La fluctuation des quantités de glucosinolates affiche un penchant à la hausse du stade floraison vers le stade nouaison. Nous signalons un remaniement très important de la majeure partie des molécules caractérisées (3 molécules sur 4 molécules) à savoir, la Sinigrine, la Glucoberverine et la Glucoberteroïne. L'évolution importante des taux de la Sinigrine (61,21%) et de la Glucoberverine (51,77%) a été signalée en passant du stade floraison vers le stade nouaison les taux de la Glucoberteroïne sont revus à la baisse (18,02%) en ce qui concerne *Raphanus raphanistrum*

Pour *Hirschfeldia incana*, nous signalons aussi un remaniement très important d'un nombre mineur des molécules caractérisées (3 molécules sur 7 molécules) à savoir, la Sinigrine, la Glucoberverine et la Pentenyl

Les fleurs et les gousses s'accaparent des taux les plus importants par rapport aux autres compartiments. En phase de floraison, chez les deux espèces les accumulations croissantes en glucosinolates sont signalées depuis les racines vers les fleurs. Alors que durant la phase de nouaison, cette tendance d'accroissement en glucosinolates s'affiche d'une manière très accusée du compartiment fleur vers le compartiment gousse. A l'exception de ces deux compartiments, des accumulations divergentes sont signalés sur les compartiments racine et feuille. Enfin, nous signalons que les grandes quantités accumulées sont au profit d'*H. incana* et *R. raphanistrum* respectivement pour la phase de floraison et la phase de nouaison

La comparaison de la composition chimique et des quantités accumulées dans les compartiments durant les deux phases d'évolution nous montre l'existence des différences qualitative et quantitative en glucosinolates entre les tiges et les fleurs de la phase de floraison et ceux de la phase de nouaison chez *R. raphanistrum**

Chez *H. incana*, de la phase floraison vers la phase nouaison nous avons noté la même cinétique en terme de modification qualitatives et quantitatives des glucosinolates.

En perspective, il serait intéressant de caractériser les molécules bioactives sur l'ensemble de la germination à la nouaison, d'essayer d'élargir le présent aspect sur les mêmes espèces évoluant dans des étages bioclimatiques différents. D'étendre cet aspect aux autres crucifères de l'Afrique du nord. Détailler les études physiologiques pour évaluer la contribution de la synthèse, le transport et la dégradation de cette variation

Maintenant que les schémas de variabilité de la teneur en Glucosinolates et la composition au cours des deux phases critiques chez *Raphanus raphanistrum* et *Hirschfeldia incana* sont établis, des études complémentaires serait intéressantes pour évaluer leurs effets sur les paramètres de production de culture et sur les paramètres populationnels des bioagresseur dans les conditions de plein champ. Connaître le mode d'apport le plus efficace en terme d'application foliaire ou par biofumigation, pousser les recherches afin d'arriver a une formulation qui permettra une utilisation à grande échelle.

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

OGM organismes génétiquement modifiés

AITC allyl-isothiocyanate ()

GLS Glucosinolate

Allium sinigrine

DSM thiols et les sulfures

IAN indole-3-acétonitrile

IAA 3-acétique

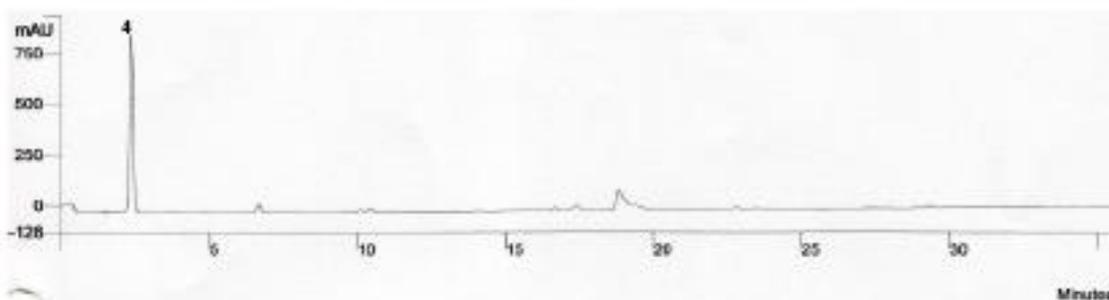
ESP epithiospecifier

trp tryptophane -

IAOx indole-3-acétaldéhyde ()

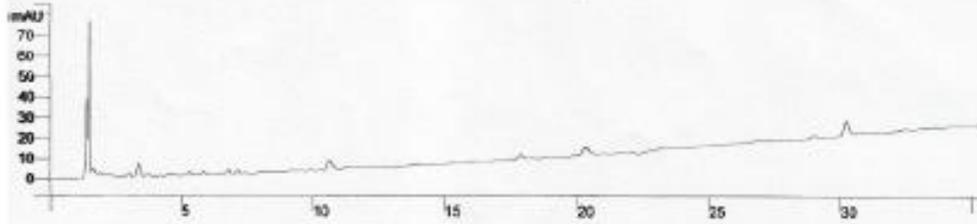
Data File: c:\star\data\g\1\23.06.11\etalon
 Channel: 1 - 235.00 nm RESULTS
 Sample ID: Etalon 23.06.11
 Operator (In): varian
 Injection Date: 23.06.11 08:32:15
 Injection Method: c:\star\methodes\ic\method\essais.mth
 Run time (min): 45,000
 Workstation: DJ8MWJ3J
 Instrument(In): HPLC

Operator (Calc): varian
 Calc Date: 23/06/2011 09:17:23
 Times Calculated: 1
 Calculation Method: c:\star\methodes\ic\method\essais.mth
 Instrument (Calc): HPLC
 Run Mode: Analyse
 Peak Measurement: Peak Area
 Calculation Type: Percent
 Calibration Level: NA
 Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		2,6910	0,333	0,000	3437574	0,00	BB	5,0		0
2		0,9098	1,424	0,000	1162186	0,00	BP	16,4		0
3		0,8508	1,792	0,000	1086871	0,00	VV	0,0		0
4		57,5253	2,369	0,000	73483808	0,00	VB	7,6		0
5		2,9087	6,651	0,000	3715599	0,00	BB	8,6		0
6		1,4816	10,470	0,000	1892562	0,00	VV	9,3		0
7		1,2707	16,671	0,000	1623262	0,00	VV	10,7		0
8		0,9754	17,169	0,000	1246052	0,00	VV	11,7		0
9		2,9855	17,447	0,000	3813731	0,00	VV	13,6		0
10		21,7311	18,852	0,000	27759718	0,00	VV	21,5		0
11		1,5409	20,120	0,000	1968341	0,00	VV	0,0		0
12		0,9459	21,992	0,000	1208296	0,00	VV	0,0		0
13		1,6741	22,821	0,000	2138560	0,00	VV	0,0		0
14		1,2621	23,501	0,000	1612218	0,00	VV	0,0		0
15		1,2470	29,360	0,000	1592899	0,00	PV	28,7		0
Totals		99,9999		0,000	127741680					

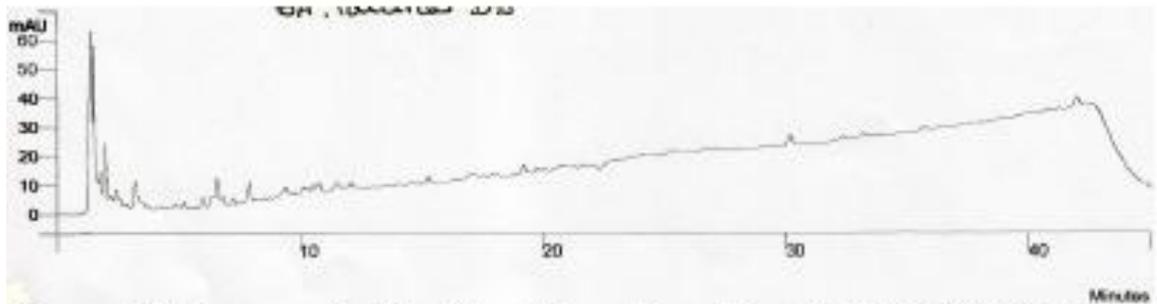
Data File: c:\star\data\gl\23.06.11\Tiga R2.run
Channel: 1 - 235.00 nm RESULTS
Sample ID: Tiga Harsh-R2 23.06.11
Operator (In): varian
Injection Date: 23.06.11 17:11:46
Injection Method: c:\star\method\slc\method\ssslc.mth
Run time (min): 45.000
Workstation: DUBMWJ3J
Instrument (In): HPLC
Operator (Calc): varian
Calc Date: 23/06/2011 17:58:03
Times Calculated: 1
Calculation Method: c:\star\method\slc\method\ssslc.mth
Instrument (Calc): HPLC
Run Mode: Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent
Calibration Level: NA
Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result (I)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		20,9151	1,367	0,000	1895998	0,00	BV	5,2		0
2		35,5629	1,481	0,000	3223846	0,00	VB	3,8		0
3		1,3708	1,629	0,000	124262	0,00	TS	0,0		0
4		5,6435	3,365	0,000	511593	0,00	BB	7,6		0
5		0,7645	4,502	0,000	69301	0,00	BV	6,7		0
6		1,0170	4,713	0,000	92194	0,00	VB	7,5		0
7		0,9503	5,306	0,000	86147	0,00	BB	7,3		0
8		1,0171	5,812	0,000	92205	0,00	BB	6,7		0
9		0,5992	6,690	0,000	54323	0,00	BV	7,2		0
10		1,7917	6,796	0,000	162423	0,00	VP	7,2		0
11		1,1542	7,122	0,000	104630	0,00	FB	8,3		0
12		6,4104	10,618	0,000	581113	0,00	BB	11,4		0
13		2,7558	17,847	0,000	249817	0,00	BB	13,3		0
14		0,7215	18,897	0,000	65401	0,00	BB	6,0		0
15		6,5137	20,293	0,000	390480	0,00	BB	15,5		0
16		0,7559	26,849	0,000	68521	0,00	BB	6,0		0
17		1,3942	28,995	0,000	126385	0,00	BB	6,0		0
18		9,5043	30,191	0,000	861582	0,00	BB	11,9		0
19		1,1580	32,446	0,000	104973	0,00	BB	12,5		0
Totals		100,0001		0,000	9065194					

Data File: c:\star\data\g\23.06.11\rachosR1
Channel: 1 - 235.00 nm RESULTS
Sample ID: rachosSinapis R1 23.06.11
Operator (In): vatan
Injection Date: 23.06.11 08:32:16
Injection Method: c:\star\method\lc\method1\essala.mth
Run time (min): 45,000
Workstation: DJ8KXJ3J
Instrument (In): HPLC

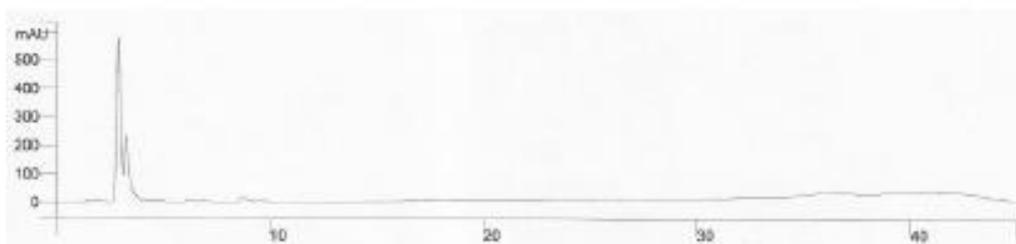
Operator (Calc): vatan
Calc Date: 23/06/2011 09:17:23
Times Calculated: 1
Calculation Method: c:\star\method\calc\method1\essala.mth
Instrument (Calc): HPLC
Run Mode: Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent
Calibration Level: NA
Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		6,2561	1,384	0,000	5279801	0,00	BV	9,7		0
2		3,5047	1,500	0,000	2957745	0,00	VV	5,5		0
3		1,3041	1,781	0,000	1100572	0,00	VV	11,2		0
4		2,3520	2,007	0,000	1984955	0,00	VV	7,1		0
5		1,2527	2,464	0,000	1057185	0,00	VV	19,5		0
6		1,6217	3,211	0,000	1368669	0,00	VV	11,7		0
7		3,0316	24,136	0,000	2558529	0,00	PV	0,0		0
8		1,5943	25,570	0,000	1345539	0,00	VV	0,0		0
9		1,2382	26,771	0,000	1045013	0,00	VV	0,0		0
10		5,1561	37,391	0,000	4351509	0,00	VV	0,0		0
11		3,5806	38,049	0,000	3021857	0,00	VV	0,0		0
12		6,5899	38,904	0,000	5561504	0,00	VV	0,0		0
13		14,7995	40,225	0,000	12490034	0,00	VV	0,0		0
14		6,1240	40,720	0,000	5168308	0,00	VV	0,0		0
15		6,7686	41,253	0,000	5712387	0,00	VV	0,0		0
16		12,5262	41,966	0,000	10571446	0,00	VV	0,0		0
17		22,2996	42,550	0,000	18819732	0,00	VB	94,9		0
Totals		99,9999		0,000	84394784					

Data File: c:\star\data\glb\070611\etalon
Channel: 1_ 295.00 nm RESULTS
Sample ID: Etalon 070611
Operator (In): varian
Injection Date: 070611 09:10:47
Injection Method: c:\star\method\slc\glc.mth
Run time (min): 45,000
Workstation: DJ9KNJSJ
Instrument(In): HPLC

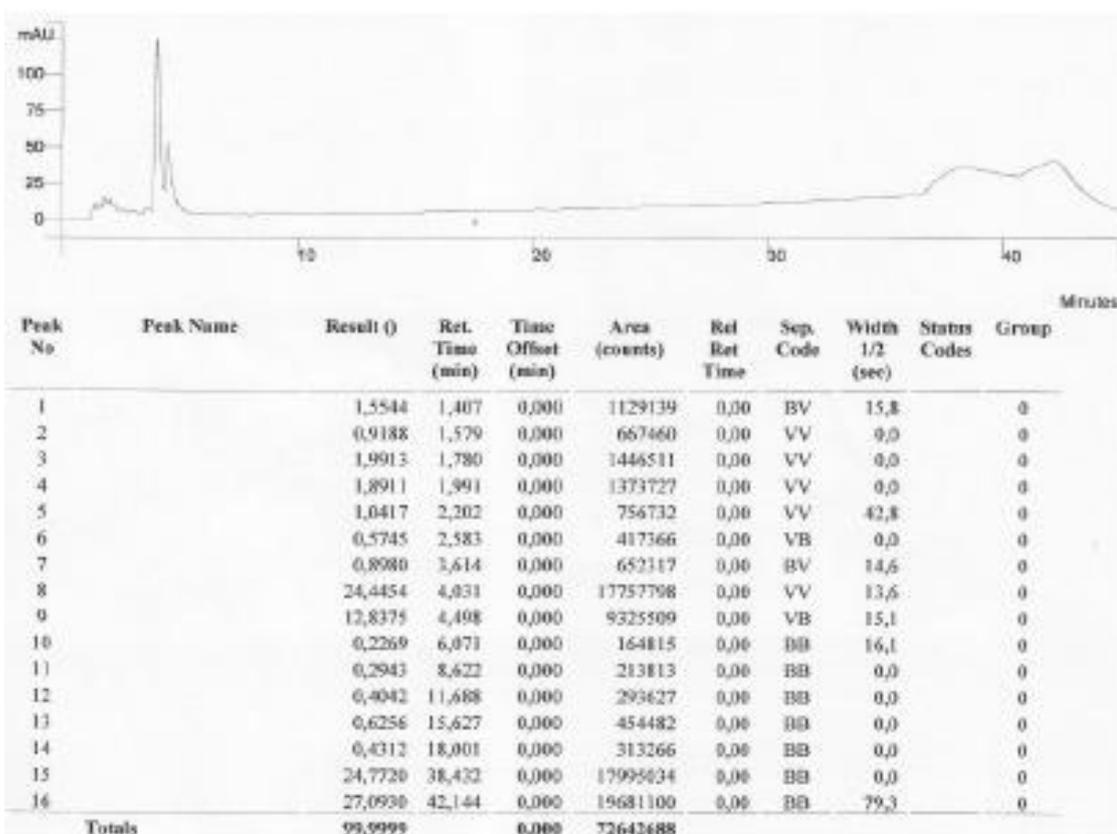
Operator (Calc): varian
Calc Date: 07/06/2011 09:55:53
Times Calculated: 1
Calculation Method: c:\star\method\slc\glc.mth
Instrument (Calc): HPLC
Run Mode: Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent
Calibration Level: NA
Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		0,1926	1,407	0,000	559243	0,00	BP	11,4		0
2		0,0762	1,599	0,000	221315	0,00	PV	7,6		0
3		0,0724	1,826	0,000	210333	0,00	VB	0,0		0
4		0,0163	2,355	0,000	47457	0,00	BP	4,4		0
5		23,9553	2,891	0,000	69571168	0,00	PV	11,4		0
6		14,5158	3,248	0,000	42150960	0,00	VB	14,1		0
7		0,1416	4,853	0,000	411304	0,00	TS	0,0		0
8		0,0239	5,423	0,000	69313	0,00	TS	0,0		0
9		0,5190	6,206	0,000	1507176	0,00	BV	17,0		0
10		0,2161	6,837	0,000	627638	0,00	VB	20,5		0
11		1,3346	8,744	0,000	3875882	0,00	BV	20,3		0
12		0,5664	9,552	0,000	1645013	0,00	VB	21,7		0
13		0,2529	17,118	0,000	676249	0,00	BV	26,8		0
14		0,6813	18,043	0,000	1978579	0,00	VV	41,2		0
15		0,1579	19,201	0,000	458468	0,00	VB	0,0		0
16		0,1285	22,246	0,000	373124	0,00	BV	37,4		0
17		28,4486	36,405	0,000	82620696	0,00	VV	0,0		0
18		8,0552	39,472	0,000	23335988	0,00	VV	0,0		0
19		20,6856	41,588	0,000	60075280	0,00	VB	440,0		0
Totals		100,0002		0,000	290421184					

Data File: c:\star\data\gb\080611\HGR2
 Channel: 1 - 235.00 nm RESULTS
 Sample ID: H goussees recolte 2 080611
 Operator (In): varian
 Injection Date: 08/06/11 10:18:15
 Injection Method: c:\star\methodes\ic\igs.mth
 Run time (min): 45,000
 Workstation: DJ8WJ3J
 Instrument (In): HPLC

Operator (Calc): varian
 Calc Date: 08/06/2011 11:03:23
 Times Calculated: 1
 Calculation Method: c:\star\methodes\ic\igs.mth
 Instrument (Calc): HPLC
 Run Mode: Analysis
 Peak Measurement: Peak Area
 Calculation Type: Percent
 Calibration Level: NA
 Verification Tolerance: NA



Data File: c:\star\data\gl\07.06.11\SG2
Channel: 1 - 235.00 nm RESULTS
Sample ID: SG2 07.06.11
Operator (In): varian
Injection Date: 07.06.11 13:38:24
Injection Method: c:\star\method\slc\gl\sls.mth
Run time (min): 45,000
Workstation: DJ9KNJ3J
Instrument(In): HPLC

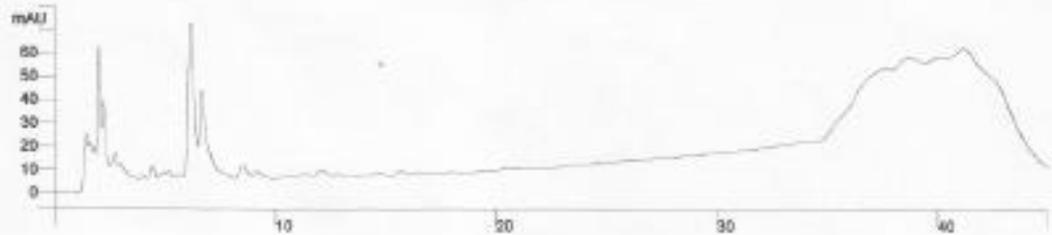
Operator (Calc): varian
Calc Date: 23/06/2011 14:23:31
Times Calculated: 1
Calculation Method: c:\star\method\slc\gl\sls.mth
Instrument (Calc): HPLC
Run Mode: Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent
Calibration Level: NA
Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		2,8226	1,417	0,000	1407713	0,00	BV	12,8		0
2		1,7519	1,578	0,000	873736	0,00	VV	6,0		0
3		4,0634	1,793	0,000	2026586	0,00	VV	6,0		0
4		6,5612	1,980	0,000	3272330	0,00	VB	37,2		0
5		1,8532	3,661	0,000	924258	0,00	BV	17,4		0
6		50,4344	4,039	0,000	25153438	0,00	VV	13,8		0
7		31,8036	4,456	0,000	15861619	0,00	VB	15,6		0
8		0,7097	6,040	0,000	353929	0,00	BB	12,1		0
Totals		100,0000		0,000	49873688					

Data File: c:\star\data\gb\07.06.11\HFLE-1
 Channel: 1_ 235.00 nm RESULTS
 Sample ID: HFLE1 07.06.11
 Operator (In): varian
 Injection Date: 07.06.11 10:02:34
 Injection Method: c:\star\methodes\ic\igs.mh
 Run time (min): 45,000
 Workstation: DJ8KXJ3J
 Instrument(In): HPLC

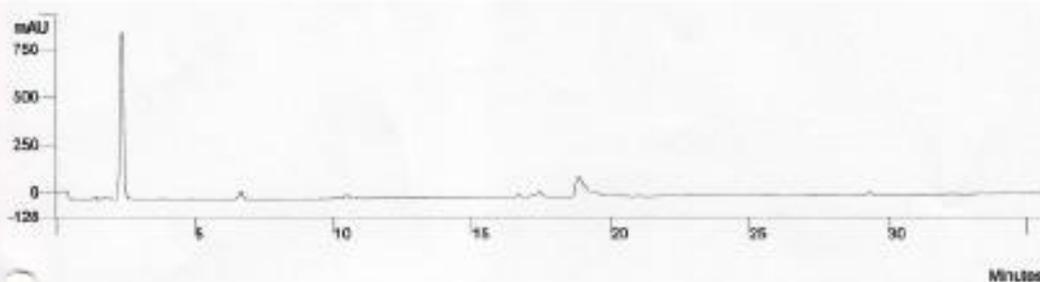
Operator (Calc): varian
 Calc Date: 23/06/2011 10:54:41
 Times Calculated: 1
 Calculation Method: c:\star\methodes\ic\igs.mh
 Instrument (Calc): HPLC
 Run Mode: Analysis
 Peak Measurement: Peak Area
 Calculation Type: Percent
 Calibration Level: NA
 Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		0,8937	1,428	0,000	2699146	0,00	BV	15,5		0
2		0,6891	1,568	0,000	2054076	0,00	VV	0,0		0
3		0,5543	1,771	0,000	1675741	0,00	VV	0,0		0
4		1,8029	1,989	0,000	5445277	0,00	VV	9,3		0
5		1,5194	2,189	0,000	4588867	0,00	VV	17,0		0
6		0,7622	2,729	0,000	2302071	0,00	VV	0,0		0
7		0,2886	3,000	0,000	871653	0,00	VV	0,0		0
8		0,1314	3,215	0,000	396801	0,00	VB	0,0		0
9		0,0510	4,015	0,000	154128	0,00	BV	10,4		0
10		0,2415	4,416	0,000	729482	0,00	VV	12,6		0
11		0,0945	4,860	0,000	285448	0,00	VV	11,8		0
12		0,1973	5,119	0,000	595790	0,00	VV	21,7		0
13		0,1091	5,648	0,000	302332	0,00	VV	15,6		0
14		4,2271	6,141	0,000	12766778	0,00	VV	18,1		0
15		3,2252	6,658	0,000	9741015	0,00	VV	18,4		0
16		0,0086	7,687	0,000	25932	0,00	TS	0,0		0
17		0,4287	8,409	0,000	1294697	0,00	VV	31,5		0
18		0,2578	9,128	0,000	778668	0,00	VB	25,7		0
19		0,1432	11,382	0,000	432320	0,00	BV	29,6		0
20		0,2982	12,062	0,000	900560	0,00	VV	20,5		0
21		0,0852	12,822	0,000	257251	0,00	VB	0,0		0
22		0,1679	14,603	0,000	507015	0,00	BP	29,4		0
23		0,1378	15,666	0,000	416060	0,00	PV	30,8		0
24		0,0495	16,471	0,000	148870	0,00	VV	0,0		0
25		0,0779	17,142	0,000	235375	0,00	VV	0,0		0
26		0,0328	17,997	0,000	99038	0,00	VB	0,0		0
27		0,5250	21,289	0,000	1585641	0,00	BV	0,0		0
28		33,5206	37,640	0,000	101240248	0,00	VV	0,0		0
29		13,2524	38,734	0,000	40025520	0,00	VV	0,0		0
30		36,2447	41,158	0,000	109467728	0,00	VB	512,7		0
Totals		99,9999		0,000	302823744					

Data File: c:\star\data\g\b\10.06.11.etalon
Channel: 1_ 235.00 nm RESULTS
Sample ID: Etalon 10.06.11
Operator (In): vatan
Injection Date: 10.06.11 08:12:29
Injection Method: c:\star\methodes\lc\method\essale.mth
Run time (min): 45,000
Workstation: DJBNWJSJ
Instrument (In): HPLC

Operator (Calc): vatan
Calc Date: 10/06/2011 08:50:11
Times Calculated: 1
Calculation Method: c:\star\methodes\lc\method\essale.mth
Instrument (Calc): HPLC
Run Mode: Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent
Calibration Level: NA
Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		2,6910	0,333	0,000	3437574	0,00	BB	5,0		0
2		0,9098	1,424	0,000	1162185	0,00	BP	16,4		0
3		0,8508	1,792	0,000	1086871	0,00	VV	0,0		0
4		57,5253	2,369	0,000	73443808	0,00	VB	7,6		0
5		2,9087	6,651	0,000	3715599	0,00	BB	8,6		0
6		1,4816	10,470	0,000	1892562	0,00	VV	9,3		0
7		1,2707	16,671	0,000	1623262	0,00	VV	10,7		0
8		0,9754	17,169	0,000	1246052	0,00	VV	11,7		0
9		2,9855	17,447	0,000	3813731	0,00	VV	13,6		0
10		21,7311	18,832	0,000	27759718	0,00	VV	21,5		0
11		1,5409	20,120	0,000	1968341	0,00	VV	0,0		0
12		0,9459	21,992	0,000	1208296	0,00	VV	0,0		0
13		1,6741	22,821	0,000	2138560	0,00	VV	0,0		0
14		1,2621	23,501	0,000	1612218	0,00	VV	0,0		0
15		1,2470	29,360	0,000	1592899	0,00	PV	28,7		0
Totals		99,9999		0,000	127741680					

Das File: c:\star\data\glb\10.06.11\PS-R1.run
Channel: 1 - 235.00 nm RESULTS
Sample ID: Faulte S results-1 10.06.11
Operator (In): vatan
Injection Date: 10.06.11 14:40:20
Injection Method: c:\star\method\glc\glc.mh
Run time (min): 45,000
Workstation: DJ9KNJSJ
Instrument(In): HPLC

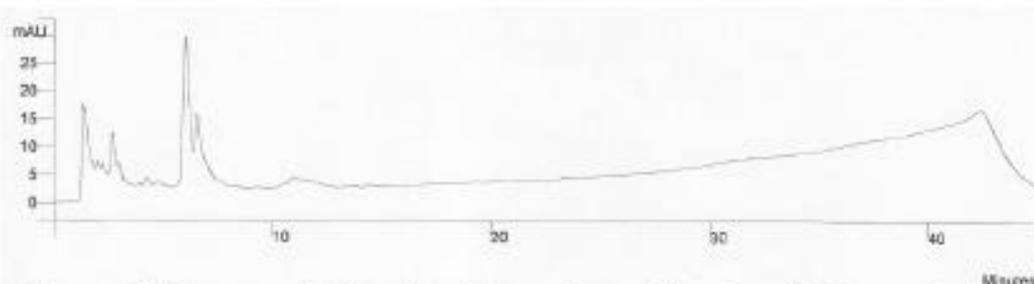
Operator (Calc): vatan
Calc Date: 10/06/2011 16:25:37
Times Calculated: 1
Calculation Method: c:\star\method\glc\glc.mh
Instrument (Calc): HPLC
Run Mode: Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent
Calibration Level: NA
Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		3,7703	1,395	0,000	4557917	0,00	BV	15,3		0
2		1,2809	1,535	0,000	1548530	0,00	VV	0,0		0
3		1,3563	1,738	0,000	1639813	0,00	VV	0,0		0
4		1,2155	1,963	0,000	1469402	0,00	VV	0,0		0
5		0,6308	2,158	0,000	762533	0,00	VV	51,5		0
6		0,3390	2,667	0,000	409867	0,00	VB	0,0		0
7		0,1138	3,942	0,000	137553	0,00	BV	10,2		0
8		0,7317	4,241	0,000	884522	0,00	VV	18,0		0
9		0,6819	4,747	0,000	824299	0,00	VV	15,1		0
10		0,8702	5,202	0,000	1051956	0,00	VV	0,0		0
11		0,5555	5,610	0,000	671494	0,00	VV	0,0		0
12		7,8070	6,003	0,000	9437840	0,00	VV	20,5		0
13		2,4828	6,563	0,000	3001252	0,00	VV	0,0		0
14		7,5808	6,906	0,000	9164315	0,00	VV	34,7		0
15		4,5083	7,504	0,000	5450029	0,00	VB	42,6		0
16		4,3976	10,821	0,000	5316240	0,00	BV	21,7		0
17		3,4365	11,544	0,000	4154369	0,00	VB	56,6		0
18		0,4666	14,458	0,000	564112	0,00	BV	30,1		0
19		0,0900	15,610	0,000	108843	0,00	VV	22,2		0
20		0,9749	16,193	0,000	89513	0,00	VP	54,6		0
21		0,1823	17,072	0,000	220636	0,00	PB	37,2		0
22		0,8330	20,275	0,000	39928	0,00	BB	0,0		0
23		29,8946	38,343	0,000	36139380	0,00	BV	0,0		0
24		6,4360	39,722	0,000	7780491	0,00	VV	0,0		0
25		21,0643	42,243	0,000	25404440	0,00	VB	231,2		0
Totals		99,9999		0,000	120889264					

Data File: c:\star\data\gb\10.06.11\igsS-R1.run
Channel: 1 - 235.00 nm RESULTS
Sample ID: Tigs S-R1 10.06.11
Operator (In): varian
Injection Date: 10.06.11 13:21:18
Injection Method: c:\star\method\ic\igs.mth
Run time (min): 45,000
Workstation: DUBKWI3J
Instrument (In): HPLC

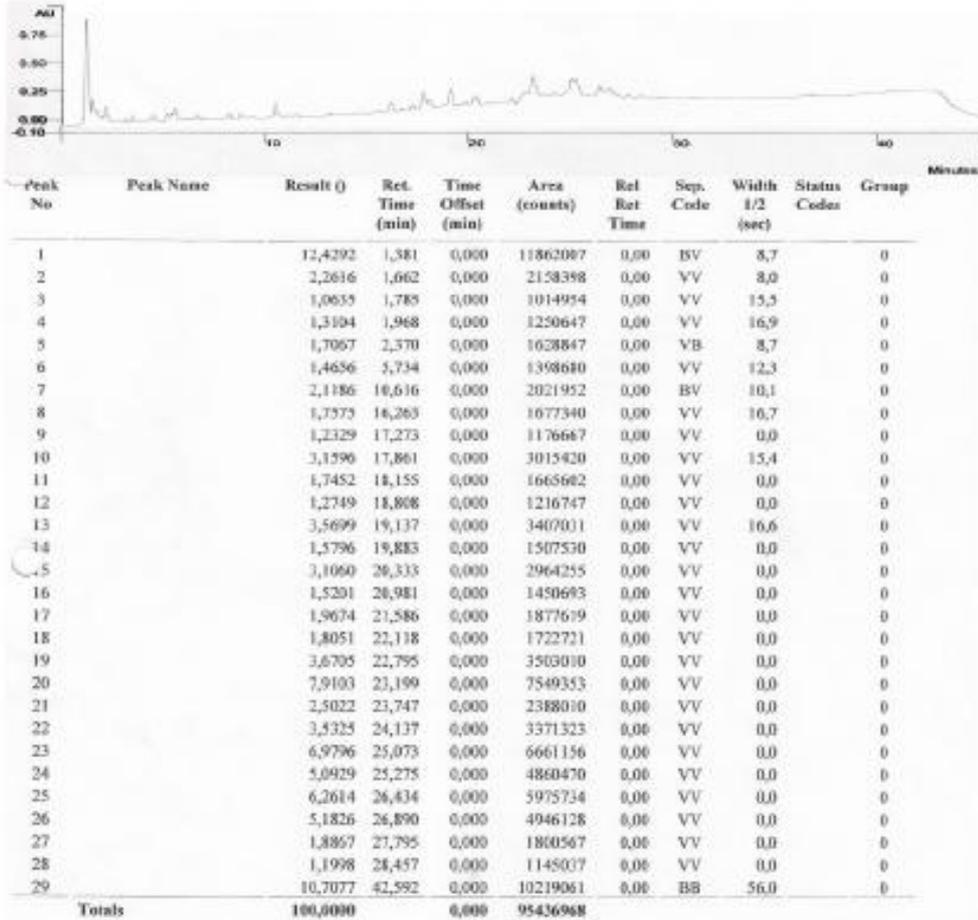
Operator (Calc): varian
Calc Date: 10/06/2011 14:05:25
Times Calculated: 1
Calculation Method: c:\star\method\ic\igs.mth
Instrument (Calc): HPLC
Run Mode: Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent
Calibration Level: NA
Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		6.2110	1.306	0.000	790450	0.00	BV	7.1		0
2		8.6772	1.393	0.000	1104322	0.00	VB	32.7		0
3		0.9867	1.965	0.000	125570	0.00	BV	6.6		0
4		0.8513	2.162	0.000	108343	0.00	VB	5.2		0
5		6.7972	2.659	0.000	865055	0.00	BV	9.8		0
6		3.1306	2.949	0.000	398423	0.00	VB	16.4		0
7		1.5995	4.246	0.000	203563	0.00	BB	14.9		0
8		42.5236	5.996	0.000	5411730	0.00	BV	19.2		0
9		29.2240	6.541	0.000	3719246	0.00	VB	20.5		0
Total		100.0001	6.000	0.000	12726792					

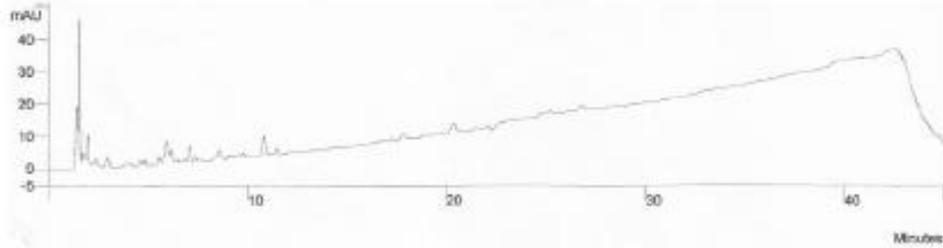
Data File: c:\star\data\gl\16.09.11\5PiaR2.run
Channel: 1 - 235.00 nm RESULTS
Sample ID: Flour R2-S 16.09.11
Operator (In): varian
Injection Date: 16.09.11 14:11:32
Injection Method: c:\star\method\k\method\ossio.mth
Run time (min): 45.000
Workstation: DJ8KNJSJ
Instrument(In): HPLC

Operator (Calc): varian
Calc Date: 16/09/2011 14:55:38
Times Calculated: 1
Calculation Method: c:\star\method\c\method\ossio.mth
Instrument (Calc): HPLC
Run Mode: Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent
Calibration Level: NA
Verification Tolerance: NA



Data File: c:\star\data\gb\16.00.11\Hadnas-R1
Channel: 1 - 235.00 nm RESULTS
Sample ID: Racinas-Racolas-H 16.00.11
Operator (In): varian
Injection Date: 16.09.11 08:42:32
Injection Method: c:\star\method\ic\method\icssale.mth
Run time (min): 45,000
Workstation: DUBRWJ3J
Instrument(In): HPLC

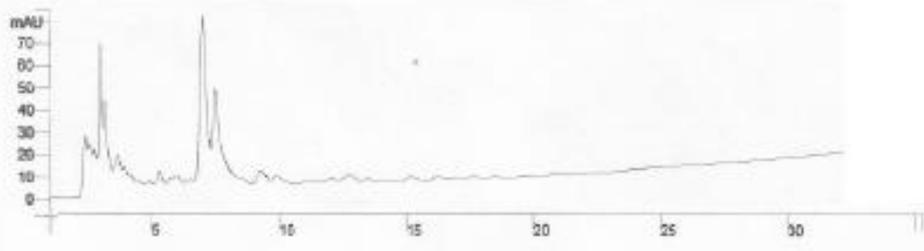
Operator (Calc): varian
Calc Date: 16/09/2011 09:28:23
Time Calculated: 1
Calculation Method: c:\star\method\ic\method\icssale.mth
Instrument (Calc): HPLC
Run Mode: Analytic
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent
Calibration Level: NA
Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Ret. Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		0,5124	1,395	0,000	1238636	0,00	BV	6,0		0
2		0,8071	1,508	0,000	1950905	0,00	VV	3,3		0
3		0,4607	16,826	0,000	1115695	0,00	VV	0,0		0
4		0,6386	17,840	0,000	1543669	0,00	VV	0,0		0
5		0,4499	18,903	0,000	1087613	0,00	VV	0,0		0
6		0,6497	19,440	0,000	1570428	0,00	VV	0,0		0
7		0,4575	19,890	0,000	1105797	0,00	VV	0,0		0
8		1,1565	20,357	0,000	2795111	0,00	VV	0,0		0
9		0,6794	20,917	0,000	1642560	0,00	VV	0,0		0
10		0,7393	21,537	0,000	1787103	0,00	VV	0,0		0
11		1,0453	22,116	0,000	2526729	0,00	VV	0,0		0
12		1,0995	22,818	0,000	2657607	0,00	VV	0,0		0
13		0,9933	23,202	0,000	2401064	0,00	VV	0,0		0
14		1,1048	23,912	0,000	2670528	0,00	VV	0,0		0
15		0,9495	24,297	0,000	2295193	0,00	VV	0,0		0
16		1,3533	24,847	0,000	3271680	0,00	VV	0,0		0
17		1,6127	25,246	0,000	3898229	0,00	VV	0,0		0
18		2,5716	26,393	0,000	6215943	0,00	VV	0,0		0
19		2,3314	26,819	0,000	5635375	0,00	VV	0,0		0
20		0,5037	27,313	0,000	1217543	0,00	VV	0,0		0
21		3,2255	28,441	0,000	7796358	0,00	VV	0,0		0
22		1,6651	28,964	0,000	4024823	0,00	VV	0,0		0
23		1,1465	29,262	0,000	2771393	0,00	VV	0,0		0
24		3,1270	30,073	0,000	7558597	0,00	VV	0,0		0
25		7,9228	32,278	0,000	19150972	0,00	VV	0,0		0
26		3,2400	33,055	0,000	7831812	0,00	VV	0,0		0
27		1,3286	33,454	0,000	3211549	0,00	VV	0,0		0
28		14,8534	40,082	0,000	84247296	0,00	VV	0,0		0
29		3,6083	40,504	0,000	8722006	0,00	VV	0,0		0
30		3,1761	41,098	0,000	7677350	0,00	VV	0,0		0
31		16,5904	42,529	0,000	40102192	0,00	VV	276,8		0
Total		99,9997		0,000	241719152					

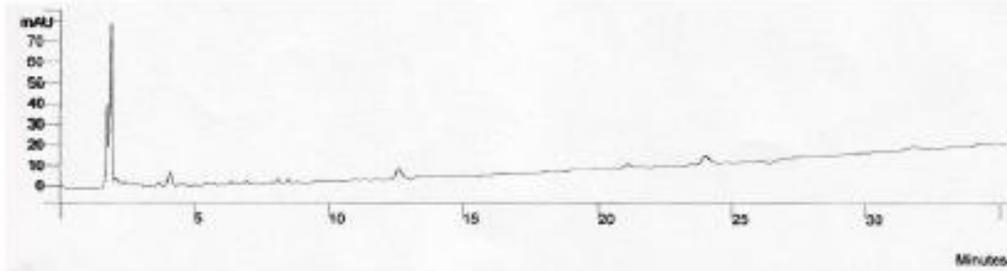
Data File: c:\star\data\glb\16.09.11\Fleur-H-R2
Channel: 1 = 236.00 nm RESULTS
Sample ID: HFleur-R2 16.09.11
Operator (In): vatan
Injection Date: 16.09.11 16:32:16
Injection Method: c:\star\methodes\lc\method\ossio.mth
Run time (min): 45,000
Workstation: DUBHWJSJ
Instrument(In): HPLC

Operator (Calc): vatan
Calc Date: 16/09/2011 12:17:23
Times Calculated: 1
Calculation Method: c:\star\methodes\lc\method\ossio.mth
Instrument (Calc): HPLC
Run Mode: Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent
Calibration Level: NA
Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Minutes Group
1		0,8937	1,428	0,000	2699146	0,00	BV	15,5		0
2		0,6801	1,568	0,000	2054076	0,00	VV	6,0		0
3		0,5548	1,771	0,000	1675741	0,00	VV	6,0		0
4		1,8029	1,989	0,000	5445277	0,00	VV	9,3		0
5		1,5194	2,149	0,000	4588867	0,00	VV	17,0		0
6		0,7622	2,739	0,000	2302071	0,00	VV	6,0		0
7		0,2886	3,060	0,000	871653	0,00	VV	6,0		0
8		0,1314	3,215	0,000	396801	0,00	VB	6,0		0
9		0,0510	4,015	0,000	154128	0,00	BV	16,4		0
10		0,2415	4,416	0,000	729482	0,00	VV	12,6		0
11		0,0945	4,860	0,000	285448	0,00	VV	11,8		0
12		0,1973	5,119	0,000	595790	0,00	VV	21,7		0
13		0,1001	5,648	0,000	302332	0,00	VV	15,6		0
14		4,2271	6,141	0,000	12766778	0,00	VV	18,1		0
15		3,2252	6,658	0,000	9741013	0,00	VV	18,4		0
16		0,0086	7,647	0,000	25932	0,00	TS	0,0		0
17		0,4287	8,199	0,000	1294697	0,00	VV	31,5		0
18		0,2378	9,128	0,000	778668	0,00	VB	25,7		0
19		0,1432	11,382	0,000	432530	0,00	BV	39,6		0
20		0,2982	12,062	0,000	900560	0,00	VV	20,5		0
21		0,0852	12,822	0,000	257251	0,00	VB	0,0		0
22		0,1679	14,603	0,000	507015	0,00	BP	29,4		0
23		0,1378	15,666	0,000	416000	0,00	PV	30,8		0
24		0,0493	16,471	0,000	148870	0,00	VV	0,0		0
25		0,0779	17,142	0,000	235375	0,00	VV	0,0		0
26		0,0328	17,997	0,000	99038	0,00	VB	0,0		0
27		0,3250	21,289	0,000	1585641	0,00	BV	0,0		0
Totals		99,9999		0,000	302623744					

Date File:	c:\star\data\g\b\03.07.11.Tiga-H-R1	Operator (Calc):	varian
Channel:	1 - 255.00 nm RESULTS	Calc Date:	03/07/2011 09:10:33
Sample ID:	H-Tiga r0001a-1 03.07.11	Times Calculated:	1
Operator (In):	varian	Calculation Method:	c:\star\method\slc\method1\essala.mth
Injection Date:	03.07.11 06:35:25	Instrument (Calc):	HPLC
Injection Method:	c:\star\method\slc\method1\essala.mth	Run Mode:	Analysis
Run time (min):	45,000	Peak Measurement:	Peak Area
Workstation:	DJ8MNJSJ	Calculation Type:	Percent
Instrument (In):	HPLC	Calibration Level:	NA
		Verification Tolerance:	NA



Peak No	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		20,9151	1,367	0,000	1895998	0,00	BV	5,2		0
2		35,5629	1,481	0,000	3223846	0,00	VB	3,8		0
3		1,3708	1,629	0,000	124262	0,00	TS	0,0		0
4		5,6435	3,365	0,000	511593	0,00	BB	7,6		0
5		0,7645	4,502	0,000	69301	0,00	BV	6,7		0
6		1,0170	4,715	0,000	92194	0,00	VB	7,5		0
7		0,9503	5,306	0,000	86147	0,00	BB	7,3		0
8		1,0171	5,812	0,000	92205	0,00	BB	6,7		0
9		0,5992	6,600	0,000	54323	0,00	BV	7,2		0
10		1,7917	6,796	0,000	162423	0,00	VP	7,2		0
11		1,1542	7,122	0,000	104630	0,00	PB	8,3		0
12		6,4104	10,618	0,000	581113	0,00	BB	11,4		0
13		2,7558	17,847	0,000	249817	0,00	BB	13,3		0
14		0,7215	18,807	0,000	65401	0,00	BB	0,0		0
15		6,5137	20,293	0,000	590480	0,00	BB	15,5		0
16		0,7559	26,849	0,000	68521	0,00	BB	0,0		0
17		1,3942	28,995	0,000	126385	0,00	BB	0,0		0
Totals		100,0001		0,000	9065194					

Data File: c:\star\data\gb\16.09.11\etalon
Channel: 1 - 235.00 nm RESULTS
Sample ID: Etalon 16.09.11
Operator (In): varian
Injection Date: 16.09.11 08:32:16
Injection Method: c:\star\methodes\lc\method\1\essais.mth
Run time (min): 45,000
Workstation: DJ8WVJ3J
Instrument(In): HPLC

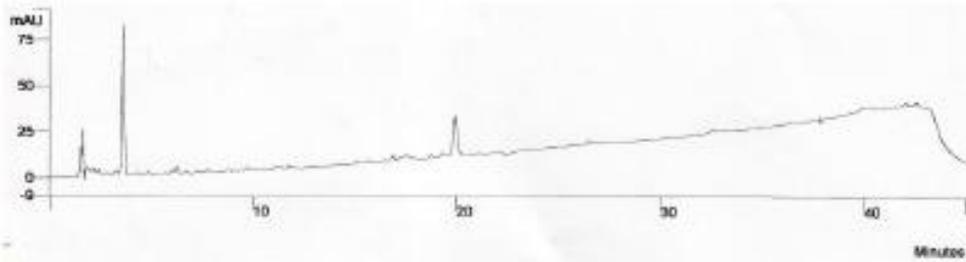
Operator (Calc): varian
Calc Date: 16/09/2011 09:17:23
Times Calculated: 1
Calculation Method: c:\star\methodes\lc\method\1\essais.mth
Instrument (Calc): HPLC
Run Mode: Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent
Calibration Level: NA
Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		0,9504	1,645	0,000	1266498	0,00	BB	4,6		0
2		63,9239	3,714	0,000	85180768	0,00	BB	8,6		0
3		1,2049	8,319	0,000	4270602	0,00	BB	8,0		0
4		1,6053	11,968	0,000	2139167	0,00	VB	8,3		0
5		1,3476	17,820	0,000	1795690	0,00	BV	8,4		0
6		4,1591	18,280	0,000	5542186	0,00	VB	14,2		0
7		21,5705	19,565	0,000	28743504	0,00	BV	19,1		0
8		1,1680	20,223	0,000	1556384	0,00	VB	0,0		0
9		1,2626	22,335	0,000	1682489	0,00	VP	15,9		0
10		0,8076	40,593	0,000	1076199	0,00	VB	0,0		0
Totals		99,9999		0,000	133253480					

Data File: c:\star\data\gbl\16.09.11\HReults R1
Channel: 1 - 235.00 nm RESULTS
Sample ID: Feuilles H-Récolte 1 16.09.11
Operator (In): vanan
Injection Date: 16.09.11 22:23:16
Injection Method: c:\star\methodes\lc\methodes\ssale.mth
Run time (min): 45,000
Workstation: DUBKMNJSJ
Instrument(In): HPLC

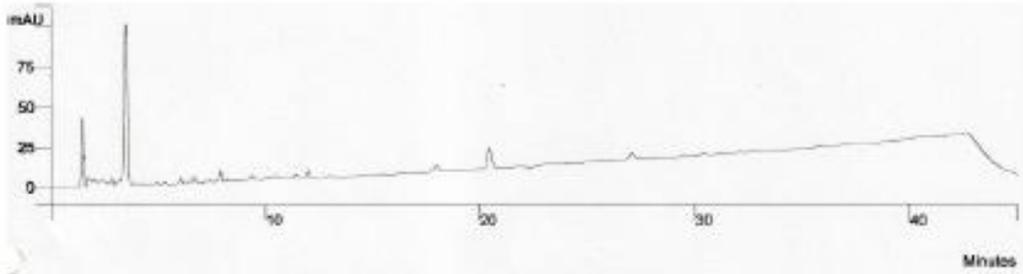
Operator (Calc): vanan
Calc Date: 16/09/2011 22:10:53
Times Calculated: 1
Calculation Method: c:\star\methodes\lc\methodes\ssale.mth
Instrument (Calc): HPLC
Run Mode: Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent
Calibration Level: NA
Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width I/2 (sec)	Status Codes	Group
1		9,6814	1,526	0,000	1118312	0,00	BV	6,0		0
2		9,8380	1,636	0,000	1136402	0,00	VP	4,2		0
3		57,1672	3,610	0,000	6603485	0,00	BB	7,6		0
4		23,3135	19,932	0,000	2692587	0,00	BB	11,8		0
Totals		100,0001		0,000	11551186					

Data File: c:\star\data\g\b\16.09.11\Hautlie Rec2
Channel: 1 - 236.00 nm RESULTS
Sample ID: Feuilles H-Récolte 2 16.09.11
Operator (In): varian
Injection Date: 16.09.11 23:25:11
Injection Method: c:\star\methodes\lc\methodes\salle.mth
Run time (min): 45,000
Workstation: DJ8HWJSJ
Instrument(In): HPLC

Operator (Calc): varian
Calc Date: 17/09/2011 00:15:27
Times Calculated: 1
Calculation Method: c:\star\methodes\lc\methodes\salle.mth
Instrument (Calc): HPLC
Run Mode: Analysis
Peak Measurement: Peak Area
Calculation Type: Percent
Calibration Level: NA
Verification Tolerance: NA



Peak No	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		19,0194	1,423	0,000	2480603	0,00	BY	5,3		0
2		67,9687	3,463	0,000	8864789	0,00	BB	7,9		0
3		13,0119	20,426	0,000	1697071	0,00	BB	12,3		0
Totals		100,0000		0,000	13042463					

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 **MARINVAL 1988 : (Ph.)**, Cueillette, agriculture et alimentation végétale de l'Épipaléolithique jusqu'au 2ème âge du Fer en France méridionale. Apports paléoethnographiques de la carpologie, Thèse de l'E.H.E.S. S., Paris, 1988, 2 vol., 458 p.
- 2 **HELENE DEBERNARDI 2004** Les matières fertilisantes et les produits phytosanitaires en production végétale biologique Etat des lieux et propositions d'évolution Institut Technique de l'Agriculture Biologique 75p
- 3 **CATHERINE REGNAULT-ROGER , BERNARD PHILOGENE , CHARLES VINCENT 2008** Biopesticides d'origine végétale 2e édition r
- 4 **METCALF R.L, ET LUCKMAN W.H., 1994** – introduction to insect pest management, 3ed ed. Wiley interscience, new york, 650 p.,
- 5 **MATTHEWS G.A., 1992** - pesticide application methods, 2nd edition. Longman scientific and technical, uk, 405 p
- 6 **LACEY A.J., 1985** - weed control. *In*: p.t. haskell (éd.). *Pesticide application principles and practice*. Oxford science publications, oxford, pp: 456-485
- 7 **RIBA G. ET SILVY C., 1989** – La lute biologique et les biopesticides. *In* : La lutte biologique, dossier de la cellule environnement, n°5, INRA, pp : 49-54
- 8 **FAO., 1996** - Besoins alimentaires et croissance démographique - Document d'information technique 4, Sommet mondial de l'alimentation. Rome. 62 p
- 9 **NOVARTIS, 1997**. *Le livre vert du maïs*, Cb. Novartis, Saint-Sauveur, France, 109 p.
- 10 **ONU., 1996**. Déclaration adoptée par consensus à la Journée des parlementaires. Rapport du Sommet mondial de l'alimentation. Rome, p27
- 11 **METCALF R.L., 1980** – changing role of insecticides in crop protection. *Annu.rev. entomol.* 25, pp: 219-256.
- 12 **HISLOP E.C., 1993** - application technology for crop protection: an introduction. *In* matthews g.a.et hislop e.c. (eds). *Application technology for crop protection*. Cab int., UK. pp: 3-11
- 13 **METCALF R.L., 1994** – insecticides in pest management. *In* metcalf r.l, et luckman w.h., 1994. introduction to insect pest management, 3ed ed. wiley interscience, new york, 650 p.

- 14 **URECH P.A. 1994** – fungicide resistance management: needs and success factors. *In: s.heaney et al. (eds) fungicide resistance, bcpc monograph n°60*, pp: 349-356
- 15 **HEAP I.M., 1997**- The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *pestic. sci.*, 51, pp: 235-243.
- 16 **PIMENTEL D., ACQUAY H.A., BILTONEN M., RICE P., SILVA M., NELSON J., LIPNER V., GIORDANO S., HOROWITZ A. ET D'AMORE M., 1992** – environmental and economic costs of pesticides use. *bioscience*, 42 (10), pp: 750-760.
- 17 **BOUGUERRA M.L., 1986** - Les pesticides et le tiers monde. *La Recherche*, n° 176 54 pp 240-268
- 18 **HARRY, 1993** - Intoxications humaines par produits phytosanitaires. Conférence séminaire européen COMETT, Angers, 11-14 « Pesticides agricoles et environnement »
- 19 **SILVY C., 1992** - Quantifications... *Info Zoo, Bulletin d'information des zoologistes de l'INRA*, n° 6, pp: 90-103
- 20 **HOKKANEN H.M.T. ET LYNCH J.M., 1995** - *biological control, benefits and risks*. Cambridge university press, 304 p.
- 21 **VINCENT C. ET CODERRE D., 1992**- La lutte biologique. Tec et Doc Lavoisier. 12 p
- 22 **VAN DRIESCHE R.G. ET BELLOWS T.S., 1996** - *biological control*, chapman & hall, new york, 539 p
- 23 **JERVIS M. ET KIDD N., 1996** - *insect natural enemies, practical approaches to their study and evaluation*. chapman & hall, new york, 491 p
- 24 **CALTAGIRONE L.E. ET DOUTT R.L., 1989** -the history of the vedalia beetle importation to california and its impact on the development of biological control. *annual review of entomology*, 34, pp: 1-6.
- 25 **GREATHEAD D.J., 1995** - benefits and risks of classical biological control. *in: h.m.t. hokkanen et j.m. lynch (eds.). Biological control: benefits and risks*. cambridge university press et ocde, paris, pp: 53-63.
- 26 **CLOUTIER C. ET CLOUTIER C., 1992** - Les solutions biologiques de lutte pour la répression des insectes et acariens ravageurs des cultures. *In : C. Vincent et D. Coderre (eds.) La lutte biologique*, Gaëtan Morin (Boucherville, Québec) et Lavoisier Tech Doc (Paris), pp: 19-88
- 27 **SILVY C.& RIBA G. 1999**. Biopesticides contre maladies, insectes, mauvaises herbes. Dossier de l'Environnement de l'INRA n°19 (Lutte biologique II), 157-201

- 28 **FERRON, 1978** Biological control of insect pests by entomogenous Fungi annu. Rey. Entomol. 23, 409-442.
- 29 **COPPING LG, MENN JJ. 2000.** Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. Pest Manage. Sci. 56, p. 651-676.
- 30 **GRANADOS RR, FEDERICI BA Ed., 1986.** — 77ie biology of baculoviruses. 2 Vol., 275 p. + 276 p. CRC Press, Boca Raton, Florida. Hepburn HR Ed., 1976
- 31 **MILLER ET AL., 1983** The insect integument. Elsevier scientific publishing Company, Amsterdam, 571
- 32 **GUY BOIVIN, 2011** « Parasitoïdes et lutte biologique: paradigme ou panacée », *VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement* [En ligne], Volume 2 Numéro 2 | octobre 2001, mis en ligne le 01 octobre 2001, .
- 33 **CHARLES VINCENT ET BERNARD 2001** , « Les méthodes de lutte physique comme alternatives aux pesticides », *VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement* [En ligne], Volume 2 Numéro ,
- 34 **KNOWLES, B. H., AND FARNDAL, W. 1988.** Activation of insect cell adenylate cyclase by *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins and melittin. *Biochem J* 253, 235-241
- 35 **ALI ALIZADEH1, MOHAMAD AMIN SAMIH†, MASOOD KHEZRI‡ AND ROHALLAH SABERI RISEH 2005** *Department of Plant Protection and Horticulture, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran* Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with Several Pesticides 234p
- 36 **MARTEL P, BOIVIN G, BELCOURT J 1986** Efficacy and Persistence of Different Insecticides against the Tarnished Plant Bug *Lygus-Lineolaris* Heteroptera Miridae on a Season-Long Host Plant *Coronilla-Varia*. *Journal of Economic Entomology* 79, 721-5.
- 37 **HALL JK, HARTWIG NL 1990** Triazine Herbicide Fate in a No-Tillage Corn Zea-Mays L. Crown Vetch *Coronilla-Varia* L. Living Mulch System. *Agriculture Ecosystems and Environment* 30, 281-94.
- 38 **WAAGE, J. AND D. GREATHEAD 1986.** *Insect Parasitoids*. Academic Press, London

- 39 **DELLA TORRE, A., FANELLO, C., AKOGBETO, M., DOSSOU-YOVO, J., FAVIA, G., PETRARCA, V., COLUZZI, M. 2001** Molecular evidence of incipient speciation within *Anopheles gambiae* s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol* 10: 9-18
- 40 **HUDON, M., AND E. J. LEROUX. 1986.** Biology and population dynamics of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) with special reference to sweet corn in Quebec. III. Population dynamics and spatial distribution. *Phytoprotection* 67: 93-115.
- 41 **MICHAEL A. MCCLURE, MARK E. SCHMITT, AND MICHAEL D. MCCULLOUGH 2008** Distribution, Biology and Pathology of *Anguina pacifica* 226–239 p
- 42 **COLL, M., AND D. G. BOTTRELL. 1992.** Mortality of European corn borer larvae by natural enemies in different corn microhabitats. *Biol. Control* 2: 95-103.
- 43 **DEBACH, P. 1974.** *Biological Control by Natural Enemies.* Cambridge University Press, London & New York. 323 p.
- 44 **HANSSEL, M.P & MAY, R.M 1988** Spatial heterogeneity and the dynamics of parasitoid-host systems *Ann. Zool. Fennici* 25 :55-61
- 45 **BOSTANIAN, N.J. & L.J. COULOMBE 1986** An integrated pest management program for apple orchards in southwestern Quebec 1131-1142
- 46 **FOURNIER, D. 2005** Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chem Biol Interact*
- 47 **GUILLET, P., ALNWICK, D., CHAM, M. K., NEIRA, M., ZAIM, M., HEYMANN, D., MUKELABAI, K. 2001** Long-lasting treated mosquito nets: a breakthrough in malaria prevention. *Bull World Health Organ* 79: 998
- 48 **GRAINGE, M. AND S. AHMED. 1988.** *Handbook of Plants with Pest-Control Properties.* Wiley, New York
- 49 **HANIF, Z., S.A. KHAN, B. K. MARWAT, A.I. KHAN AND IKRAMULLAH. 2004.** Important weeds of wheat crop of Malakandher Farm, 1. Agricultural University, Peshawar. *Pak. J. Weed. Sci. Res.*, 10:109-112
- 50 **MARTIN, T., OCHOU, O. G., VAISSAYRE, M., FOURNIER, D. 2003** Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hubner) to triazophos in West Africa. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 883-7
- 51 **NAUEN, R. 2006** Insecticide mode of action: return of the ryanodine receptor. *Pest Management Sciences* 62: 690–692

- 52 **PAURON, D., BARHANIN, J., AMICHOT, M., PRALAVORIO, M., BERGÉ, J. B., LAZDUNSKI, M. 1989** Pyrethroid receptor in insect Na⁺ channel: alteration of its properties in pyrethroid-resistant flies. *Biochemistry* 28: 1673-1677
- 53 **PENNETIER, C., COSTANTINI, C., CORBEL, V., LICCIARDI, S., DABIRE, K. R., LAPIED, B., CHANDRE, F., HOUGARD, J. M. 2007b** A new perspective for controlling insecticide-resistant malaria vectors: low dose mixtures of insect repellents and an organophosphate on mosquito nets are more lethal than pyrethroid against multi-locus resistant *Anopheles gambiae*. submitted
- 54 **TOTH IK., BELL KS., HOLEVA MC., BIRCH PRJ., 2003-** Soft-rot erwiniae: from genes to genomes. *Mol Plant Pathology* 4: 17-30.
- 55 **MUHANNAD J., FRANZ H., FURKERTB, MILLER W., 2002-** Eur. J. Pharm. Biopharm. 53 115–123
- 56 **REGNAULT-ROGER C., 2002** - De nouveaux phytoinsecticides pour le troisième millénaire ? *In: Biopesticides d'origine végétales*, ed Tec & doc. Londres-Paris-New York. pp: 19-39.
- 57 **JOEL, D.M., V.H. PORTNOY, 1998.** The angiospermous root parasite *Orobanche* L. (Orobanchaceae) induces expression of a pathogenesis-related (PR) gene in susceptible tobacco roots. *Ann. Bot.*, 81, 779-781.
- 58 **AZEVEDO N.R., CAMPOS I.F., FERREIRA H.D., PRATES T.A., SANTOS S.C., SERAPHIN J.C., PAULA J.R. ET FERREI P.H, 2001.** Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry*; 57(5) : 733-736.
- 59 **MUHANNAD J., FRANZ H., FURKERTB, MILLER W., 2002-** Eur. J. Pharm. Biopharm. 53 115–123
- 60 **REGNAULT-ROGER, 2005b.** Molécules allelochimiques et extraits végétaux dans la protection des plantes : nature, rôle et bilan de leur utilisation au XXe siècle. *In* Regnault-Roger, C, Fabres G. *Philogène* , B J.R .Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp 625-650.;
- 61 **AVATO P., ARGENTIERI M. P. et DE MASTRO G., 2008-** Combined methods for the analysis of total content of glucosinolates in some brassica oilseeds. Italy. P87;
- 62 **BELLOSTAS N., SORENSEN J. C. ET SORENSEN H., 2008-** Glucosinolates qualitative and quantitative evaluation of cruciferous plants during their life cycles. Chemistry Department, The Royal Veterinary and Agricultural University, Frederiksberg C, Denmark

- 63 **MORRA M. J., 2008-** Controlling soil-borne plant pests using glucosinolate-containing tissues, p 7.
- 64 **BLAZEVIC I., RADONIC A., MASTELIC, ZEKIC M., SKOCIBUŠIC M. ET, MARAVIC A., 2010-** Glucosinolates, glycosidically bound volatiles and antimicrobial activity of *Aurinia sinuata* (Brassicaceae). *Food Chemistry* 121. Croatia, p 1020–1028
- 65 **BERNARDI R., MARI M., LEONI O., CASALINI L., CINTI S., PALMIERI S. 2008-** Biofumigation for controlling post-harvest fruit pathogens. Italy
- 66 **AUGER J , THIBOUT E, 2002-** substances soufrées des *Allium* et des Crucifères et leurs potentialités phytosanitaires. *In* Regnault-Roger, C, Philogène , B J.R , Vincent C .Biopesticides d'origine végétale . Tec & Doc, Paris, p 77-96
- 67 **AZIZ BOUCHELTA, AHMED BOUGHDAD ET ABELALI BLENZAR 2004,** Effets biocides des alcaloïdes, des saponines et des flavonoïdes extraits de *Capsicum frutescens* L. (*Solanaceae*) sur *Bemisia tabaci* (*Gennadius*) (*Homoptera : Aleyrodidae*)
- 68 **GOMEZ, B., MERTES, L. A. K., PHILLIPS, J. D., MAGILLIGAN, F. J. AND JAMES, L. A. 1995.** 'Sediment characteristics of an extreme flood: 1993 upper Mississippi River valley', *Geology*, 23, 963–966.
- 69 **RANASINGH NIRAKAR, 2007-** Biopesticides: an Economic Approach for Pest Management. Orissa Review. April 2007. Plant Protection, KVK, Rayagada, Gunupur
- 70 **GUNNING, R. V., MOORES, G. D., DEVONSHIRE, A. L. 1999** Esterase inhibitors synergise the toxicity of pyrethroids in Australian *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 63: 50-62
- 71 **FEENY P 1976** Plant apparency and chemical defense. *Rec Adv Phytochem* 10:1–40
- 72 **VAN EMDEN J.H. 1972** La mycoflore du sol, caractéristique de quelques cultures, pages 25–26, September
- 73 **LITTLER MM, LITTLER DS 1980** The evolution of thallus form and survival strategies in benthic marine macroalgae: field and laboratory tests of a functional form model. *Am Nat* 116:25–44
- 74 **VAN ALSTYNE KL, HOUSER LT 2003** Dimethylsulfide release during macroinvertebrate grazing and its role as an activated chemical defense. *Mar Ecol Prog Ser* 250:175–181
- 75 **VAN LOON, L.C., 1985.** Pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol.*, 4, 111-116

- 76 **RENWIC, J.A.A., RADKE, C.D. SACHDEV-GUPTA, K. & STÄDLER, E. 1992.** Leaf surface chemicals stimulating oviposition by *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) on cabbage. *Chemoecology* 3, 33–38
- 77 **PIGOTT, C. R., AND ELLAR, D. J. 2007.** Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin activity. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 255-281
- 78 **TADA, M., Y. HIROE, S. KIYOHARA AND S. SUZUKI, 1988.** Nematicidal and antimicrobial constituents from *Allium grayi* Regel. and *Allium fistulosum* L. var. caespitosum. *J. Agric. Biol. Chem.*, 52: 2381–5
- 79 **PARK, H., Y.C. HUNG AND R.F. BRACKETT, 2002.** Antimicrobial effect of electrolyzed water for inactivating *Campylobacter jejuni* during poultry washing. *Int. J. Food Microbiol.*, 72: 77–83
- 80 **BOYD D.W. ET ALVERSON D.R., 2000.** Repellency effects of garlic extracts on twospotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. *J. Entomol. Sci.*, 35, 86-90.
- 81 **HOSOKI, T. AND T. KUBARA. 1989.** Breaking corm dormancy and accelerated flowering of gladiolus with methyl disulfide treatment. *HortScience* 24:968–971.
- 82 **SURYAKALA G., KISHEN RAO B., TAKUR S.S. ET NAGARAJA RAO P., 1984.** Juvenomimetic activity and insecticidal activity of extracts from *Allium sativum* and *Butea monosperma* on *Spodoptera litura* (Lepidoptera : Noctuidae). *Zool. Jb. Physiol.*, 88, 113-117.
- 83 **KADOTA, H. AND Y. ISHIDA 1972.** "Production of Volatile Sulfur Compounds by Microorganisms." *Annual Review of Microbiology* 26(1): 127-138.
- 84 **KLOEPPER, J.W., C.M. RYU, S.A. ZHANG, 2004.** Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathol.*, 94, 1259-1266
- 85 **NAGAMATSU, Y., TODA, S., KOIKE, T., MIYOSHI, Y., SHIGEMATSU, S., AND KOGURE, M. 1998.** *Cloning, sequencing, and expression of the Bombyx mori receptor for Bacillus thuringiensis insecticidal CryIA(a) toxin.* *Biosci Biotechnol Biochem* 62, 727-73
- 86 **OLIVEIRA C.R.F., CYSNEIROS M .C .H. et HATANO EDUARDO., 2007 -** Occurrence of *Pyemotes* sp. on *Tuta absoluta* (Meyrick) , *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(6), pp: 929-932
- 87 **Li, G., and Quiros, F.C. 2002.** Genetic analysis, expression and molecular characterization of BoGSL-ELONG, a major gene involved in the aliphatic glucosinolate pathway of *Brassica* species. *Genetics*, 162: 1937–1943

- 88 **BAILLY R., MAMAROT J., PSARSKI P., 1983** - Mauvaises herbes des grandes cultures. Ed. ACTA, 78 p.
- 89 **KERGUELEN 1993** Index synonymique de la Flore de France, Muséum national d'histoire naturelle.)
- 90 **BONES A.M., ROSSITER J.T. 1996**, The myrosinase-glucosinolate system, its organization and biochemistry, *Physiol. Plant.* 97 194–208.
- 91 **ETTLINGER M.G., KJAER A. 1968**, Sulfur compounds in plants, *Rec. Adv. Phytochem.* 1 59–144.
- 92 **HALKIER B.A. 1999.**, Glucosinolates, in: Ikan R. (Ed.), *Naturally Occurring Glycosides: Chemistry, Distribution and Biological Properties*, John Wiley and Sons Ltd, London, , pp. 193–223
- 93 **FAHEY J.W., ZHANG Y., TALALAY P. 1997**, Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (10367–10372
- 94 **ZHANG Y., TALALAY P. 1994**, Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms, *Cancer Res.* 54 1976S–1981S.
- 95 **HASEGAWA T., YAMADA K., KOSEMURA S., YAMAMURA S., HASEGAWA K., 2000** Phototropic stimulation induces the conversion of glucosinolate to phototropism-regulating substances of radish hypocotyls, *Phytochemistry* 54 275–279.
- 96 **HULL A.K., VIJ R., CELENZA J.L. 2000**, Arabidopsis cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 2379–2384.
- 97 **MIKKELSEN M.D., HANSEN C.H., WITTSTOCK U., HALKIER B.A. 2000**, Cytochrome P450 CYP79B2 from Arabidopsis catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indoleglucosinolates and indole-3-acetic acid, *J. Biol. Chem.* 275 33712–33717.
- 98 **CHEN S., HALKIER B.A. 2000**, Characterization of glucosinolate uptake by leaf protoplasts of *Brassica napus*, *J. Biol. Chem.* 275 22955–22960.
- 99 **FENWICH R., HEANEY R.K., MULLINW.J. 1983**, Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 18 123–201.
- 100 **RASK L., ANDREASSON E., EKBOM B., ERIKSSON S., PONTOPPIDAN B., MEIJER J. 2000**, Myrosinase: Gene family evolution and herbivore defense in *Brassicaceae*, *Plant Mol. Biol.* 42 93–113.
- 101 **RODMAN J.E., A 1991** Taxonomic analysis of glucosinolate producing plants, part 1, *Phenetics Syst. Bot.* 16 598–618

- 102 **SØRENSEN H. 1990**, Glucosinolates: structure, properties, function, in: Shadidi F. (Ed.), *Canola and Rapeseed*, AVI Book, New York, , pp. 149–172.
- 103 **HOGGE L.R., REED D.W., UNDERHILL E.W., HAUGHN G.W. 1988**, HPLC separation of glucosinolates from leaves and seeds of *Arabidopsis thaliana* and their identification using thermospray liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* 26 551–556.
- 104 **KLIEBENSTEIN D.J., KROYMANN J., BROWN P., FIGUTH A., PEDERSEN D., GERSHENZON J. 2001**, Mitchell-Olds T., Genetic control of natural variation in *Arabidopsis thaliana* glucosinolate accumulation, *Plant Physiol.* 126 811–825
- 105 **ANDERSEN M.D., BUSK P.K., SVENDSEN I., MØLLER B.L. 2000**, Cytochromes P-450 from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) catalyzing the first steps in the biosynthesis of the cyanogenic glucosides linamarin and lotaustralin, Cloning, functional expression in *Pichia pastoris*, and substrate specificity of the isolated recombinant enzymes, *J. Biol. Chem.* 275 1966–1975.
- 106 **JONES P.R., MØLLER B.L., HØJ P.B. 1999**, The UDP-glucose: *p*-Hydroxymandelonitrile-O-glucosyltransferase that catalyzes the last step in synthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin in *Sorghum bicolor*, *J. Biol. Chem.* 274 35483–35491
- 107 **MØLLER B.L., POULTON J. 1993**, The biosynthesis of cyanogenic glucosides, in: Dey P.M., Harborne J.B. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press, New York, , pp. 183–207
- 108 **NIELSEN J.S., MØLLER B.L. 2000**, Cloning and expression of cytochrome P450 enzymes catalyzing the conversion of tyrosine to *p*-hydroxyphenylacetaldoxime in the biosynthesis of cyanogenic glucosides in *Triglochin maritima*, *Plant Physiol.* 122 1311–1321.
- 109 **WITTSTOCK U., HALKIER B.A. 2000**, Cytochrome P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate, *J. Biol. Chem.* 275 14659–14666.
- 110 **BENNETT R.N., KIDDLE G., WALLSGROVE R.M., 1997**Involvement of cytochrome P450 in glucosinolate biosynthesis in white mustard, *Plant Physiol.* 114 1283–1291.
- 111 **DU L., LYKKESFELDT J., OLSEN C.E., HALKIER B.A., 1995**Involvement of cytochrome P450 in oxime production in glucosinolate biosynthesis as demonstrated by an in vitro microsomal enzyme system isolated from jasmonic acid-induced seedlings of *Sinapis alba* L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 12505–12509.

- 112 **HANSEN C.H., WITTSTOCK U., OLSEN C.K., HICK A.J., PICKETT J.A., HALKIER B.A. 2001**, Cytochrome P450 CYP79F1 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of dihomomethionine and trihomomethionine to the corresponding aldoximes in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates, *J. Biol. Chem.* 276 11078–11085.
- 113 **MIKKELSEN M.D., HANSEN C.H., WITTSTOCK U., HALKIER B.A. 2000**, Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indoleglucosinolates and indole-3-acetic acid, *J. Biol. Chem.* 275 33712–33717.
- 114 **BONES A., THANGSTAD O.P., HAUGEN O.A., ESPEVIK T. 1991**, Fate of myrosin cells: characterization of monoclonal antibodies against myrosinase, *J. Exp. Bot.* 42 () 1541–1549.
- 115 **BENNETT R.N., KIDDLE G., HICK A.J., DAWSON G.W., WALLSGROVE R.M. 1996**, Distribution and activity of microsomal NADPH-dependent monooxygenases and amino acid decarboxylases in cruciferous and non-cruciferous plants, and their relationship to foliar glucosinolate content, *Plant Cell Environ.* 19 801–812.
- 116 **BENNETT R.N., LUDWIG-MULLER J., KIDDLE G., HILGEN BERG W., WALLSGROVE R.M. 1995**, Developmental regulation of aldoxime formation in seedlings and mature plants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) and oilseed rape (*Brassica napus*): glucosinolate and IAA biosynthetic enzymes, *Planta* 196 239–244.
- 117 **OLDFIELD M.F., BENNETT R.N., KIDDLE G., WALLSGROVE R.M., BOTTING N.P. 1999**, Biochemical characterization of an aldoxime-forming flavoprotein involved in 2-phenylethylglucosinolate biosynthesis in *Brassica* species, *Plant Physiol. Biochem.* 37 99–108.
- 118 **LUDWIG-MUELLER J., RAUSCH T., LANG S., HILGENBERG W. 1990**, Plasma membrane bound high plant isoenzymes convert tryptophan to indole-3-acetaldoxime, *Phytochemistry* 29 1397–1400
- 119 **HÖGLUND A.S., LENMAN M., FALK A., RASK L. 1991**, Distribution of myrosinase in rapeseed tissues, *Plant Physiol.* 95 213–221.
- 120 **THANGSTAD O.P., EVJEN K., BONES A. 1991**, Immunogold-EM localization of myrosinase in Brassicaceae, *Protoplasma* 161 85–93.
- 121 **GROB K., MATILE P.H. 1979**, Vacuolar location of glucosinolates in horseradish root cells, *Plant Sci. Lett.* 14 327–335.
- 122 **KELLY P.J., BONES A., ROSSITER J.T. 1998**, Subcellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*, *Planta* 206 370–377.

- 123 **KOROLEVA O.A., DAVIES A., DEEKEN R., THORPE M.R., TOMOS A.D., HEDRICH R. 2000**, Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk, *Plant Physiol.* 124 599–608.
- 124 **FOO H.L., GRONNING L.M., GOODENOUGH L., BONES A.M., DANIELSEN B.E., WHITING D.A., ROSSITER J.T. 2000**, Purification and characterization of epithiospecifier protein from *Brassica napus*: enzymic intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis, *FEBS Lett.* 468 243–246.
- 125 **PALMIERI S., ROLLIN P., SØRENSEN H., SØRENSEN S. 1998**, Myrosinase technology for a potential glucosinolate utilization in agro-industry, *Agro. Food Inst. Hi-Tech. Jan./Feb.* 24–27.
- 126 **CLOSSAIS-BESNARD N., LARHER F. 1991**, Physiological role of glucosinolates in *Brassica napus*. Concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during a complete life cycle, *J. Sci. Food Agric.* 56 25–38.
- 126 **CLOSSAIS-BESNARD N., LARHER F. 1991**, Physiological role of glucosinolates in *Brassica napus*. Concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during a complete life cycle, *J. Sci. Food Agric.* 56 () 25–38.
- 127 **PORTER A.J.R., MORTON A.M., KIDDLE G., DOUGHTY K.J., WALLSGROVE R.M. 1991**, Variation in the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* L.), I. Effects of leaf age and position, *Ann. Appl. Biol.* 118 461–467.
- 128 **LI Y.C., KIDDLE G., BENNETT R., WALLSGROVE R.M. 1999**, Local and systemic changes in glucosinolates in Chinese and European cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.) after inoculation with *Sclerotinia sclerotiorum* (stem rot), *Ann. Appl. Biol.* 134 45–58.
- 129 **BARTLET E., KIDDLE G., WILLIAMS I., WALLSGROVE R. 1999**, Wound-induced increases in the glucosinolate content of oilseed rape and their effect on subsequent herbivory by a crucifer specialist, *Entomol. Exp. Appl.* 91 () 163–167.
- 130 **KORITSAS V.M., LEWIS J.A., FENWICK G.R. 1991**, Glucosinolate response of oilseed rape, mustard and kale to mechanical wounding and infestation by cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*), *Ann. Appl. Biol.* 118 209–221.
- 131 **LUDWIG-MUELLER J., BENNETT R., KIDDLE G., IHMIG S. 1999**, Ruppel M., Hilgenberg W., The host range of *Plasmodiophora brassicae* and its relationship to endogenous glucosinolate content, *New Phytol.* 141 443–458.

- 132 **BLAKE-KALFF M.M., HARRISON K.R., HAWKESFORD M.J., ZHAO F.J., MCGRATH S.P. 1998**, Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response to sulfur deficiency during vegetative growth, *Plant Physiol.* 118 1337–1344.
- 133 **BERGMAN F. 1970**, Die glucosinolat-biosynthese im verlauf der ontogenese von *Sinapis alba* L., *Z. Pflanzenphysiol.* 62 362–375.
- 134 **LYKKESFELDT J., MØLLER B.L. 1993**, Synthesis of benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L.: isothiocyanates as potent enzyme inhibitors, *Plant Physiol.* 102 609–613.
- 135 **LEIN K.A. 1972**, Genetische und physiologisch untersuchungen zur bildung von glucosinolaten in rapssamen: Lokalisierung des haupt-biosyntheseortes durch pfpfropfungen, *Z. Pflanzenphysiol.* 67 333–342.
- 136 **DOUGHTY K.J., KIDDLE G., PYE B.J., WALLSGROVE R.M. 1995**, Selective induction of glucosinolates in oilseed rape leaves by methyl jasmonate, *Phytochemistry* 38 347–350
- 137 **MÖLLERS C., NEHLIN L., GLIMELIUS K., IQBAL M.C.M. 1999**, Influence of in vitro culture conditions on glucosinolate composition of microspore-derived embryos of *Brassica napus*, *Physiol. Plant.* 107 () 441–446.
- 138 **KIDDLE G.A., DOUGHTY K.J., WALLSGROVE R.M. 1994**, Salicylic acid-induced accumulation of glucosinolates in oilseed rape leaves, *J. Exp. Biol.* 45 () 1343–1346.
- 139 **VISVALINGAM S., HRNSI T.G., BONES A.M. 1998**, Sulphate and micronutrients can modulate the expression levels of myrosinase in *Sinapis alba* plants, *Physiol. Plant.* 104 30–37.
- 140 **TAIPALENSUU J., ANDREASSON E., ERIKSSON S., RASK L. 1997**, Regulation of the wound-induced myrosinase-associated protein transcript in *Brassica napus* plants, *Eur. J. Biochem.* 247 963–971.
- 141 **BARTEL B., FINK G.R. 1994**, Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 6649–6653.
- 142 **SZTEIN AE, COHEN JD, SLOVIN JP, COOKE TJ 1995**: Auxin metabolism in representative land plants. *Amer J Botany*, 82:1514-1521
- 143 **ANONYME., 1998** – Changement climatique et ressources en eau dans les pays du Maghreb, Algérie, Maroc, Tunisie, en jeux et
- 144 **MUTIN G., 1977** - La Mitidja décolonisation et espèces géographiques. Ed. OPU, Alger, 607p

- 145 **STEWART P., 1969** – Quotient pluviométrique et dégradation biosphérique ; Quelques réflexions. Bull. Soc. Hist. Afri. Du nord, pp : 24-24
- 146 **BAGNOULS F. et GAUSSEN H., 1953** - Saison sèche et indice xérothermique. Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse, 88, pp: 193-239
- 147 **DAJOZ R., 1985** – Précis d'écologie. Ed. Bordas, Paris, 505 p
- 148 **DELAHAYE THIERRY, LEQUAY ARTHUR & AL.** - Les découvertes botaniques de nos sociétaires en 2000 – 2001 - p. 76-79 -
- 149 **DE GUINOCHET & AL. 1973-1984** Flore de France par les éditions du C.N.R.S. (5 vol.,) :
- 150 **L. WEST, I. TSUI, G. HAAS 2000** Single column approach for the liquid chromatographic separation of polar and non-polar glucosinolates from broccoli sprouts and seeds. *Journal of Chromatography A*, 966 227–232
- 151 **HAMMER K.A., CARSON C.F. ET RILEY T.V., 1999** - Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.*, 1(86), pp: 985-990.
- 152 **KAWAKISHI S, KANEKO T. 1987.** Interaction of proteins with allyl isothiocyanate. *J. Agric. Food Chem.* 35:85–88
- 153 **AGRAWAL AA, CONNER JK, JOHNSON MTJ, WALLSGROVE R. 2002.** Ecological genetics of an induced plant defense against herbivores: additive genetic variance and costs of phenotypic plasticity. *Evolution* 56:2206–13
- 154 **FUTUYMA, D.J., 2001-** *Ecological Specialization and Generalization. In Evolutionary Ecology: Concepts and Case Studies.* (eds C.W. Fox, D.A. Roff & D.J. Fairbairn), pp. 177-189. Oxford University Press, Oxford,
- 155 **BEGON, M., TOWNSEND, C.R., & HARPER, J.H., 2006-** *Ecology. From Individuals to Ecosystems.* Fourth Edition. Blackwell Publishing.
- 156 **ROSA, E.A.S., HEANEY, R.K., FENWICK, G.R., PORTAS, C.A.M., 1997.** Glucosinolates in crop plants. *Horticultural Reviews* 19, 99±215.
- 157 **KUSHAD, M.M., BROWN, A.F., KURLICH, A.C., JUVIK, J.A., KLEIN, B.P., WALLIG, M.A., JEFERY, E.H., 1984.** Variation of glucosinolates in vegetable crops of Brassica oleracea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 1548±1571
- 158 **JOSEFSSON, E., 1970.** Pattern, Content, and Biosynthesis of Glucosinolates in Some Cultivated Cruciferae. Svalof, Swedish Seed Association, Sweden
- 159 **HAUGHN, G.W., DAVIN, L., GIBLIN, M., UNDERHILL, E.W., 1991.** Biochemical genetics of plant secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 97, 217±226

- 160 **FAHEY, J.W., STEPHENSON, K.K., 1999.** Cancer chemoprotective effects of cruciferous vegetables. *HortScience* 34, 4±8.
- 161 **FARNHAM, M.W., STEPHENSON, K.K., FAHEY, J.W., 2000.** The capacity of broccoli to induce a mammalian chemoprotective enzyme varies among inbred lines. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 125, 482±488
- 162 **BOOTH, E.J., WALKER, K.C., 1992.** The effect of site and foliar sulfur on oilseed rape: comparison of sulfur responsive and non-responsive seasons. *Phyton* 32, 9±13
- 163 **BUTCHER, D.N., EL-TIGANI, S., INGRAM, D.S., 1974.** The role of indole glucosinolates in the club root disease of the Cruciferae. *Physiological Plant Pathology* 4, 127±140.
- 164 **BODNARYK, R.P., 1992.** Effects of wounding on glucosinolates in the cotyledons of oilseed rape and mustard. *Phytochemistry* 31, 2671± 2677
- 165 **BODNARYK, R., YOSHIHARA, T., 1995.** Structure-activity relationships of cyclopentane analogs of jasmonic acid for induced responses of canola seedlings, *Brassica napus* L. *Journal of Chemical Ecology* 21, 1735±1743
- 166 **ZANGERL, A.R., BAZZAZ, F.A., 1993.** Theory and pattern in plant defense allocation. In: Fritz, R.S., Simms, E.L. (Eds.), *Plant Resistance to Herbivores and Pathogens*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 363–391
- 167 **ROSA, E.A.S., 1997.** Daily variation in glucosinolate concentrations in the leaves and roots of cabbage seedlings in two constant temperature regimes. *J. Sci. Food Agric.* 73, 364–368
- 168 **KIRKEGAARD, J.A., SARWAR, M., 1998.** Biofumigation potential of Brassicas. I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown Brassicas. *Plant Soil* 201, 71–89
- 169 **MAGRATH, R., BANO, F., MORGNER, M., PARKIN, I., SHARPE, A., LISTER, C., DEAN, C., TURNER, J., LYDIATE, D., MITHEN, R., 1994.** Genetics of aliphatic glucosinolates. I. Side chain elongation in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Heredity* 72, 290±299
- 170 **MITHEN, R.F., DEKKER, M., VERKERK, R., RABOT, S., JOHNSON, I.T., 2000.** The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability of glucosinolates in human foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 967±984
- 171 **DU, L.C., HALKIER, B.A., 1998.** Biosynthesis of glucosinolates in the developing silique walls and seeds of *Sinapis alba*. *Phytochemistry* 48, 1145±1150

- 172 **MIKKELSEN, M.D., HANSEN, C.H., WITTSTOCK, U., HALKIER, B.A., 2000.** Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.* 275, 33712–33717.
- 173 **REINTANZ, B., LEHNEN, M., REICHEL, M., GERSHENZON, J., KOWALCZYK, M., SANDBERG, G., GODDE, M., UHL, R., PALME, K., 2001.** Bus, a bushy *Arabidopsis* CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell* 13, 351–367
- 174 **BILSBORROW, P.E., EVANS, E.J., MURRAY, F., ZHAO, F.J., 1993.** Glucosinolate changes in developing pods of single and double low varieties of autumn-sown oilseed rape (*Brassica napus*). *Ann. Appl. Biol.* 122, 135,143.
- 175 **Brudenell A.J.P., Griffiths H., Rossiter J.T., Baker D.A. 1999,** The phloem mobility of glucosinolates, *J. Exp. Bot.* 50 745–756.
- 176 **MERRITT SZ. 1996.** Within-plant variation in concentrations of amino acids, sugar, and sinigrin in phloem sap of black mustard, *Brassica nigra* (L) Koch (Cruciferae). *J. Chem. Ecol.* 22:1133–45
- 177 **CHEN S, PETERSEN BL, OLSEN CE, SCHULZ A, HALKIER BA. 2001.** Long-distance phloem transport of glucosinolates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127:194–201
- 178 **LYKKESFELDT J., MØLLER B.L. 1993,** Synthesis of benzylglucosinolate in *Tropaeolum majus* L.: isothiocyanates as potent enzyme inhibitors, *Plant Physiol.* 102 609–613
- 179 **MAGRATH R., MITHEN R. 1993,** Maternal effects on the expression of individual aliphatic glucosinolates in seeds and seedlings of *Brassica napus*, *Plant Breeding* 111 () 249–252
- 180 **KLIEBENSTEIN, D.J., KROYMANN, J., BROWN, P., FIGUTH, A., PEDERSEN, D., GERSHENZON, J., MITCHELL-OLDS, T., 2001.** Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiol.* 126, 811–825.
- 181 **MERRITT S.Z. 1996,** Within-plant variation in concentrations of amino acids, sugar, and sinigrin in phloem sap of black mustard, *Brassica nigra* L. Koch, *J. Chem. Ecol.* 22 1133–1145
- 182 **Gijzen M., McGregor I., Seguin-Swartz G. 1989,** Glucosinolate uptake by developing rapeseed embryos, *Plant Physiol.* 89 260–263.
- 183 **GIJZEN M., SEGUIN-SWARTZ G., MCGREGOR I. 1994,** Glucosinolate metabolism in rapeseed embryos: effect of feeding glucosinolate precursors and uptake of glucosinolate by different plant cultivars, *J. Plant Physiol.* 144 17–21.