

UNIVERSITÉ DE OUAGADOUGOU

École Doctorale
Sciences et Technologies

Laboratoire de Chimie Organique
et de Physique Appliquées



N° d'ordre ...310...

Thèse présentée

Par Moumouni KOALA

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Ouagadougou

Option : Sciences et Technologies

Spécialité : Chimie Organique – Chimie des Substances Naturelles

**ETUDE DES ANTIOXYDANTS D'*IPOMOEA BATATAS* (PATATE
DOUCE À CHAIR ORANGE) : STRUCTURES ET PROPRIÉTÉS
BIOLOGIQUES**

Soutenue le 28 Janvier 2015 devant le jury composé de :

Président : - Yaya MAHMOUT, Professeur, Université de Ndjaména, Tchad

Membres : - Dominique SOHOUNHLOUE, Professeur, Université d'Abomey-Calavi, Bénin (**Rapporteur**)

- Adama SABA, Professeur, Université de Ouagadougou, Burkina Faso (**Rapporteur**)

- Mamoudou H. DICKO, Professeur, Université de Ouagadougou, Burkina Faso (**Examineur**)

- Eloi PALÉ, Maître de Conférences, Université de Ouagadougou, Burkina Faso (**Directeur**)

Dédicace

À mamère

À mon père

À mon épouse

À ceux qui m'aiment malgré tous mes défauts

Remerciements

Le moment est venu de remercier les personnes sans qui cette étape importante de ma vie n'aurait pu avoir lieu.

Je remercie d'abord « **THE McKNIGHT FOUNDATION** » pour avoir financé ce travail à travers le projet « *Promotion de la patate douce à chair orange pour contrôler la carence en Vitamine A et en Antioxydant au Burkina Faso* ».

J'aimerais remercier le Professeur Mouhoussine NACRO, responsable du Laboratoire de Chimie Organique et de Physique Appliquées, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Non content de m'inonder d'idées nouvelles et originales, vous vous êtes toujours investi pour me faciliter la réalisation des travaux de recherche (projets, bourses, etc.). Je tiens à vous témoigner mon admiration sur votre manière de diriger le laboratoire : toujours disponible, attentif à ses étudiants et capable d'autant de sérieux que d'humour... Que demander de plus!? Merci Professeur !

Je remercie Monsieur Eloi PALE, Maître de conférences et actuel responsable du Laboratoire de Chimie Organique et de Physique Appliquées pour m'avoir donné le sujet de cette thèse qu'il a lui-même acceptée de diriger de bout en bout. Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude et mon admiration pour m'avoir suivi quotidiennement tout au long de ces quatre années. Vous avez fait preuve de disponibilité et de patience, et m'avez fait partager votre grande culture, pas uniquement scientifiques d'ailleurs. Vos conseils et bien sûr vos compétences m'ont guidé et m'ont permis de m'interroger sur ce à quoi doit ressembler un bon chercheur. Pour tout cela, je vous dis un grand merci.

Au Dr HEMA Adama, que vous trouvez ici toute ma gratitude ! Vous avez été celui à qui j'ai eu constamment recours face aux multiples difficultés pendant la réalisation de ce travail. Votre grande disponibilité, vos critiques scientifiques, votre rigueur dans le travail ont constitué d'énormes atouts dans l'aboutissement de ce travail de thèse. De par ces qualités qu'on vous reconnaît, vous avez suscité en moi le sens du travail bien fait. Dr. HEMA je vous dis merci !

Cette thèse est le fruit d'une collaboration entre LCOPA, l'INERA, et HKI. Je tiens donc à remercier Dr SOME Koussao Pau André, Monsieur BELEM Jérôme pour leur contribution à l'aboutissement de ce travail notamment la mise à disposition du matériel végétal.

Au Professeur Dominique Laurain-Mattar, Directrice du Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Lorraine. Je voudrais vous exprimer ma gratitude ainsi qu'à votre équipe. La disponibilité de votre équipe a été d'une grande importance à l'aboutissement de ce travail notamment la réalisation des spectres de masse, indispensables à la caractérisation des caroténoïdes.

J'exprime toute ma reconnaissance au Dr. SEREME Abdoulaye, chercheur au CNRST pour ses nombreux apports scientifiques et ses encouragements qui m'ont stimulé.

Je remercie chaleureusement Dr. DABIRE Constantin Maniéno pour m'avoir promulgué ses conseils judicieux au cours de mon parcours, aux bons moments passés à parler d'autres choses que de science (*Allons manger la vie!!!*).

Je remercie du fond du cœur Abel MBAIOGAOU, AYINA Kouzoungui et Remy BATIONO pour la convivialité qui a prévalu au laboratoire pendant la réalisation de ce travail. Merci aussi à tous mes collègues et amis des différents laboratoires pour leur sympathie, leur amitié et leurs suggestions qui m'ont été utiles pour la réalisation de ce travail.

Aux membres du jury

Je vous prie d'agréer, Messieurs les Professeurs, l'expression de ma considération distinguée ; vous qui avez accepté de juger ce travail.

Enfin, pour leur soutien sans faille et permanent, je tiens à remercier de tout cœur mes parents, mes oncles Dr NEBIE Issa, OUEDRAOGO Ousmane, BATIONO Nestor ainsi qu'à mon épouse pour leur amour et leur compréhension.

Abréviations

AAO : activité antioxydante

ABTS : acide 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATP : Adénosine 5' triphosphate

CAD : cinnamyl alcool déshydrogénase

CCR : cinnamate CoA réductase

CHI : chalcone flavanone isomérase

CHS : chalcone synthase

DO : densité optique

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EOR : espèces oxygénées réactives

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power

GPx : glutathion peroxydase

GSH : glutathion réduit

GSSG : glutathion oxydé

HPLC : Chromatographie liquide à haute performance

MPO : myéloperoxydase

NADH : Nicotinamide Adénine dinucléotide réduit

PAL : phénylalanine ammonialyase

PDCO : patate douce à chair orange

POD : peroxydases ; Lacc : laccases

Q-TOF : spectromètre hybride quadripôles-temps de vol (*Quadrupole-Time of flight*)

Rf : référence frontale (CCM)

RFC : réactif de Folin-Ciocalteu

SOD : superoxyde dismutase

TAL : tyrosine ammonialyase

TCP : teneur en composés phénoliques

TCT : teneur en caroténoïdes totaux

TMS : teneur en matière sèche

TPTZ : 2,4,6-tripyridyl-s-triazine

TR : transférases.

UV : Ultra-violet

Table des matières

Remerciements	ii
Abréviations	iv
Table des matières	vi
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xii
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
PREMIÈRE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES ANTIOXYDANTS	4
I. Radicaux libres	4
II. Stress oxydant	6
II.1. Détérioration des lipides.....	6
II.2. Détérioration des protéines.....	7
II.3. Détérioration de l'ADN.....	8
III. Antioxydants.....	8
III.1. Définition	8
III.2. Familles d'antioxydants	9
III.2.1. Antioxydants endogènes	9
III.2.1.1. Systèmes enzymatiques	9
III.2.1.2. Systèmes non enzymatiques.....	11
III.2.2. Antioxydants exogènes	11
III.2.2.1. Les antioxydants pharmaceutiques	11
III.2.2.1. Les antioxydants végétaux apportés par l'alimentation.....	12
III.2.2.1.1. Les caroténoïdes.....	12
III.2.2.1.2. Les composés phénoliques.....	13
III.3. Méthodes d'évaluation des antioxydants	21
III.3.1. Dosages basés sur un mécanisme par HAT	21

III.3.1.1. Dosage ORAC (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>).....	22
III.3.1.2. Dosage de la décoloration de la crocine.....	24
III.3.1.3. Dosage TRAP (<i>Total Radical-trapping Antioxidant Parameter</i>).....	26
III.3.1.4. Détermination du TOSC : <i>Total Oxidant Scavenging Capacity</i>	27
III.3.1.5. Détermination du LDL : <i>Low-Density Lipoprotein Oxidation</i>	28
III.3.2. Les dosages basés sur un mécanisme de transfert électronique (SET).....	28
III.3.2.1. Dosage des phénols totaux par le Réactif de Folin-Ciocalteu (RFC).....	29
III.3.2.2. Dosage du TEAC (<i>Trolox Equivalent Antioxydant Capacity</i>).....	31
III.3.2.3. Dosage du FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>).....	33
III.3.2.4. Le dosage du CUPRAC : <i>Copper Reduction Assay</i>	34
III.3.2.5. Dosage au 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	35
Conclusion.....	36
CHAPITRE II : LA PATATE DOUCE ET SES MICRONUTRIMENTS.....	37
I. <i>Ipomoea batatas</i> (patate douce).....	37
I.1. Historique.....	37
I.2. Description botanique.....	38
I.3. Utilisation.....	39
II. Les micronutriments de la patate douce.....	39
II.1. Les caroténoïdes.....	39
II.1.1. Diversité des caroténoïdes de la patate douce à chair orange.....	39
II.1.2. Localisation des caroténoïdes dans le tubercule de patate douce à chair orange... ..	40
II.1. 3. Biosynthèse des caroténoïdes de la patate douce.....	41
II.1. 3.1. La synthèse d’IsoPentenyl Pyrophosphate : IPP.....	41
II.1. 3.1.1. La voie de l’acide mévalonique.....	41
II.1. 3.1.2. La voie du deoxyxylulose phosphate.....	42
II.2. Les composés phénoliques.....	45
II.2.1. Diversité des composés phénoliques de la patate douce.....	45

II.2.2. Localisation des composés phénoliques dans le tubercule de la patate douce.....	45
II.2.3. Biosynthèse des composés phénoliques de la patate.....	46
II.3.1. Les sources de variations d'ordre génétique	48
II.3.2. Effet des techniques culturales	49
II.3.2.1. Fertilisation.....	49
II.3.3. Effet des facteurs de l'environnement.....	50
II.3.4. Conclusion.....	50
III. Généralités sur les caroténoïdes	50
III.1. Définition des caroténoïdes	50
III.2. Fonctions Biologiques	52
III.3. Techniques générales appliquées à l'étude des caroténoïdes	53
III.3.1. Extraction	53
III.3.2. Saponification	54
III.3.3. Analyse structurale des caroténoïdes par spectrométrie de masse.....	54
III.3.2.1. Le couplage chromatographie-spectrométrie de masse	55
Conclusion.....	57
DEUXIÈME PARTIE : RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	58
CHAPITRE I : DOSAGE DES CAROTENOÏDES ET DES POLYPHENOLS TOTAUX DE HUIT VARIETES DE PDCO	59
Introduction	59
I. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	60
I.1. Matériel végétal.....	60
I.2. Détermination de la quantité de matière sèche.....	60
I.3. Extraction et dosage des composés phénoliques et des caroténoïdes	60
I.3.1. Extraction.....	60
I.3.2. Évaluation de la teneur en caroténoïdes totaux	61
I.3.3. Évaluation des teneurs en composés phénoliques (TCP)	61

I.3.4. Évaluation des activités antioxydantes (AAO).....	62
I.3.4.1. Évaluation des AAO par la méthode FRAP	62
I.3.4.2. Évaluation des AAO par la méthode au DPPH	63
I.3.4.2. Évaluation des AAO par la méthode à l'ABTS (<i>Trolox Equivalent Antioxydant Capacity</i>).....	64
II. Résultats et discussion	64
II.1. Détermination des teneurs en caroténoïdes, en composés phénoliques et l'activité antioxydante.....	64
II.1.2. Les teneurs en caroténoïdes.....	64
II.1.3. Teneur en matière sèche	66
II.1.4. Les teneurs en composés phénoliques des extraits de PDCO	67
II.1.5. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de PDCO	69
II.2. Corrélation entre les méthodes de dosages.....	70
Conclusion	75
CHAPITRE II : FACTEURS INFLUENÇANT LES TENEURS EN CAROTENOÏDES ET EN COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DE LA PDCO.....	76
I. Les facteurs influençant la composition en caroténoïdes et en composés phénoliques de la PDCO	76
I.1. Méthodologie	76
I.2. Résultats et discussion.....	79
I.2.1. Effet de fertilisant organique	79
I.2.2. Effet des fertilisants minéraux	80
I.2.3. Effet des fertilisants organo-minéraux	81
Conclusion	83
II. Influence des zones agro-écologiques sur la teneur en caroténoïdes et en phénols totaux de la PDCO.....	83
II.1. Méthodologie	83
II.2. Résultats et discussion	84

Conclusion	86
III. Effet des attaques des charançons sur les teneurs en caroténoïdes et des phénols totaux de la PDCO	86
Introduction	86
III.1. Méthodologie	87
III.2. Résultats et discussion	88
III.2.1. Teneurs en composés phénoliques	88
III.2.2. Activité antioxydante	89
III.2.3. Teneurs en caroténoïdes totaux	90
Conclusion	91
CHAPITRE III : CARACTERISATION DES CAROTENOÏDES MAJORITAIRES DE LA PDCO	92
Introduction	92
I. Évaluation des teneurs en caroténoïdes de dix variétés de PDCO.....	92
I.1. Matériel et méthodes	92
I.1.1. Matériel végétal	92
I.1.2. Méthodologie	92
I.2. Résultats et discussion.....	93
II. Caractérisation des caroténoïdes majoritaires de la variété Jewel	94
II.1. Matériel végétal	94
II.2. Extraction des caroténoïdes de la PDCO (variété Jewel)	95
II.3. Purification des caroténoïdes par chromatographie sur colonne	95
II.4. Méthode d'analyse des caroténoïdes majoritaires par CCM/MS	96
II.5. Résultats et discussion	96
II.5.1. Caractérisation des caroténoïdes majoritaires de plante étudiée	96
II.5.1.1. Analyses CCM/MS des caroténoïdes extraits	96
II.5.1.1.1. <i>Identification des caroténoïdes majoritaires présents dans l'extrait de Jewel</i>	96
II.5.1.1.1.1. <i>Identification des composés E et C</i>	98

<i>II.5.1.1.1.2. Identification de composés D et A</i>	101
<i>II.5.1.1.1.3. Identification du composé B</i>	105
Conclusion.....	107
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	108
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	110
I. Préparation du matériel végétal.....	111
II. Propriétés biologiques.....	111
III. Extraction, séparation et purification des caroténoïdes.....	112
II.1. Extraction.....	112
III.2. Méthodes chromatographiques.....	112
III.2.1. Chromatographie sur colonne ouverte.....	112
III.2.2. Chromatographie sur couche mince.....	113
III.3. Spectrométrie de masse (MS).....	113
Références bibliographiques.....	114

Liste des tableaux

Tableau 1 : Teneurs des principaux caroténoïdes identifiés dans la patate douce fraîche	40
Tableau 2 : Teneurs de quelques composés phénoliques dans des patates fraîches.....	45
Tableau 3 : Teneur en caroténoïdes totaux des variétés de patate douce d'après Gabriela ^[34]	49
Tableau 4 : Effet de l'apport de fertilisant sur la teneur en caroténoïdes.....	50
Tableau 7 : Teneurs en polyphénols totaux des variétés de (PDCO).....	68
Tableau 8 : Teneurs en antioxydants des variétés de (PDCO).....	69
Tableau 9 : Coefficient de corrélation (R) entre dosages	73
Tableau 10 : Corrélation entre TAO, TPP et TCT des extraits de PDCO.....	73
Tableau 11 : Détail des 9 combinaisons minérales à base d'Azote (N), de phosphore (P) et de potassium (K).	77
Tableau 12 : Les vingt-sept (27) combinaisons de fertilisants organiques et minéraux testées sur la variété de patate douce TIB-440060.....	78
Tableau 13 : Influence de différentes doses de fertilisation organique sur la production de TAO, TPP et de CT par la variété TIB-440060 de patate douce	79
Tableau 14 : Augmentation des TAO, TPP et TCT de la PDCO en fonction de l'apport en fumure organique	80
Tableau 15 : Influence de différentes doses de fertilisation minérale sur la production de TAO, TPP et de CT par la variété TIB-440060 de patate douce.....	81
Tableau 16 : Contribution en pourcentage du type de fertilisation sur l'accumulation de TAO, TPP et de CT par la variété de patate douce TIB-440060.....	82
Tableau 17 : Corrélation (R^2) entre les différentes teneurs de la PDCO.....	83
Tableau 18 : Teneur en micronutriments du Tiébélé2 en fonction de la localité.....	84
Tableau 19 : TPP, TAO et TCT des tubercules sains et attaqués de cinq variétés de PDCO ..	88
Tableau 20 : Données statistiques des différences significatives entre les teneurs des patates saines et les patates attaquées par les charançons	91
Tableau 21 : TCT et rendement des dix cultivars de PDCO	93
Tableau 22 : Matériel végétal.....	112

Liste des figures

Figure 1 : L'O ₂ à l'origine des radicaux libres	4
Figure 2 : Formation en cascade des différentes EOR à partir du radical peroxyde	5
Figure 3 : Mécanisme de la peroxydation lipidique	7
Figure 4 : Systèmes enzymatiques antioxydants	10
Figure 5 : Mécanisme de l'activité pro-vitamine A du β -carotène	12
Figure 6 : Squelette de base des flavonoïdes	14
Figure 7 : Structures chimiques des flavanones	14
Figure 8 : Structures chimiques des flavonols	14
Figure 9 : Structures chimiques de flavan-3-ols	15
Figure 10 : Structures chimiques de deux anthocyanes	15
Figure 11 : Structures chimiques d'acides hydroxybenzoïques	16
Figure 12 : Structures chimiques d'acides hydroxycinnamiques	17
Figure 13 : Structures chimiques des stilbènes	17
Figure 14 : Structures de quelques lignanes	18
Figure 15 : Structures des tocophérols et des tocotriénols	19
Figure 16 : Structures chimiques des formes acide et basique de la vitamine C	20
Figure 17 : Capacité antioxydante d'un échantillon en AUCnet : Par les Laboratoires Brunswick (2003)	22
Figure 18 : Exemple d'une courbe d'étalonnage (linéaire) obtenue à partir des AUC en fonction de la concentration en α -tocophérol (en μ M)	24
Figure 19 : Cinétiques de l'oxydation de la R-PE initiée par 5 mM de l'AAPH en présence du plasma avant et après l'addition du trolox (1,8 μ M solution finale)	27
Figure 20 : Formation et piégeage du radical par un antioxydant donneur H : le trolox	32
Figure 21 : Réduction du Fer(III) en Fer(II) dans la méthode FRAP	33
Figure 22 : Réduction du Cu(II) en Cu (I)	34
Figure 23 : Structure du radical de DPPH	35
Figure 24 : Tubercules de patate douce	38
Figure 25 : Synthèse d'IPP par la voie de l'acide mévalonique	42
Figure 26 : Synthèse d'IPP par la voie du deoxyxylulose phosphate.	43
Figure 27 : Voie de biosynthèse générale des isoprénoïdes	44
Figure 28 : Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques	47

Figure 29 : Les différents cycles obtenus après cyclisation du lycopène.....	51
Figure 30 : Structures de quelques caroténoïdes	52
Figure 31 : Chromatographie liquide et la spectrométrie de masse (LC-MS)	55
Figure 32 : Spectre de masse APCI de l'ion positif du β -carotène [122].....	56
Figure 33 : Courbe-étalon du β -carotène.....	61
Figure 34 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (AG)	62
Figure 35 : Courbe d'étalonnage de trolox par la méthode FRAP	63
Figure 36 : Courbe d'étalonnage de trolox par la méthode de DPPH.....	63
Figure 37 : Courbe d'étalonnage de trolox par la méthode à l'ABTS.	64
Figure 38 : Histogramme comparatif des TCT ($\mu\text{g EBC/g}$) des variétés croisées de PDCO. .	66
Figure 39 : Relations entre la matière sèche (%) et le logarithme des TCT.	67
Figure 40 : Histogramme comparatif des TCP (mg d'EAG/g) des variétés de PDCO	68
Figure 41 : Histogramme comparatif des activités antioxydantes des variétés de PDCO	70
Figure 42 : Formes mésomères du radical phénoxy formé (stabilisation par résonance).....	72
Figure 43 : Courbe de corrélation entre les AAO (FRAP) et les TCP des variétés de PDCO.	72
Figure 44 : Courbe de corrélation entre les AAO (DPPH) et les TCP des variétés de PDCO.	72
Figure 45 : Courbe de corrélation entre les AAO (ABTS) et les TCP des variétés de PDCO.	73
Figure 46 : Courbe de corrélation entre AAO et TCT des variétés de PDCO	74
Figure 47 : Dendrogramme des huit variétés de PDCO.....	75
Figure 48 : Histogramme comparatif des TCT, des AAO et des TCP la variété Tiébélé2 en fonction de la localité	85
Figure 49 : Courbe de corrélation entre les TCT et les AAO de la variété Tiébélé2.....	85
Figure 50 : Illustration des attaques des charançons	87
Figure 51 : Histogramme comparatif des TCP des tubercules sains et attaqués.....	89
Figure 52 : Histogramme comparatif des AAO des tubercules sains et attaqués.....	90
Figure 53 : Histogramme comparatif des TCT des tubercules sains et attaqués.....	91
Figure 54 : Histogramme comparatif des TCT de dix variétés de PDCO.....	94
Figure 55 : Patate douce (variété Jewel)	95
Figure 56 : Spectre de masse de l'extrait de Jewel (ESI+, hexane.....	97
Figure 57 : Structures représentatives de la zéaxanthine et de la lutéine	98
Figure 58 : Spectre MS/MS du pic E m/z 569 $[\text{M}+\text{H}]^+$	99
Figure 59 : Spectre MS/MS du pic C m/z 551 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$	100
Figure 60 : Structures représentatives de α et β -cryptoxanthine	102
Figure 61 : Spectre MS/MS du pic D m/z 553 $[\text{M}+\text{H}]^+$	103

Figure 62 : Spectre MS/MS du pic A m/z 535 [M+H-H ₂ O] ⁺	104
Figure 63 : Structure du β-carotène (pic B).....	105
Figure 64 : Spectre MS/MS du pic B m/z 537 [M+H] ⁺	106
Figure 65 : Schéma général de l'extraction à la séparation des pigments purs.....	112

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les caroténoïdes et les polyphénols sont deux groupes de pigments végétaux largement répandus dans les plantes. Ces composés sont très souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et des légumes ^[1, 2]. Leur pouvoir colorant remarquable au niveau des fleurs est un élément très important dans l'attraction des agents pollinisateurs (oiseaux, papillons, etc.) qui pourront véhiculer les semences et ainsi assurer la pérennité des espèces ^[3, 4]. Ces composés constituent également l'arsenal chimique principal de défense des plantes contre les traumatismes, le stress, les agents pathogènes, les radiations ultra-violettes, etc. ^[3-6].

La couleur est un paramètre très important dans notre vie. Outre son caractère esthétique évident, elle influence nos choix et nos humeurs. On observe qu'un véritable langage des couleurs s'est développé sur la base de cette constatation ^[7]. Ce langage est beaucoup utilisé par les principaux acteurs de la consommation (publicitaire, médias ...).

L'industrie alimentaire n'est pas en reste. Pour répondre à l'exigence du consommateur face à l'apparence du produit, un effort de contrôle de ces paramètres s'impose. Pour ce faire, certains aliments sont enrichis par des molécules colorantes (caroténoïdes, anthocyanes).

La synthèse chimique de ces composés est cependant coûteuse et elle est de plus en plus remise en cause de nos jours pour des raisons de risques de toxicité ^[3-6]. L'origine biologique de ces pigments s'avère être une alternative intéressante. Outre leur aspect visuel, les caroténoïdes et les polyphénols présentent également un intérêt fonctionnel reposant essentiellement sur leurs propriétés antioxydantes. L'activité antioxydante de ces composés est due principalement à leur grande réactivité vis-à-vis des radicaux libres dans l'organisme. En effet, l'investigation épidémiologique et l'approche expérimentale mettent en exergue l'efficacité d'une consommation diversifiée de certains aliments (riches en caroténoïdes et en polyphénols) tels que les fruits et légumes dans la prévention d'un grand nombre de pathologies ^[5]. Une équipe du professeur John Folts' (1999) ^[5] montra que la consommation du jus de raisin pendant deux semaines augmente l'élasticité des vaisseaux sanguins tout en diminuant le taux d'oxydation du cholestérol chez les malades atteints d'une maladie de l'artère coronaire ; la résistance des vaisseaux s'en trouverait ainsi triplée ^[5].

Conscients des effets bioactifs majeurs des polyphénols et des caroténoïdes contre les formes réactives de l'oxygène dans l'organisme, la découverte de nouveaux composés bioactifs dans les matériels végétaux ne fera qu'augmenter le potentiel de sources des antioxydants. C'est dans cette optique que nous avons orienté nos investigations vers la recherche et l'identification des caroténoïdes et des polyphénols contenus dans certaines plantes d'Afrique en général et du Burkina Faso en particulier.

L'objectif général de la présente étude est la valorisation de la patate douce à chair orange comme source naturelle d'antioxydants. Il s'agit donc de quantifier les teneurs en caroténoïdes et en phénols totaux de diverses variétés de patates douces à chair orange cultivées au Burkina Faso et d'évaluer leur activité antioxydante. La variété la plus riche en caroténoïde est choisie pour l'identification des caroténoïdes majoritaires.

Ce travail est organisé en deux parties. La première partie est consacrée à l'étude bibliographique des antioxydants en général. Il s'agit d'une synthèse des généralités sur les radicaux libres, le stress oxydatif, les antioxydants et les méthodes de mesure des antioxydants. La biosynthèse et les facteurs influençant l'accumulation des antioxydants dans la plante sont également présentés dans cette première partie.

La deuxième partie porte sur l'étude proprement dite de la patate douce à chair orange. Elle regroupe trois chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à l'évaluation des teneurs en caroténoïdes et en polyphénols totaux ainsi que l'activité antioxydante de huit variétés de PDCO
- Le deuxième chapitre traite des sources de variabilités des antioxydants de la PDCO
- Dans le troisième chapitre, les résultats de la caractérisation des caroténoïdes majoritaires de la variété la plus intéressante sont présentés.

PREMIÈRE PARTIE :

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES ANTIOXYDANTS

I. Radicaux libres

Les radicaux libres sont des molécules ou atomes qui possèdent un ou plusieurs électrons non appariés sur leur couche externe. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique [8, 9]. Ils apparaissent soit pendant la rupture symétrique d'une liaison covalente (rupture homolytique) au cours de laquelle chaque atome conserve son électron, soit pendant une réaction redox avec perte ou gain d'électrons à partir d'un composé non radical (figure 1). Compte tenu de leur instabilité énergétique, les radicaux libres ont tendance à revenir immédiatement à un état stable en donnant un électron ou en prenant une à une autre molécule : ils peuvent donc être réducteurs ou oxydants. Jouant le rôle d'accepteur ou de donneur d'électrons, les radicaux libres ont donc la propriété d'être extrêmement réactifs vis-à-vis des autres molécules, possédant un temps de demi-vie extrêmement court (de la nano- à la milliseconde).

Par sa configuration électronique, l'oxygène moléculaire est un radical libre. En effet, il possède deux électrons non appariés (figure 1). Toutefois, un blocage cinétique limite sa réactivité : les spins de ces deux électrons célibataires sont parallèles lui attribuant une stabilité relativement grande [10].

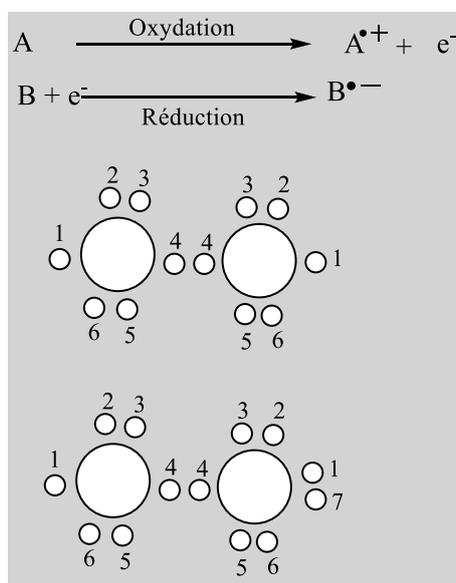
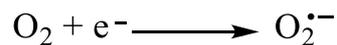


Figure 1 : L'O₂ à l'origine des radicaux libres

Cependant, dans l'organisme une partie de cet oxygène moléculaire peut capter de manière univalente et séquentielle un électron conduisant alors à la formation du chef de file des espèces oxygénées réactives (EOR) : l'anion superoxyde.



C'est ainsi que dans la mitochondrie, à l'état physiologique, il existe lors du transport électronique le long de la chaîne respiratoire, une fuite d'électrons provoquant la production de $\text{O}_2^{\bullet -}$ [10]. La poussée respiratoire des polynucléaires neutrophiles (*respiratory burst*) et des oxydases (*xanthine oxydase*, *NO synthase*, *eicosanoïdes*) constituent également de sources cellulaires de production d'anion superoxyde [10]. Ce radical superoxyde va alors conduire au cours de véritables chaînes d'oxydoréductions à la formation de nombreuses espèces oxygénées réactives (figure 2). Les EOR regroupent non seulement des radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$) ou le radical hydroxyle (OH^\bullet) mais également des dérivés non radicalaires tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou les hydroperoxydes (ROOH) [10].

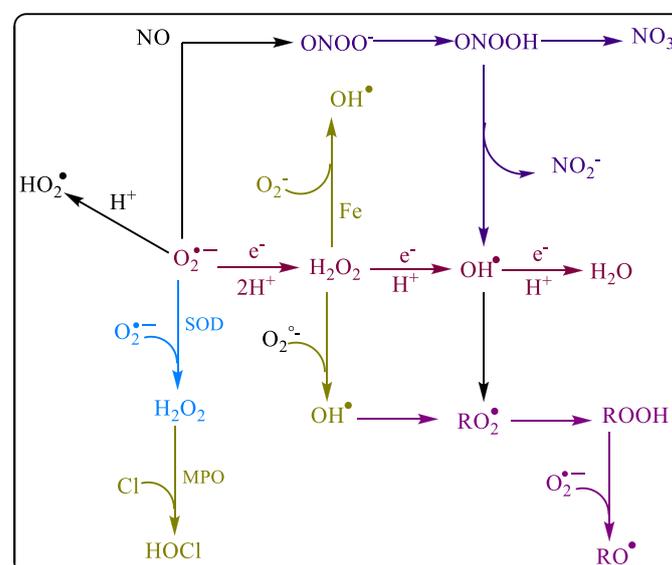


Figure 2 : Formation en cascade des différentes EOR à partir du radical peroxyde

Les espèces oxygénées réactives sont donc la conséquence inévitable de la consommation de l'oxygène moléculaire par l'organisme. Leur production est permanente et physiologique. En effet, les EOR de par leur réactivité participent à de nombreuses fonctions : phagocytose, bactéricidie, signalisation cellulaire [11-13]. Par exemple certains travaux [10, 14] ont montré qu'au niveau cellulaire, l'exposition de fibres musculaires au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a augmenté toutes les caractéristiques de la contraction musculaire : pic de force, constante de temps, temps de demi-relaxation [14]. Les EOR participeraient également à l'amélioration du captage musculaire du glucose, et à la reconstitution des stocks en glycogène musculaire [15]. Enfin, les EOR régulent de nombreux facteurs de transcription tels que l'*activator-protein-1* (AP-1) et le *heat shock factor-1* (HSF-

1) qui activent des gènes dits « protecteurs » pour la cellule [13, 16]. En effet, ces gènes régulent l'expression de molécules de défense telles que les antioxydants ou les *heat shock protein* (HSP) contribuant ainsi au processus de réparation et de régénération cellulaire [13].

Cependant, les effets physiologiques des EOR ne s'observent que lorsqu'il existe un équilibre entre ces substances et les antioxydants qui représentent un système de protection cellulaire face à la réactivité des espèces oxygénées réactives. À l'heure actuelle, deux catégories de système de défense ont été mises en évidence [10, 17]. Le système endogène est constitué d'enzymes ou d'agents réducteurs (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase, complexe enzymatique de la thiorédoxine) dont l'action est de neutraliser les EOR par leur transformation en molécules stables et non réactives. L'organisme possède une seconde ligne de défense les « piègeurs de radicaux libres » qui sont des composés pour la plupart apportés par l'alimentation et dont le rôle essentiel est de neutraliser les effets néfastes des EOR, limitant ainsi toute atteinte de l'intégrité cellulaire. Parmi ces antioxydants non-enzymatiques (exogènes), on retrouve certaines vitamines, les polyphénols, les caroténoïdes, les oligo-éléments, etc. L'organisme a donc besoin d'un équilibre nutritionnel afin de préserver un équilibre cellulaire adéquat entre les EOR et les antioxydants. Cet équilibre cellulaire entre éléments oxydants et réducteurs est communément connu sous le nom d'équilibre « redox ».

Or, dans de nombreuses conditions (malnutrition, maladies inflammatoires, tabagisme, stress, etc.), cet équilibre ou homéostasie redox est perturbé de manière chronique. La balance entre EOR et antioxydants est déséquilibrée en faveur des oxydants. C'est ce que la littérature définit comme le stress oxydant [11].

II. Stress oxydant

Le stress oxydant c'est lorsque l'organisme est incapable de se défendre contre l'agression des EOR, en raison de l'existence d'un déséquilibre entre la production de ces substances (EOR) et la capacité de défense des antioxydants [10, 11]. Lors d'un stress oxydant, les EOR non « détoxiquées » par le système antioxydant attaquent et endommagent par oxydation les macromolécules directement à leur contact, contenues dans les cellules, notamment les lipides, les protéines, l'ADN.

II.1. Détérioration des lipides

L'attaque des radicaux libres au sein des doubles liaisons lipidiques membranaires induit des processus de peroxydations en cascade (figure 3). Ceci aboutit à la désorganisation

complète de la membrane et altérant de ce fait ses fonctions d'échange, de barrière et d'information [18].

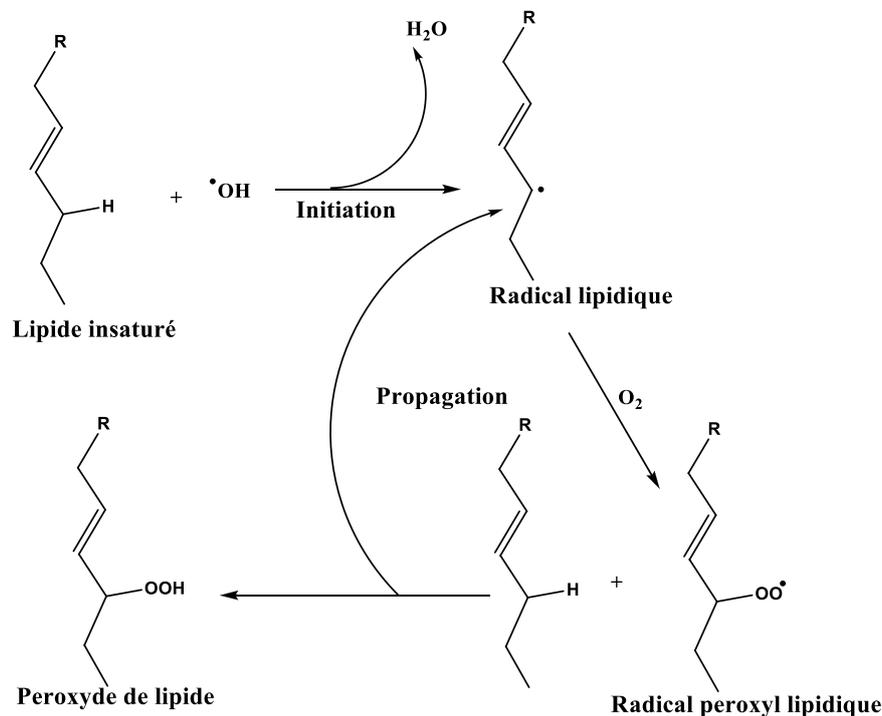


Figure 3 : Mécanisme de la peroxydation lipidique

II.2. Détérioration des protéines

La toxicité des EOR s'exerce également sur les protéines. En effet, elles sont capables de réagir avec les différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. Les plus sensibles à leur action sont les acides aminés aromatiques comme le tryptophane, la tyrosine, l'histidine, sur lesquels le radical $\text{H}\cdot$ s'additionne, modifiant la conformation de la protéine [10, 19]. Sur les acides aminés contenant un atome de soufre tels que la cystéine et la méthionine, l'oxydation par les radicaux libres conduit à la formation de ponts de disulfures, donc l'agrégation de plusieurs molécules de protéines. Les EOR sont aussi capables de couper les liaisons peptidiques et de former ainsi des fragments de protéines. Par ailleurs, le radical $\text{H}\cdot$, mais aussi l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$, s'attaquent également aux protéines des tissus de soutien, comme le collagène du tissu conjonctif. L'oxydation de ces acides aminés conduit à la modification de la conformation spatiale et à une altération de la fonction protéique [10, 19]. Les protéines oxydées perdent leur capacité à se fixer correctement sur un récepteur ou à fixer spécifiquement un ligand, altérant la signalisation cellulaire.

II.3. Détérioration de l'ADN

L'ADN est aussi une cible majeure des EOR, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial. En effet, les radicaux $O_2^{\bullet -}$ et OH^{\bullet} provoquent des lésions de l'ADN [10, 15]. Ceux-ci peuvent en effet interagir avec les désoxyriboses de l'ADN mais aussi avec ses bases puriques et pyrimidiques. Ces altérations structurales lorsqu'elles ne sont « réparées » entraînent à long terme des altérations géniques : cassures chromosomiques, mutations, délétion, amplification. Ceci est à l'origine d'un dysfonctionnement au niveau du métabolisme protéique [10, 20].

De par leur action sur les principaux constituants moléculaire de la cellule, les EOR induisent des différents signaux susceptibles d'activer les systèmes de protéolyse et mort cellulaire. Les modifications génomiques, métaboliques et fonctionnelles induites par un stress oxydant ont été impliquées dans le développement de différentes pathologies. Ainsi, l'oxydation des lipides et de l'ADN est un facteur primordial dans l'augmentation des maladies cardiovasculaires [10, 21] et celle des cancers [10, 22, 23]. Le stress oxydant est impliqué dans des affections aussi diverses que l'arthrite, la maladie de Parkinson [10, 24] et la maladie d'Alzheimer [10, 25]. Enfin, le stress oxydant est également un mécanisme majeur dans le vieillissement physiologique, selon la théorie radicalaire [10].

L'apport nutritionnel en antioxydants à partir des plantes alimentaires qui en sont riches, ou à doses plus fortes à partir de médicaments, ont connu dès lors un véritable engouement scientifique.

III. Antioxydants

III.1. Définition

Ces dernières décennies, l'intérêt porté aux antioxydants a considérablement augmenté en raison de leurs propriétés biologiques. Biologiquement, les antioxydants sont définis comme étant « des substances synthétiques ou naturelles qui peuvent empêcher ou retarder la détérioration d'un produit par l'action de l'oxygène de l'air » [5, 6]. En biochimie et en médecine, les antioxydants sont « des enzymes ou autres substances organiques, telles que la vitamine E ou le β -carotène, capables de contrecarrer les effets préjudiciables de l'oxydation dans les tissus animaux » [5, 6]. La définition biologique est appropriée et s'adapte mieux au concept des antioxydants connus du grand public car, les gens se rendent plus compte de leur santé que la prévention de l'autoxydation du caoutchouc. Selon la discipline scientifique, les objectifs de la protection sont sensiblement différents. En effet, dans l'industrie chimique, les antioxydants se rapportent souvent aux composés qui retardent l'autoxydation d'un produit

chimique tel que le caoutchouc et les plastiques. Dans les sciences alimentaires, les antioxydants ont une plus large portée, du fait qu'ils incluent les composants qui empêchent les graisses des aliments de rancir aussi bien que les antioxydants diététiques « une substance alimentaire qui diminue de manière significative les effets nuisibles des espèces réactives, telles que les espèces réactives de l'oxygène et d'azote, sur la fonction physiologique normale chez l'homme » [26], comme défini en Médecine. Pour Gutteridge et Halliwell, un antioxydant se définit comme une substance qui, quand elle est présente en faible concentration par rapport à celle des substrats oxydables, retarde significativement ou prévient l'oxydation de ces substrats [8, 27]. Les substrats oxydables peuvent être des lipides, des protéines, des glucides et des acides nucléiques. Au regard de ces différentes facettes, la dénomination « *antioxydant* » peut inclure divers composés endogènes et exogènes.

III.2. Familles d'antioxydants

On distingue deux grands groupes d'antioxydants que sont les antioxydants endogènes et les antioxydants exogènes.

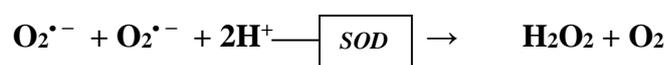
III.2.1. Antioxydants endogènes

III.2.1.1. Systèmes enzymatiques

Face à l'agression des radicaux libres, l'organisme humain dispose des systèmes de protection enzymatique qui produisent des enzymes susceptibles d'atténuer ou d'inhiber les effets délétères des espèces réactives oxygénées. L'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 sont les principales cibles de ces enzymes. Par leur action, les enzymes éliminent ces espèces par une réaction enzymatique, les transformant ainsi en eau et en oxygène moléculaire.

❖ Les superoxydes dismutases (SOD)

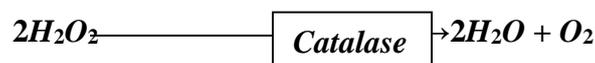
Les superoxydes dismutases (SOD) sont des métalloprotéines qui possèdent une activité enzymatique antioxydante. Dans l'organisme, elles sont présentes dans le cytoplasme sous une forme associée au cuivre et au zinc (CuZn-SOD) et dans les mitochondries sous une forme associée au manganèse (Mn-SOD). Les bactéries comme *Escherichia coli* possèdent quant à elles une SOD associée au fer (Fe-SOD). Les SOD sont capables d'éliminer l'anion superoxyde par une réaction de dismutation en transformant les radicaux superoxydes en peroxydes d'hydrogène et en oxygène moléculaire (figure 4) [28, 29].



La transformation du radical superoxyde en H_2O_2 peut s'effectuer spontanément mais l'enzyme accélère environ 10 000 fois cette réaction. Elle a un effet protecteur contre les réactions radicalaires dans la mesure où la catalase et la glutathion peroxydase sont suffisantes pour détruire le H_2O_2 formé. Dans le cas contraire l'excès de H_2O_2 , surtout en présence de métaux, conduit à la formation des radicaux HO^\bullet , extrêmement toxiques (réaction de Fenton).

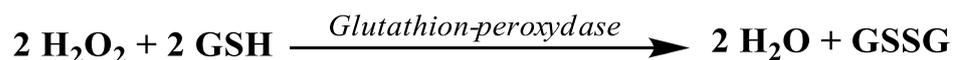
❖ La catalase

Les catalases sont présentes dans un grand nombre de tissus mais sont particulièrement abondantes dans le foie et les globules rouges [54, 55]. Elles catabolisent les peroxydes d'hydrogène en molécules d'eau pour prévenir la formation de radicaux hydroxyles.



❖ Les glutathion-peroxydases

Les glutathion-peroxydases sont des protéines qui ont en commun une structure tétramérique. Chaque tétramère possède un atome de sélénium dans son site actif [29, 30]. Elles sont présentes à la fois dans le cytosol et dans les mitochondries de la plupart des tissus où elles réalisent la quasi-totalité de l'élimination de H_2O_2 et des hydroperoxydes $ROOH$ (figure 4).



Le maintien de l'activité de la glutathion-peroxydase nécessite la régénération du glutathion réduit GSH, assurée par la glutathion réductase à partir du NADPH (figure 4), lui-même régénéré par la voie des pentoses.

Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans le système enzymatique antioxydant peut être résumé par le schéma suivant :

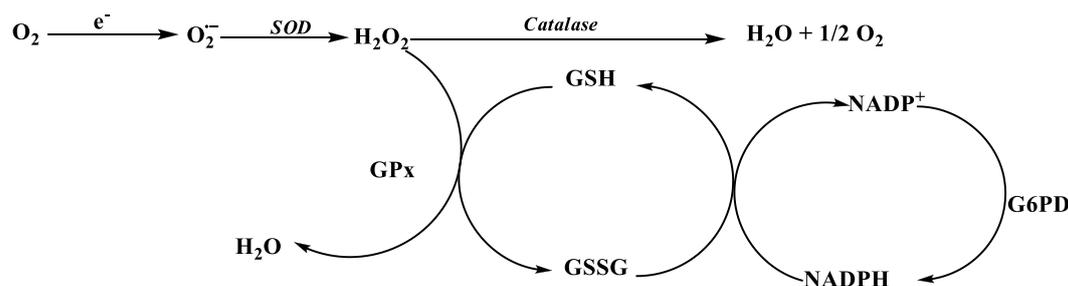
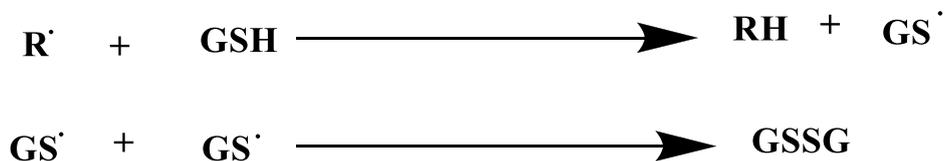


Figure 4 : Systèmes enzymatiques antioxydants

III.2.1.2. Systèmes non enzymatiques

Les systèmes endogènes non enzymatiques comprennent entre autres l'acide urique, la bilirubine, la mélanine, la mélatonine, l'acide lipoïque, le glutathion. Le glutathion réduit est l'un des plus importants composés antioxydants endogènes synthétisés par les cellules.



Les radicaux peroxydes et l'oxygène singulet sont piégés par la bilirubine protégeant ainsi l'albumine et les acides gras liés à l'albumine des attaques radicalaires. À ce groupe on peut ajouter les protéines chélatrices de métaux de transition comme l'haptoglobine, la ferritine, l'albumine et la céruléoplasmine qui agissent en diminuant la disponibilité d'agents pro-oxydants comme les ions $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ou $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^{+}$. Cela permet de prévenir la production des radicaux libres (par la réaction de Fenton) [31].

III.2.2. Antioxydants exogènes

Outre les substances antioxydantes propres à l'organisme, les médicaments et l'alimentation peuvent également être d'autres sources d'antioxydants. La majorité de ce type d'antioxydants est d'origine végétale. En effet, face aux différentes attaques, la plante synthétise diverses substances pour se protéger : les métabolites secondaires [3, 4, 32].

III.2.2.1. Les antioxydants pharmaceutiques

En ce qui concerne les antioxydants pharmaceutiques, de nouveaux composés aux propriétés antioxydantes sont en cours de développement. En effet, de nombreux agents thérapeutiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens, les antihyperlipoprotéiniques, les β -bloquants et les antihypertensifs ont été évalués pour leur propriétés antioxydantes. Citons deux exemples :

- ✓ **Le probucol (Lurselle)** est un médicament qui en plus de ses effets reconnus dans la baisse du taux sanguin en cholestérol, prévient l'athérogenèse en agissant comme antioxydant et en supprimant l'oxydation des lipoprotéines de faible densité (LDL).
- ✓ **La N-acétylcystéine** est une molécule intéressante qui pénètre les cellules et agit de manière très efficace dans la régénération du glutathion. Des recherches ont également démontré que la N – acétylcystéine peut être utile dans le traitement des maladies pulmonaires dues à des espèces réactives de l'oxygène [33].

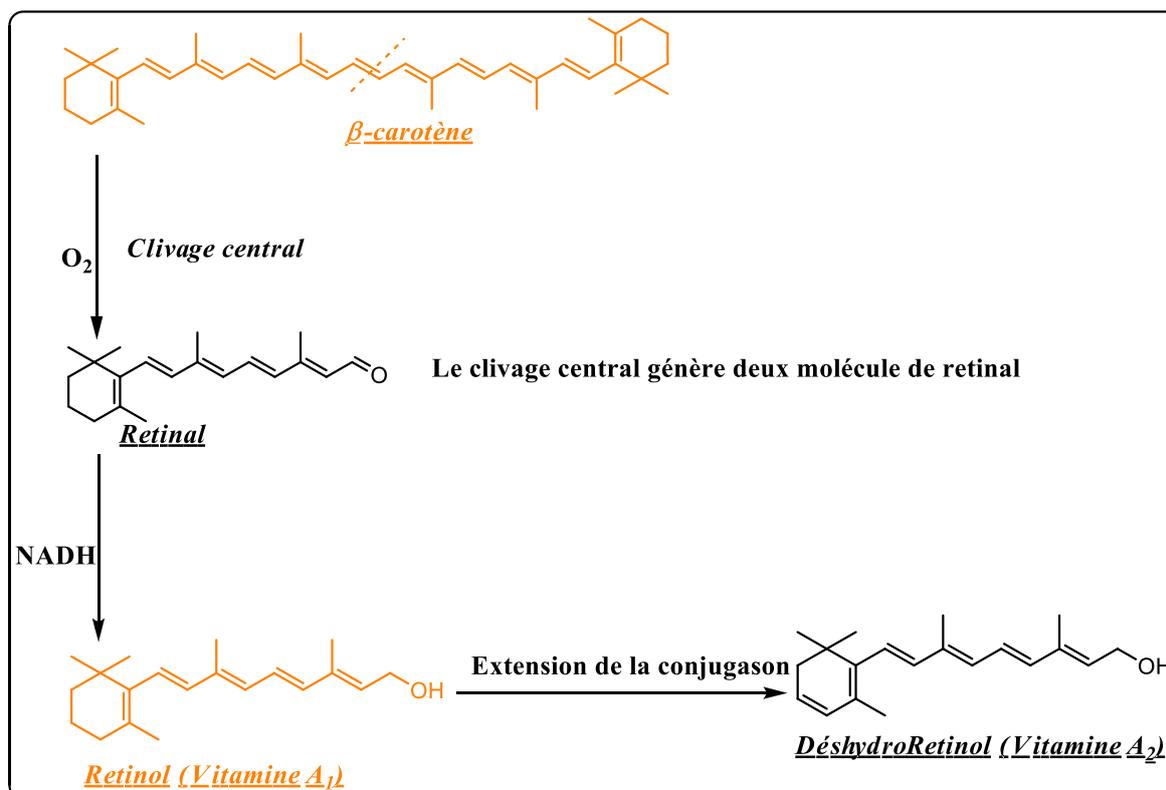
III.2.2.1. Les antioxydants végétaux apportés par l'alimentation

Les aliments renferment une vaste gamme de micronutriments pouvant jouer un rôle important dans la prévention des maladies liées au stress oxydant. En effet, l'une des propriétés communes de ces microconstituants des plantes est leur pouvoir antioxydant. On peut citer entre autre : les caroténoïdes, les polyphénols, les vitamines, les oligo-éléments, etc.

III.2.2.1.1. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des constituants membranaires des chloroplastes et forment un groupe de pigments liposolubles. Ils contribuent à la coloration jaune, orange ou rouge des fruits et légumes. On les retrouve souvent dans les plantes alimentaires.

Ils sont d'abord connus pour la capacité de certains d'entre eux à être convertis en vitamine A (Figure 5), une vitamine essentielle, indispensable à la vision, à la préservation des tissus épithéliaux ou au système immunitaire [34-36]. Près de 10 % des caroténoïdes et, parmi eux, l' α -carotène, le β -carotène et la cryptoxanthine sont des précurseurs de la vitamine A. La lutéine et la zéaxanthine quant à elles interviennent dans la prévention des maladies liées à la dégénérescence maculaire [37].



Les caroténoïdes sont également de puissants antioxydants capables de protéger nos cellules contre les attaques des radicaux libres et d'exercer une action préventive contre un

certain nombre de maladies dégénératives. Photoprotecteurs, les caroténoïdes protègent les cellules exposées à la lumière des dommages oxydatifs. Enfin, certaines études montrent que les caroténoïdes contribuent au renforcement des communications intercellulaires, ce qui pourrait expliquer qu'ils puissent ralentir le développement de tumeurs cancéreuses [34-37].

III.2.2.1.2. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques constituent une importante famille d'antioxydants dans les plantes, les fruits et les légumes. L'alimentation en fournit environ un gramme par jour. L'industrie agro-alimentaire utilise également ces composés notamment les polyphénols comme additif [3-5, 32]. Ces micronutriments ont été d'antan qualifiés de métabolites secondaires car pensait-on qu'ils n'étaient que des résidus du métabolisme des plantes. Ce sont notamment des arômes, des tanins astringents, voire des composés sans couleur, sans odeur et sans saveur. On sait aujourd'hui qu'ils ne sont pas si secondaires que cela et qu'ils contribuent à protéger la plante contre les pathogènes, les champignons de pourriture, du rayonnement UV, etc. [1, 4, 5, 32, 38, 39].

Ces composés de structures chimiques extrêmement variées, sont souvent propres à une espèce ou à un groupe d'espèces et participent à l'identité chimique de la plante. Ces micronutriments ont parfois des activités biologiques, pharmacologiques ou nutritionnelles. Les polyphénols en particulier, possèdent comme la vitamine C, la vitamine E ou les caroténoïdes, des propriétés antioxydantes et sont capables de piéger les radicaux libres générés en permanence par notre organisme ou formés en réponse à des agressions de notre environnement (cigarette, polluants, infections, etc.) [1, 4, 5, 32, 38, 39]. Ingérés avec nos aliments, ces composés renforcent nos défenses naturelles contre le stress oxydant et préviendraient ainsi diverses pathologies chroniques comme les cancers et les maladies cardio-vasculaires [1, 4, 5, 32, 38, 39].

La nature et les teneurs en polyphénols dans les divers aliments sont très variables [40]. Ils sont classés en fonction de leur structure et de leur squelette carboné : ce sont surtout les acides phénoliques, les flavonoïdes et dans une moindre mesure les stilbènes et les lignanes.

○ Les flavonoïdes

Cette classe regroupe plusieurs milliers de molécules réparties en plus de 10 sous-classes et qui ont toutes en commun une structure de type 2-phénylbenzopyrane (figure 6).

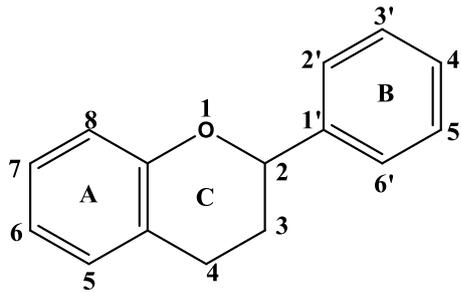


Figure 6 : Squelette de base des flavonoïdes

La structure de l'hétérocycle central et son degré d'oxydation, permettent de distinguer les différentes sous-classes de flavonoïdes :

- **Les flavanones**

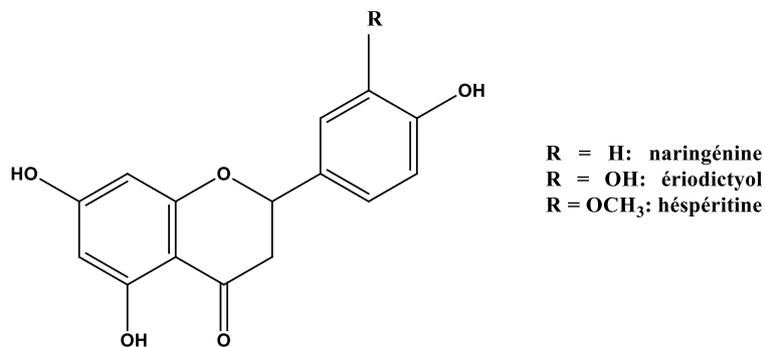


Figure 7 : Structures chimiques des flavanones

- **Flavonols**

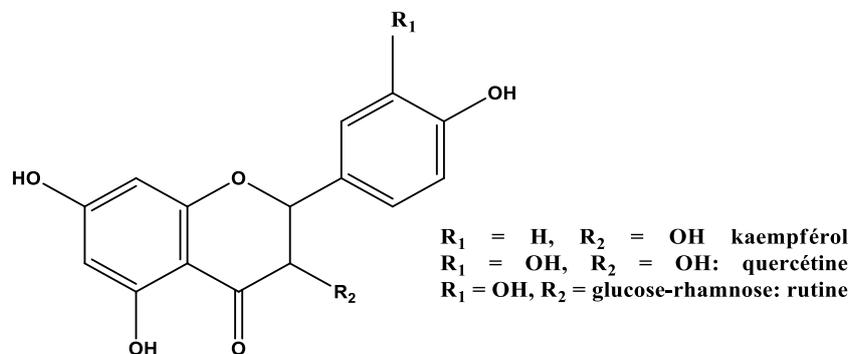


Figure 8 : Structures chimiques des flavonols

- **Flavanols**

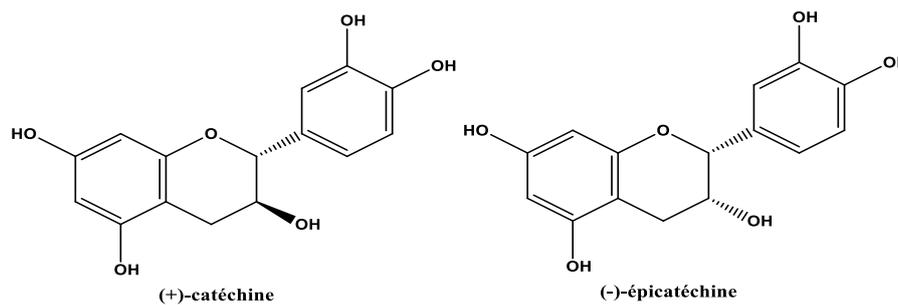


Figure 9 : Structures chimiques de flavan-3-ols

- **Les anthocyanes**

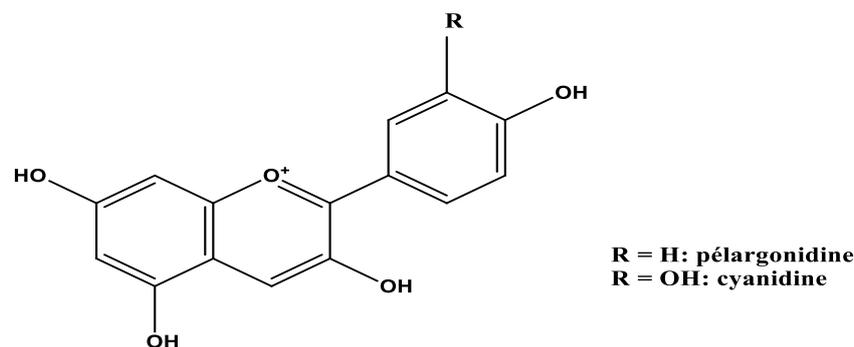


Figure 10 : Structures chimiques de deux anthocyanes

Le degré d'hydroxylation des différents cycles a un impact sur les spectres d'absorption des molécules. Ainsi, certains composés comme les anthocyanes, jouent un rôle de pigment au sein des organismes végétaux [3-5, 8, 32].

Les flavonoïdes sont généralement liés à des sucres par des liaisons glycosidiques. Cette glycosylation peut avoir de multiples conséquences : modification de la couleur des pigments, augmentation de l'hydrosolubilité et modification des propriétés biologiques des molécules [3-5, 8, 32].

- **Les tannins**

Les tannins sont des composés qui résultent de la condensation de certaines formes simples évoquées précédemment. Ils sont capables de se lier à des protéines en solution et de les précipiter. Il existe deux grands groupes de tannins :

- **les tannins hydrolysables** caractérisés par le fait qu'ils se dégradent par hydrolyse chimique ou enzymatique. Une partie non phénolique est alors libérée ainsi qu'une partie phénolique constituée d'acide gallique ou d'acide ellagique (dimère de l'acide gallique).
- **les tannins condensés** (ou proanthocyanidines) qui résultent de la condensation d'oligomères ou de polymères de flavan-3-ols dérivés de la (+)-catéchine ou de ses

nombreux isomères. Ils sont résistants à l'hydrolyse ; seules les attaques chimiques fortes sont capables de les dégrader.

Les tannins sont utilisés depuis l'Antiquité pour le tannage des peaux d'animaux. D'un point de vue alimentaire, ils sont responsables de l'astringence de nombreux fruits, légumes et de produits qui en sont dérivés. Cette caractéristique est due à leur propriété de complexation avec les protéines salivaires.

○ Les acides phénoliques

Le terme acide phénolique peut s'appliquer à tout composé organique possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique [40, 41]. Cependant, ce terme en phytochimie est réservé aux dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique [41].

• Les acides hydroxybenzoïques

Les acides hydroxybenzoïques dérivent tous de l'acide benzoïque. Ils sont majoritairement présents sous forme d'esters ou de glycosides dans les plantes; les formes libres sont parfois retrouvées mais dans de faibles proportions. Les principaux acides hydroxybenzoïques retrouvés dans les végétaux sont les acides *p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique et syringique (figure 11).

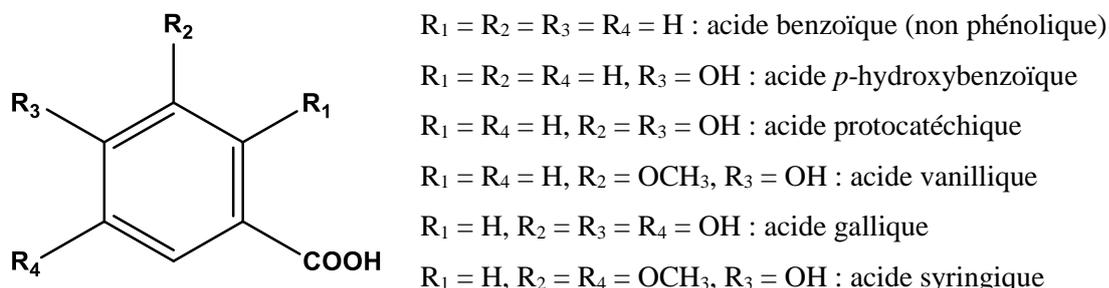


Figure 11 : Structures chimiques d'acides hydroxybenzoïques

• Les acides hydroxycinnamiques

Les acides hydroxycinnamiques dérivent de l'acide cinnamique. Ils présentent une double liaison sur la chaîne latérale; il existe ainsi deux séries d'isomères (*cis* ou *Z* et *trans* ou *E*) dont les propriétés biologiques peuvent être différentes. Cependant, les formes *trans* sont largement majoritaires dans la nature.

Tout comme les acides hydroxybenzoïques, les acides hydroxycinnamiques sont rarement présents à l'état libre et généralement combinés à d'autres molécules organiques formant des esters, des phénolamides ou des glucosides. Parmi ces composés, l'acide

caféique, généralement présent sous forme d'esters a une répartition quasi universelle chez les végétaux.

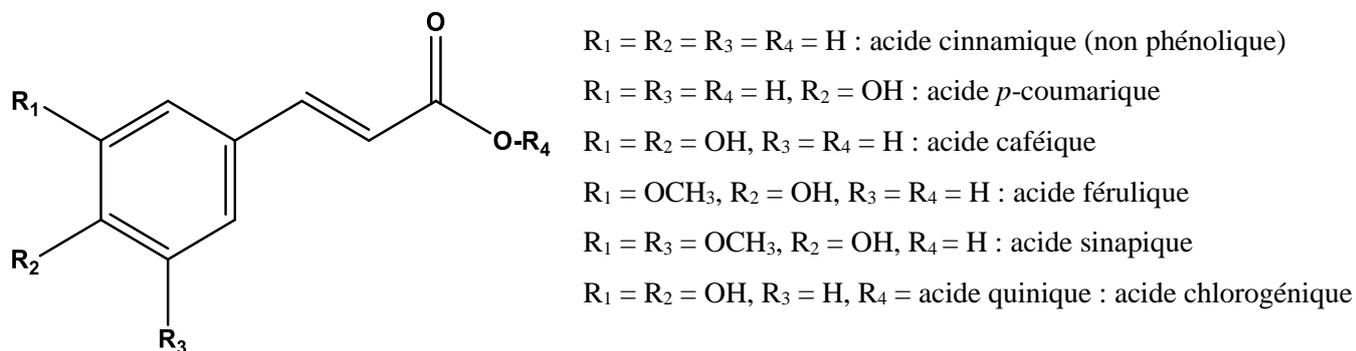
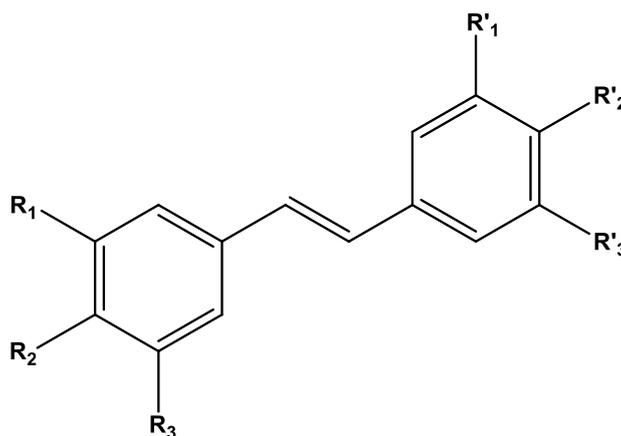


Figure 12 : Structures chimiques d'acides hydroxycinnamiques

○ Les stilbènes

Les stilbènes dérivent des acides hydroxycinnamiques ; ils regroupent des dérivés hydroxy- et méthoxy- du stilbène simple, ainsi que leurs formes hétérosidiques et polymériques.



$R_1 = R_3 = R'_2 = OH, R_2 = R'_1 = R'_3 = H$: resvératrol

$R_1 = R_3 = OCH_3, R_2 = R'_1 = R'_3 = H, R'_2 = OH$: ptérostilbène

$R_1 = \text{glucose}, R_2 = R'_3 = OH, R_2 = R'_1 = OH, R'_2 = OCH_3$: rhapontine

$R_1 = \text{glucose}, R_2 = R'_1 = R'_3 = H, R_3 = R'_2 = OH$: picéide

Figure 13 : Structures chimiques des stilbènes

○ Les lignanes

Ce sont des composés phénoliques formés de deux unités monolignols (figure 14). Ces mêmes unités de base permettent aux végétaux de synthétiser un long polymère appelé la lignine. Elle est présente dans les parois des vaisseaux conducteurs. Les lignanes se diffèrent

par le type de liaison entre les deux unités et par les modifications qui interviennent après la dimérisation [41, 42]. Ils sont hépato-protecteurs, antiviraux, antioxydants (inhiberaient la peroxydation des lipides) [41, 43]. Les lignanes les plus étudiés du point de vue leur activité antiradicalaire sont les dérivés bifuranyles des graines de sésame (*Sesamum indicum* DC, pedaliaceae). Les lignanes diarylfuranofuraniques tels que le sésaminol (figure 14), ont démontré des propriétés antiradicalaires expliquant ainsi la stabilité de l'huile de sésame [41, 44].

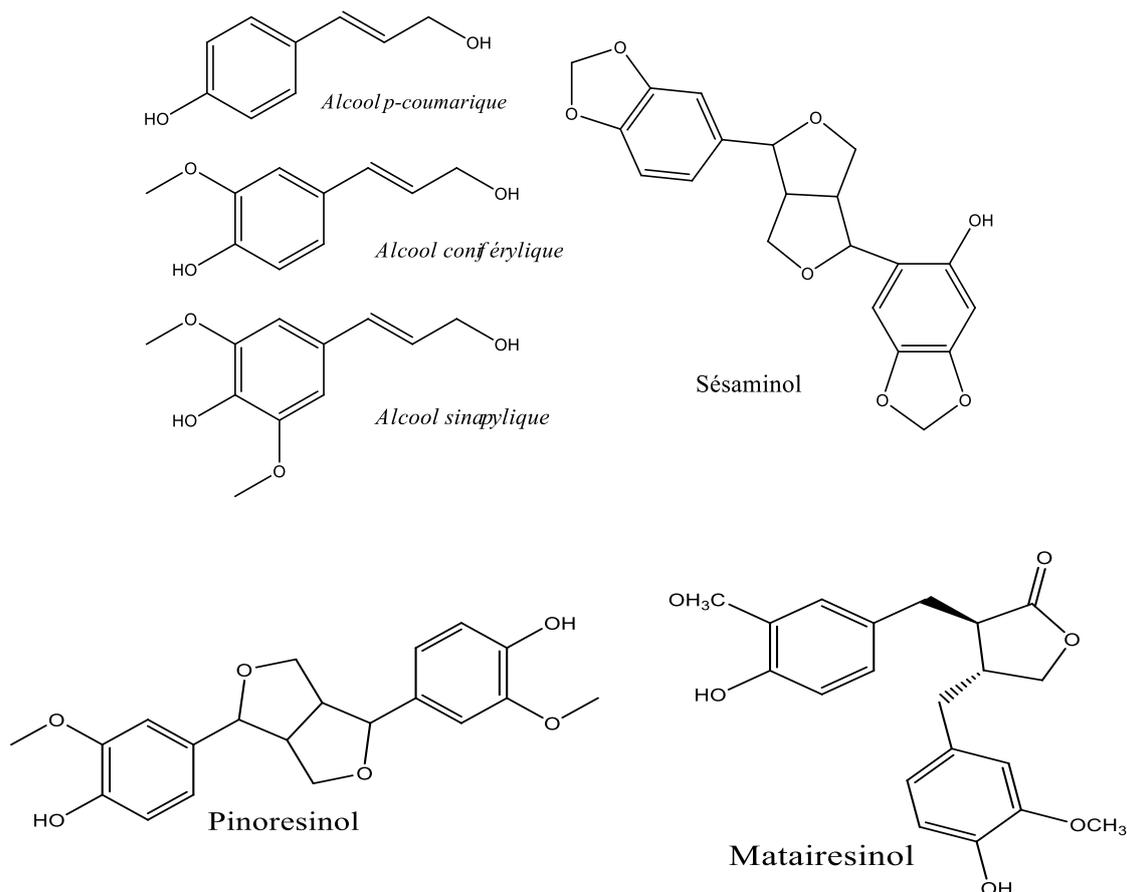


Figure 14 : Structures de quelques lignanes

○ Les vitamines

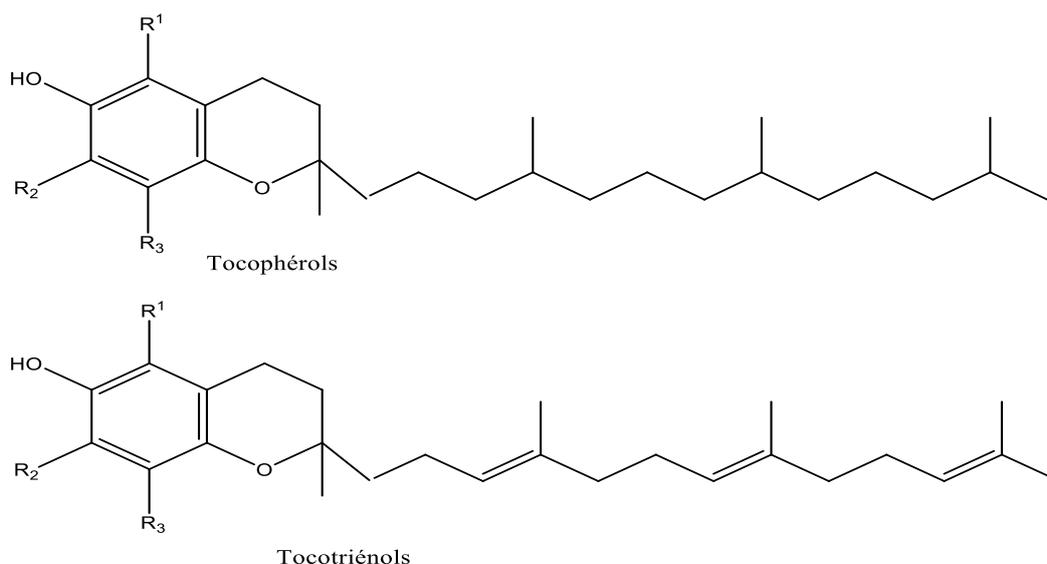
Les vitamines sont des substances organiques, sans valeur énergétique propre, qui sont indispensables à l'organisme et que l'homme ne peut synthétiser en quantité suffisante. Elles doivent être apportées par l'alimentation. Plus d'une dizaine répondent à cette définition. Certaines d'entre elles telles que les vitamines E et C, sont pourvues de propriétés biologiques [6].

- **La vitamine E et ses dérivés**

La vitamine E est le terme générique utilisé habituellement pour désigner les différents tocophérols et tocotriénols (4 tocophérols et 4 tocotriénols). Cette vitamine liposoluble est reconnue pour ses propriétés antioxydantes et assure la stabilité des structures cellulaires.

La molécule de tocol constitue la structure de base des tocophérols. Elle est constituée d'un noyau hydroxychromane et d'une chaîne phytyle entièrement saturée. Les différentes formes de tocophérols (α , β , γ et δ) se distinguent entre eux par le nombre et la situation des groupements méthyles fixés sur le noyau chromanol. Parmi ces composés, le plus fréquemment retrouvé dans la nature est l' α -tocophérol, qui présente également l'activité vitaminique la plus élevée.

Les tocotriénols diffèrent des tocophérols par la présence de trois doubles liaisons sur la chaîne latérale. Naturellement présents dans la nature, les α - et β -tocotriénols possèdent une activité vitaminique alors que les formes γ et δ sont inactives [8].



R ₁	R ₂	R ₃	Dénomination	
			Dérivés du tocophérol	Dérivés du tocotriénol
CH ₃	CH ₃	CH ₃	α -tocophérol (5, 7,8-triméthyltolcol)	α -tocotriénol (5, 7,8-triméthyltocotriénol)
CH ₃	H	CH ₃	β -tocophérol (5,8-diméthyltolcol)	β -tocotriénol (5,8-diméthyltocotriénol)
H	CH ₃	CH ₃	γ -tocophérol (7,8-diméthyltolcol)	γ -tocotriénol (7,8-diméthyltocotriénol)
H	H	CH ₃	δ -tocophérol (8-méthyltolcol)	δ -tocophérol (8-méthyltolcol)

Figure 15 : Structures des tocophérols et des tocotriénols

- **La vitamine C**

La vitamine C est une vitamine hydrosoluble au fort pouvoir réducteur mais très sensible à la lumière et à la chaleur. Au sein de l'organisme, c'est un cofacteur enzymatique impliqué dans un certain nombre de réactions physiologiques. Elle est impliquée dans la synthèse du collagène et des globules rouges et joue un rôle de promoteur de l'absorption du fer.

D'un point de vue chimique, la vitamine C regroupe l'acide L-ascorbique et sa base conjuguée : l'ion ascorbate (figure 16). Dans les tissus, on retrouve un équilibre réversible entre ces deux formes.

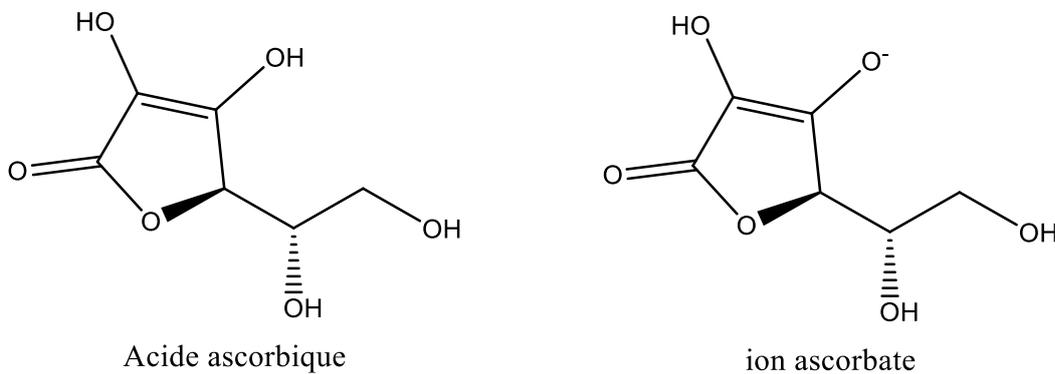


Figure 16 : Structures chimiques des formes acide et basique de la vitamine C

L'acide ascorbique est stable à l'état solide, à l'abri de la lumière et de l'humidité. En revanche, en solution aqueuse, il s'altère très rapidement au contact de l'oxygène. La chaleur, la présence d'ions métalliques ou un milieu basique accélèrent significativement ce phénomène d'oxydation [8].

- **Les oligo-éléments**

Ils sont appelés aliments protecteurs ; ces micronutriments sont présents en très petite quantité dans l'organisme (trace). Ils sont indispensables au bon fonctionnement de celui-ci. On peut citer entre autre le sélénium, le cuivre, le zinc, etc.

- **Le sélénium** est un oligo-élément largement distribué à des concentrations relativement faible dans la chaîne alimentaire humaine. C'est un nutriment essentiel qui joue un rôle majeur dans le système de défense antioxydant.
- **Le cuivre** participe au maintien des systèmes de défense antioxydants dans l'organisme.

- **Le zinc** est important pour les mécanismes de défense de l'organisme contre les maladies inflammatoires. Un régime équilibré est le meilleur moyen de garantir un apport de zinc.

III.3. Méthodes d'évaluation des antioxydants

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante des aliments et des échantillons biologiques par piégeage des radicaux libres. En effet, en fonction de la réaction chimique impliquée, la majorité des dosages de l'activité antioxydante peuvent être globalement divisés en deux catégories : les dosages basés sur une réaction de transfert d'atome d'hydrogène (HAT : *Hydrogen Atom Transfer*) et les dosages basés sur réaction de transfert d'électron (SET : *Single Electron Transfer*).

Les méthodes basées sur un mécanisme par HAT mesurent la capacité classique d'un antioxydant (AH) à piéger les radicaux libres (X^\bullet) en leur cédant un atome d'hydrogène.



Celles basées sur un mécanisme par SET mesurent l'habilité d'un antioxydant à réduire les radicaux libres en cédant un électron :

Substrat (oxydant) + e^- (électron de l'antioxydant) \longrightarrow substrat réduit + antioxydant oxydé. Selon ce principe, le substrat lui-même est un oxydant qui capte un électron provenant de l'antioxydant. En perdant un électron au profit du substrat, l'antioxydant devient par la suite un radical, mais beaucoup plus stable.

III.3.1. Dosages basés sur un mécanisme par HAT

Dans la littérature, plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits et des aliments. Nombreuses sont celles qui sont basées sur un mécanisme par transfert d'atome d'hydrogène (HAT). Ainsi, beaucoup de scientifiques pensent que ce sont les réactions les plus appropriées par lesquelles les antioxydants agissent. En effet, l'antioxydant réagit avec le radical libre et préserve le substrat de l'attaque des radicaux libres. Ce substrat sera à l'abri des attaques nuisibles des radicaux libres aussi longtemps possible que l'antioxydant sera disponible. Les réactions HAT dépendent à la fois du solvant et du pH et sont généralement plus rapides, complètes en quelques minutes voire quelques secondes. Les méthodes de dosage HAT présentent des limites dans leur application, en occurrence la présence des agents réducteurs comme les métaux dans le milieu réactionnel

qui peuvent entraîner une surestimation de la réactivité des antioxydants dosés. Parmi ces méthodes on peut citer entre autre les méthodes TRAP (*paramètre total de piégeage radicalaire*), ORAC (*Capacité d’Absorption du radical d’oxygène*), et le dosage de décoloration de la crocine. Ces dosages sont constitués par : (a) un initiateur radicalaire d’azote, normalement le dihydrochlorure [2,2’-azobis (2-amidinopropane)] AAPH ; (b) un substrat moléculaire (UV ou fluorescence) pour suivre la réaction ; (c) l’antioxydant ; et (d) les paramètres cinétiques de la réaction collectés pour la quantification de la capacité antioxydante.

III.3.1.1. Dosage ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Le dosage ORAC est basé sur les premiers travaux de Ghiselli et *coll.* [46] et Glazer [47] et développé plus tard par Cao et *coll.* [48]. La méthode ORAC mesure l’inhibition antioxydante des oxydations provoquées par le radical peroxy et met ainsi en évidence l’activité de l’antioxydant qui, par transfert d’un atome d’hydrogène, interrompt la chaîne radicalaire [49].

Dans ce dosage, le radical peroxy réagit avec un substrat fluorescent pour former un produit non fluorescent, qui peut être dosé facilement par fluorescence. La capacité antioxydante est déterminée par la diminution du taux et la quantité de produit formé jusqu’à la fin de la réaction :

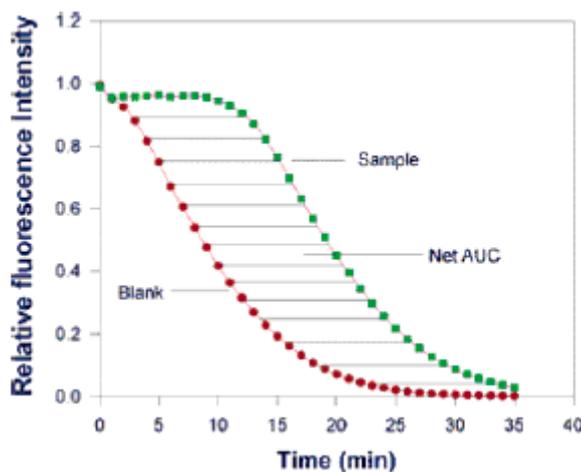
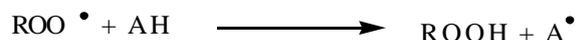


Figure 17 : Capacité antioxydante d’un échantillon en AUCnet : Par les Laboratoires Brunswick (2003)

En clair, lors des premières études, Cao et *coll.* [48] ont mesuré la destruction d’une protéine végétale [La β -phycoerythrin (β -PE)], qui est fluorescente lorsqu’elle est soumise à un rayonnement spécifique. Sous l’action des radicaux libres présents dans le milieu

réactionnel, la protéine est détruite et perd sa fluorescence, tandis qu'en présence d'un capteur de radicaux libres (antioxydant), la fluorescence persiste.



Les substrats fluorescents qui sont actuellement préférés : la fluorescéine (FL ; 3', 6'-*dihydroxyspiro [isobenzofuran-1 [3H], 9' [9H] - xanthen] - 3-one*) [50, 51] ou dichlorofluorescéine (H₂DCF-dA ; 2', 7' -dichlorodihydrofluorescein diacétate) [48] sont plus stables et moins réactives. Les produits oxydés de la FL induits par les radicaux peroxy ont été identifiés par LC-MS, et le mécanisme de la réaction est identifié comme un mécanisme classique HAT [49].

La réaction du substrat avec les radicaux peroxy est suivie par la perte de la fluorescence au cours du temps. Le calcul de l'efficacité d'un antioxydant se fait à partir de l'aire AUC (Areas Under the Curve) entre les courbes de décroissance de la fluorescence en présence et en l'absence d'antioxydant (AOX), comme le montre la figure 18 (AUC = [AUC_{AOX} - AUC_{no AOX}]).

Les valeurs ORAC sont habituellement exprimées en Equivalent de Trolox (*l'acide 6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tétraméthylchromane-2-carboxylique*). Une courbe d'étalonnage (figure 18) est établie en utilisant les AUC obtenues à partir de différentes concentrations de Trolox (standard), et les Equivalents de Trolox (ET) des échantillons sont calculés à partir des relations linéaire ou quadratique suivantes : (Y = a + bX, linéaire ; y = a + bX + cX², quadratique) entre la concentration en Trolox (Y en μM) et le AUC de la fluoresceine (X). Les résultats sont exprimés en μM d'Equivalent de Trolox par gramme ou par litre de l'échantillon (μM d'ET/g ou μM d'ET/L) [49, 52].

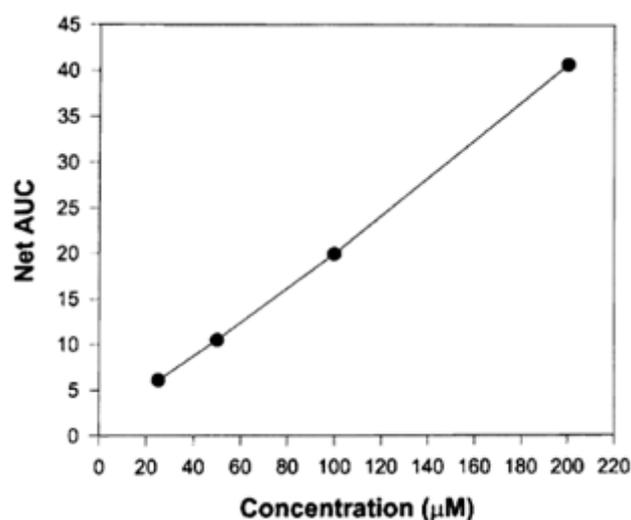


Figure 18 : Exemple d'une courbe d'étalonnage (linéaire) obtenue à partir des AUC en fonction de la concentration en α -tocophérol (en μM).

Le dosage de l'ORAC fournit une source contrôlable de radicaux peroxy qui modélisent les réactions des antioxydants avec les lipides dans les aliments et dans les systèmes physiologiques, et peut être adapté pour déterminer les antioxydants hydrophiles et hydrophobes en changeant la source des radicaux et le solvant [52-55].

III.3.1.2. Dosage de la décoloration de la crocine

La crocine est un dérivé naturel de caroténoïde. Sous l'action des radicaux, elle se décolore par une réaction d'oxydation. Cette décoloration peut être inhibée ou empêchée par des antioxydants classiques donneurs d'atomes d'hydrogène étouffant les radicaux.



Cette méthode permet de mesurer la capacité d'inhibition des antioxydants protégeant la crocine de la décoloration par le générateur radicalaire : le dihydrochlorure (2,2'-azobis (2-amidinopropane) (AAPH) [56]. Ursini et *coll.* plus tard appliquèrent cette méthode pour mesurer la capacité antioxydante du plasma [57]. Expérimentalement, la réaction porte sur la préparation préalable de 2,0 mL d'une solution tampon phosphate (0,1 M, pH 7,0) contenant 10 μM de crocine et une certaine quantité de l'antioxydant. Après, l'initiateur radicalaire AAPH (50 μL , 0,5 M) est ajouté pour amorcer la réaction. L'avancement de la réaction est suivi par un spectromètre UV-vis à une longueur d'onde de 443 nm, le maximum d'absorption de la crocine ($\epsilon = 1,33 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Le taux de décoloration devient linéaire une minute

après l'addition d'AAPH et on suit spectrométriquement la réaction pendant 10 mn. Pour éliminer les éventuelles interférences de l'échantillon lui-même, les blancs sans la crocine sont aussi suivis à la même longueur d'onde. Les taux de décoloration de la crocine initiale sont obtenus à partir des courbes cinétiques en présence (V) ou en l'absence (V_0) des antioxydants. Le rapport entre V et V_0 obéit l'équation suivante :

$$\frac{V_0}{V} = \frac{K_a}{K_c} \times \frac{[AH]}{[C]} \quad [64]$$

où k_a est la constante du taux de la réaction des antioxydants avec ROO^\bullet , k_c la constante du taux de la réaction entre ROO^\bullet et la crocine, $[C]$ est la concentration de la crocine, et $[AH]$ est la concentration de l'antioxydant. Un graphe de $[AH]/[C]$ en fonction de V_0/V donnerait une droite linéaire de pente k_a/k_c , indiquant la capacité relative de piégeage du radical peroxy. Pour un antioxydant donné, la valeur de k_a/k_c est divisée par la valeur de k_a/k_c de l'échantillon. Pour le plasma, une linéarité de la courbe est obtenue avec une pente de 0,79. La capacité antioxydante de la vitamine C est de façon surprenante très élevée 7,7 équivalents de trolox (En comparaison, la valeur ORAC de la vitamine C est de 0,95) [58].

Le dosage de la décoloration de la crocine a trouvé des applications jusqu'ici limitées aux échantillons alimentaires. Les constantes de taux de réaction entre ROO^\bullet et les « phytonutriments » peuvent varier considérablement, et certains d'entre eux ont des taux comparables à celui de la crocine (ainsi, pas de phase de latence), tandis que d'autres donneront une phase de latence. Dans ce cas, les taux d'inhibition de la décoloration sont tellement petits et ne sont pas sensibles aux changements de concentration des antioxydants. Ceci pourrait expliquer le fait que la vitamine C possède une capacité antioxydante exceptionnellement élevée. La crocine absorbe plutôt à une courte longueur d'onde (450 nm), et beaucoup de colorants alimentaires, tels que les caroténoïdes, absorbent à la même longueur d'onde. Pour éviter l'interférence de chaque échantillon, un blanc témoin (un mélange contenant seulement AAPH et l'échantillon alimentaire) doit être examiné en même temps. Enfin, la crocine est un mélange de colorants naturels extraits à partir du safran et est sujette à une trop grande variabilité, qui limite son application industrielle dans un procédé quantitatif.

III.3.1.3. Dosage TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*)

Le dosage TRAP suit la capacité des composés antioxydants à interférer avec la réaction entre les radicaux peroxy et un substrat cible. Les réactions de base du dosage sont similaires à celles de l'ORAC [46, 59]. On utilise dans ce dosage, la R-phycoérythrine (R-PE) comme substrat fluorescent [60]. L'avancement de la réaction de la R-PE avec AAPH est suivi par fluorométrie sur la figure 19.

La capacité antioxydante X d'un échantillon donné est exprimée en équivalents de Trolox selon l'équation :

$$\frac{C_{\text{Trolox}}}{T_{\text{Trolox}}} = \frac{X}{T_{\text{plasma}}}$$

où C_{Trolox} est la concentration de Trolox, T_{Trolox} est le temps latent de la courbe cinétique de la R-PE en présence du Trolox, X est la capacité antioxydante du plasma, et T_{plasma} est le temps latent de la courbe cinétique en présence du plasma. X est alors multiplié par 2,0 (facteur stœchiométrique du Trolox) et par le facteur de dilution de l'échantillon pour donner la valeur du TRAP ($\mu\text{mol/L}$). Pour obtenir le T_{Trolox} de la même courbe cinétique de l'échantillon, le Trolox est ajouté au mélange réactionnel quand la fluorescence de la R-PE est environ 50 % de la valeur initiale. La réaction est suivie jusqu'à ce que le taux de dégradation de la fluorescence se retrouve au niveau d'avant addition du Trolox. La phase latente est alors calculée en extrapolant les courbes de l'oxydation maximale de la R-PE avant et après l'addition du trolox (Figure 19). Cependant, tous les échantillons ne possèdent pas une phase de latence. Ursini et ses collègues simulèrent les effets des antioxydants sur la phase latente de la peroxydation et ont constaté que les mesures basées sur le temps latent ont surestimé la capacité antioxydante des antioxydants plus faibles [61]. Valkonene et *coll.* ont modifié la détermination du TRAP en utilisant le diacétate de dichlorofluorescein (DCFH-DA) comme substrat moléculaire [62]. En présence de l'AAPH, le DCFH-DA est oxydé et aussi hydrolysé dans le processus, pour donner la dichlorofluorescéine (DCF) fortement fluorescente. L'augmentation du signal de la fluorescence est une indication de l'avancement de l'oxydation.

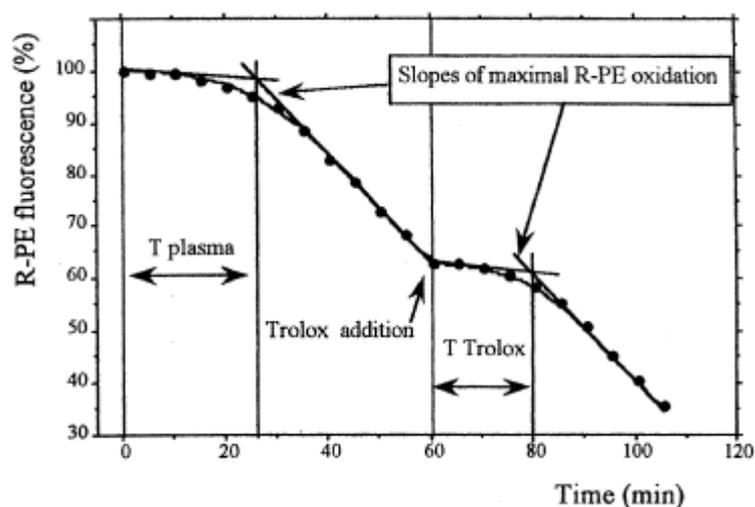


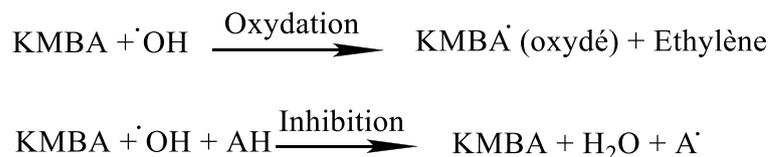
Figure 19 : Cinétiques de l'oxydation de la R-PE initiée par 5 mM de l'AAPH en présence de plasma avant et après l'addition du trolox (1,8 μ M solution finale).

La méthode du TRAP est le plus souvent utilisée pour des mesures de la capacité antioxydante *in vivo* dans le sérum ou dans le plasma parce qu'elle dose des antioxydants non-enzymatiques, tels que le glutathion, l'acide ascorbique, le α -tocophérol, et le β -carotène [60].

La détermination du TRAP implique le déclenchement de la peroxydation des lipides en produisant des radicaux peroxy hydrosolubles et est sensible à tous les antioxydants reconnus interrupteurs de la chaîne des réactions radicalaires, mais il est relativement complexe et sa mise en œuvre prend énormément de temps et exige une grande expertise et de l'expérience.

III.3.1.4. Détermination du TOSC : *Total Oxidant Scavenging Capacity*

Mis au point par Winston et *coll.* [63, 64], ce dosage permet la quantification spécifique de la capacité d'absorption des antioxydants agissant spécifiquement contre trois puissants oxydants tels que les radicaux hydroxyle, peroxy, et le peroxy nitrite [65]. Elle aborde une question importante dans l'évaluation des différents antioxydants de différentes sources radicalaires biologiquement appropriées. Le substrat dans cette analyse qui est l'acide α -cétog- γ -méthiobutyrique (KMBA), est oxydé pour donner de l'éthylène. Pendant la formation de l'éthylène, on suit la tension de vapeur de la cellule de réaction par une chromatographie en phase gazeuse (CPG), et la capacité antioxydante est quantifiée comme le pouvoir de l'antioxydant à inhiber la formation de l'éthylène par rapport à une réaction de contrôle. La méthode utilise le secteur sous la courbe (AUC) qui définit mieux les points expérimentaux pendant le temps de la réaction, qui peut aller jusqu'à 300 mn.



Elle n'est pas aisément adaptable aux mesures de routine exigées pour un contrôle de qualité parce qu'elle nécessite plusieurs injections de l'échantillon dans le chromatographe pour mesurer la production d'éthylène. Les cinétiques du dosage TOSC sont telles qu'il n'y a pas une relation linéaire entre le pourcentage d'inhibition du TOSC par la source antioxydante et la concentration ou la dilution de l'antioxydant [66].

III.3.1.5. Détermination du LDL : *Low-Density Lipoprotein Oxidation*

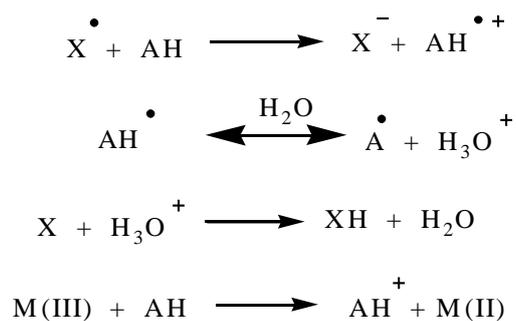
Cette méthode a été principalement mise au point pour mesurer le taux antioxydant ; elle est également adaptée pour évaluer la capacité antioxydante dans un système plus physiologiquement approprié. Les LDL sont fraîchement isolés des échantillons sanguins, l'oxydation est initiée par le Cu(II) ou l'AAPH, et la peroxydation des constituants lipidiques est suivie à 234 nm par les teneurs des diènes conjugués ou des peroxydes pour les hydroperoxydes lipidiques [67, 68].

L'oxydation du LDL en utilisant l'AAPH comme source radicalaire est clairement appropriée aux réactions d'oxydation qui pourraient se produire *in vivo*. Sur un groupe limité d'échantillons, on a observé une bonne corrélation entre l'oxydation du LDL (en utilisant l'AAPH) et la valeur de l'ORAC [69]. Cependant, cette corrélation est absente quand le Cu(II) est utilisé comme oxydant.

La méthode présente un inconvénient important du fait que la LDL doit être isolé de façon régulière, et en raison de la nécessité d'obtenir des échantillons sanguins provenant de différents individus, il n'est pas possible d'obtenir des préparations conformes. Ainsi, cette méthode ne favorise pas le développement d'une analyse cohérente et reproductible de routine pour la détermination de l'activité antioxydante.

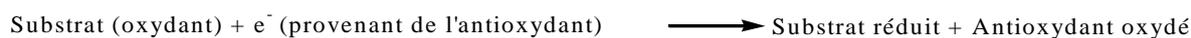
III.3.2. Les dosages basés sur un mécanisme de transfert électronique (SET)

Les dosages basés sur un mécanisme de transfert électronique déterminent la capacité d'un potentiel antioxydant de transférer un électron pour réduire un composé, à savoir les métaux, les carbonyles, et les radicaux [70] :



Parmi ces méthodes on peut citer le dosage des phénols totaux par le Réactif de Folin-Ciocalteu (RFC), le dosage du TEAC (Trolox Equivalents Antioxidant Capacity), le dosage du FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), et le dosage de la capacité de réduction du Cu(II) et le test au DPPH (2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl).

Tous ces dosages mettent en jeu deux constituants dans le milieu réactionnel, les antioxydants et l'oxydant (qui joue le rôle de substrat). Ils sont basés sur la réaction de transfert électronique suivante:



Le substrat lui-même est un oxydant qui capte un électron de l'antioxydant, entraînant ainsi des changements de coloration du substrat. Le degré du changement de coloration est proportionnel aux concentrations de l'antioxydant. La fin de la réaction est atteinte quand il n'y a plus de changement de coloration. Une courbe d'étalonnage linéaire est établie à partir de différentes concentrations d'un antioxydant de référence (trolox, acide ascorbique, BHT, acide gallique, etc.). La pente de la courbe reflète la capacité de réduction de l'antioxydant, qui est exprimée en équivalent de trolox (ET) ou d'acide gallique (EAG). Puisqu'il n'y a pas de réaction compétitive impliquée et il n'y a aucun radical de l'oxygène pendant les mesures, il est incertain que les résultats de mesure soient en relation avec la capacité antioxydante. Pour faire la corrélation, on suppose que le pouvoir antioxydant est égal à la capacité de réduction de l'antioxydant [71]. Ces méthodes ressemblent aux titrages d'oxydoréduction classiques dans les analyses chimiques.

III.3.2.1. Dosage des phénols totaux par le Réactif de Folin-Ciocalteu (RFC)

Le réactif de Folin-Ciocalteu a été initialement conçu pour le dosage des protéines en exploitant son activité vis-à-vis de la tyrosine (protéine contenant un groupe phénol) [72]. Plusieurs années plus tard, Singleton et *coll.* étendent cette méthode au dosage des phénols totaux du vin ; depuis lors ce dosage a trouvé beaucoup d'applications [73]. Singleton et Rossi

[98] ont amélioré la méthode avec du réactif molybdotungstophosphorique heteropolyanion qui réduit plus spécifiquement les phénols;



et



La longueur d'onde λ_{max} de ce réactif est 765 nm. Ils ont également imposé des étapes et des conditions indispensables pour l'obtention de données fiables et prévisibles :

- ❖ un rapport volumique approprié de l'alcali et du RFC ;
- ❖ un temps de réaction et de température optimaux pour le développement de la couleur ;
- ❖ la lecture de l'absorbance à 765 nm ;
- ❖ l'utilisation de l'acide gallique comme phénol de référence.

La méthode améliorée décrite par Singleton et Rossi [74, 75] indique des conditions permettant de minimiser la variabilité des résultats. Singleton et Rossi [74] ont conclu que : «comparée aux méthodes de l'oxydation du permanganate ou à l'absorption ultra-violet, la méthode de SR donne des résultats prévisibles pour une série de composés phénoliques».

La mesure par le RFC est une méthode de référence couramment utilisée pour estimer les phénols totaux. Le RFC mesure en réalité la capacité de réduction d'un échantillon, mais ceci ne ressort pas dans l'expression «dosage des phénols totaux». En 1993, un rapport utilisant le polyphénol oxydase pour doser les phénols totaux dans le thé serait plus spécifique aux composés phénoliques [76].

Le R-FC n'est pas spécifique aux composés phénoliques car il peut être réduit par des composés non phénoliques (par exemple la vitamine C, le Cu(I), etc.). Les composés phénoliques réagissent avec le réactif de FC seulement en milieu basique (réalisé en ajoutant une solution de carbonate de sodium à pH d'environ 10). La dissociation du proton phénolique donne un anion phénolate, lequel est capable de réduire le R-FC. Cela justifie le fait que la réaction s'opère par un mécanisme par transfert d'électron. Les composés bleus formés entre le phénolate et le R-FC sont indépendants de la structure des composés

phénoliques, excluant donc la possibilité de coordination des complexes formés entre le métal central et les composés phénoliques.

Malgré la nature chimique indéfinie du R-FC, le dosage des phénols totaux par ce réactif est pratique, simple et reproductible. En conséquence, beaucoup de résultats ont été obtenus et ce dosage est devenu une méthode de routine dans l'étude des antioxydants phénoliques.

Le principe du dosage repose sur les conditions de la méthode améliorée mise au point par Singleton et Rossi [6, 72, 77]. Il consiste à mélanger 1 mL de l'extrait (convenablement dilué) avec environ 60 mL d'eau et 5 mL du réactif de Folin-Ciocalteu. Après 8 min, on ajoute 15 mL de Na_2CO_3 à 7,5 %. Le volume du mélange est complété à 100 mL avec de l'eau. Le tout est gardé dans un bain à 37 °C pendant 30 min puis on mesure les absorbances à 760 nm. Une courbe d'étalonnage est préalablement établie en utilisant l'acide gallique comme référence. Les résultats seront alors exprimés en équivalent d'acide gallique par gramme ou par litre du produit à tester.

III.3.2.2. Dosage du TEAC (Trolox Equivalent Antioxydant Capacity)

Le dosage du TEAC est rapporté pour la première fois par Miller et Rice-Evans [76]. Son principe est basé sur la capacité de piégeage des antioxydants vis-à-vis du radical-cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (figure 20). En effet, l'ABTS est oxydé par les radicaux peroxy et bien d'autres oxydants. Le potentiel antioxydant des composés testés est évalué par la diminution de l'intensité de la couleur intense du radical-cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$ par la réaction directe de ces composés avec les radicaux libres. L'activité des composés testés est exprimée par rapport au trolox.

À l'origine, cette analyse a utilisé le metmyoglobine et H_2O_2 pour produire du ferrylmyoglobine, qui réagit avec ABTS pour former $\text{ABTS}^{\bullet+}$ [76]. L'échantillon testé est ajouté au milieu réactionnel avant que le radical soit formé.

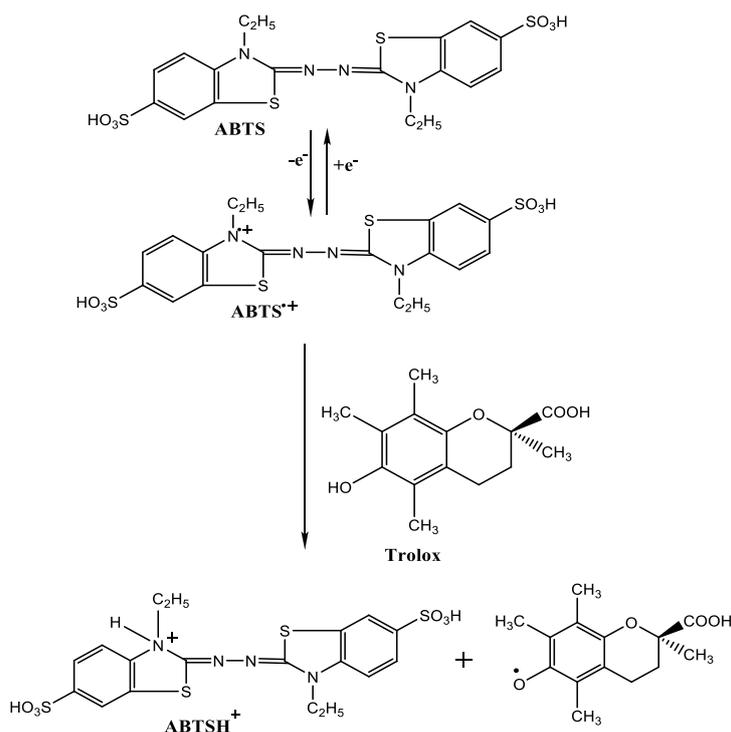


Figure 20 : Formation et piégeage du radical par un antioxydant donneur H : le trolox

Selon Cano et coll. [78], le radical-cation $ABTS^{\bullet+}$ peut être généré soit par une réaction chimique (le dioxyde de manganèse, le persulfate de potassium) ou par des réactions enzymatiques (metmyoglobine, hémoglobine). La génération enzymatique est plus rapide par rapport à la réaction chimique qui dure 16 heures de temps. Les longueurs d'onde d'absorption 415 et 734 nm ont été adoptées par les chercheurs pour suivre par spectrophotométrie la réaction entre l'antioxydant et le radical-cation $ABTS^{\bullet+}$ [79]. Pour la quantification, on mesure la diminution de l'absorbance du radical-cation $ABTS^{\bullet+}$ en présence de l'échantillon testé ou du trolox pendant une période de 10 minutes et la capacité antioxydante est calculée en équivalent de trolox.

La mesure du TEAC est utilisée dans beaucoup de laboratoire de recherche pour l'évaluation du potentiel antioxydant en raison de la simplicité de son mode opératoire. Des valeurs du TEAC de beaucoup de composés et d'échantillons alimentaires ont été rapportées [80]. Le radical-cation $ABTS^{\bullet+}$ réagit rapidement avec les antioxydants et peut être utilisé sur une large gamme de pH. En outre, il est soluble aussi bien dans les solvants aqueux que dans les solvants organiques. Ce qui permet son utilisation dans de multiples milieux pour évaluer le potentiel antioxydant hydrophile et lipophile des extraits et des fluides du corps. Les réactions de TEAC sont autorisées et adaptées aux microplaques ou plaques multipuits [81].

III.3.2.3. Dosage du FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Le dosage du FRAP a été à l'origine développé par Benzie et Strain [82] pour mesurer le pouvoir réducteur du plasma, mais a été plus tard adapté et utilisé pour le dosage des antioxydants des extraits botaniques [3, 5, 83]. La réaction mesure la capacité d'un composé à réduire le complexe ferrique 2,4,6 tripyridyl-s-triazine (TPTZ) pour donner un produit coloré (figure 21) [84].

La réaction détecte des composés qui ont des potentiels redox $< 0,7$ V (le potentiel redox de Fe^{3+} -TPTZ). Le pouvoir réducteur semble être lié au degré d'hydroxylation et s'étend à la conjugaison dans les polyphénols [84]. Cependant, la méthode du FRAP ne détermine pas le pouvoir réducteur des composés agissant par un piégeage radicalaire (transfert de H), particulièrement les thiols et les protéines. Ceci provoque une sous-estimation sérieuse dans les sérums.

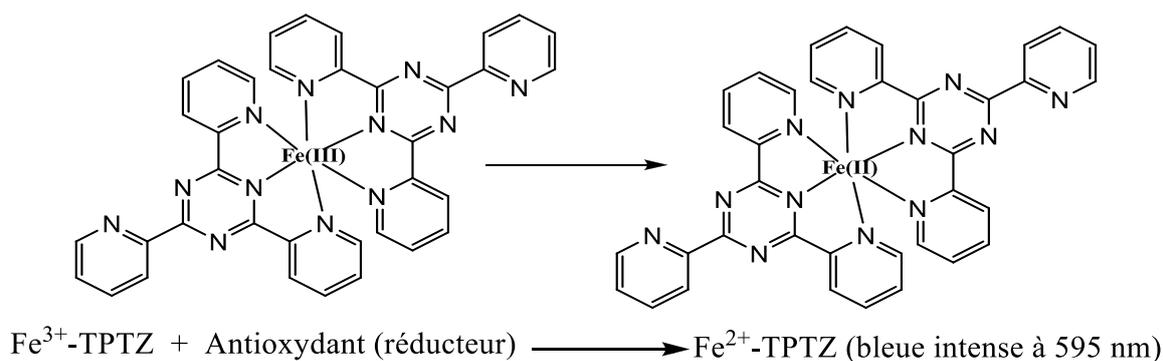


Figure 21 : Réduction du Fer(III) en Fer(II) dans la méthode FRAP

Le potentiel redox de Fe(III) (0,70V) est comparable à celui de l' ABTS^{*+} (0,68V). Donc, il n'y a pratiquement pas de différence entre le dosage TEAC et la méthode FRAP en dehors du fait que la méthode TEAC est réalisée à pH neutre tandis que la méthode FRAP s'opère dans des conditions acides (pH~3,6) pour maintenir la solubilité du fer. En effet, la réaction à un pH faible diminue le potentiel d'ionisation conduisant à un transfert d'électron. Le potentiel redox augmente, causant ainsi à un « shift » une modification du mécanisme dominant de la réaction.

Dans cette méthode, un sel ferrique, le $\text{Fe(III)} (\text{TPTZ})_2\text{Cl}_3$ ($\text{TPTZ} = 2,4,6\text{-tripyridyl-s-triazine}$) est utilisé comme oxydant [82, 83]. Le réactif FRAP est préparé en mélangeant 1 mL TPTZ (1 mL, 10 mM dans 40 mM de HCl), 10 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium (pH = 3,6) et 1 mL de solution de Fe(III) , H_2O . Environ 30 μL d'eau distillée est mélangée avec 20 μL d'extrait convenablement dilué, on y ajoute ensuite 200 μL de solution

FRAP. On mesure l'absorbance de la décoloration en bleue intense à 595 nm avec le lecteur microplaque (spectrophotomètre MP96, SAFAS par exemple) environ 10 minutes après.

Pulido et *coll.* [83] ont examiné le dosage du FRAP des polyphénols diététiques dans l'eau et dans le méthanol. L'absorbance (A_{595}) augmente lentement pour les polyphénols tels que l'acide caféique, l'acide tannique, l'acide férulique, l'acide ascorbique, et la quercétine, même après plusieurs heures de réaction. Ainsi, une absorbance mesurée à un temps donné peut ne pas représenter celle d'une réaction totale. En réalité, on mesure tout simplement la capacité réductrice basée sur l'ion ferrique, qui n'est pas liée à l'activité antioxydante d'un point de vue mécanistique et physiologique. Cependant, contrairement à d'autres tests du pouvoir antioxydant global, le dosage du FRAP est simple, prompt, peu coûteux, et n'exige pas un équipement spécial. Le dosage du FRAP peut être mis en œuvre en utilisant des méthodes automatiques, semi-automatiques, ou manuelles.

III.3.2.4. Le dosage du CUPRAC : Copper Reduction Assay

On dispose peu d'informations éditées sur ce dosage. Cependant, un laboratoire industriel l'a utilisé comme une mesure du potentiel antioxydant total [85]. La méthode est basée sur la réduction du Cu (II) en Cu (I) par des réducteurs (antioxydants) présents dans un échantillon. Un réactif chromogène, la bathocuproïne (2,9-diméthyl-4,7-diphényl-1,10-phenanthroline), forme un complexe 2:1 avec du Cu (I), qui a un maximum d'absorption à 490 nm [86]. L'on a constaté qu'une mole d' α -tocophérol peut réduire deux moles de Cu (II) en Cu (I) [87].

Zaporozhets et *coll.* l'ont utilisé pour la mesure du pouvoir antioxydant des produits de fines herbes, basée sur la spectrophotométrie en phase solide en utilisant le complexe du tétrabenzobenzimidazole [1.5.9, - 13] tetraazacyclohexadecine-Cu(II) immobilisé sur le gel de silice (figure 22). L'absorbance du sorbant modifié (712 nm) augmente quand le Cu (II) est réduit [5, 88].

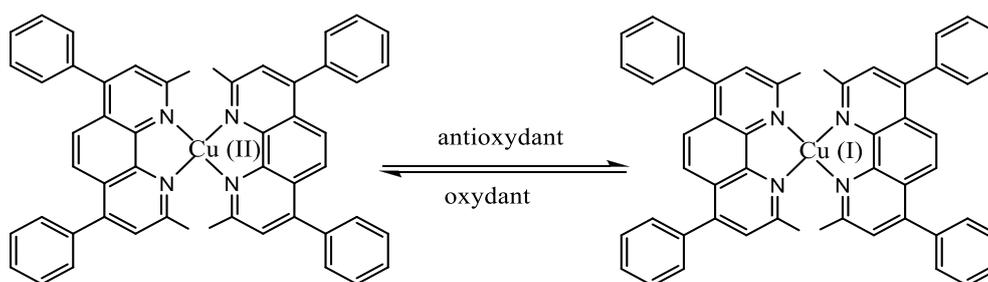


Figure 22 : Réduction du Cu(II) en Cu (I)

III.3.2.5. Dosage au 2,2-Diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Le DPPH est l'un des quelques radicaux organiques d'azote (figure 23) stables et disponibles dans le commerce et possédant un maximum d'absorption UV-vis à 515 nm. Lors de la réduction, la solution colorée se décolore; l'avancement de la réaction est convenablement suivi par un spectrophotomètre.

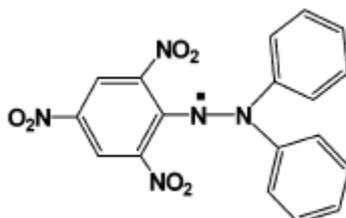


Figure 23 : Structure du radical de DPPH

Le dosage au DPPH suit typiquement le procédé suivant : La solution du DPPH (3,9 mL, 25 mg/L) dans du méthanol est mélangée à la solution de l'échantillon (0,1 mL). L'absorbance du mélange réactionnel est lue à 515 nm pendant 30 minutes ou jusqu'à ce que l'absorbance soit constante. Lors de la réduction, la solution se décolore. Le pourcentage de DPPH restant est calculé par :

$$\% \text{ DPPH } \cdot_{\text{Rest}} = 100 \times \frac{[\text{DPPH } \cdot]_{\text{Rest}}}{[\text{DPPH } \cdot]_{T=0}}$$

% DPPH_{rest} est proportionnel aux concentrations de l'antioxydant, et la concentration qui cause une diminution de la concentration initiale de DPPH de 50 % est définie comme EC₅₀. Le temps nécessaire pour atteindre l'état d'équilibre avec la concentration EC₅₀ est calculé à partir de la courbe cinétique et défini comme TEC₅₀.

Sanchez-Moreno et *coll.* ont établi le comportement cinétique d'un composé antioxydant de la façon suivante : < 5 min (rapide) ; 5- 30 min (moyenne) ; > 30 min (lent). Ils ont proposé en plus un paramètre noté AE « antiradical efficiency » (efficacité antiradicalaire) [5, 89] pour exprimer la capacité antioxydante de certains antioxydants :

$$AE = \frac{1}{TCE_{50} \times CE_{50}}$$

Le dosage au DPPH est simple et rapide et nécessite seulement un spectrophotomètre UV-Visible, ce qui explique son utilisation très répandue dans le screening des antioxydants. Cependant, quelques inconvénients limitent ses applications. En effet, plusieurs antioxydants

qui réagissent vivement avec le radical péroxyl peuvent réagir lentement ou peuvent même être inertes vis-à-vis du DPPH. Ainsi, de petites molécules qui ont un meilleur accès au site radicalaire ont un pouvoir antioxydant apparemment élevé avec ce dosage. Il semble que le radical du DPPH est décoloré aussi bien par les agents réducteurs que par un transfert de H. On pensait que le test au DPPH s'opérait par une réaction de transfert d'un atome d'hydrogène mais de récents travaux l'ont suggéré autrement [90, 91]. Sur la base de l'analyse cinétique de la réaction entre les phénols et le DPPH, Foti et *coll.* [86] ont rapporté que la réaction se comporte en fait comme une réaction par transfert d'électrons. Selon ces auteurs, l'étape déterminante pour cette réaction consiste en un processus de transfert rapide d'un électron des anions phénoxydes vers le DPPH. La capture d'un atome H des composés phénoliques par le radical DPPH est une réaction négligeable, car elle se passe très lentement.

Conclusion

L'oxygène bien qu'indispensable à la vie est également à l'origine de toxicité, d'acidité, d'altération, de dégénérescence au travers du stress oxydant. Une alimentation équilibrée riche en antioxydants (fruits, légumes et tubercules), permettrait d'entretenir la santé, de renforcer le système immunitaire surtout des personnes les plus vulnérables (femmes allaitantes ou en grossesse, les personnes âgées et les patients du VIH-SIDA), et aussi de prévenir certaines maladies, telles que le cancer ou les maladies coronariennes, les accidents vasculaires cérébraux et les maladies neurodégénératives.

Plusieurs méthodes connues permettent d'évaluer le potentiel antioxydant d'un produit. Les principales méthodes de détermination de la capacité antioxydante d'un produit pur ou de mélange ont été examinées et regroupées selon leurs principes. Elles mesurent l'efficacité d'une substance à piéger les radicaux libres en donnant un électron (SET) ou un atome d'hydrogène (HAT). Les méthodes de Folin-Ciocalteu, du TEAC, FRAP et le dosage au DPPH sont couramment utilisés du fait de leur efficacité et de leur simplicité de mise en œuvre. D'autres par contre répondent mieux à des critères de performance (gamme analytique, reproductibilité, etc.) et peuvent donc être utilisées comme des méthodes de référence dans la détermination de la capacité antioxydante. Parmi elles, figurent la méthode ORAC et la méthode de Folin-Ciocalteu. Ainsi après analyse et évaluation, les méthodes FRAP, DPPH, ABTS et la méthode de Folin-Ciocalteu ont été retenues pour la présente recherche.

CHAPITRE II : LA PATATE DOUCE ET SES MICRONUTRIMENTS

I. *Ipomoea batatas* (patate douce)

Ipomoea batatas (patate douce) est une plante herbacée et vivace de la famille des Convolvulacées. Elle est largement cultivée dans les zones tropicales, subtropicales et les zones tempérées chaudes ^[92] pour ses tubercules et ses feuilles qui sont comestibles pour l'homme et le bétail. Les pays asiatiques, notamment la Chine, sont les principaux producteurs avec 113, 6 millions de tonnes en 2004, soit 88, 9 % de la production mondiale ^[92]. Le Centre international de la pomme de terre (Centro Internacional de la Papa, CIP) de Lima, au Pérou (www.cipotato.org/sweetpotato/sweetpotato.htm), entretient la plus importante banque de gènes de patate douce au monde, qui comprend des milliers de variétés sauvages, traditionnelles et améliorées. Contrairement à la Chine, 90 % de la production de l'Afrique et de l'Amérique du Sud sont destinés à la consommation humaine ^[93].

I.1. Historique

Les premières suppositions donnent l'Inde comme origine car elle y était anciennement cultivée, probablement avant le 16^e siècle.

Mais son origine est plus certainement latino-américaine. En effet, l'analyse des caractères morphologiques de la patate douce et l'abondance des espèces sauvages en Amérique centrale font penser que son centre d'origine se situerait entre le Yucatan dans la péninsule mexicaine et l'embouchure de l'Orénoque dans le Venezuela ^[92]. Une étude biomoléculaire a révélé plus récemment une grande diversité de patates douces en Amérique centrale. Cela prouve que c'est le centre principal de diversité et plus probablement le centre d'origine vu l'abondance des parents sauvages de la patate douce qui s'y trouvent ^[93, 94]. L'introduction de la patate en Europe occidentale s'est faite à partir des Antilles après le voyage de Christophe Colomb en 1492 ^[92]. Après la conquête des Amériques, sa diffusion fut accélérée dans le monde entier par les explorateurs espagnols et portugais notamment en Afrique, en Inde et en Asie du sud-est ^[92].

D'autres hypothèses penchent pour une dissémination naturelle des semences soit par des courants marins (ce qui n'a jamais été avéré), soit par les pollinisateurs particulièrement le pluvier doré qui séjourne occasionnellement sur les côtes d'Amérique du sud.

I.2. Description botanique

Type morphologique : la patate douce est une plante herbacée et vivace mais annuelle en culture. On peut trouver selon les variétés, des ports érigés/dréssés ou semi-érigés ou rampant. La tige est cylindrique et sa couleur varie en fonction des variétés. Elle est de couleur verte dans la majeure partie des cas, mais on peut rencontrer des tiges de couleur rouge-pourpre. Les variétés à port dréssé peuvent avoir 1 m de long alors que celles à port rampant présentent une longueur de 2 à 3 m et peuvent atteindre par moment 5 m. On rencontre aussi des variétés qui présentent des vrilles.

Feuilles : elles sont simples et alternées. Le pétiole est relativement long et le limbe variable à bord sinué ou denté ou bien lobé.

Floraison : en conditions normales, la floraison de patate douce dépend des variétés : certaines ne fleurissent pas tandis que d'autres fleurissent peu ou donnent beaucoup de fleurs. La couleur de la fleur varie du blanc au pourpre. Elles apparaissent à l'aisselle des feuilles, isolées ou groupées en cymes de quelques fleurs.

Système racinaire : il est formé de racines fibreuses qui absorbent les éléments nutritifs et l'eau et de racines latérales qui sont les tubercules. La patate douce produit des tubercules de forme plus ou moins allongée, voire arrondie, à la peau fine. Suivant la variété, la couleur de la peau est beige, brune, jaune, orange, rouge, violette. La couleur de la chair du tubercule varie également selon la variété : blanc, beige, jaune, orange, rouge, rose, violette. Presque toutes les combinaisons de peau et de chair peuvent se rencontrer (figure 24).



Figure 24 : Tubercules de patate douce

Les tubercules à chair blanche ou jaune pâle sont moins sucrés et ont un taux d'humidité inférieur à ceux qui sont rouges ou oranges ^[95]. Ils sont très riches en amidon. Leur saveur

sucrée et leur texture farineuse rappelle celle du manioc. Dans certaines régions d'Afrique et dans les Caraïbes, la farine de patate douce est beaucoup plus appréciée que celle du blé.

I.3. Utilisation

Au Burkina Faso comme partout dans les régions tropicales, aussi bien les tubercules que les feuilles de la patate douce constituent un aliment de base où elle substitue la pomme de terre. Souvent considérée par les populations qui la consomment comme un aliment de soudure, elle contribue à sauver de nombreuses vies de la famine en période de conflits ou de catastrophes naturelles (sécheresse, inondation, etc.). Certaines associations d'aide humanitaire font la promotion de sa culture comme une meilleure alternative à l'aide alimentaire.

La patate douce possède un avantage souvent méconnu en termes de productivité : la comparaison de sa matière sèche et énergétique produite à l'hectare dépasse largement d'autres produits agricoles comme le blé par exemple. En outre sa teneur en protéines devance de nombreux autres produits. Depuis les années 2000, la transformation de patate douce sous forme de chips, de biscuits, de gâteaux ou encore de la fécule, du sirop, de l'alcool, de la confiture, etc. a été trouvée dans le marché mais sa production est encore à l'état artisanal. Certaines variétés, riches en amidon, servent à l'alimentation du bétail. Les feuilles et les tiges présentent aussi un grand intérêt comme fourrage vert pour les animaux.

II. Les micronutriments de la patate douce

De nombreuses études épidémiologiques et cliniques montrent que la patate douce et les produits à base de patate douce sont susceptibles de limiter les risques de maladies cardiovasculaires, les cancers et les maladies de carence (avitaminose par exemple) [8, 94, 95]. Ces vertus nutritionnelles seraient dues en grande partie à la présence de microconstituants antioxydants (caroténoïdes, vitamines et composés phénoliques). La patate douce est également reconnue pour sa richesse en vitamines et la grande diversité de composés phénoliques qu'elle contient.

II.1. Les caroténoïdes

II.1.1. Diversité des caroténoïdes de la patate douce à chair orange

Le caroténoïde retrouvé majoritairement dans la patate douce à chair orange est le *trans*- β -carotène qui constitue le principal pigment [34]. Le β -carotène sous ses formes *cis* peut également être retrouvé mais en de faibles proportions. L' α -carotène et la β ou l' α -

cryptoxanthine, des micronutriments possédant une activité pro-vitaminique A, sont eux aussi présents dans de nombreuses variétés de PDCO principalement sous la forme *trans*. Par ailleurs, des intermédiaires de la biosynthèse du β -carotène (phytoène, phytofluène, neurosporène et le lycopène) mais également de faibles quantités de lycoxanthine et de γ - et δ -carotène ont été identifiés. On peut aussi noter la présence de xanthophylles : la lutéine, la zéaxanthine, la néoxanthine et la violaxanthine [34]. D'autre part, des produits issus de l'oxydation du β -carotène peuvent être présents dans les PDCO fraîches, notamment le 5,6-dihydroxy-5',6'-époxy- β -carotène et le 5,8,5',8'-diépoxy- β -carotène [97]. Les principaux caroténoïdes identifiés dans les patates fraîches ont été quantifiés. Les teneurs répertoriées par plusieurs études sont présentées dans le Tableau 1. Ces teneurs sont très variables, comme souligné plus haut. Les conditions écologiques du milieu de culture (date de récolte dans l'année, ensoleillement, température, qualité du sol, etc.) peuvent influencer grandement la teneur en caroténoïdes. Par ailleurs, la composition en caroténoïdes peut varier énormément selon le cultivar.

Tableau 1 : Teneurs des principaux caroténoïdes identifiés dans la patate douce fraîche

Caroténoïde	Teneurs (mg/100 g de produit frais)	Références
β -carotène (<i>cis</i> et <i>trans</i>)	0,03-1900	[98, 99]
α -carotène	0,001-0,1	[98]
Lycopène	0,001-0,01	[98]
Lutéine	0,07-300	[98, 100]
β -Cryptoxanthine	0,001-0,01	[100]
Zéaxanthine	0,01-120	[98, 101]
Anthéroxanthine	0,04-400	[97]

II.1.2. Localisation des caroténoïdes dans le tubercule de patate douce à chair orange

Après analyse de différentes parties du tubercule de patate (peau et chair) de plusieurs variétés, de nombreux auteurs ont montré que la majorité du β -carotène se trouve dans la chair [102]. De même, les xanthophylles et les carotènes de la patate ont été quantifiés à plusieurs stades du développement, et ceci dans les différentes parties du tubercule. Les xanthophylles (néoxanthine, violaxanthine, la zéaxanthine et lutéine) ont été détectées dans toutes les parties du tubercule et sont majoritairement présents dans la chair. Le lycopène a été également

déecté dans tous les tissus. Il est présent de façon relativement homogène dans le tubercule [103].

II.1. 3. Biosynthèse des caroténoïdes de la patate douce

La biosynthèse des caroténoïdes dérive de la biosynthèse générale des isoprénoïdes. L'embranchement de ces deux voies se fait au niveau du phytoène.

Quel que soit l'organisme considéré, les premières étapes de la biosynthèse des caroténoïdes sont communes. Les enzymes intervenant dans cette voie de biosynthèse sont codées par des gènes notés *crt* suivie d'une lettre.

La synthèse des caroténoïdes se fait dans les chromoplastes, des organites présents à l'intérieur des cellules des fruits où le lycopène et le β -carotène seraient présents sous forme de cristaux [104]. Le composé indispensable à la synthèse de tous les caroténoïdes est l'isopentényl pyrophosphate (IPP) qui, suite à des réactions d'isomérisation et de condensation, forme le phytoène (figures 25, 26 et 27). Ce dernier est à l'origine de tous les autres caroténoïdes.

Ainsi, par l'intermédiaire de réactions de désaturation, d'oxydation, de cyclisation et de réarrangement impliquant de nombreuses enzymes, l'ensemble des carotènes et xanthophylles de la patate sont synthétisés.

II.1. 3.1. La synthèse d'IsoPentényl Pyrophosphate : IPP

Les isoprénoïdes sont des métabolites présents dans tous les organismes vivants, leur précurseur biologique universel est l'isopentényl pyrophosphate. Jusqu'au début des années 1990, on considérait la voie de l'acide mévalonique comme la seule voie de biosynthèse permettant la formation d'IPP [7]. Mais une seconde voie, celle du deoxyxylulose phosphate, totalement différente de la première, fut découverte chez les eubactéries et les organismes eucaryotes photosynthétiques [7].

II.1. 3.1.1. La voie de l'acide mévalonique

La synthèse d'IPP par la voie de l'acide mévalonique est surtout utilisée par les champignons. Des expériences de marquage radioactif, ont montré que les champignons et les levures utilisaient uniquement la voie du mévalonate pour la production d'IPP. Les différentes étapes de cette voie de biosynthèse sont présentées dans la figure 25. Le mévalonate est formé

par trois acetyl-CoA *via* l'hydroxyméthylglutaryl-CoA. Les étapes successives impliquent deux réactions de phosphorylation menant à l'acide mévalonique pyrophosphate. Le mévalonate pyrophosphate subit ensuite une décarboxylation à l'origine de la formation d'isopentenyl pyrophosphate.

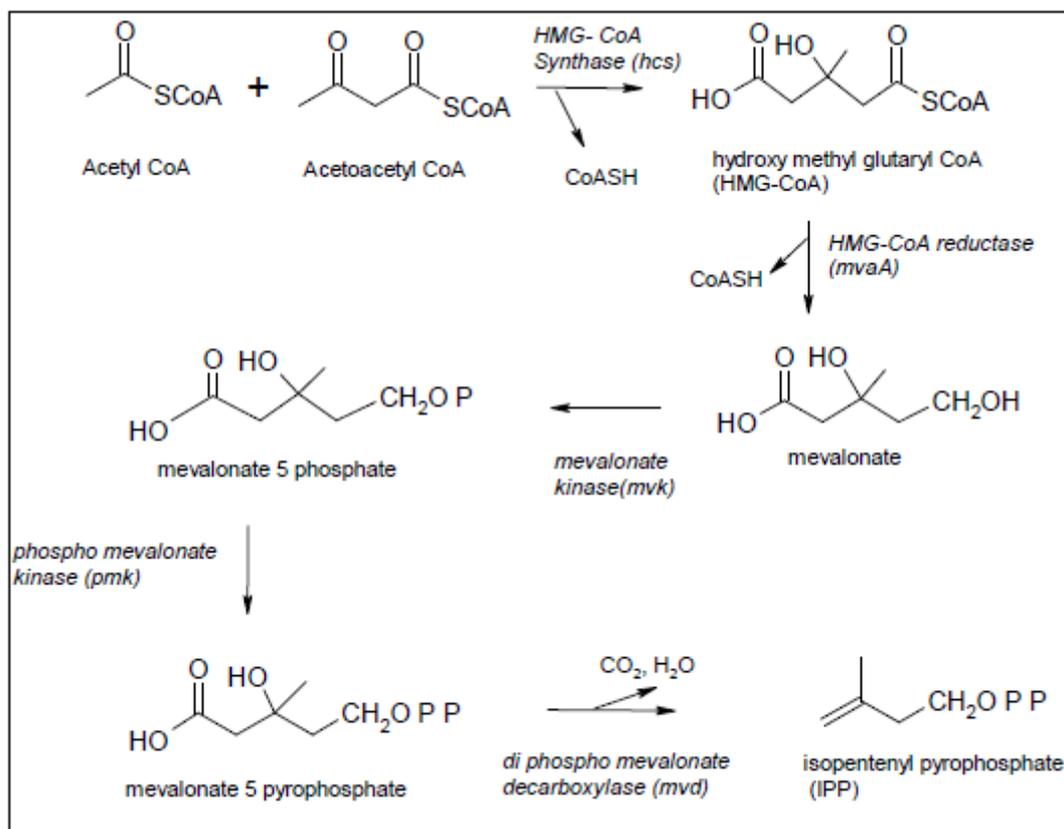


Figure 25 : Synthèse d'IPP par la voie de l'acide mévalonique

II.1. 3.1.2. La voie du deoxyxylulose phosphate

Cette voie découverte dans les années 1990, est présentée comme une alternative à la voie du mévalonate [7]. Dans cette voie, le précurseur de l'IPP n'est plus le mévalonate mais le glycéraldéhyde phosphate et le pyruvate. L'utilisation de glucose marqué (Glucose ^{13}C) a permis d'identifier cette voie chez les eubactéries, l'algue verte *Scenedesmus obliquus* et les plantes supérieures [7].

La première réaction de cette voie de biosynthèse (Figure 26) conduit à la formation de 1-deoxy D-xylulose-5-phosphate par la condensation du pyruvate avec le glycéraldéhyde-3-phosphate sous l'action de la deoxyxylulose phosphate synthase thiamine dépendante. Le produit de cette première réaction est ensuite transformé en 2C-méthyl-D-érythritol-4-phosphate par la deoxyxylulose phosphate réducto-isomérase. La réaction suivante permet la formation de 4-diphosphocytidyl-2-C-méthylérythritol par une réaction CTPdépendante. Ce composé subit ensuite une phosphorylation en position 2, puis la libération du CMP. Le 2-C-

méthyl-D-érythritol 2,4-cyclodiphosphate est alors formé. Les réactions ultérieures menant à la synthèse d'IPP sont restées inconnues plusieurs années.

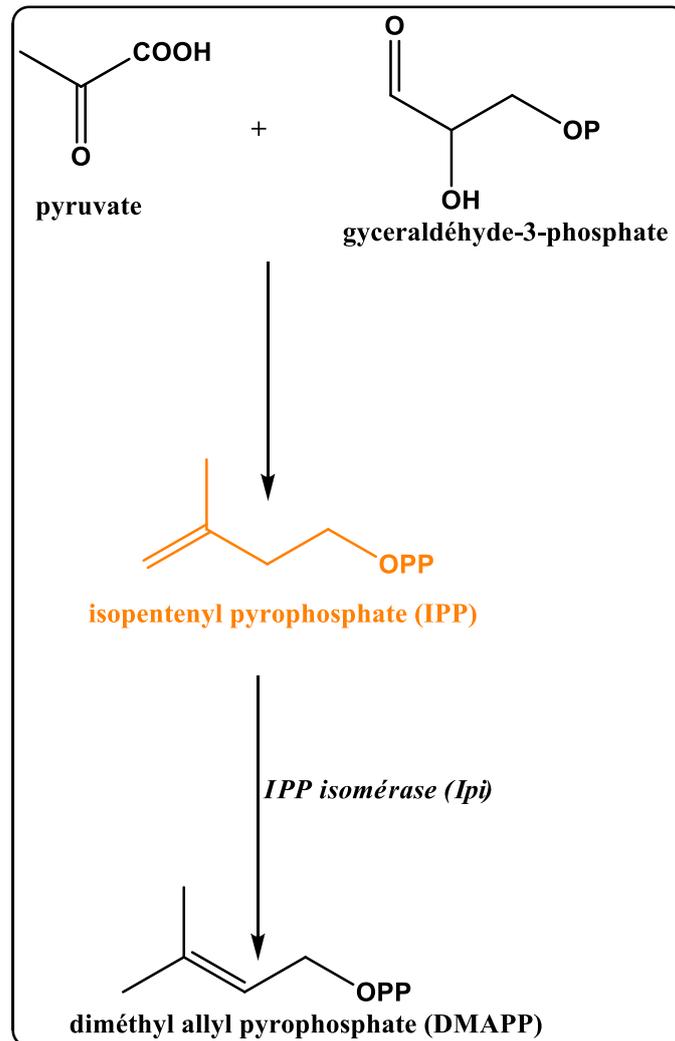


Figure 26 : Synthèse d'IPP par la voie du deoxyxylulose phosphate.

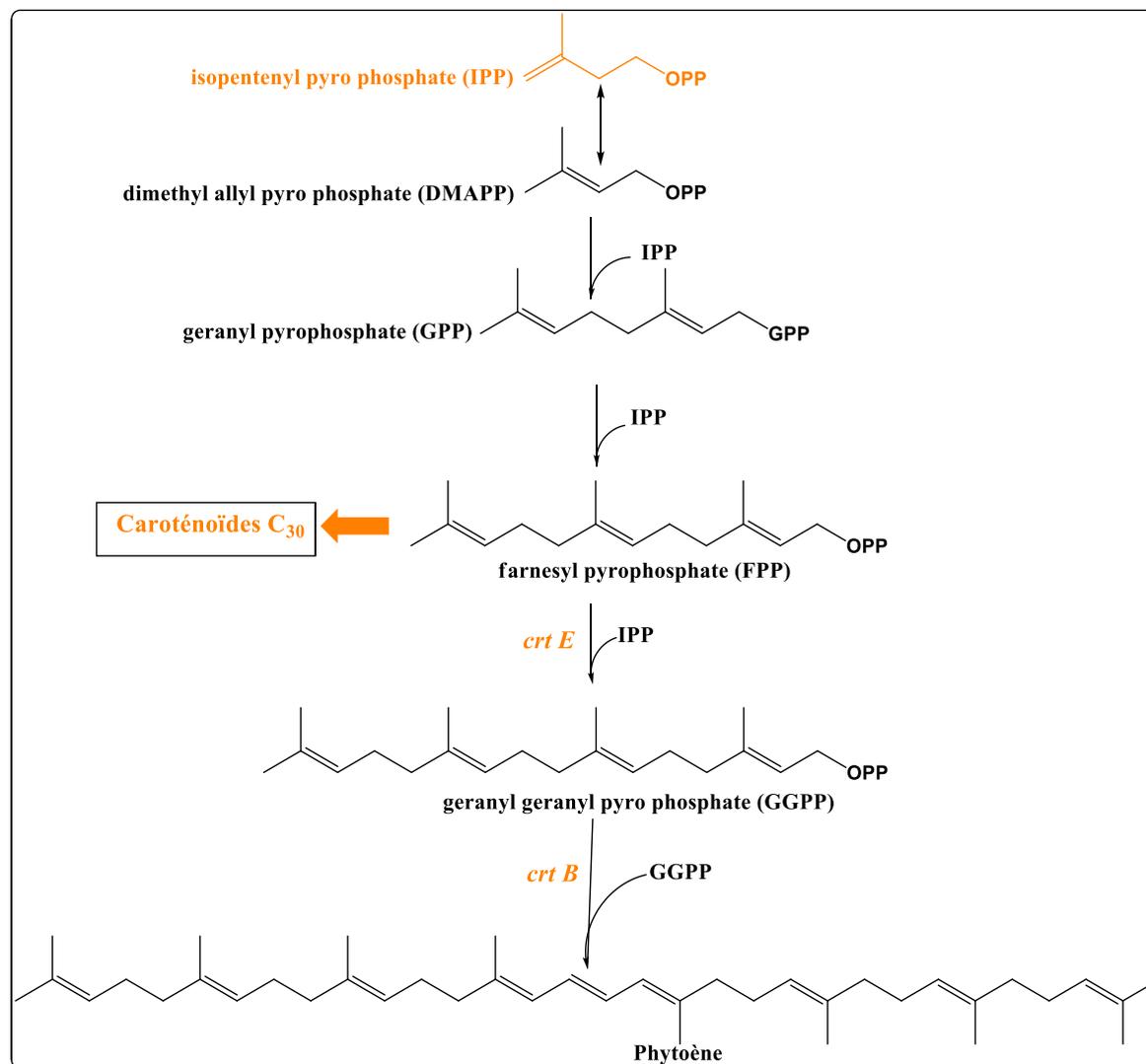


Figure 27 : Voie de biosynthèse générale des isoprénoïdes

II.2. Les composés phénoliques

II.2.1. Diversité des composés phénoliques de la patate douce

Une grande diversité de composés phénoliques a été identifiée dans la patate douce. Ce sont principalement des acides hydroxycinnamiques, des anthocyanes, des flavonols et des flavanones, presque tous sous forme glycosylée. Oki et coll. [5, 103, 105] ont identifié dans la patate les acides chlorogénique, isochlorogénique et cinammique ainsi que les anthocyanes comme la cyanidine et la péonidine. Parmi les acides hydroxycinnamiques de la patate, ont été identifiés des glycosides des acides *p*-coumarique, caféique et férulique, des acides caféoylquiniques (chlorogéniques), *p*-coumaroylquiniques et féruloylquiniques et un conjugué entre l'acide coumarique et la rutine. Des acides di- et tricaféoylquiniques ont également été retrouvés [105].

Etant donné la diversité des composés phénoliques présents dans les patates et le manque de standards disponibles dans le commerce, leur quantification a généralement été réalisée grâce à des méthodes de dosage globales. Seuls les composés majoritaires pour lesquels des étalons sont disponibles, ont pu être quantifiés. Les teneurs en acide chlorogénique et l'acide gallique mesurées dans des patates fraîches sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Teneurs de quelques composés phénoliques dans des patates fraîches

Composé phénolique	Teneurs (mg/g de matière fraîche)	Références
Acide chlorogénique	8-28	[105]
Acide gallique	1-7	[103, 106]

II.2.2. Localisation des composés phénoliques dans le tubercule de la patate douce

Selon plusieurs études, les polyphénols seraient principalement concentrés sur la peau [107, 108]. Les variétés de patates douces de couleur pourpre contiennent beaucoup d'anthocyanes qui leur donnent leurs couleurs. La forte concentration de ces composés au sein du tissu épidermique peut s'expliquer par l'intensité des radiations lumineuses reçues par les cellules de l'épiderme, qui stimulent la synthèse de ces polyphénols. Par ailleurs, les flavonoïdes pourraient jouer un rôle de protection vis-à-vis des pathogènes et du stress environnemental, dû par exemple à la sécheresse ou aux rayonnements ultra-violets [3, 4, 7, 32].

Les acides phénoliques ont été détectés dans toutes les parties du tubercule. Les acides caféoylquiniques sont majoritairement présents dans l'épiderme alors que les acides féruliques, coumariques et caféiques glycosylés se répartissent entre le gel, l'épiderme et la chair.

II.2.3. Biosynthèse des composés phénoliques de la patate

Les composés phénoliques forment un très vaste ensemble de substances qu'il est difficile de définir simplement. L'élément structural fondamental qui les caractérise est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupe hydroxyle, libre ou engagé dans une autre fonction : éther, ester, hétéroside.

La phénylalanine et la tyrosine, deux acides aminés aromatiques, sont à l'origine de la formation de la plupart des composés phénoliques chez les végétaux. Ces deux composés sont eux-mêmes formés à partir de sucres simples issus du métabolisme primaire par la voie de l'acide shikimique (figure 28). Par désamination, la phénylalanine donne le précurseur immédiat des phénols : l'acide cinnamique. Ce composé n'est pas encore phénolique mais est à l'origine de la synthèse de tous les acides hydroxycinnamiques. Les formes esters de ces acides avec le coenzyme A, jouent un rôle dans le métabolisme des végétaux et sont à l'origine des principales classes de composés phénoliques : acides benzoïques, anthocyanes, coumarines, lignines et flavonoïdes.

Chez la patate, ce sont principalement des réactions intervenant dans les voies de synthèse des dérivés des acides hydroxycinnamiques et des flavonoïdes qui ont lieu.

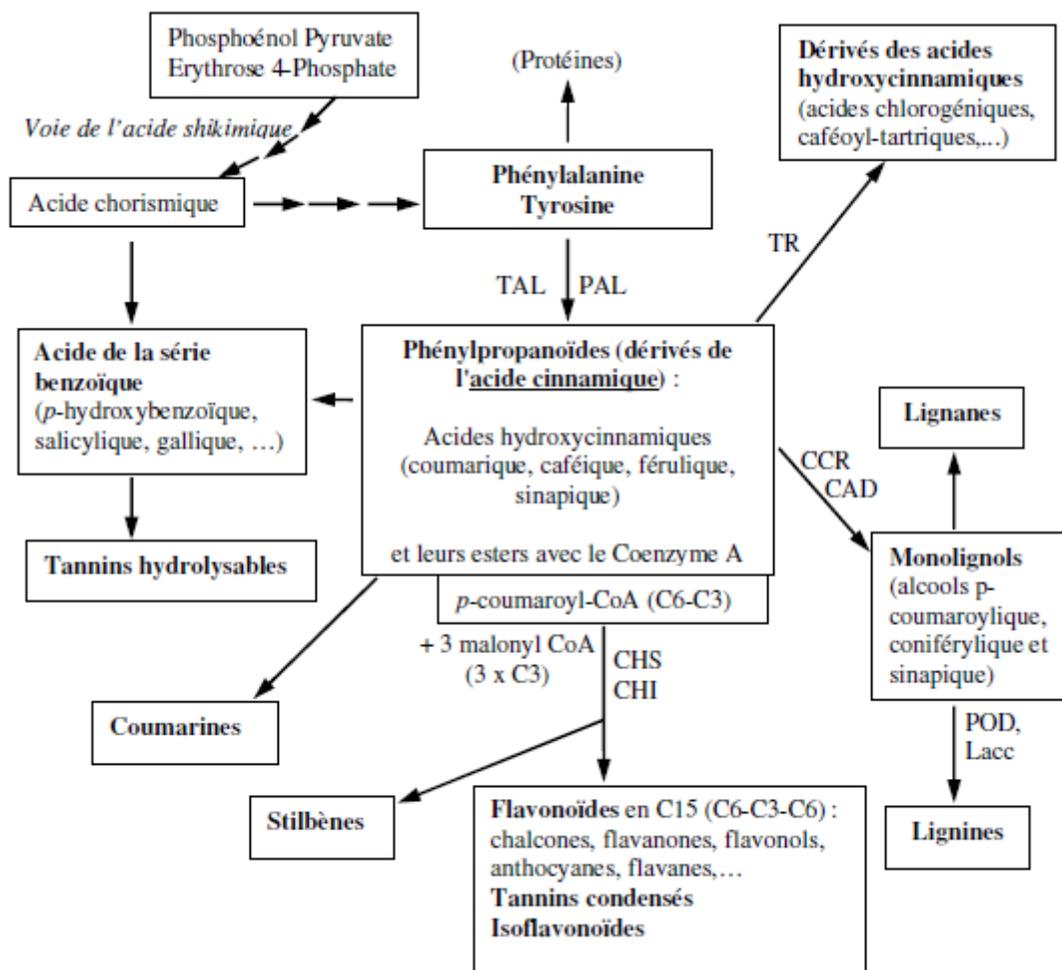


Figure 28 : Les grandes lignes de la biosynthèse des principaux groupes de composés phénoliques.

II.3. Les sources de variabilités des micronutriments de la patate douce

La patate douce comme tous les végétaux, présente une diversité de composition et de teneur en phytonutriments (caroténoïdes, composés phénoliques, etc.). Au-delà de la diversité entre espèces, de nombreuses sources de variations vont moduler ces teneurs au sein de chaque espèce. Les principales sources de variations sont d'ordre génétique (variétés, cultivars), des techniques culturales, des conditions environnementales et des conditions de conservation et de transformation après récolte. L'objectif de cette partie est d'identifier les principales sources de variation des phytonutriments de la patate et les leviers de contrôle pouvant conduire à moduler leurs concentrations. Il s'agit également de hiérarchiser l'impact des différentes sources de variation, bien que des interactions entre les différentes sources de variation compliquent le contrôle des teneurs.

II.3.1. Les sources de variations d'ordre génétique

La création de nouvelles variétés n'est possible que s'il y a variabilité génétique et héritabilité. De nombreuses études comparent la composition pour un (ou quelques) composé(s) chez plusieurs variétés cultivées dans les mêmes conditions. Ces études sont destinées à connaître la gamme de variation offerte aux consommateurs pour une espèce, mais aussi à identifier des géniteurs potentiels pour la sélection. La patate douce présente une grande variabilité génétique. En effet, on note plusieurs milliers de variétés de patate douce dans le monde ^[109]. À titre d'exemple, le Centre international de la pomme de terre (Centro Internacional de la Papa, CIP) de Lima, au Pérou, entretient la plus importante banque de gènes de patate douce au monde, qui comprend des milliers de variétés sauvages, traditionnelles et améliorées. Plusieurs travaux ont montré que les caroténoïdes, associés à des pigments colorés (β -carotène, zéaxanthine) sont très concentrés dans les variétés de patate à chair orange qu'à chair blanche ^[94, 98, 110]. Gabriela et *coll.* ^[34] ont quantifié les caroténoïdes totaux de plusieurs variétés de patate douce (voir tableau 3). Ils arrivent à la conclusion que la teneur en caroténoïdes augmente avec l'intensification de la couleur orange.

Tableau 3 : Teneur en caroténoïdes totaux des variétés de patate douce d'après Gabriela ^[34]

Numéro CIP (variété)	Couleur de la chair	Caroténoïdes totaux ($\mu\text{g}/100 \text{ g}$ de patate fraîche)
705821	Jaune pâle	305 ± 12
705172	Jaune pâle	373 ± 9
704393	Jaune	787 ± 37
701862	Jaune	833 ± 32
702472	Orange	1259 ± 42
705799	Orange	1578 ± 27
704218	Orange	1773 ± 93

II.3.2. Effet des techniques culturales

Plusieurs recherches s'intéressent aux effets des techniques culturales sur la qualité des fruits et légumes, la principale concernant la fertilisation étudiée seule ou, le plus souvent, en interaction (surtout dans le cas des cultures sous serre). Les composantes de la qualité considérées sont de façon générale les produits issus du métabolisme primaire (sucres, acides), beaucoup moins fréquemment ceux du métabolisme secondaire auxquels appartiennent les composés bioactifs (phénols, vitamines, etc.).

II.3.2.1. Fertilisation

On considère ici soit la fertilisation classique de type N, P, K, soit des apports de fumure organique (composts) mis en œuvre dans un objectif d'enrichissement de la culture. Jusqu'à récemment, les pratiques de fertilisation étaient essentiellement tournées vers l'obtention de rendements importants et ce n'est que depuis peu que l'on s'interroge sur les effets possibles des apports minéraux et organiques sur la qualité des produits.

La diversité des conditions expérimentales mises en œuvre, les interactions avec des facteurs non contrôlés, rendent souvent difficile l'établissement de lois générales. Les modes d'action des techniques étudiées ne sont pas pris en considération. Des expériences combinant l'apport de fertilisants minéraux (N, P, K) et irrigation ont été conduites par S. M. Laurie et coll. ^[110] sur deux variétés de patate douce à chair orange. Les résultats de cette étude (Tableau 4) montrent une augmentation des teneurs en caroténoïdes totaux avec l'apport de fertilisants.

Tableau 4 : Effet de l'apport de fertilisant sur la teneur en caroténoïdes totaux de la PDCO [110]

Apport de fertilisant	Teneur en caroténoïdes totaux
témoin (0 %)	133,7 ± 0.9
Intermédiaire (50 %)	153,1 ± 3.2
Élevé (100 %)	151,0 ± 4.9

0 % : pas de fertilisant ; 50 % : 75, 15 et 95 kg/ha de N, P et K respectivement ; 100 % : 150, 30 et 190 kg/ha de N, P et K respectivement

II.3.3. Effet des facteurs de l'environnement

La section précédente a montré le poids particulier des facteurs génétiques qui déterminent directement la teneur des composés présents chez la patate. Cependant, plusieurs travaux ont mis en évidence une influence des facteurs de l'environnement (au sens large), qu'il s'agisse de l'effet de facteurs isolés (température, rayonnement) ou de combinaisons complexes de facteurs (effet de l'année, effet de la région de production) sur la qualité des fruits et légumes. Dans la littérature, peu de travaux sur la patate s'intéressent à ce thème.

II.3.4. Conclusion

La bibliographie dans le domaine considéré est souvent disparate et il est difficile d'en tirer des conclusions définitives. Les techniques culturales ou les modes de production entraînent des variations dans la teneur en composés bioactifs mais les résultats sont souvent contradictoires et n'autorisent pas à tirer des lois générales. Les composés à valeur nutritionnelle sont des produits du métabolisme secondaire dont les interactions avec les facteurs de l'environnement (pris au sens large : facteurs physiques du milieu, interventions techniques sur la culture) sont complexes et encore mal connus contrairement à ce qui se passe pour le métabolisme primaire : ceci explique les résultats contradictoires trouvés dans la bibliographie.

III. Généralités sur les caroténoïdes

III.1. Définition des caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des molécules lipidiques appartenant à la famille des terpènes. Les terpènes représentent une grande classe de composés à fonctions très variées. L'appartenance à cette catégorie est alors établie sur les critères de structure et de biosynthèse. L'unité de base de ces structures est l'isoprène composé à 5 atomes de carbone (C₅). Les

terpènes sont issus de la condensation d'au moins deux isoprènes. La classification en monoterpène, diterpène ou tétraterpène dépend du nombre d'isoprène condensé. Les terpènes les plus connus sont ceux responsables du principe odoriférant des végétaux comme le limonène pour le citron, le menthol ou le camphre. Les caroténoïdes sont dans la catégorie des tétraterpènes, car généralement issus de la condensation de 8 unités C₅. Les caroténoïdes sont des composés à structure hydrocarbonée généralement composés de 40 atomes de carbone (structure en C₄₀), mais il existe aussi des structures en C₃₀ ou C₅₀. Les caroténoïdes hydrocarbonés appartiennent à la sous famille des carotènes.

Ils peuvent être modifiés par un groupement fonctionnel oxygéné, on parlera alors de xanthophylles [7]. Il existe une variété importante de caroténoïdes. On compte plus de 700 structures différentes [7]. Plusieurs éléments interviennent dans cette diversité :

- Tout d'abord le nombre de carbone constituant le squelette de la molécule peut varier de 30 à 50 avec une majorité pour les structures en C₄₀.
- Ensuite ces pigments peuvent être à structure linéaire ou cyclique. Les cycles, au nombre de un ou deux, se situent aux extrémités de la molécule.
- Le type de cycle rencontré sur ces structures est lui aussi variable, il peut s'agir de cycle β, ε ou aromatique (voir figure 29).

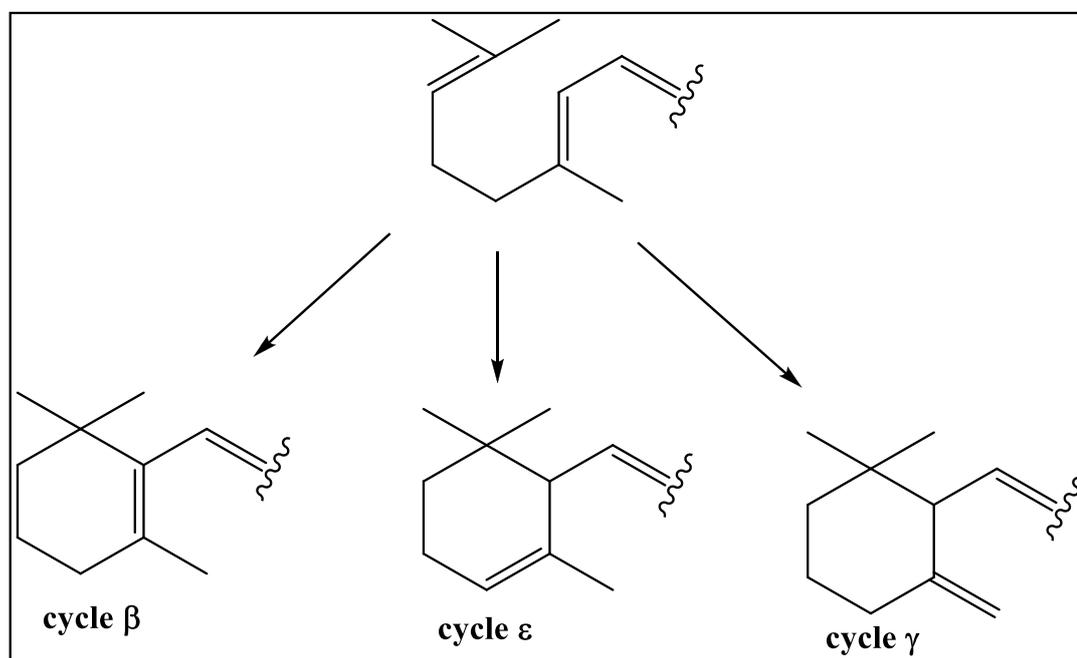


Figure 29 : Les différents cycles obtenus après cyclisation du lycopène

- Enfin le dernier élément permettant cette diversité de structure est la présence ou non d'atome d'oxygène dans la molécule. Ces atomes d'oxygène peuvent être présents sous forme de fonction hydroxyle, cétone, époxy ou méthoxy. Ils sont généralement

insérés aux extrémités de la molécule qu'elle soit à structure cyclique ou non. Les groupements hydroxyles des cycles β peuvent ensuite être glycosylés, phénomène observé avec la zéaxanthine chez *Erwinia herbicola* [7].

La couleur est l'élément caractéristique de ces molécules, elle peut varier du jaune au rouge. Ces molécules doivent leur couleur à leur système de doubles liaisons conjuguées créant un chromophore et permettant ainsi l'absorption de la lumière visible entre 400 nm et 500 nm. Le degré de conjugaison du chromophore détermine les caractéristiques d'absorption du caroténoïde [7]. Il faut un minimum de 7 doubles liaisons conjuguées à un composé pour absorber la lumière visible (cas du ζ -carotène). Au-delà de 7, plus le nombre de double liaison conjuguée est important plus le λ_{\max} (longueur d'onde d'absorbance maximale) du caroténoïde est grand et plus sa couleur tend vers le rouge foncé. La figure 30 montre les structures des caroténoïdes généralement rencontrés dans l'alimentation humaine.

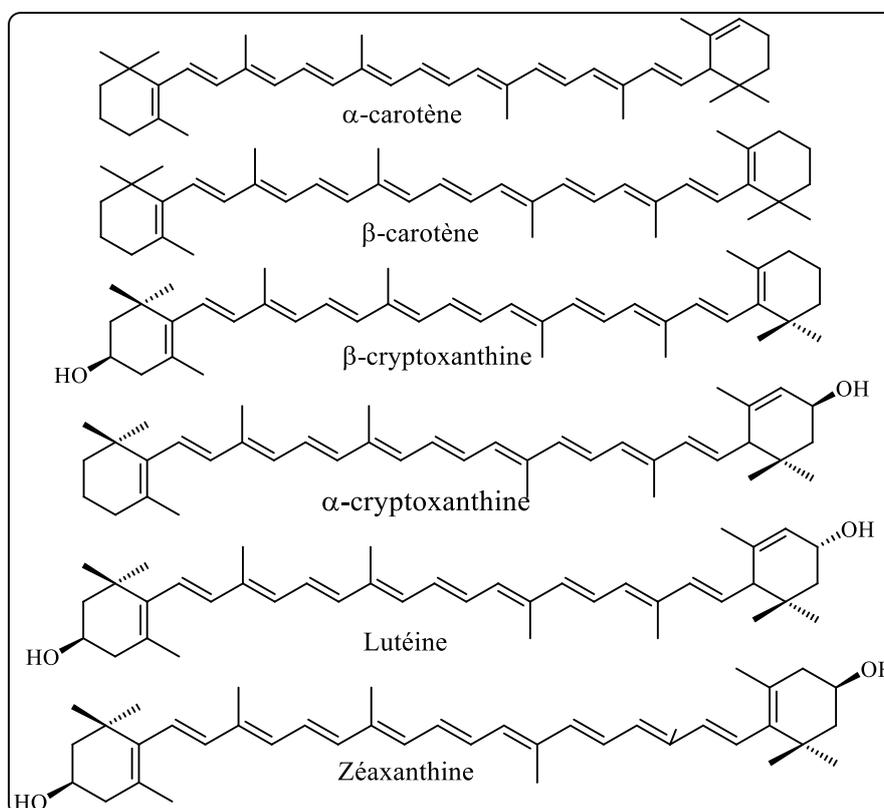


Figure 30 : Structures de quelques caroténoïdes

III.2. Fonctions Biologiques

Chez les organismes photosynthétiques, les caroténoïdes permettent le transfert de l'énergie lumineuse à la chlorophylle. La photosynthèse est alors efficace sur un plus large éventail de longueurs d'onde. Pour expliquer leur biosynthèse par des organismes non photosynthétiques, on suggère un rôle de régulation de la fluidité membranaire. Mais l'intérêt

de ces pigments tient également à leurs propriétés antioxydantes [7]. Leur structure permet de piéger les espèces réactives de l'oxygène, protégeant ainsi la cellule. Cet effet antioxydant présente un avantage pour toutes les espèces aérobies, qu'elles soient ou non photosynthétiques.

Certains caroténoïdes sont des éléments nutritifs importants pour l'homme et les animaux puisqu'ils servent de précurseurs à la vitamine A, le rétinol. En effet, la première étape dans la formation du rétinol est le clivage de la double liaison centrale du β -carotène, ce qui permet l'obtention de deux molécules de rétinol qui, après réduction, donneront la vitamine A [7, 112]. En outre, les caroténoïdes seraient également impliqués dans la prévention de certaines maladies. Leur effet bénéfique a été montré dans les maladies de l'œil, dont la DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge), les maladies cardiovasculaires, certains cancers et l'érythème induit par la lumière. L'action des caroténoïdes dans la prévention de ces maladies serait liée à leur pouvoir antioxydant.

Enfin les caroténoïdes auraient un rôle dans la régulation du système immunitaire et dans la protection de la stabilité génomique [7, 112, 113].

III.3. Techniques générales appliquées à l'étude des caroténoïdes

III.3.1. Extraction

Les caroténoïdes sont des substances lipophiles. Ils sont donc solubles dans les solvants organiques comme l'acétone, le *n*-hexane, le tétrahydrofurane (THF), l'éthanol (EtOH), le méthanol (MeOH) [113]. C'est également le cas des systèmes de solvants comme le DCM-MeOH (6 : 1, v/v), acétone-éther de pétrole (50 : 50, v/v), *n*-hexane-acétate d'éthyle (85 : 15, v/v) ou encore EtOH-hexane (4 : 3, v/v) [113]. L'extraction consiste donc à épuiser le matériel végétal broyé par un solvant organique pur ou un système de solvants organiques cités plus haut. L'extraction des caroténoïdes doit se faire dans un intervalle de temps court pour éviter leur exposition à la lumière et à l'oxygène, dans le but de minimiser l'autooxydation et l'isomérisation *cis-trans* de ces composés [113]. Les métaux de transition comme le fer, le cuivre, reconnus pour leur effet pro-oxydant, tout comme les températures élevées doivent être évités pour préserver les structures des caroténoïdes pendant l'extraction [113-115]. L'étape suivante dans l'extraction est la filtration de l'extrait brut. L'expérience est répétée au moins deux fois, jusqu'à l'épuisement total du matériel végétal. Les différents filtrats sont regroupés puis concentrés au rotavapor à une température inférieure à 40 °C et à l'abri de la lumière.

III.3.2. Saponification

Généralement, après l'extraction du matériel végétal, la saponification alcaline est la deuxième étape dans le protocole de détermination des caroténoïdes [116]. Les caroténoïdes dans les fruits et les légumes sont principalement estérifiés par des acides gras. En outre, le degré d'estérification varie en fonction du nombre de groupements hydroxyle présents dans les xanthophylles. On rencontre donc les caroténoïdes mono esters (telle que la β -cryptoxanthine) et les di esters (la lutéine et la zéaxanthine). Ainsi, l'analyse des profils chromatographiques de ces caroténoïdes estérifiés peut s'avérer difficile. Pour simplifier la séparation et dans le souci de débarrasser l'extrait des traces de chlorophylle, la plupart des méthodes d'analyse quantitative des caroténoïdes sont précédées d'une phase de saponification [117].

En général, la saponification est effectuée dans une solution de KOH : solution aqueuse, méthanolique ou éthanolique, et la concentration peut varier de 10 à 60 % (m/v) [116]. Les conditions dans lesquelles la saponification est mise en œuvre peut être à la température ambiante pendant 3 à 24 heures ou sous chauffage qui permet de réduire le temps de la réaction [116]. Après la saponification, l'échantillon est extrait avec de l'éther de diéthyle ou de l'hexane, puis l'extrait est lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée jusqu'à ce que tout le KOH soit éliminé.

III.3.3. Analyse structurale des caroténoïdes par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une méthode physico-chimique appliquée, entre autre à la détermination des structures des composés organiques. Elle permet d'accéder à la masse moléculaire d'une substance et apporte des informations structurales par le biais de l'étude des fragments moléculaires engendrés [116, 118].

Parmi les méthodes analytiques, la spectrométrie de masse (MS) occupe une place privilégiée grâce à ses caractéristiques : méthode hautement sensible (détection de composés à l'état de traces en quantité inférieure au milligramme), spécifique, applicable à des mélanges complexes, combinable à de nombreuses techniques chromatographiques et possédant une grande variété d'applications (analyses chimiques qualitatives et quantitatives, interaction entre molécules, biomédecine, etc.) [118, 119].

Note. Dans cette partie, nous nous intéresserons essentiellement aux caroténoïdes les plus fréquemment rencontrés et notamment dans le cadre de nos travaux.

III.3.2.1. Le couplage chromatographie-spectrométrie de masse

Ce sont surtout les possibilités de couplage avec des techniques chromatographiques qui ont fait le succès de l'analyse par MS des caroténoïdes [116, 118]. La chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) est très peu utilisée pour l'analyse des caroténoïdes à cause de leur instabilité inhérente et leur très faible volatilité. Avec le développement des sources d'ionisation à pression atmosphérique (APCI, ESI), le couplage de la chromatographie liquide et de la spectrométrie de masse (LC-MS) (figure 31) est devenu la technique la plus efficace et de ce fait la plus utilisée pour l'analyse des caroténoïdes dans des mélanges complexes (facilité de mise en œuvre et disponibilité d'appareils de routine performants et abordables). Les techniques de couplage sont plébiscitées car ne nécessitant pas d'étapes de purification préalable des composés, elles représentent un gain de temps important surtout lorsque les quantités d'échantillons disponibles sont faibles [116, 118]. Il existe de nombreux exemples de l'application de cette technique pour l'analyse de mélanges de produits naturels complexes et, en particulier, de mélanges de caroténoïdes [116, 118, 120, 121].



Figure 31 : Chromatographie liquide et la spectrométrie de masse (LC-MS)

III.3.2.2. Les différentes techniques d'ionisation en spectrométrie de masse

Différentes techniques d'ionisation existent dont les plus récentes sont les techniques d'ionisation douces que sont l'électrospray (ESI : electro spray ionization) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI : atmospheric pressure chemical ionization). Les caroténoïdes ont été largement étudiés en spectrométrie de masse [121]. Ces techniques, de

sensibilité comparable (détection de composés à l'état de traces), produisent des ions pseudomoléculaires abondants. Pendant que ESI produit principalement des ions moléculaires présentant peu de fragmentation, APCI produit des ions pseudo-moléculaires et/ou des ions moléculaires protonés ou deprotonés et éventuellement aussi d'autres ions fragments tels que $[M+H-H_2O]^+$ $[M+H-2H_2O]^+$ en fonction de la structure, en particulier pour les xanthophylles [122] (figure 32).

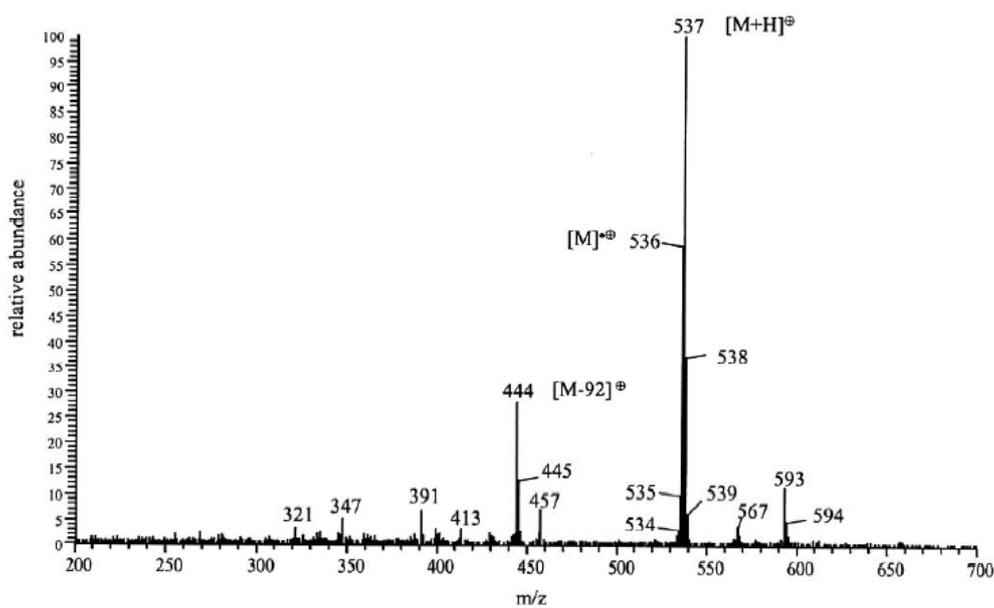


Figure 32 : Spectre de masse APCI de l'ion positif du β -carotène [122]

ESI-MS/MS a été développé pour l'identification des caroténoïdes oxydés dans les échantillons biologiques [123, 124]. Après une dissociation induite par collision des ions pseudo-moléculaires $[M+H]^+$ de caroténoïdes, un certain nombre d'ions caractéristiques sont produits.

Clarke et *coll.* [122, 123] ont rapporté l'utilisation de LC-MS/APCI pour l'analyse de neuf caroténoïdes (néoxanthine, violaxanthine, anthéroxanthine, lutéine, zéaxanthine, β -cryptoxanthine, lycopène, α -carotène et le β -carotène) dans des échantillons alimentaires au Royaume-Uni. Sept des composés identifiés dans cette étude ont produit des ions pseudo-moléculaires comme pics de base tandis que la néoxanthine et la lutéine ont produit des ions fragments résultant de la perte d'eau comme pics de base. Ces deux composés ont montré également des fragments $[M+H-2H_2O]^+$ importants. Des ions pseudo-moléculaires non protonés n'ont pas été observés dans les conditions APCI mais plutôt à l'aide de ESI.

Ces études ont permis d'établir des schémas de fragmentation de ces composés dans le but de pouvoir les identifier dans un extrait brut sans avoir à les isoler [125].

Ainsi, l'introduction de la LC/MS dans l'analyse des extraits de plante représente une étape importante dans l'identification des produits naturels [125]. C'est la technique de choix pour

caractériser rapidement sans séparation chimique les éléments d'un mélange de composés naturels pour savoir s'ils sont connus ou non.

Jusqu'à un passé récent, après migration, le spot est gratté de la plaque TLC/HPTLC, élué dans un tube et transféré dans le spectre de masse. Maintenant des interfaces TLC-MS très pratiques et universelles sont disponibles et peuvent automatiquement extraire sélectivement les spots sur la plaque TLC/HPTLC et les diriger en ligne dans les systèmes HPLC-MS selon le modèle et la technique (APCI-MS, APPI-MS ou ESI-MS).

Conclusion

Il existe de nos jours plusieurs milliers de variétés de patate douce. Les variétés à chair orange sont particulièrement riches en caroténoïdes comme le β -carotène, précurseur de la vitamine A. Les caroténoïdes et les polyphénols des plantes ont des teneurs variables en fonction des facteurs environnementaux et culturels.

Nous avons essayé de montrer que la spectrométrie de masse peut apporter une grande contribution à l'identification structurale des caroténoïdes. Ce puissant outil d'analyse, hautement sensible et permettant des déterminations structurales sans isolement des composés, est un atout pour identifier les métabolites secondaires dans les extraits végétaux. De nos jours, de nouveaux développements ont élargi son champ d'application (détection et quantification de substances en milieu biologique, étude des interactions entre molécules, étude des métabolisations... [116, 118]).

Bien que la spectrométrie de masse ait connu des avancées spectaculaires au cours de ces dernières années, elle demeure insuffisante pour l'identification de nouvelles structures caroténoïdiques. Toutefois, cette technique est un préalable indispensable aux techniques de RMN multidimensionnelles.

DEUXIÈME PARTIE :

RÉSULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE I : DOSAGE DES CAROTENOÏDES ET DES POLYPHENOLS TOTAUX DE HUIT VARIETES DE PDCO

Introduction

Le développement des aliments fonctionnels (ceux qui en plus de nous nourrir, pourraient prévenir nos maux et même les guérir), est l'une des grandes tendances en science et technologie alimentaire. Des études récentes ont été centrées plus spécifiquement sur les bénéfices en matière de santé qu'offrent les ingrédients alimentaires d'origine végétale, à savoir les stérols, les caroténoïdes et les polyphénols ^[126].

Les caroténoïdes et les polyphénols sont des composés bioactifs, très répandus dans le monde végétal et contribuent de manière significative aux processus physiologiques des végétaux comme la croissance cellulaire, la germination, la maturation ou la coloration des fruits, fleurs et légumes ^[3]. L'étude de ces composés a connu un intérêt particulier ces dernières décennies en raison de leurs propriétés antioxydantes. En effet, de nombreuses études ont révélé que ces composés possèdent une activité antioxydante due principalement à leur grande réactivité vis-à-vis des radicaux libres dans l'organisme ^[4-8]. Ces effets bénéfiques expliquent donc le grand intérêt des chercheurs à orienter leurs efforts dans la recherche de nouvelles molécules naturelles en remplacement des colorants alimentaires d'origine synthétique.

Au Burkina Faso, certaines plantes peu consommées se révèlent être très riches en composés bioactifs. C'est le cas de la patate douce, surtout les variétés à chair colorée, qui renferme des substances phytochimiques potentiellement bioactives, telles que l'acide caféique, l'acide 5-caféoylquinique (5-CQA, l'acide chlorogénique), di-et tri-CQA, les flavonoïdes et les caroténoïdes ^[2].

L'objectif du travail de recherche de cette première partie est la quantification des caroténoïdes et des polyphénols de plusieurs variétés de PDCO cultivées au Burkina Faso ainsi qu'à l'évaluation de leur potentiel antioxydant. Pour ce faire, trois méthodes sont utilisées à savoir les méthode FRAP, DPPH et de l'ABTS pour l'évaluation de l'activité antioxydante. La méthode qui présente la meilleure corrélation entre le potentiel antioxydant et les caroténoïdes totaux d'une part, et les polyphénols d'autre part, est choisie pour la suite des travaux.

I. MATÉRIEL ET MÉTHODES

I.1. Matériel végétal

Dans cette première partie, les huit variétés de patate douce qui ont fait l'objet de notre étude proviennent de deux sources :

- ✓ Les variétés TIB-440060 et Caromex à chair orange sont introduites du CIP-Afrique de l'Est comme source de bêta-carotène (provitamine A) [198, 127]. Mais ces deux variétés s'adaptent difficilement au contexte agro-écologique du Burkina Faso.
- ✓ Les six autres variétés : BF82xCIP-13 ; BF82xCIP-18 ; BF82xTIB-4 ; BF82xTIB-6 ; BF92xResisto-14 ; BF92xCIP-6 à chair orange ont été développées par hybridation à l'Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA) à partir de parents à chair orange introduits (TIB-440060, Resisto, CIP-199260-1) non adaptés au contexte environnemental local qui ont été croisés à des cultivars locaux (BF82 et BF92) bien adaptés mais pauvres en provitamine A [127]. Ces six variétés ont été développées dans le but de disposer de variétés de patate douce à chair orange riches en bêta-carotène et adaptées au contexte agro-écologique du Burkina Faso pouvant être utilisées dans la lutte contre les malnutritions récurrentes surtout chez la mère et chez l'enfant.

I.2. Détermination de la quantité de matière sèche

L'objectif est de déterminer la quantité de matière sèche sur une masse (M_1) de patate fraîche d'une variété donnée. Pour effectuer cette mesure, on épluche les patates puis on les sèche au laboratoire. Au bout de vingt jours, la masse constante (M_2) de la patate sèche est obtenue à l'aide d'une balance de précision. La quantité de matière sèche est enfin déterminée par la formule suivante :

$$\text{Matière sèche \%} = \left(1 - \frac{M_2}{M_1}\right) \times 100 \quad [128]$$

Les échantillons sont alors scellés dans des plastiques sous vide à l'aide d'un soude-sac à vide d'air.

I.3. Extraction et dosage des composés phénoliques et des caroténoïdes

I.3.1. Extraction

Trois (3) grammes de chaque échantillon de PDCO sont extraits par macération à 4 °C pendant 24 heures avec 10 mL de chacun des systèmes de solvants suivants : acétone-eau-

acide acétique (70 : 29,5 : 0,5 v/v) [129] pour les dosages des teneurs en antioxydants (TAO) et des taux de polyphénols totaux (TPP) et acétone-hexane (50 : 50 v/v) [130] pour le dosage des caroténoïdes totaux. Après agitation vigoureuse au vortex pendant 30 minutes, les extraits sont soigneusement filtrés sous pression réduite sur du papier Whatman n°1 et les résidus sont de nouveau extraits deux fois avec 3 mL de solvant pendant 24 heures à 4 °C. Les filtrats sont conservés au réfrigérateur à 4 °C à l'abri de la lumière et de l'oxygène pour les mesures ultérieures.

I.3.2. Évaluation de la teneur en caroténoïdes totaux

Les teneurs en caroténoïdes totaux des extraits de PDCO sont évaluées suivant la méthode décrite par McMurry et ses collaborateurs [131, 132] mais légèrement modifiée. Après une dilution convenable, les absorbances des extraits conservés à la température ambiante et à l'abri de la lumière, sont lues à 450 nm. Les teneurs en caroténoïdes totaux sont obtenues en rapportant les absorbances des extraits sur une courbe-étalon ($y = 25,56x + 0,016$; $R^2 = 0,999$) établie en utilisant le β -carotène comme standard (figure 33). Les teneurs en caroténoïdes sont exprimées en équivalents de β -carotène par gramme d'échantillon (EBC/g). Toutes les mesures sont réalisées trois fois.

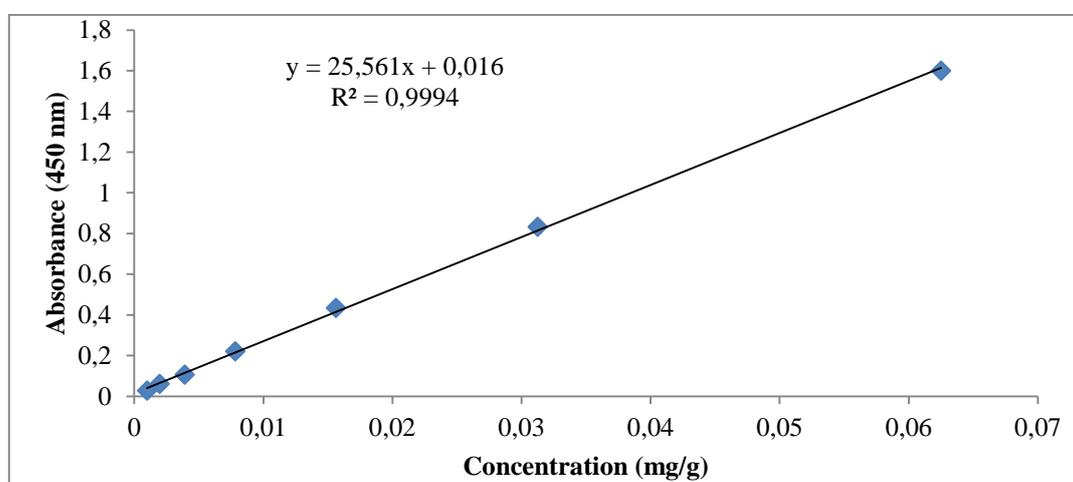


Figure 33 : Courbe-étalon du β -carotène

I.3.3. Évaluation des teneurs en composés phénoliques (TCP)

Les teneurs en composés phénoliques des extraits sont déterminées en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu (RFC) [133]. Environ 60 μ L d'extrait sont mélangés avec 60 μ L de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dix fois. Le mélange est laissé à la température ambiante pendant huit minutes pour permettre la réaction complète du réactif de Folin-Ciocalteu sur les substances oxydables ou sur les phénolates. On y a ajouté ensuite 120 μ L de Na_2CO_3 (7,5 %

dans l'eau) pour neutraliser les réactifs résiduels. Les absorbances des extraits ont été mesurées à 765 nm avec une microplaque en quartz 96 puits (spectrophotomètre MP96, SAFAS) après incubation pendant 30 minutes à 37 °C.

En utilisant l'acide gallique comme référence, une courbe d'étalonnage est établie (figure 34). Les résultats, déterminés à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage ($y = 46,41x + 0,063$, $R^2 = 0,998$), sont exprimés en mg d'Equivalent d'acide gallique (EAG) par gramme de matériel végétal. Toutes les mesures sont répétées trois fois.

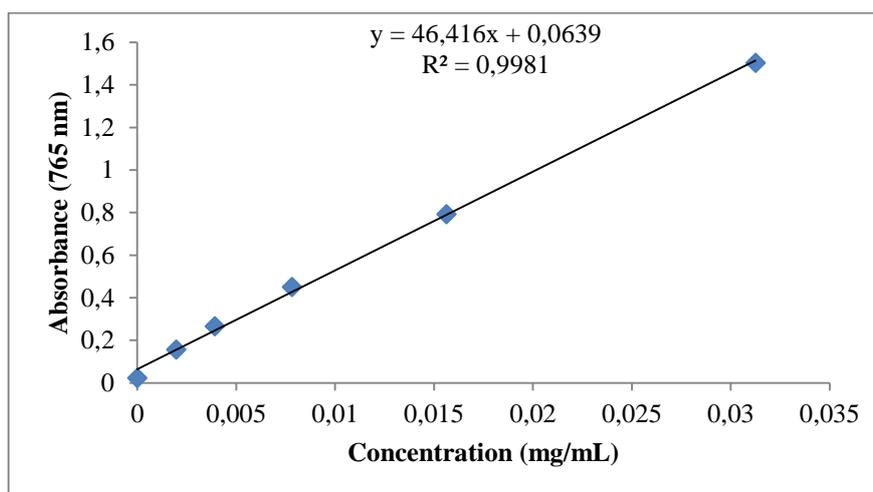


Figure 34 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (AG)

I.3.4. Évaluation des activités antioxydantes (AAO)

Les activités antioxydantes des extraits de PDCO sont déterminées par trois méthodes, à savoir les méthodes FRAP, DPPH et TEAC.

I.3.4.1. Évaluation des AAO par la méthode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Dans cette méthode, un sel ferrique, le Fe(III) (TPTZ)₂Cl₃ (TPTZ = 2,4,6-tripyridyl-s-triazine) est utilisé comme oxydant [82, 83]. Il est préparé en mélangeant 1 mL TPTZ (1 mL, 10 mM dans 40 mM de HCl), 10 mL d'une solution tampon d'acétate de sodium (pH = 3,6) et 1 mL de solution de Fe(III), 7 H₂O. Environ 30 µL d'eau distillée est mélangée avec 20 µL d'extrait, on y ajoute ensuite 200 µL de solution FRAP. On mesure l'absorbance de la recoloration en bleue intense à 593 nm avec le lecteur microplaque (spectrophotomètre MP96, SAFAS) environ 10 minutes après.

Pour cela on établit d'abord une courbe d'étalonnage (figure 35) en utilisant le trolox comme antioxydant de référence. Les résultats, déterminés à partir de l'équation de la courbe

d'étalonnage ($y = 28,67x + 0,066$; $R^2 = 0,999$), ont été exprimés en mg d'Equivalent de trolox (ET) par gramme de matériel végétal. Toutes les mesures sont répétées trois fois.

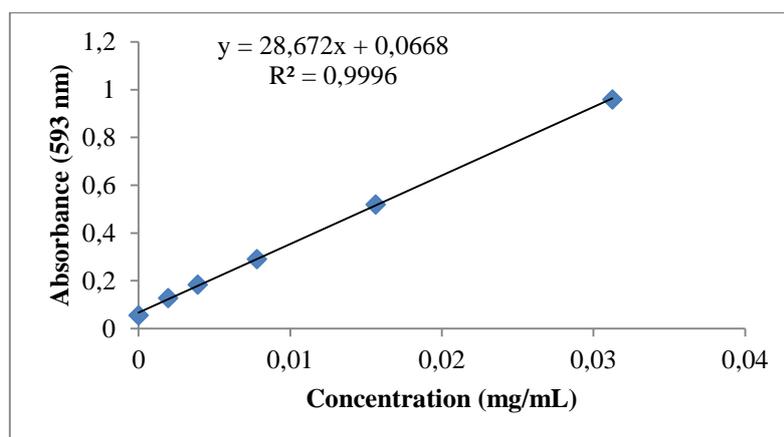


Figure 35 : Courbe d'étalonnage de trolox par la méthode FRAP.

I.3.4.2. Évaluation des AAO par la méthode au DPPH

Cette méthode permet d'évaluer les propriétés antioxydantes d'un composé [137]. Le radical DPPH est dissout dans du méthanol (2 mg/50 mL). On établit une courbe d'étalonnage (figure 36) en utilisant le trolox comme référence. On mélange 50 μ L de trolox avec 200 μ L de solution de DPPH. Le mélange est agité vigoureusement puis conservé à température ambiante et à l'abri de la lumière. La décroissance des absorbances à 517 nm est mesurée en utilisant le spectrophotomètre microplaque MP96, SAFAS. On détermine donc l'activité antioxydante des extraits en rapportant les absorbances sur la courbe d'étalonnage (Figure 36) d'équation ($y = -23,26x + 0,677$, $R^2 = 0,999$). Les AAO sont exprimées en mg d'Equivalent de trolox (ET) par gramme de matériel végétal. Toutes les mesures ont été réalisées trois fois.

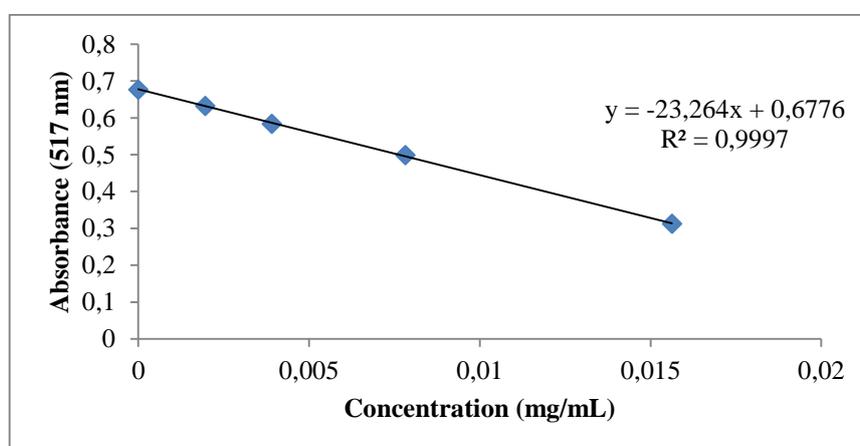


Figure 36 : Courbe d'étalonnage de trolox par la méthode de DPPH.

I.3.4.2. Évaluation des AAO par la méthode à l'ABTS (*Trolox Equivalent Antioxydant Capacity*)

Le trolox est utilisé comme référence. On établit d'abord une courbe d'étalonnage. Pour cela, on mélange 50 μL de trolox avec 200 μL de réactif ABTS. Le mélange est vigoureusement agité et gardé à la température ambiante à l'abri de la lumière. La décroissance des absorbances à 734 nm est mesurée en utilisant le spectrophotomètre microplaque MP96, SAFAS. On détermine donc l'activité antioxydante des extraits en rapportant les absorbances sur la courbe d'étalonnage ($y = -25,20x + 0,567$, $R^2 = 0,996$) (Figure 37). Les AAO sont exprimées en mg d'Equivalent de trolox (ET) par gramme de matériel végétal. Toutes les mesures ont été réalisées trois fois.

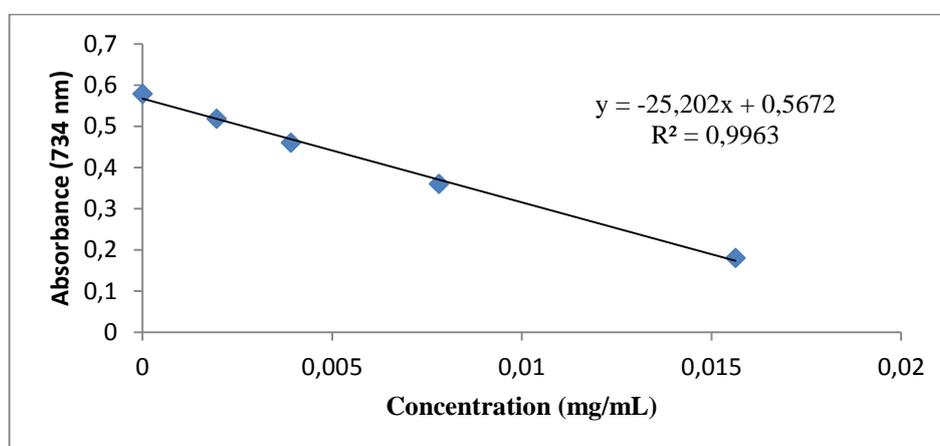


Figure 37 : Courbe d'étalonnage de trolox par la méthode à l'ABTS.

II. Résultats et discussion

II.1. Détermination des teneurs en caroténoïdes, en composés phénoliques et l'activité antioxydante

Dans le but de déterminer les paramètres descriptifs qui aideront à mieux identifier les variétés de PDCO, les teneurs en caroténoïdes, en polyphénols et l'activité antioxydante des extraits des huit cultivars ont été évaluées.

II.1.2. Les teneurs en caroténoïdes

Les caroténoïdes totaux (TCT) des huit (08) variétés de (PDCO) sont présentés dans le tableau 5. Elles sont exprimées en μg d'équivalent de β -carotène par gramme de poids sec (μg

EBC/g de poids sec). Cependant, elles peuvent être exprimées aussi en fonction du poids frais parce que généralement le produit est commercialisé et consommé frais.

Tableau 5 : Teneurs en caroténoïdes totaux des variétés de (PDCO)

Variétés	TCT (μg d'EBC/g de poids sec)
TIB-440060	$72 \pm 0,0006^{\text{b}}$
BF92xResisto-14	$180 \pm 0,0004^{\text{f}}$
BF92xCIP-6	$132 \pm 0,0038^{\text{e}}$
BF82xTIB-6	$75 \pm 0,0024^{\text{b}}$
BF82xCIP-13	$115 \pm 0,0005^{\text{c}}$
BF82xTIB-4	$16 \pm 0,0007^{\text{d}}$
BF82xCIP-18	$24 \pm 0,0002^{\text{a}}$
Caromex	$68 \pm 0,0004^{\text{b}}$

Les résultats des teneurs en caroténoïdes totaux sont exprimés sous la forme moyenne \pm écart-type. Les comparaisons multiples entre les variétés sont effectuées par le "multivariate analysis de Genstat version 14". Les moyennes dans chaque colonne suivies par une lettre différente sont significativement différentes ($P < 0,05$).

Le caroténoïde majoritaire de la PDCO est le *trans*- β -carotène, mais il existe aussi d'autres caroténoïdes tels que α -carotène, y compris toutes les formes *trans* et *cis* [95, 134-137]. Toutefois, compte tenu des objectifs de notre étude, la détermination des caroténoïdes totaux en équivalence de β -carotène, qui a déjà été rapporté dans la littérature, est une méthode acceptable qui donne une bonne estimation de l'ensemble des caroténoïdes puisque 90 % de la teneur en caroténoïdes totaux de la PDCO est constitué de β -carotène [95].

L'analyse des variances effectuées en utilisant le logiciel statistique Genstat version 14 a permis d'effectuer les comparaisons des huit variétés de PDCO. Les résultats montrent une grande variabilité des TCT des extraits de PDCO, de 16 à 180 μg EBC/g de poids sec (respectivement pour les variétés BF82xTIB-4 et BF92xResisto-14) soit une augmentation de près de 11 fois des teneurs en caroténoïdes totaux comparée aux variétés TIB-440060 et Caromex introduites (tableau 5 et figure 38).

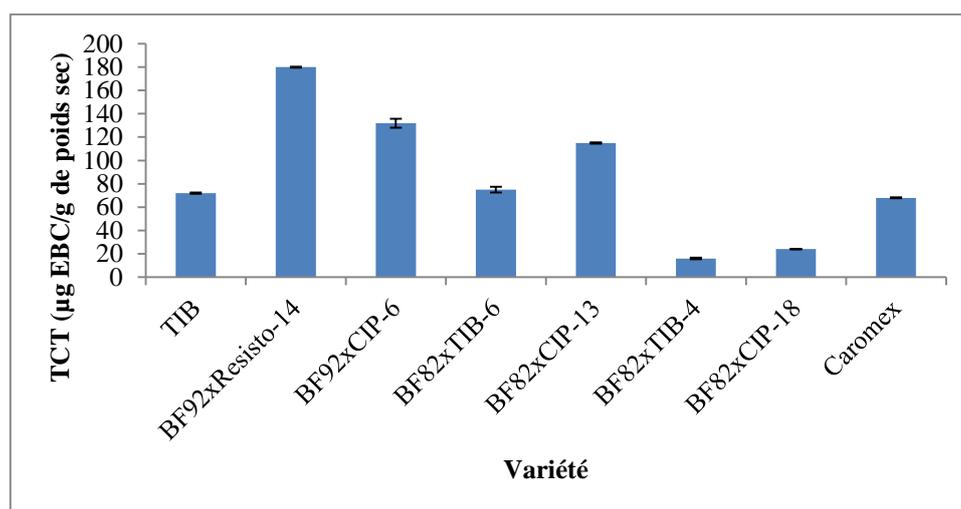


Figure 38 : Histogramme comparatif des TCT ($\mu\text{g EBC/g}$) des variétés croisées de PDCO.

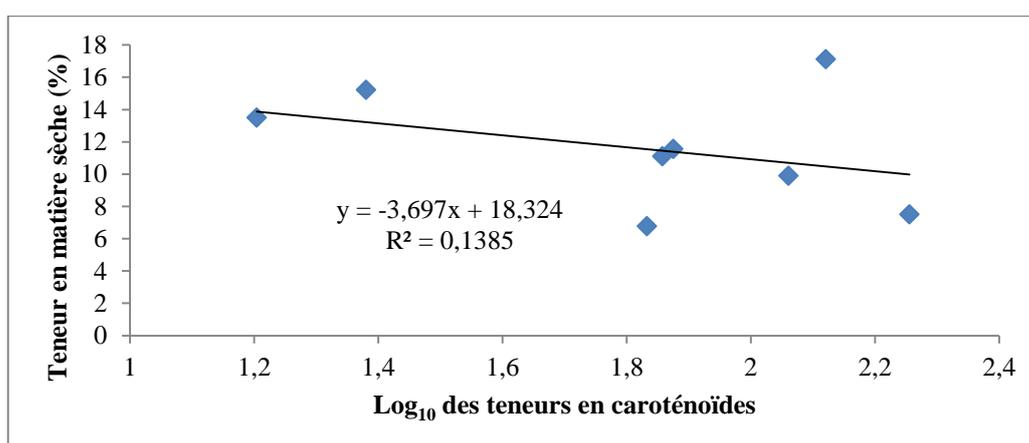
II.1.3. Teneur en matière sèche

Les teneurs en matière sèche (TMS) ont été évaluées parce qu'il est rapporté qu'en Afrique, les consommateurs ont une préférence pour les variétés de patate qui présentent une matière sèche élevée [95, 138, 139]. L'un des défis majeur est de développer des variétés « *biofortifiées* » (riches en caroténoïdes provitamines A) mais qui présentent aussi des teneurs en MS élevées. Le tableau 6 présente les résultats obtenus à partir de la mesure de la TMS des huit variétés de PDCO étudiées. Les TMS déterminées sont supérieures à la teneur moyenne dans la PDCO rencontré dans la littérature qui est de l'ordre de 20 à 30 % [140]. Les variétés introduites (Caromex et TIB-440 060) ont les plus fortes teneurs en TMS (respectivement 44 et 71 %). Sauf le BF92XCIP-6 (28,61 %), toutes les variétés hybrides ont une TMS moyenne d'environ 38 %, supérieure à la valeur moyenne dans la littérature. En général, le niveau élevé de la teneur en eau (TMS faible) est associée à une grande perte des tubercules lors du stockage de la PDCO. Ces croisements ont fourni des variétés hybrides moins périssables.

Par ailleurs, en 2012, Keith Tomlins et *coll.* [95] avaient souligné qu'en général, la teneur en matière sèche de la patate douce diminue avec l'augmentation de la teneur en caroténoïdes. On note une très faible corrélation ($R = 0,372$) entre le logarithme de la teneur en caroténoïdes et les teneurs en matière sèche des extraits de PDCO (figure 39). Hagenimana et *coll.* (1998) [141] avaient rapporté qu'il y a très peu de relation qui existe entre la teneur en caroténoïdes totaux et la teneur en matière sèche des patates douces à chair orange, en dehors de la différence des teneurs en caroténoïdes liées à la couleur de leur chair.

Tableau 6 : Teneur en matière sèche de huit variétés de PDCO

Variété	Teneur en matière sèche (%)
BF82 X CIP-13	44,25
BF82 X CIP-18	35,63
BF82 X TIB-4	37,17
BF82 X TIB-6	37,02
BF92 X CIP-6	28,61
BF92 X Resisto-14	36,97
TIB-440060	43,94
Caromex	72,84

**Figure 39 :** Relations entre la matière sèche (%) et le logarithme des TCT.

II.1.4. Les teneurs en composés phénoliques des extraits de PDCO

Les extraits de PDCO analysés par la méthode de Folin-Ciocalteu présentent une large gamme de teneurs en composés phénoliques comme le montre le tableau 7 et sont exprimés en milligramme (mg) d'équivalent d'acide gallique (AG) par gramme de poids sec. Ces teneurs en composés phénoliques (TCP) ont été analysées statistiquement en utilisant la version 14 du logiciel statistique Genstat. Des différences significatives ont été observées ($P < 0,05$) entre les extraits des huit variétés de PDCO étudiés. En effet, elles varient de 1,06 (BF82xTIB-4) à 2,43 mg d'équivalents d'acide gallique (EAG)/g de poids sec (BF92xResisto-14), ce qui représente une variation d'environ 2 fois (tableau 7, figure 40). Les variétés les

plus riches en TCP sont BF92xResisto-14 et BF92xCIP-6 avec des teneurs d'environ 2,43 et 2,30 mg d'EAG par gramme de poids sec respectivement. BF82xTIB-4 et BF82xTIB-6 ont les plus faibles TCP respectives 1,06 et 1,18 (mg d'EAG/g de poids sec) (Tableau 7, Figure 40). En outre, les variétés introduites TIB440060 et Caromex ont des teneurs en composés phénoliques assez moyennes respectivement 1,37 et 1,45 mg de EAG par gramme de poids sec comparées aux plus fortes teneurs (entre 2,30 et 2,43) et aux plus faibles (de 1,06 à 1,18) observées sur les variétés nouvellement développées par croisement.

Tableau 7 : Teneurs en composés phénoliques des variétés de (PDCO)

Variétés	TCP (mg d'EAG/g de poids sec)
TIB-440060	1,37±0,089 ^{bc}
BF92xResisto-14	2,43±0,009 ^d
BF92xCIP-6	2,26±0,018 ^d
BF82xTIB-6	1,18±0,005 ^{ab}
BF82xCIP-13	1,25±0,067 ^b
BF82xTIB-4	1,06±0,033 ^a
BF82xCIP-18	1,43±0,035 ^c
Caromex	1,45±0,013 ^c

Les résultats des teneurs en composés phénoliques sont exprimés sous la forme moyenne \pm écart-type. Les comparaisons multiples entre les variétés sont effectuées par le " multivariate analysis de Genstat version 14". Les moyennes dans chaque colonne suivies par une lettre différente sont significativement différentes ($P < 0,05$).

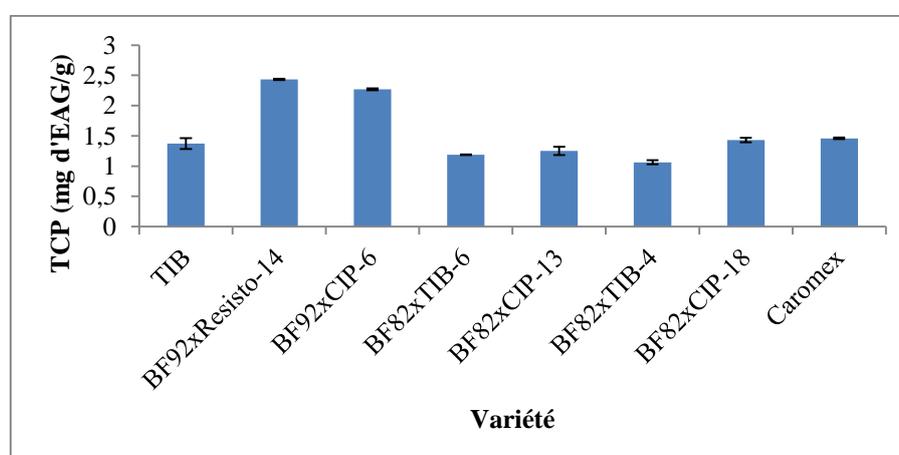


Figure 40 : Histogramme comparatif des TCP (mg d'EAG/g) des variétés de PDCO

II.1.5. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de PDCO

La capacité de piégeage des radicaux libres des extraits de PDCO est déterminée à l'aide de trois méthodes à savoir le DPPH, ABTS et FRAP. Les résultats sont consignés dans le tableau 8 et sont exprimés en milligramme (mg) d'équivalent de trolox par gramme de poids sec (mg d'ET/g de poids sec). L'analyse statistique (ANOVA : *analysis of variance*) des activités antioxydantes des extraits de PDCO montre que les différences des activités ne sont significatives que sur certaines variétés ($P > 0,05$).

Tableau 8 : Teneurs en antioxydants des variétés de (PDCO)

Variétés	AAO (mg d'équivalent de trolox par gramme de poids sec)		
	FRAP	DPPH	ABTS
TIB-440060	1,78±0,04 ^{bc'}	2,09±0,007 ^E	0,4±0,025 ^{C'}
BF92xResisto-14	4,12±0,04 ^{e'}	3,52±0,012 ^G	0,66±0,023 ^{E'}
BF92xCIP-6	3,04±0,07 ^{d'}	2,53±0,012 ^F	0,57±0,020 ^{D'}
BF82xTIB-6	1,85±0,07 ^{c'}	1,69±0,034 ^D	0,18±0,033 ^{A'B'}
BF82xCIP-13	1,62±0,01 ^{b'}	1,49±0,022 ^B	0,12±0,021 ^{A'}
BF82xTIB-4	1,07±0,04 ^{a'}	1,37±0,025 ^A	0,24±0,008 ^{B'}
BF82xCIP-18	1,77±0,02 ^{bc'}	1,56±0,013 ^{BC}	0,18±0,020 ^{A'B'}
Caromex	1,71±0,04 ^{bc'}	1,62±0,021 ^C	0,22±0,024 ^{B'}

Les résultats des teneurs en antioxydants sont exprimés sous la forme moyenne ± écart-type. Les comparaisons multiples entre les variétés sont effectuées par le "multivariate analysis de Genstat version 14". Les moyennes dans chaque colonne suivies par une lettre différente sont significativement différentes ($P < 0,05$).

Les activités antioxydantes des extraits de PDCO, évaluées par le radical DPPH, varient de 1,37 à 3,52 mg d'ET/g de poids sec, soit une variation de 3 fois (tableau 8, figure 41). En effet, l'extrait de la variété BF92xResisto-14 présente la grande activité antioxydante (3,528 mg d'ET/g de poids sec) suivi de l'extrait de la BF92xCIP-6 (2,531 mg d'ET/g de poids sec). En revanche, la variété BF82xTIB-4 a la plus faible valeur de AAO (1,37 mg d'ET/g de poids sec) suivie de BF82xCIP-13 (1,49 mg d'ET/g de poids sec) toutes deux inférieures à celles des deux variétés introduites (TIB-440060 et Caromex) avec respectivement des teneurs de 2,09 et 1,62 mg d'ET/g de poids sec.

Par la méthode à l'ABTS, les valeurs varient de 0,12 à 0,66 mg d'ET/g de poids sec ce qui représente une variation plus élevée que celle des essais au DPPH soit plus de 5 fois (tableau 8, figure 41). Comme observé dans le cas du DPPH, les extraits des variétés BF92xResisto-14 et BF92xCIP-6 présentent les plus fortes AAO avec respectivement 0,66 et 0,57 mg d'ET/g de poids sec. La variété BF82xCIP-13 présente la plus faible valeur (0,12 mg d'ET/g de poids sec).

Avec la méthode FRAP, les AAO varient de 1,07 à 4,12 mg d'ET/g de poids sec soit une variation d'environ 4 fois. Comme le cas dans les deux méthodes précédentes, l'extrait de la variété BF92xResisto-14 présente la capacité antioxydante la plus élevée (4,12 mg d'ET/g de poids sec), suivie de la variété BF92xCIP-6 (3,04 mg d'ET/g de poids sec). Les variétés BF82xCIP-13 et BF82xTIB-4 quant à elles, présentent les faibles valeurs, respectivement 1,62 et 1,07 mg d'ET/g de poids sec (tableau 8, figure 41).

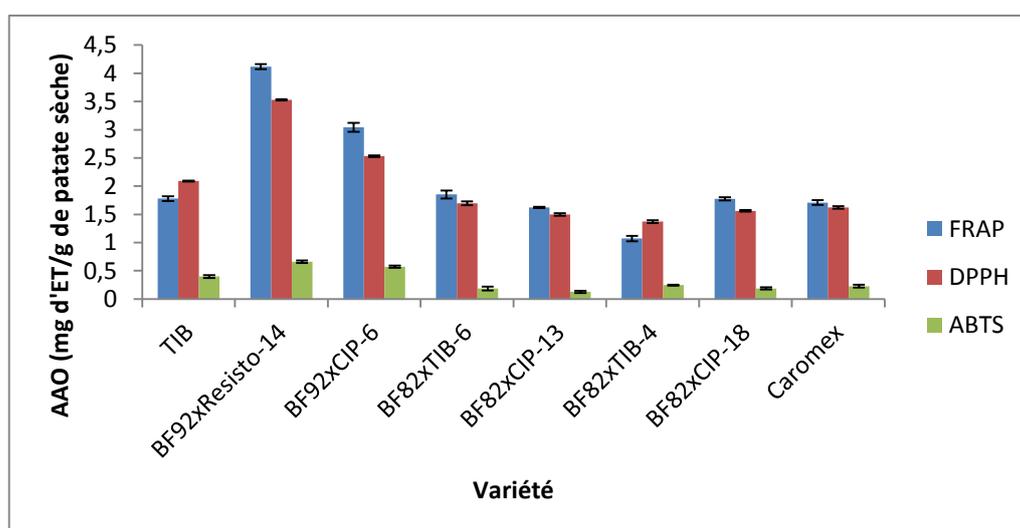


Figure 41 : Histogramme comparatif des activités antioxydantes des variétés de PDCO

II.2. Corrélation entre les méthodes de dosages

Pour corréler les résultats obtenus avec les différentes méthodes, une analyse des courbes de régression est effectuée (coefficient de corrélation R, tableau 9, page 74). D'importantes corrélations ont été observées entre les différentes méthodes utilisées pour déterminer le potentiel antioxydant, en particulier entre FRAP et DPPH ($R = 0,968$, tableau 9) puis entre DPPH et ABTS ($R = 0,935$, tableau 9). La corrélation la plus faible a été observée entre les AAO de FRAP et ABTS ($R = 0,875$, tableau 9).

Dans cette étude de comparaison des méthodes, toutes les méthodes ont montré leur capacité à déterminer l'activité antioxydante des extraits de PDCO. Comme le montre le

tableau 9 à la page 74, la forte corrélation relativement ($R > 0,9$) entre les valeurs moyennes de trois types de méthodes ABTS, DPPH et FRAP mérite une attention particulière. Cette corrélation peut être expliquée par le fait que les antioxydants sont des composés capables de donner un électron ou un atome d'hydrogène pour la réduction des radicaux libres. Arnous et coll. (2002) ^[142] ont aussi fait état d'une forte corrélation entre la capacité antiradicalaire libre du DPPH et la capacité de réduction de l'ion ferrique dans les vins. L'évaluation des activités antioxydantes par différentes méthodes a montré une tendance semblable avec des différentes valeurs numériques. Cela suggère que nous pourrions utiliser une de ces méthodes pour mesurer la capacité antioxydante des extraits de PDCO.

Les résultats de l'analyse des capacités antioxydantes des extraits de PDCO sont également corrélés avec leurs teneurs en composés phénoliques déterminées par le réactif de Folin-Ciocalteu. Les résultats obtenus avec la méthode FRAP et le radical DPPH corrélaient de manière significative avec les résultats obtenus par la méthode de Folin-Ciocalteu ($R = 0,957$ et $R = 0,916$ respectivement, tableau 9 et figures 43 et 44). La corrélation la plus faible a été trouvée avec ABTS ($R = 0,903$, tableau 9 et figure 45). Des corrélations significatives ont également été observées entre les dosages FRAP et DPPH et les teneurs en composés phénoliques déterminées par la méthode de Folin-Ciocalteu. Ces résultats indiquent une relation entre les teneurs en composés phénoliques dans les extraits de PDCO et leurs capacités antioxydantes. Par conséquent, la présence de composés phénoliques dans les extraits de PDCO contribue de manière significative à leurs propriétés antioxydantes. La méthode FRAP présente la corrélation la plus élevée ($R = 0,957$, tableau 9 et figure 43) avec les teneurs en composés phénoliques des extraits de PDCO. Dans ce travail, les composés phénoliques ont contribué pour plus de 91 % dans les activités antioxydantes des extraits des variétés de PDCO étudiées (tableau 10, page 74). Ce résultat est en accord avec les résultats précédemment rapportés qui stipulent que le potentiel de réduction du fer peut être lié aux composés phénoliques ^[138, 143]. Les propriétés antioxydantes des composés phénoliques sont directement liées à leur structure. En effet, ce sont des composés d'un (ou de plusieurs) cycles aromatiques portant un ou plusieurs groupes hydroxyles. Ils sont potentiellement capables de neutraliser les radicaux libres en formant des radicaux phénoxyls stabilisés par résonance ^[143] (figure 42). En effet, l'efficacité de ces composés s'explique par la délocalisation de l'électron célibataire de l'oxygène avec le noyau aromatique et stabilise ainsi le radical formé (figure 42).

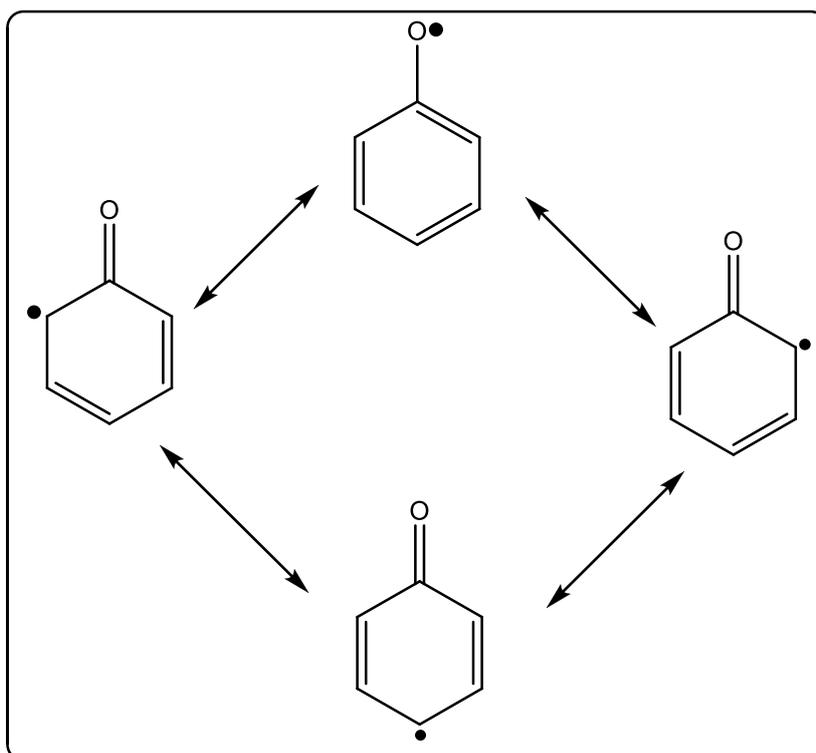


Figure 42 : Formes mésomères du radical phénoxy formé (stabilisation par résonance)

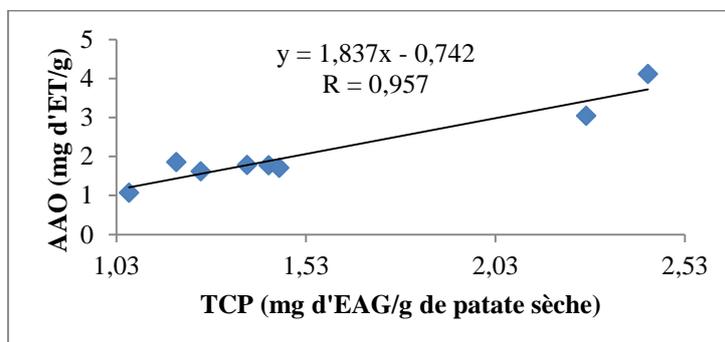


Figure 43 : Courbe de corrélation entre les AAO (FRAP) et les TCP des variétés de PDCO.

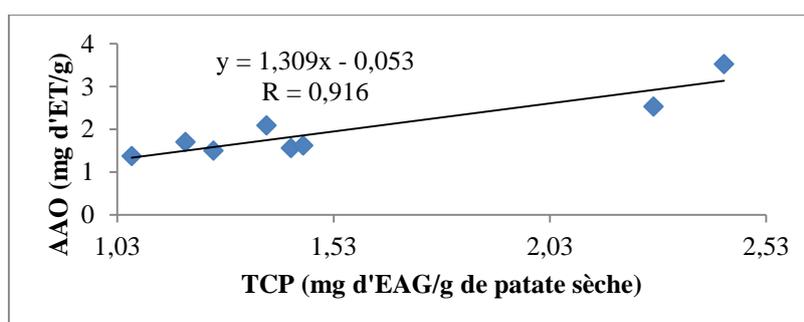


Figure 44 : Courbe de corrélation entre les AAO (DPPH) et les TCP des variétés de PDCO.

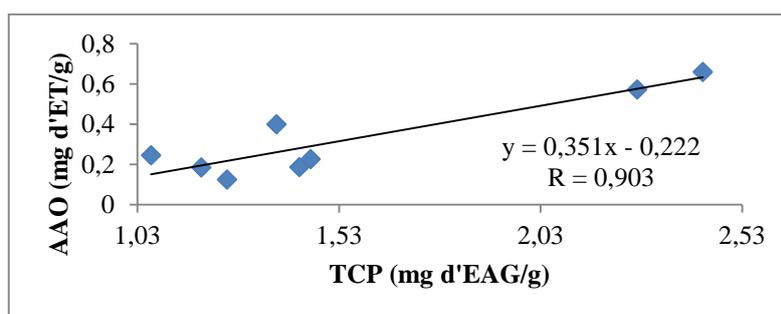


Figure 45 : Courbe de corrélation entre les AAO (ABTS) et les TCP des variétés de PDCO.

Tableau 9 : Coefficient de corrélation (R) entre les mesures des activités antioxydantes

	RFC	ABTS	DPPH	FRAP
ABTS	0,903			
DPPH	0,916	0,935		
FRAP	0,957	0,875	0,968	
TCT	0,803	0,704	0,835	0,867

Les composés phénoliques ne sont pas les seuls composés responsables de l'activité antioxydante des extraits de plantes. Les caroténoïdes sont également de puissants antioxydants naturels. Les teneurs en caroténoïdes totaux évaluées dans les extraits des variétés de PDCO ont certainement contribué à leurs capacités antioxydantes (figure 46). Une bonne corrélation a été observée entre les TCT et les AAO, confirmant ainsi l'impact positif des caroténoïdes totaux sur les AAO des variétés de PDCO (tableau 10, figure 46).

Tableau 10 : Corrélation entre AAO, TPP et TCT des extraits de PDCO

Corrélation	R	R ² %
AAO Vs TCP	0,957	91,58
AAO Vs TCT	0,867	75,16
TCT Vs TCP	0,803	64,48

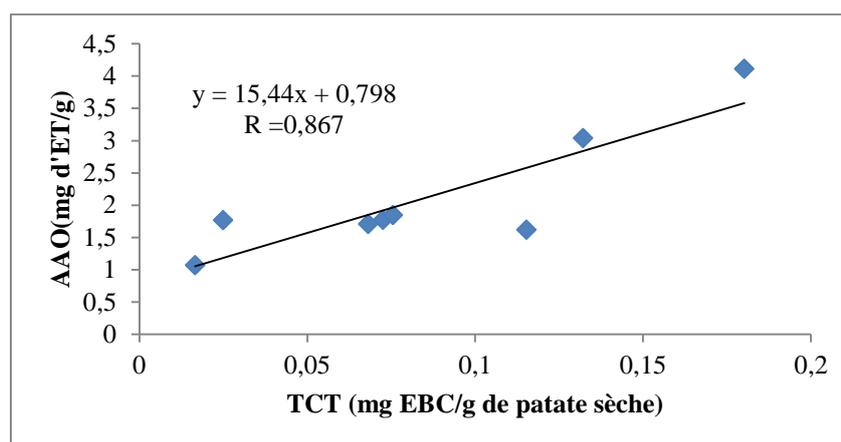


Figure 46 : Courbe de corrélation entre AAO et TCT des variétés de PDCO

Une analyse multivariée combinant l'ensemble des méthodes utilisées et permettant une appréciation globale des résultats a été traduite à l'aide d'un dendrogramme (figure 47). Il ressort de ce dendrogramme que la lignée parentale a une influence importante sur la capacité antioxydante des variétés issues des croisements et montre l'effet des parents sur les activités antioxydantes des descendants. En effet, BF82xCIP-13 et BF82xCIP-18 partageant tous deux les mêmes parents (BF82 et CIP-199062-1) ont des activités antioxydantes très voisines. Il en est de même pour les variétés BF82-TIB-4 et BF82-TIB-6 (issues de BF82 et TIB-440060) qui sont proches des deux variétés sus-évoquées avec qui elles partagent le parent femelle (BF82). Les variétés BF92 bien que n'ayant pas les deux parents en commun sont voisines. Des analyses génétiques effectuées ont démontré que le choix des parents est très important dans le développement d'une descendance qui accumule une bonne teneur en bêta-carotène. Nonobstant leur teneur initiale en bêta-carotène, certains parents ont une bonne aptitude à développer une descendance à forte teneur en bêta-carotène. Ce qui pourrait être le cas pour les activités antioxydantes. Une analyse simultanée aussi bien des parents que la descendance pourrait permettre de conforter ces résultats.

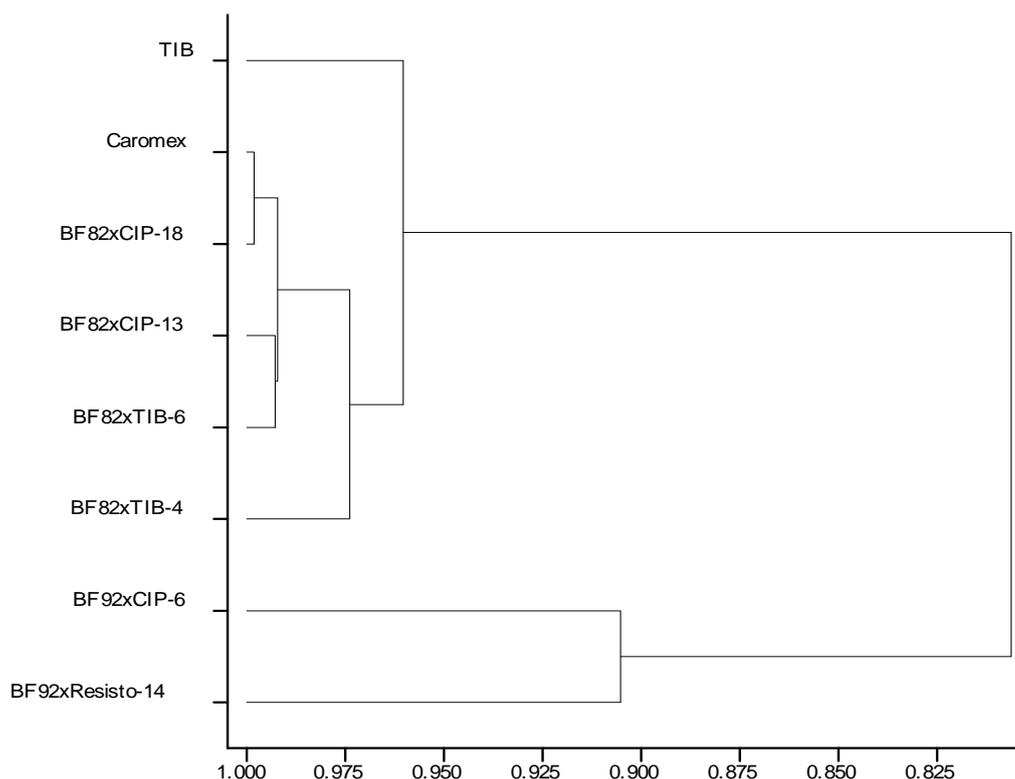


Figure 47 : Dendrogramme des huit variétés de PDCO.

Conclusion

Dans ce travail, nous avons évalué les caractéristiques agronomiques (rendement et teneur en matière sèche) et nutritionnelles (caroténoïdes et polyphénols totaux) de huit variétés de PDCO développées par hybridation à la station de l'INERA ainsi que leurs activités antioxydantes. Toutes ces caractéristiques varient significativement d'une variété à une autre. Les mesures des activités antioxydantes révèlent que tous les extraits sont actifs bien que l'activité varie d'une variété à une autre. L'activité antioxydante des variétés semble être en rapport avec leurs compositions chimiques (polyphénols, caroténoïdes). La variété BF82xTIB-4 a la plus faible activité et corrélativement les plus faibles teneurs en polyphénols et en caroténoïdes totaux. La variété BF92xResisto-14 présente un grand potentiel antioxydant avec 412 μg d'équivalent de trolox par gramme de patate sèche et par conséquent les plus fortes teneurs en polyphénols (2,43 mg d'EAG/g de poids sec) et en caroténoïdes totaux (180 μg d'EBC/g de poids sec). Cette variété possède des activités antioxydantes, en polyphénols et en caroténoïdes très intéressantes qu'on peut exploiter en promouvant sa vulgarisation et sa consommation. Elle pourrait même servir de source naturelle d'approvisionnement de ces composés fort utiles.

CHAPITRE II : FACTEURS INFLUENÇANT LES TENEURS EN CAROTENOÏDES ET EN COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DE LA PDCO

L'objectif de cette étude est d'identifier les principales sources de variation en phytonutriments et les leviers de contrôle pouvant conduire à moduler leurs concentrations. Il s'agit également de hiérarchiser l'impact des différentes sources de variation, bien que des interactions entre les différentes sources de variation compliquent le contrôle des teneurs. C'est en effet le contrôle de l'optimisation et de la stabilité de la qualité tout au long de la filière qui est le véritable enjeu pour répondre aux besoins des consommateurs, une réduction à une étape quelconque de la filière pouvant entraîner des conséquences sur le produit final.

I. Les facteurs influençant la composition en caroténoïdes et en composés phénoliques de la PDCO

I.1. Méthodologie

L'expérience consiste à déterminer l'effet des fertilisants organiques et minéraux sur les teneurs en micronutriments (caroténoïdes et phénols) de la PDCO. Pour ce faire, nous avons utilisé une seule variété, le TIB-440060.

L'expérimentation est réalisée à la station de l'INERA Kamboinsin, situé à 13 km de Ouagadougou au centre du Burkina Faso. Deux types d'engrais ont été utilisés : l'engrais organique constitué de fumier de bétail bien décomposé et les engrais minéraux à base d'azote (N), de phosphore (P) et potassium (K). Le dispositif expérimental utilisé est un split plot avec en parcelles principales la fumure organique à trois (3) niveaux et en parcelles secondaires la fumure minérale à neuf (9) niveaux (tableau 11). Au total vingt-sept (27) combinaisons de fertilisation organo-minérale ont été constituées (Tableau 12). Pour évaluer les teneurs en micronutriments, les patates sont séchées au laboratoire après récolte.

Tableau 11 : Détail des 9 combinaisons minérales à base d'Azote (N), de phosphore (P) et de potassium (K).

Traitement		Azote (kg-N ha ⁻¹)	Phosphore (kg-P ₂ O ₅ ha ⁻¹)	Potassium (kg-K ₂ O ha ⁻¹)
T1	N ₀ P ₀ K ₀	0	0	0
T2	N ₁₅ P ₀ K ₄₅	15	0	45
T3	N ₃₀ P ₀ K ₉₀	30	0	90
T4	N ₆₀ P ₀ K ₁₀₀	60	0	100
T5	N ₀ P ₃₀ K ₁₀₀	0	30	100
T6	N ₃₀ P ₃₀ K ₀	30	30	0
T7	N ₁₅ P ₃₀ K ₄₅	15	30	45
T8	N ₃₀ P ₃₀ K ₉₀	30	30	90
T9	N ₆₀ P ₃₀ K ₁₀₀	60	30	100

Tableau 12 : Les vingt-sept (27) combinaisons de fertilisants organiques et minéraux testées sur la variété de patate douce TIB-440060

FERTILISATION ORGANIQUE	FERTILISATION MINERALE								
	$N_0P_0K_0$	$N_{15}P_0K_{45}$	$N_{30}P_0K_{90}$	$N_{60}P_0K_{100}$	$N_0P_{30}K_{100}$	$N_{30}P_{30}K_0$	$N_{15}P_{30}K_{45}$	$N_{30}P_{30}K_{90}$	$N_{60}P_{30}K_{100}$
F₀=0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
F₁	T4	T8	T9	T1	T6	T2	T5	T3	T7
F₂	T8	T7	T1	T3	T6	T2	T4	T9	T5

F₀ : Témoin sans apport de fumure organique ; **F₁** : Apport de 20 t/ha de fumure organique tous les ans ; **F₂** : Apport de 20 t/ha tous les deux ans

I.2. Résultats et discussion

I.2.1. Effet de fertilisant organique

L'effet de différentes doses de fertilisant organique sur les activités antioxydantes, les teneurs en polyphénols et en caroténoïdes totaux est présenté dans le tableau 13. Les activités antioxydantes et en polyphénols augmentent significativement ($P < 0,001$) avec l'augmentation des quantités de fumure organique apportée. En effet, sur les parcelles qui n'ont reçu aucun apport en fumure organique (F_0), le TIB-440060 présente les plus faibles activités antioxydantes. On observe également les faibles teneurs en polyphénols et en caroténoïdes. Les plus fortes teneurs sont enregistrées sur les parcelles ayant reçu 20 t/ha de fumure organique chaque année (F_1) mais aussi sur F_2 où l'on a apporté 20 t/ha de fumure organique tous les deux ans (F_2). La différence est moins évidente au niveau des teneurs en caroténoïdes totaux entre les apports annuels (F_1) et les apports tous les deux ans (F_2) de fumure organique.

Tableau 13 : Influence des différentes doses de fertilisant organique sur les AAO, les TCP et les TCT de la variété TIB-440060

	AAO (mg d'ET/g)	TCP (mg d'EAG/g)	TCT (mg d'EBC/g)
F_0	2,606	1,749	0,016
F_1	3,118	2,351	0,018
F_2	3,022	2,059	0,018
Erreur standard	0,027	0,041	0,0004
LSD	0,074	0,115	0,001

En comparant les effets différentes doses de fumure organique apportées sur les teneurs des micronutriments, on enregistre une augmentation de 19,61 % ; 34,41 % et 12,82 % respectivement pour les activités antioxydantes, les teneurs en composés phénoliques et les en caroténoïdes totaux pour les apports annuels (F_1) par rapport au témoin (F_0) (tableau 14). Ces augmentations sont de 15,94 % ; 17,69 % et 12,17 % respectivement pour les activités antioxydantes et les teneurs en composés phénoliques et en caroténoïdes totaux lorsque ces apports de fumure organique sont réalisés tous les deux ans (F_2).

Tableau 14 : Augmentation des AAO, TCP et TCT de la PDCO en fonction de l'apport en fumure organique

Fumure organique	F1	F2
Taux d'augmentation des AAO/F0	19,61 %	15,94 %
Taux d'augmentation des TCP/F0	34,41 %	17,69 %
Taux d'augmentation des TCT/F0	12,82 %	12,17 %

Ces résultats suggèrent que l'apport de fumure organique a un effet positif sur la production phénols et de caroténoïdes totaux. Les apports les plus fréquents de fumure organique produisent les meilleurs résultats. Toutefois des apports organiques tous les deux ans peuvent toujours entraîner une accumulation significative de caroténoïdes totaux des tubercules de TIB-4400060.

I.2.2. Effet des fertilisants minéraux

Les différentes doses d'engrais minéraux (tableau 15) indiquent une variation significative ($P < 0,001$) des teneurs accumulées en composés phénoliques et en caroténoïdes totaux ainsi que les activités antioxydantes dans les tubercules de TIB-4400060. Les résultats obtenus indiquent que les plus fortes activités antioxydantes (AAO) sont enregistrées sous l'influence des effets combinés d'azotes et de potassium tels que nous montrent T₂ et T₃ (absence de phosphore) avec des valeurs de 3,107 et de 3,378 mg d'ET/g de matières sèches respectivement. Les plus faibles teneurs sont observées en présence ou en absence des trois éléments azote-phosphore-potassium. Pour les composés phénoliques cependant, les teneurs les plus élevées sont obtenues par la présence de phosphore à la dose de 30 kg/ha. Les faibles teneurs sont enregistrées lorsque le phosphore est absent. La biosynthèse des composés phénoliques semble être positivement influencée par les engrais phosphatés. Les sols burkinabè, reconnus pour leur pauvreté en phosphore [128], pourraient constituer une limite à l'accumulation des composés phénoliques par la patate douce. Des apports d'engrais phosphatés à la dose de 30 kg/ha pourrait être une solution à une amélioration de l'accumulation de polyphénols par la patate douce. En plus, les teneurs obtenues en

caroténoïdes totaux ne semblent pas traduire clairement une influence des différentes doses d'engrais minéraux sur leur production.

La biosynthèse des micronutriments de TIB-4400060 (caroténoïdes, composés phénoliques) dépendrait conjointement de la composition du sol en azote, en phosphore et en potassium.

Tableau 15 : Influence des différentes doses de fertilisants minéraux sur les AAO, les TCP et les TCT de la variété TIB-440060

	AAO (mg d'ET/g)	TCP (mg d'EAG/g)	TCT (mg d'EBC/g)
T ₁	2,736	1,983	0,019
T ₂	3,107	2,126	0,016
T ₃	3,378	1,877	0,013
T ₄	2,996	1,916	0,019
T ₅	2,953	2,191	0,013
T ₆	2,213	2,128	0,019
T ₇	2,940	2,184	0,017
T ₈	2,324	1,838	0,020
T ₉	2,950	2,237	0,016
Erreur standard	0,027	0,042	0,0004
LSD	0,073	0,115	0,001

I.2.3. Effet des fertilisants organo-minéraux

Les teneurs en composés phénoliques et en caroténoïdes totaux obtenues sur la variété TIB-440060 varient significativement ($P < 0,001$) en fonction de la combinaison des fertilisants organo-minéraux utilisés. En général, les combinaisons utilisant un minimum de 15 kg/ha d'azote ; 30 kg/ha de phosphore et 45 kg/ha de potassium (T₂, T₃, T₅, T₇, T₈ et T₉) associé à un apport annuel de 20 t/ha de fumure organique (F₁) ou bisannuel de la même dose (F₂) ont donné les teneurs les plus élevées en antioxydants, en composés phénoliques et en caroténoïdes totaux. Ces résultats dénotent que l'impact sur les activités antioxydantes n'est perceptible que lorsque les fertilisants utilisés sont en quantité suffisante pour favoriser une synergie d'action contribuant à élever les AAO. Le tableau 16 indique la contribution (en

pourcentage) de la fumure organique, des engrais minéraux et des combinaisons des engrais organo-minéraux sur la production des micronutriments de la patate douce (TIB-440060). Ainsi donc, l'utilisation de la fumure organique seule contribue à l'augmentation de 14,85 % ; 21,98 % et 4,38 % des activités antioxydantes, des teneurs en composés phénoliques et en caroténoïdes totaux respectivement. Ces augmentations sont de 35,36 % ; 7,35 % et 29,50 % respectivement en AAO, en TCP et en TCT si les engrais minéraux seulement sont utilisés. Cependant, lorsqu'une combinaison de fumure organique et d'engrais minéraux est faite, celle-ci contribue à 44,38 % ; 68,39 % et 62,63 % la production maximale d'antioxydants, de composés phénoliques et de caroténoïdes de la patate douce. Ces résultats mettent en exergue l'importance des fertilisants organo-minéraux sur l'accumulation des micronutriments de la patate douce surtout en polyphénols et en caroténoïdes.

Tableau 16 : Contribution en pourcentage des fertilisants sur l'accumulation de AAO, TCP et de TCT par la variété de patate douce TIB-440060

	AAO	TCP	TCT
Fertilisant organique	14,85	21,98	4,38
Fertilisant minéral	35,36	7,35	29,50
Fertilisant organo-minéral	44,38	68,39	62,63
Résiduel	5,41	2,28	3,49

En outre, une bonne corrélation est observée entre les AAO et les TCP de la PDCO (tableau 17). Cela montre un lien positif entre les AAO et l'efficacité de la méthode de Folin-Ciocalteu utilisée pour leur quantification. Cette méthode pourrait donc être utilisée pour évaluer l'activité antioxydante puisqu'elle mesure la capacité de réduction des extraits. En effet, la version améliorée décrite par Singleton et Rossi ^[144] (1979-1983) donne des résultats prévisibles pour une série de composés phénoliques. En considérant les critères de performances comme la répétabilité et la reproductibilité, cette version améliorée fait partie des méthodes de référence dans l'étude des antioxydants des extraits végétaux.

On note également une très bonne corrélation entre l'activité antioxydante et les caroténoïdes totaux (Tableau 17), preuve que les composés phénoliques ne sont pas les seuls responsables de l'activité antioxydante des extraits végétaux. Les caroténoïdes totaux contribuent

également à l'activité antioxydante des extraits végétaux ^[98] comme nous l'avons démontré précédemment.

Tableau 5 : Corrélation (R^2) entre les différentes teneurs de la PDCO

	TCP	AAO
TCP		
AAO	0,8947	
TC	0,7885	0,9784

Conclusion

Cette étude qui est l'une des premières dans la zone de l'Afrique de l'Ouest a permis de mettre en évidence les effets de la fumure organo-minérale sur la composition en caroténoïdes et en polyphénols totaux de la patate douce à chair orange. Il ressort qu'individuellement, la fumure organique et les engrais minéraux ont un effet positif sur la production des composés phénoliques et des caroténoïdes totaux dans les tubercules de PDCO. Cependant, les effets majeurs sont obtenus par la combinaison des deux types de fertilisants. Les apports annuels de fumure organique produisent plus d'effets sur les paramètres étudiés ; toutefois si l'accumulation des caroténoïdes totaux est visée, des apports de fumure organique tous les deux ans sont recommandables. L'activité antioxydante est positivement influencée par les engrais minéraux binaires contenant de l'azote et du potassium ; la production de polyphénols est influencée par les engrais phosphatés tandis que la production de caroténoïdes totaux semble ne refléter aucune influence d'engrais minéraux. Cette étude a donc permis de prouver l'importance de la fertilisants organo-minéraux sur la production des composés phénoliques et caroténoïdes totaux de la PDCO.

II. Influence des zones agro-écologiques sur la teneur en caroténoïdes et en phénols totaux de la PDCO

II.1. Méthodologie

Les sections précédentes ont montré le poids particulier du facteur variétal et des effets des fertilisants organo-minéraux qui déterminent directement la teneur des composés présents chez la PDCO. Cependant, plusieurs travaux ont mis en évidence une influence des facteurs environnementaux, qu'il s'agisse de l'effet de facteurs isolés (température, rayonnement) ou

de combinaisons complexes de facteurs (effet de l'année, effet de la région de production) sur la composition des métabolites secondaires de certains fruits et légumes. Dans cette partie, nous avons exploré l'influence des zones agro-écologiques du Burkina sur l'accumulation des micronutriments (caroténoïdes et phénols) de la PDCO. Pour cela, les boutures de la variété Tiébélé2 ont été repiquées dans quatre sites d'expérimentation du Burkina Faso suivant les aléas climatiques de la région sans une intervention extérieure (apport de fumure ou de pesticide). Après récolte, les teneurs en caroténoïdes et des phénols totaux des échantillons ont été évaluées suivant le protocole décrit plus haut.

II.2. Résultats et discussion

Les valeurs des teneurs en caroténoïdes, en composés phénoliques taux des tubercules de Tiébélé2 récoltés dans les quatre sites d'expérimentation ainsi que leur activité antioxydante sont consignées dans le tableau 18.

Tableau 6 : Teneurs en micronutriments du Tiébélé2 en fonction de la localité

Localité	TCT (mg d'EBC/g)	AAO (mg d'ET/g)	TCP (mg d'EAG/g)
Boura	1,24±0,0098 ^b	7,14±0,0455 ^A	2,28±0,0162 ^{a'}
Yoro	1,12±0,0041 ^c	5,82±0,0151 ^B	1,61±0,0370 ^{b'}
Sagalo	0,87±0,0085 ^d	3,19±0,0159 ^C	1,74±0,0188 ^{c'}
Yelbouga	1,54±0,0217 ^a	7,23±0,0502 ^A	1,78±0,0366 ^{c'}

Les résultats des teneurs en antioxydants, composés phénoliques et caroténoïdes totaux sont exprimés sous la forme moyenne ± écart-type. Les comparaisons multiples entre les variétés sont effectuées par le "multivariate analysis de Genstat version 14". Les moyennes dans chaque colonne suivies par une lettre différente sont significativement différentes ($P < 0,05$).

D'après l'analyse statistique de ces résultats donnés dans le tableau 18, les TCT, les TCP ainsi que les AAO varient significativement ($P < 0,05$) d'une localité à une autre (Figure 48). Les teneurs en caroténoïdes varient de 0,87 à 1,54 mg d'équivalent de bêta-carotène par gramme de poids sec respectivement dans les localités de Sagalo et de Yelbouga, soit une variation de 44 %. Concernant les teneurs en polyphénols totaux, elles varient de 1,61 à 2,28 mg d'équivalent d'acide gallique par gramme de poids sec respectivement dans les localités de Yoro et de Boura, soit une variation de 30 %. Les activités antioxydantes présentent la même tendance que celle des caroténoïdes totaux en fonction des quatre localités. En effet, on

observe une assez bonne corrélation ($R^2 = 0,79$; figure 49) entre les teneurs en antioxydants et celles de caroténoïdes totaux.

Il ressort donc de ces analyses que les concentrations de ces micronutriments varient en fonction des zones agro-écologiques. Comme Dragovic-Uzelac et *coll.* [144] l'ont souligné en 2007, l'absence de caractérisation climatique des localités (même climat au Burkina Faso) rend difficile l'attribution de l'origine de ces variations à tel ou tel facteur de l'environnement. Chez certains légumes, le rayonnement et la température jouent un rôle plus marqué que l'eau ou les apports de fertilisants [145]. On pourrait donc penser que ces différences seraient dues à des facteurs comme le rayonnement, la température. Il serait intéressant de contrôler rigoureusement tous ces facteurs afin de tirer des conclusions objectives. Toutefois, il est clair que, même si l'on arrivait à analyser de façon fine l'effet de tel ou tel facteur sur la synthèse de ces composés en situation très contrôlée, la transposition des résultats en condition de production serait extrêmement délicate en raison des fluctuations temporelles souvent importantes de ces facteurs.

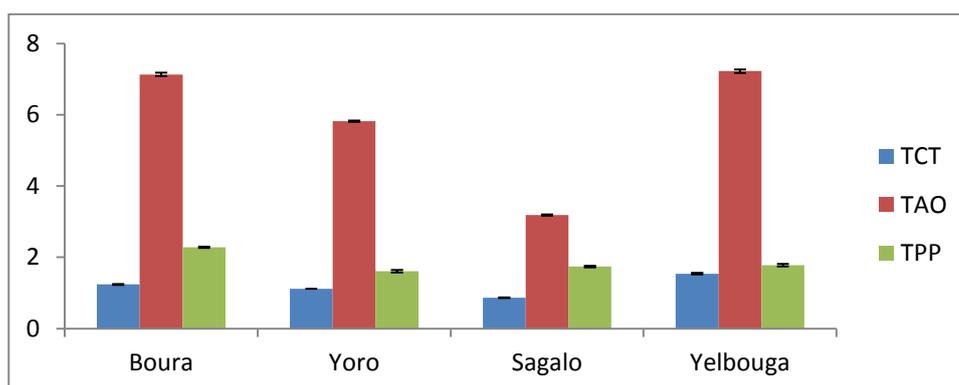


Figure 48 : Histogramme comparatif des TCT, des AAO et des TCP la variété Tiébélé2 en fonction de la localité

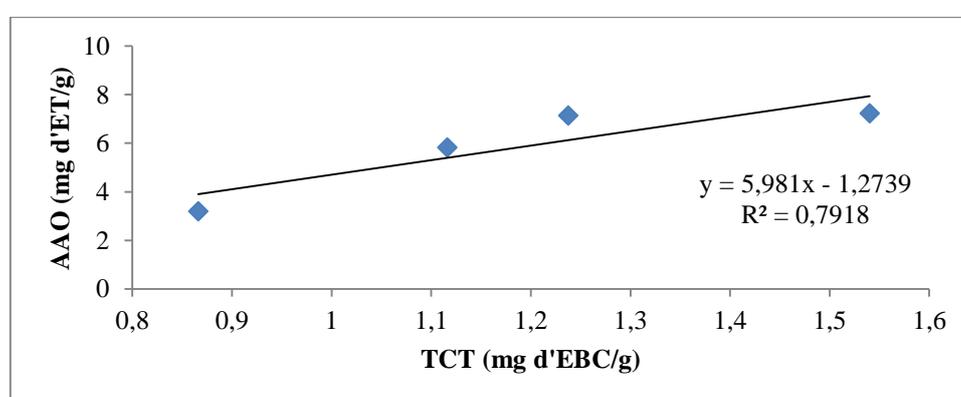


Figure 49 : Courbe de corrélation entre les TCT et les AAO de la variété Tiébélé2

Conclusion

Les résultats de cette étude ont montré une variabilité des teneurs en micronutriments de la PDCO suivant les zones agro-écologiques du Burkina Faso. On a noté une variation de près de 30 % et 45 % respectivement pour les teneurs en composés phénoliques et en caroténoïdes totaux. Toutefois, ces valeurs pourraient fortement être influencées par d'autres facteurs environnementaux non contrôlés tels que la température, le rayonnement. Ces composés à valeur nutritionnelle sont des produits du métabolisme secondaire dont les interactions avec les facteurs de l'environnement (pris au sens large : facteurs physiques du milieu, interventions techniques sur la culture) sont complexes et encore mal connus. Il est clair que seuls des efforts pour l'amélioration simultanée de l'ensemble de ces propriétés pourront attirer les consommateurs vers la PDCO et ses produits dérivés.

Il est donc important de poursuivre et d'amplifier les recherches visant à expliciter et modéliser les interactions entre génotype et environnement pour les divers critères de qualité des produits.

III. Effet des attaques des charançons sur les teneurs en caroténoïdes et des phénols totaux de la PDCO

Introduction

La patate douce [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] est une culture importante en Afrique subsaharienne où elle est cultivée comme aliment de base. Pour certains agriculteurs, sa production est également une source de revenu familial, et, par conséquent, les stratégies pour réduire les pertes dues aux ravageurs et aux maladies ne peuvent qu'être bénéfiques à l'amélioration de la sécurité alimentaire et les moyens de subsistance. En Afrique, les charançons *Cylas puncticollis* Boheman et *C. brunneus* Fabricius sont les principaux ravageurs de la production de patate douce [146]. La maîtrise de la gestion des charançons peut stimuler la production de façon spectaculaire et avoir un impact positif sur les moyens de subsistance de millions d'agriculteurs pauvres à travers l'Afrique subsaharienne. L'une des approches qui a été ciblée, est la résistance de la plante hôte. En effet, il est connu que la sensibilité aux ravageurs diffère d'un cultivar à un autre [146]. Cependant, le mécanisme de résistance serait toujours embryonnaire et mal connu [146]. Une étude menée aux États-Unis a donné un aperçu considérable sur le mécanisme de résistance de patate douce au *C. formicarius elegantulus* (charançon). Par exemple, des différences significatives des teneurs en acide caféique, en acide caféylquinique et en rutine ont été rapportées entre les cultivars

sensibles et moins sensibles. Ces composés pourraient être associés à la résistance ^[146] aux bio-agresseurs. Par ailleurs, les teneurs de deux composants triterpénoïdes (l'acétate de boehmeryl et le boehmerol) connus pour leurs propriétés à stimuler la ponte ^[146], présentent également des différences significatives entre les cultivars de patate douce sensibles et moins sensibles ^[146]. Le présent travail consiste à évaluer l'effet des attaques des charançons sur l'accumulation des phytomicronutriments (composés phénoliques, caroténoïdes) des tubercules de cinq variétés de la patate douce à chair orange (PDCO), dans la perspective d'une sélection des cultivars résistants.

III.1. Méthodologie

Les cinq variétés de patate douce à chair orange (PDCO) qui font l'objet de notre étude sont : TIB-440060 ; CIP-199062-1 ; Jewel Léo ; Jewel Kambouinsin et Caromex. Les tubercules sains et les tubercules attaqués par les charançons (figure 50) de ces différentes variétés nous ont été offerts par l'Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA). Les tubercules sont épluchés puis séchés convenablement au laboratoire. Après séchage, les TCP, les TCT et les AAO des échantillons ont été évaluées par les méthodes décrites précédemment. Les résultats sont exprimés en gramme d'équivalent par 100 g de poids sec (g/100 g de poids sec).



a) Charançon

b) Tubercule de PDCO attaqué

Figure 50 : Illustration des attaques des charançons

III.2. Résultats et discussion

Le tableau 19 présente les résultats des mesures des teneurs en micronutriments (composés phénoliques et caroténoïdes totaux respectivement) des tubercules attaqués et sains des cinq variétés de PDCO ainsi que leurs activités antioxydantes.

Tableau 7 : TCP, AAO et TCT des tubercules sains et attaqués de cinq variétés de PDCO

Variété	TCP (g EAG/100 g)		AAO (g ET/100 g)		TCT (g EBC/100 g)	
	Sain	Attaqué	Sain	Attaqué	Sain	Attaqué
TIB-440060	0,15±0,001	0,63±0,001	0,42±0,001	2,09±0,018	0,08±0,001	0,03±0,001
CIP-199062-1	0,16±0,000	0,54±0,001	0,32±0,001	1,81±0,002	0,04±0,000	0,03±0,001
Jewel-Léo	0,14±0,001	0,60±0,007	0,25±0,001	1,73±0,011	0,16±0,001	0,15±0,000
Jewel-K	0,16±0,009	0,50±0,002	0,48±0,001	1,83±0,034	0,11±0,001	0,01±0,002
Caromex	0,09±0,007	0,24±0,001	0,25±0,001	1,28±0,015	0,009±0,000	0,004±0,000

III.2.1. Teneurs en composés phénoliques

Les teneurs en composés phénoliques (TCP) des extraits de PDCO ont été examinées et les résultats sont consignés dans le tableau 19. Les différences entre les TCP des extraits des patates attaquées et les patates non attaquées varient de 0,1440 à 0,4850 g EAG/100 g de poids sec respectivement pour les variétés Caromex et TIB-440060 (Tableau 19 figure 51). Tous les extraits des patates attaquées par les charançons des cinq variétés de PDCO étudiées ont montré une hausse de TCP par rapport à ceux des patates non attaquées mais cette augmentation n'est pas statistiquement significative ($P > 0,001$) (Tableau 20, page 92). En 2005, Sousa et coll. [147] avaient montré une légère augmentation de la teneur en composés phénoliques après une étude conduite sur *Brassica oleracea* L.var. costata DC cultivé biologiquement et conventionnellement. Ces résultats sont en accord avec nos résultats même si ces différences sont indécélables statistiquement. Sérémé et coll. [148] avaient également rapporté que la résistance aux agents pathogènes du sorgho est associée à l'augmentation de la concentration de l'apigénidine qui est un composé phénolique majoritaire des gaines du sorgho rouge (*Sorghum caudatum*) [4, 148]. Il existe très peu de données sur l'impact des bio-agresseurs des patates (des charançons) sur leurs teneurs des composés phytochimiques. De plus, les teneurs en composés phénoliques et en caroténoïdes totaux des PDCO sont fortement dépendantes des facteurs de l'environnement. Ces résultats restent donc discutables et

justifient la nécessité de poursuivre les investigations en contrôlant tous les paramètres environnementaux (température, rayonnement, etc.).

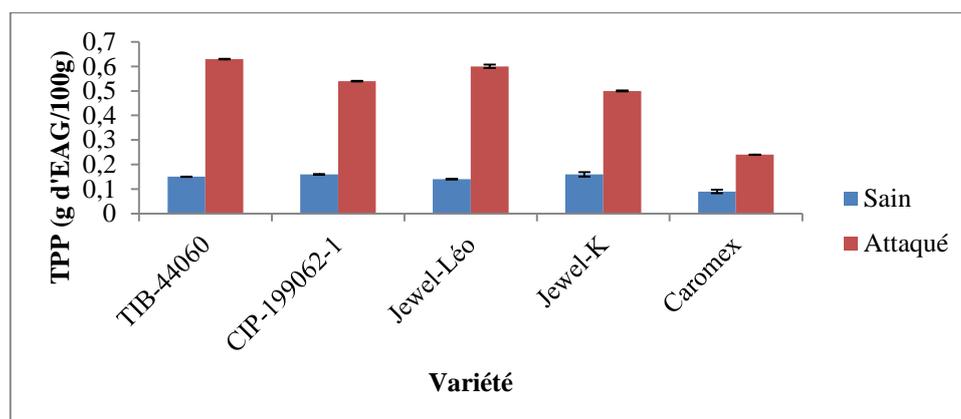


Figure 51 : Histogramme comparatif des TCP des tubercules sains et attequés

III.2.2. Activité antioxydante

Les résultats des activités antioxydantes des extraits des patates attequées et non attequées des différentes variétés de PDCO étudiées sont consignés dans le tableau 19. Les différences entre les AAO des extraits de patates attequées et non attequées varient de 1,0252 à 1,6803 g d'équivalent de trolox par 100 grammes de poids sec respectivement pour la variété Caromex et TIB-440060 (tableau 19, figure 52). Ces variations sont statistiquement significatives ($P < 0,001$) (tableau 20). Carbonaro et ses collaborateurs ^[149] avaient établi une corrélation positive entre culture biologique et augmentation de l'activité antioxydante sur *pêcher et poirier* contribuant ainsi à la protection de la plante contre les attaques (stress, traumatismes, agents pathogènes, ...). Nos résultats sont en conformité avec les données de la littérature, même si celles-ci restent limitées. Toutefois ces conclusions restent discutables en ce sens que l'activité antioxydante de la PDCO dépend également d'autres facteurs comme le climat, l'environnement mais aussi des mutations génétiques.

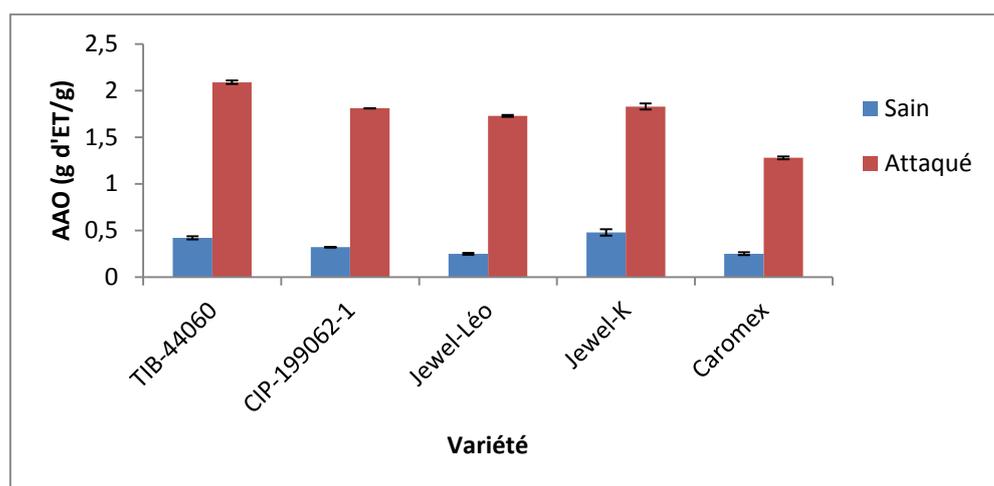


Figure 52 : Histogramme comparatif des AAO des tubercules sains et attaqués

III.2.3. Teneurs en caroténoïdes totaux

Le tableau 19 présente les résultats des mesures des teneurs en caroténoïdes totaux des extraits des patates attaquées par les charançons et des patates non attaquées. Contrairement aux résultats des mesures des activités antioxydantes et des teneurs en composés phénoliques, on observe une très faible baisse de la teneur en caroténoïdes totaux des extraits des patates attaquées par rapport celles des extraits des patates non attaquées. Les différences entre les teneurs des extraits des patates attaquées et non attaquées varient de 0,0046 à 0,0075 gramme d'équivalent de bêta-carotène par cent grammes de poids sec respectivement pour les variétés Caromex et CIP-199062-1 (tableau 19, figure 53). Ces variations observées ne sont pas statistiquement significatives ($P > 0,001$) (tableau 20). On observe sur les patates attaquées, un brunissement de la chair orange. On pourrait penser que les caroténoïdes qui sont en partie à l'origine de la couleur orange de la chair des patates sont transformés en des composés secondaires entraînant ainsi une diminution de leur teneur même si cette baisse reste statistiquement insignifiante. Il existe peu d'écrits sur l'influence des attaques des bio-agresseurs sur la teneur des caroténoïdes des PDCO ce qui ne nous permet de tirer des conclusions. En plus le degré de traumatisme (le niveau d'attaque) pourrait influencer sur nos résultats. Le profil HPLC des PDCO saines et attaquées permettrait de savoir si les caroténoïdes n'ont pas subi une transformation liée à l'attaque des charançons.

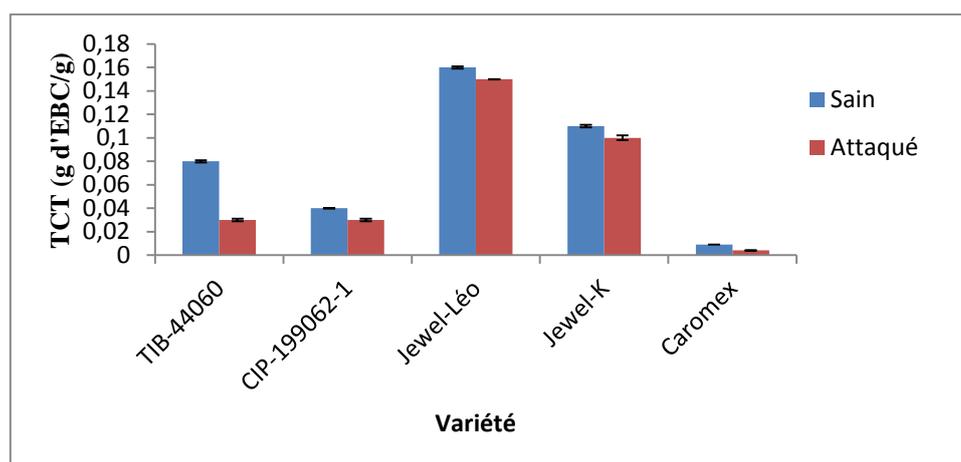


Figure 53 : Histogramme comparatif des TCT des tubercules sains et attaqués

Tableau 20 : Données statistiques des différences significatives entre les teneurs des patates saines et les patates attaquées par les charançons

Facteur testé	Probabilité <i>t-test</i>	Niveau de signification
Activité antioxydante	<0,001	S
Teneur en composés phénoliques	0,006	NS
Teneur en caroténoïdes	0,114	NS

NS : non significatif ; *S* : significatif

Conclusion

Dans la présente étude, nous avons montré que les concentrations des antioxydants des patates attaquées par les charançons croissent de façon significative par rapport aux patates non attaquées. A l'opposé, les variations des teneurs en caroténoïdes entre les patates attaquées et non attaquées ne sont pas statistiquement significatives. Le peu de travaux publiés dans la littérature dans ce domaine est souvent disparate et il est difficile d'en tirer des conclusions définitives. Les attaques des patates par les charançons entraînent des variations dans le contenu en composés bioactifs mais les résultats sont souvent contradictoires et n'autorisent pas à tirer des lois générales. Il est nécessaire pour les études ultérieures de pouvoir contrôler les paramètres qui peuvent influencer les résultats.

CHAPITRE III : CARACTERISATION DES CAROTENOÏDES MAJORITAIRES DE LA PDCO

Introduction

Carotène, caroténoïdes, sont des mots dérivés de *Daucus carota*, le nom latin de la carotte dont le bêta-carotène fut extrait et isolé pour la première fois en 1831 [150]. Le bêta-carotène est le représentant le plus connu et l'un des plus répandus dans la nature et dans notre alimentation. Plus de 700 membres de cette famille sont aujourd'hui connus [151]. Comme évoqué précédemment, certains caroténoïdes comme le bêta-carotène, la cryptoxanthine, l'alpha-carotène peuvent être convertis en vitamine A. La valorisation d'une variété de PDCO donnée dans le cadre de la lutte contre l'avitaminose A au Burkina Faso passe par une étape préliminaire de détermination quantitative et qualitative de sa composition en caroténoïdes.

Dans cette partie, nous rapportons premièrement les résultats des mesures des teneurs en caroténoïdes totaux de dix variétés de PDCO. Enfin nous présentons les résultats de la caractérisation des caroténoïdes majoritaires de la variété choisie pour ses qualités nutritionnelles.

I. Évaluation des teneurs en caroténoïdes de dix variétés de PDCO

I.1. Matériel et méthodes

I.1.1. Matériel végétal

L'étude a porté sur dix cultivars (variétés) de PDCO, dont trois recueillis au Burkina Faso de 2009 à 2010 (BF139, BF51 et Tiébélé2), quatre introduits du CIP-Afrique de l'Est (TIB-440060, CIP-199062-1, Jewel-Léo et Caromex) et les trois autres variétés : BF82xTIB-4 ; BF92xResisto-14 et BF92xCIP-6 ont été développées par hybridation à l'Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA) à partir de parents introduits (TIB-440060, Resisto, CIP-199260-1) qui ont été croisés à des cultivars locaux (BF82 et BF92). L'objectif est de déterminer et de comparer les teneurs en caroténoïdes totaux de ces dix variétés de PDCO.

I.1.2. Méthodologie

Les teneurs en caroténoïdes totaux TCT des extraits de PDCO sont déterminées par la méthode de détection spectrophotométrique dans l'ultraviolet et le visible à longueur d'onde fixe [98]. Cette méthode est décrite au paragraphe **I.3.2. du chapitre I**. Le bêta-carotène est

utilisé comme référence. Pour ce faire, nous avons établi d'abord une courbe d'étalonnage (figure 32). Les résultats, déterminés à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage ($y = 25,56x + 0,016$; $R^2 = 0,999$), sont exprimés en mg d'équivalent de bêta-carotène (EBC) par gramme de poids sec de PDCO. Les mesures ont été réalisées trois fois.

I.2. Résultats et discussion

Dans le tableau 21, sont réunies les TCT des dix cultivars de PDCO ainsi que leur rendement agronomique enregistré au Burkina Faso par l'INERA.

Tableau 21 : TCT et rendement des dix cultivars de PDCO

Variété	TCT (mg EBC/g de poids sec)	Rendement (t/ha)
BF139	1,070±0,0061	45,00
BF51	0,860±0,0306	27,00
Tiébélé2	0,975±0,0189	20,00
TIB-440060	0,831±0,0122	11,11
CIP-199062-1	0,396±0,0087	32,25
Jewel-Léo	1,682±0,0107	30,00
Caromex	0,0905±0,0052	6,78
BF92xResisto-14	0,185±0,0014	7,50
BF92xCIP-6	0,132±0,0014	17,11
BF82xTIB-4	0,0129±0,0000	13,50

Les résultats des mesures des TCT des extraits des dix variétés de PDCO permettent de constater que le cultivar Jewel-Léo est de loin la variété la plus riche en caroténoïdes totaux avec une concentration de 1,68 mg d'EBC/g de poids sec (tableau 21, figure 54). Ces résultats sont en accord avec celui de I. T. Somé *et coll.* [98] qui avaient rapporté que la variété Jewel fait partie des variétés de PDCO les plus riches en TCT [98]. Cette variété qui est introduite au Burkina par l'INERA comme source de bêta-carotène, présente également l'un des meilleurs rendements de l'ordre de 30 tonnes à l'hectare (t/ha) après les variétés BF139 et CIP-199062-1 respectivement. Par contre la variété BF82xTIB-4, un cultivar développé par hybridation, est la moins riche en caroténoïdes totaux avec une teneur de l'ordre de 0,01 mg d'EBC/g de poids sec (tableau 21, figure 54).

Dans le domaine de la nutrition, l'estimation des teneurs en micronutriments dans les divers aliments est d'une grande importance. En effet, elle permet de connaître la valeur nutritionnelle des aliments consommés et oriente ainsi le choix des aliments à promouvoir. Il faut noter que ce sont les teneurs en caroténoïdes totaux, jointes à un bon rendement cultural, qui constituent les arguments permettant la vulgarisation d'une variété donnée. Ainsi, au vu de sa performance agronomique (rendement) et sa qualité nutritionnelle (forte teneur en caroténoïdes totaux), la variété Jewel-Léo présente des arguments de choix pour sa promotion et sa vulgarisation au Burkina Faso. C'est ainsi que nous avons choisi donc la variété Jewel-Léo pour la suite de nos travaux à savoir la caractérisation des caroténoïdes majoritaires d'une part et les essais de formulation de farine infantile d'autre part.

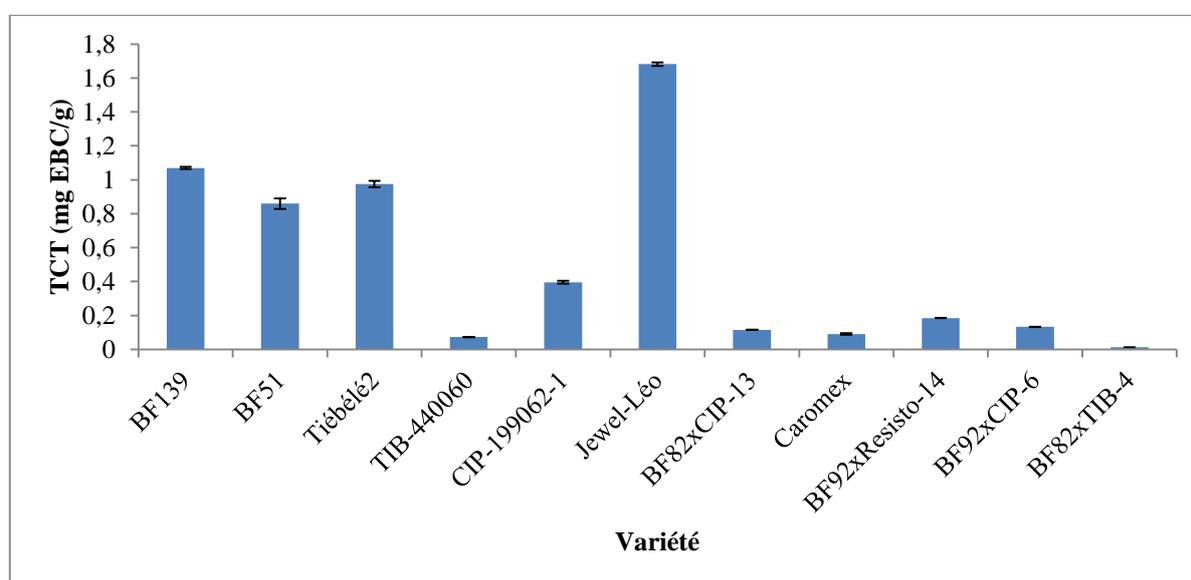


Figure 54 : Histogramme comparatif des TCT de dix variétés de PDCO

II. Caractérisation des caroténoïdes majoritaires de la variété Jewel

II.1. Matériel végétal

Jewel est une variété de patate douce à chair orange (figure 55) [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] de la famille des Convolvulacées. Elle a été créée en 1970 par croisement entre Centenniel et Nugget par le North Carolina Agricultural Research Service ^[152]. Cette variété, comme plusieurs autres cultivars, est introduite au Burkina Faso par l'INERA à partir du CIP-Afrique de l'Est comme source de bêta-carotène. C'est une plante herbacée et vivace mais annuelle en culture. La tige, de couleur verte, est rampante et mesure au moins 250 cm. Les

feuilles matures et immatures sont également de couleur verte et présentent sept lobes très légèrement dentés. La variété Jewel ne fleurit pas. La formation des tubercules est dispersée et on y rencontre des tubercules de forme longue et irrégulière ou courbée.



a) Tubercules de la variété Jewel



b) Tiges de la variété Jewel

Figure 55 : Patate douce (variété Jewel)

II.2. Extraction des caroténoïdes de la PDCO (variété Jewel)

L'extraction est pratiquée sur des tubercules préalablement lavés. Les tubercules frais de PDCO sont pelés et 30 grammes de la chair orange sont découpés en fines lamelles dans un mortier pour extraction. Pour cela, 15 mL d'hexane sont ajoutés pendant le broyage. L'extraction est répétée plusieurs fois jusqu'à la décoloration totale de l'échantillon. Pour éliminer l'eau, un desséchant, le sulfate de magnésium, a été ajouté à l'extrait hexanique. Après filtration (papier Whatman n°1), l'extrait brut est concentré à sec à une température inférieure à 35 °C et redissous dans un volume connu d'hexane pur. Pour minimiser la photoisomérisation et l'oxydation des caroténoïdes, toute la procédure d'extraction a été effectuée à l'abri de la lumière et à basse température.

II.3. Purification des caroténoïdes par chromatographie sur colonne

Les caroténoïdes ont été séparés par chromatographie sur colonne ouverte (CCO, 20 cm x 1,5 cm) sur gel de silice (40-63 μm de granulométrie). L'extrait brut a été d'abord soumis à une saponification par addition de 30 % de KOH méthanolique pendant 3 heures dans l'obscurité et à la température ambiante. Après partage liquide-liquide par l'hexane, la phase organique est extraite plusieurs fois puis concentrée à sec sous vide. Le résidu est

redissous dans un minimum d'hexane (≈ 1 mL) et déposé sur la colonne de purification. Les caroténoïdes sont élués avec de l'hexane et un mélange méthanol/dichlorométhane (1/1, v/v).

II.4. Méthode d'analyse des caroténoïdes majoritaires par CCM/MS

L'extrait pigmentaire obtenu après saponification a été analysé par CCM/MS effectué avec le système CAMAG TLC-MS interface au laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Nancy. Le spectromètre de masse utilisé est un microTOF-Q de Bruker en mode ESI positif avec une gamme de balayage de m/z allant de 530 à 580.

II.5. Résultats et discussion

II.5.1. Caractérisation des caroténoïdes majoritaires de plante étudiée

Différentes études menées sur la PDCO ont permis d'identifier les caroténoïdes synthétisés. Il est donc connu qu'elle contient du bêta-carotène. Cependant les profils pigmentaires ainsi que les niveaux de productions sont encore à détailler notamment pour la variété Jewel qui a retenu notre attention surtout pour sa forte teneur en caroténoïdes totaux. Dans cette partie nous procéderons à la caractérisation des pigments produits selon les analyses CCM/MS.

II.5.1.1. Analyses CCM/MS des caroténoïdes extraits

Les analyses des pigments caroténoïdiques de l'extrait brut de Jewel en CCM-MS et en CCM-MS/MS ont été réalisées au laboratoire de pharmacognosie de l'université de Nancy.

II.5.1.1.1. Identification des caroténoïdes majoritaires présents dans l'extrait de Jewel

Les caroténoïdes de l'extrait de Jewel isolés par la CCM, sont identifiés sur la base des informations combinées obtenues à partir de l'élution chromatographique et du spectre de masse. L'analyse des spectres CCM-MS/MS du spot 1 ($R_f = 0,48$) avec le système de solvants hexane/acétate d'éthyle 96/4 v/v) comme éluant montre que ce spot est constitué de plusieurs produits. Sur le spectre de masse en electrospray en mode positif (ESI^+), nous observons cinq ions *quasi*-moléculaires (A, B, C, D et E) à m/z 535,4 $[M+H]^+$; m/z 537,4 $[M+H]^+$; m/z 551,4 $[M+H]^+$; m/z 553,4 $[M+H]^+$ et m/z 569,4 $[M+H]^+$ suggérant des masses de 534 u ; 536 u ; 551 u ; 552 u et 568 respectivement (figure 56). Ces masses sont caractéristiques du poids moléculaire de certains caroténoïdes connus. L'identification des caroténoïdes en utilisant les informations données par la MS/MS, qui a déjà été rapportés ^[153-155], sera discutée et détaillée par la suite en prenant uniquement en compte les aspects les plus importants.

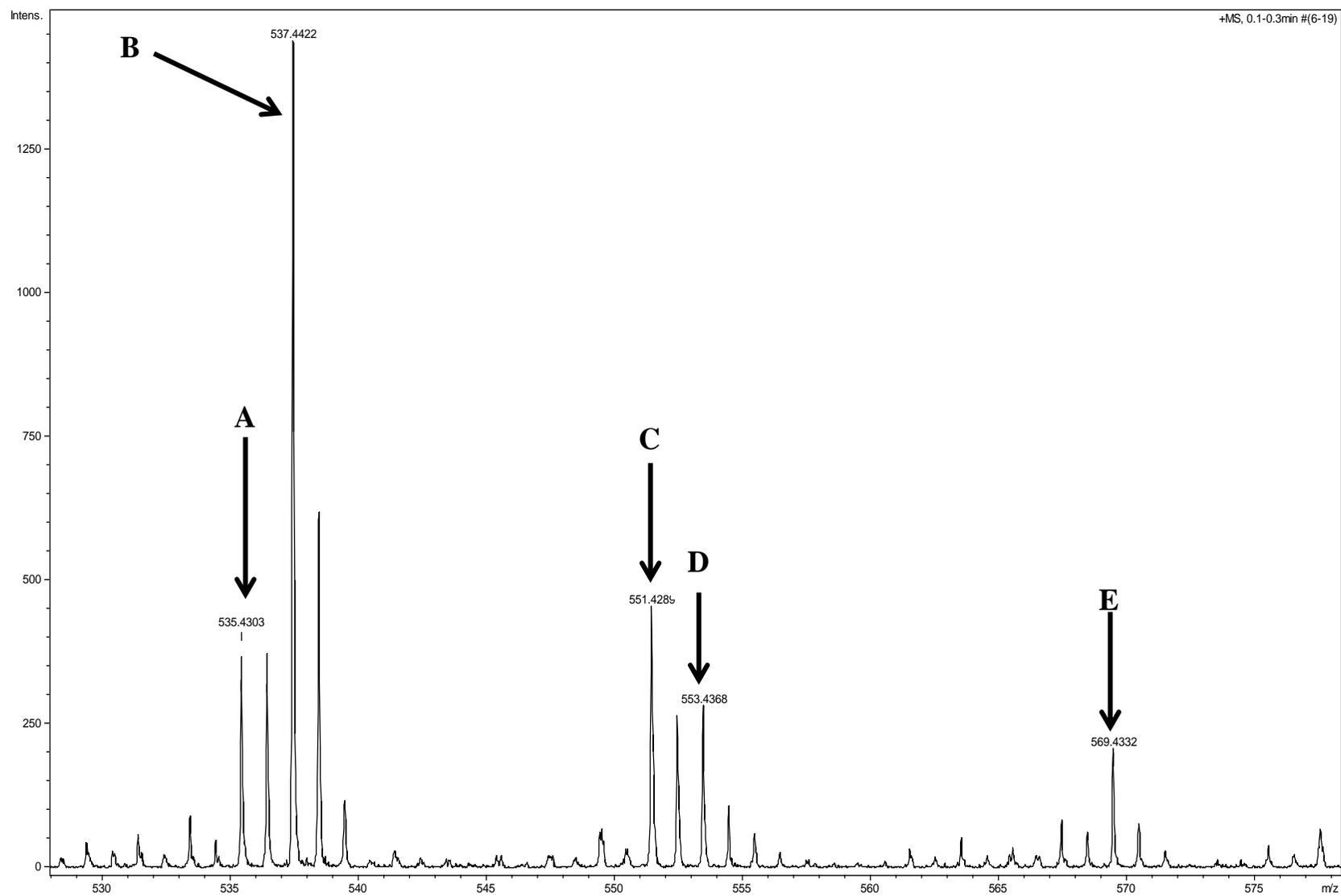


Figure 56 : Spectre de masse de l'extrait de Jewel (ESI+, hexane)

II.5.1.1.1. Identification des composés E et C

Le spectre de masse de l'extrait de PDCO montre deux pics caractéristiques m/z 551,4 et m/z 569,4 (figure 56). Sur ce spectre, nous observons un ion moléculaire m/z 569,4 en accord avec la masse calculée à l'aide de la formule ($C_{40}H_{56}O_2$). Comme souvent en mode positif, la fragmentation qui a lieu dans la source fournit d'autres ions caractéristiques. En effet, on observe un ion fragment à m/z 551,4 $[M-H-18]^+$ correspondant à la perte de H_2O . En outre, la lutéine et la zéaxanthine ont des structures très similaires, elles ne diffèrent que par la position d'une double liaison sur les cycles (figure 57). Seule la lutéine contient un groupe hydroxyle allylique, donc plus facile à éliminer que l'autre groupe hydroxyle sur l'atome de carbone secondaire avec des liaisons C-C voisines saturées. L'ion formé à m/z 551,4 $[M+H-H_2O]^+$ (figures 56 et 58) est stabilisé c'est pourquoi il a un pic plus intense que celui de l'ion moléculaire de la m/z 569,4 $[M+H]^+$ (figures 56 et 59). Contrairement à la lutéine, la zéaxanthine qui ne dispose pas de groupement hydroxyle allylique, présenterait un spectre de masse avec un pic de base m/z 569,4 plus intense que celui du fragment m/z 551,4, comme précédemment rapporté par De Rosso et Mercadante ^[156, 157]. La lutéine et la zéaxanthine ont été détectées par HPLC dans certaines variétés de PDCO ^[98]. Il découle donc de ces analyses que ces deux composés sont présentes dans l'extrait de Jewel mais la teneur en lutéine est supérieure par rapport à celle de la zéaxanthine. Les composés E et C sont respectivement la zéaxanthine et la lutéine (figure 59).

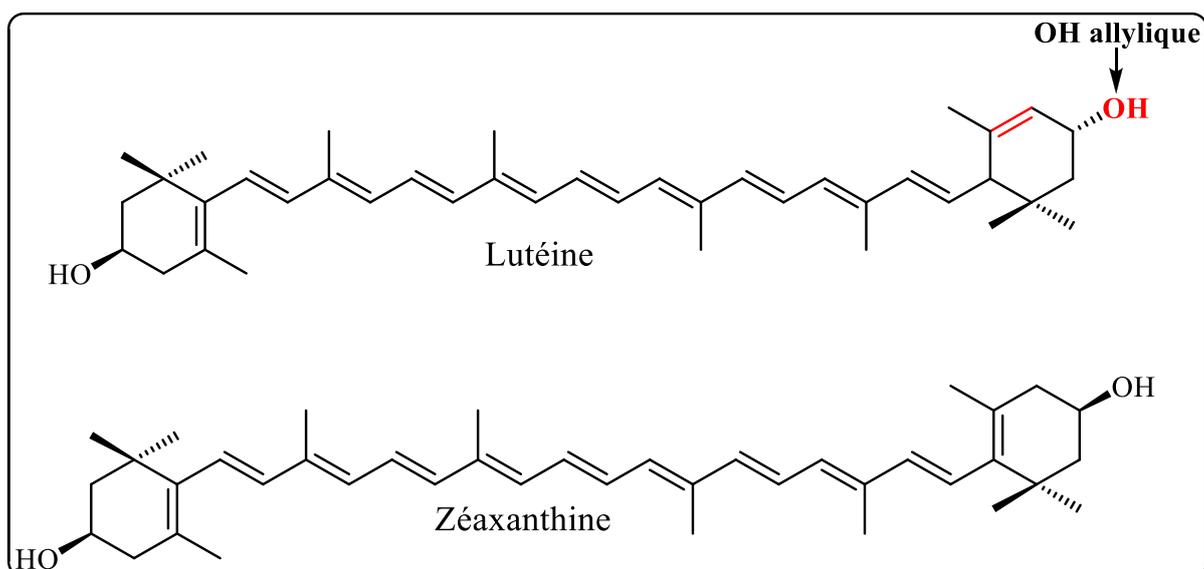


Figure 57 : Structures représentatives de la zéaxanthine et de la lutéine

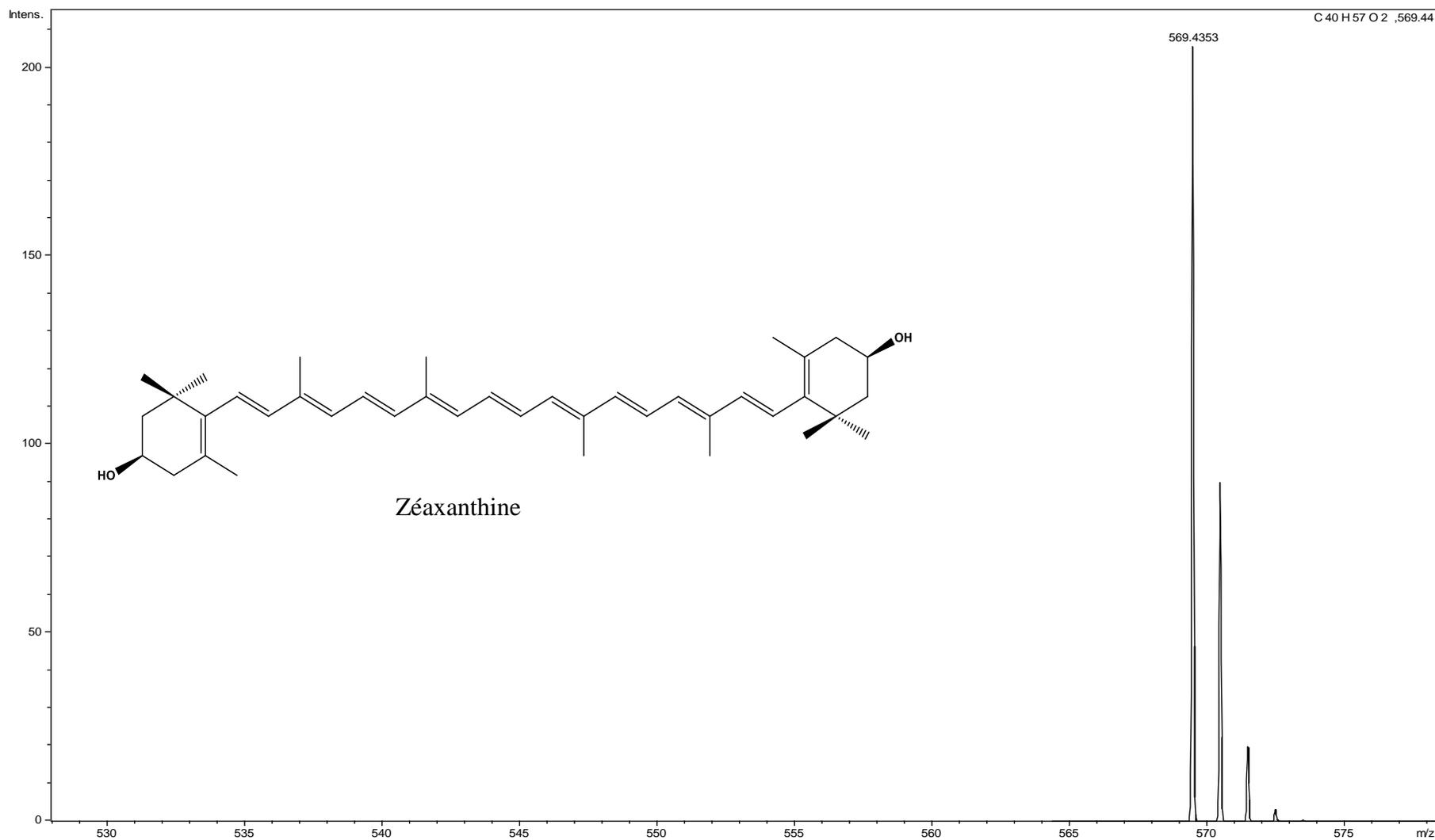


Figure 58 : Spectre MS/MS du pic E m/z 569 [M+H]⁺

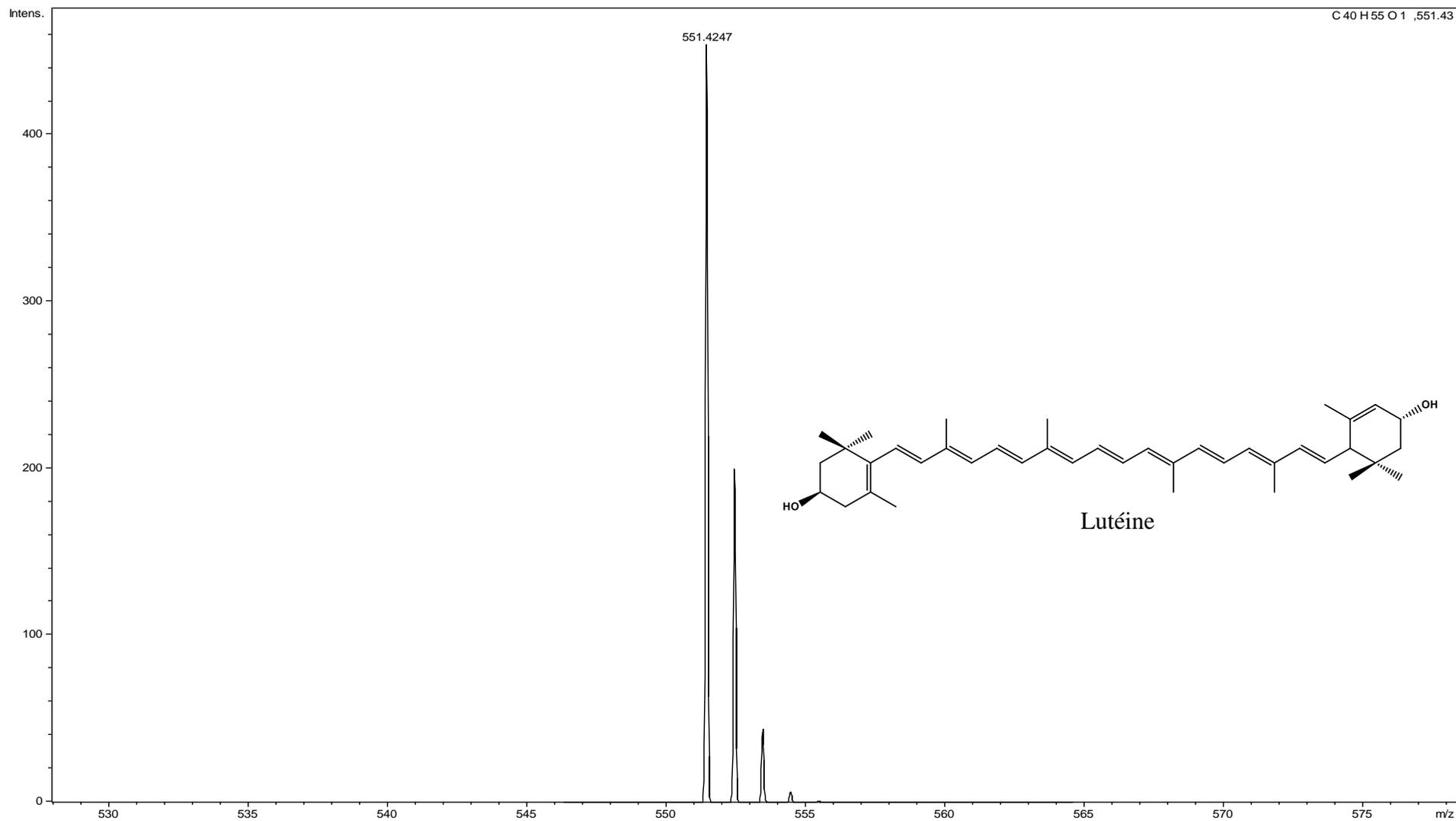


Figure 59 : Spectre MS/MS du pic C m/z 551 [M+H-H₂O]⁺

La lutéine et la zéaxanthine, vu leur structure, n'ont aucune activité provitaminique A (cf. **I.4.2.2.1.1. du chapitre I**). Mais elles interviennent dans la prévention des maladies liées à la dégénérescence maculaire [158]. En effet, de nombreuses études ont montré que la lutéine et la zéaxanthine jouent un rôle important pour la santé de l'œil, notamment pour sa protection contre le risque de dégénérescence maculaire et de cataracte, toutes deux responsables de cécité et de mal vision chez les personnes âgées. La zéaxanthine et la lutéine sont particulièrement concentrées dans la partie centrale de la rétine, appelée *macula lutea*. Ces deux mots latins qui signifient tache jaune lui sont donnés en raison de la couleur jaune de la zéaxanthine et de la lutéine. Elles forment le pigment maculaire, couche protectrice qui absorbe la lumière bleue.

II.5.1.1.1.2. Identification de composés D et A

La β -cryptoxanthine et l' α -cryptoxanthine ont la même formule brute ($C_{40}H_{56}O$) et, par conséquent, le même ion pseudo-moléculaire (m/z 553) et elles ont également le même chromophore. La seule différence structurale entre elles, réside au niveau de la position du groupe hydroxyle et de la double liaison du deuxième noyau de la molécule comme le montre la figure 60. Le groupement hydroxyle de l' α -cryptoxanthine est allylique donc facile à éliminer par rapport au groupement hydroxyle de la β -cryptoxanthine qui, lui, est lié à un atome secondaire avec des liaisons C-C voisins saturés. La différenciation entre ces deux molécules (α - et β -cryptoxanthine) se fait par comparaison de l'intensité du pic de l'ion moléculaire m/z 553 (figures 56 et 61) avec celle du fragment de m/z 535 $[M+H-18]^+$. Le spectre de masse de l'extrait de Jewel (figure 56) a montré un pic plus intense du fragment m/z 535 (pic A, figure 62) par rapport au pic de l'ion moléculaire m/z 553 (Figures 56 et 61). Cela confirme la stabilité du fragment m/z 535 après la perte de l'hydroxyle allylique de la double liaison, comme indiqué dans la littérature [159, 160]. Ces deux xanthophylles (β -cryptoxanthine et l' α - cryptoxanthine) ont été détectées dans plusieurs cultivars de PDCO. Nous pouvons déduire de ces analyses que dans l'extrait de Jewel, l' α -cryptoxanthine (pic A) est majoritaire par rapport à son homologue β -cryptoxanthine (pic D).

Par ailleurs, la zeinoxanthine qui a la même formule brute et le même chromophore que l' α -cryptoxanthine mais qui diffère par la position du groupement OH (figure 60), pourrait être identifiée par un pic plus intense de l'ion moléculaire m/z 553 par rapport à celui du fragment m/z 535. La faible intensité du pic de l'ion moléculaire montre qu'elle est minoritaire même si elle est détectée. L'emplacement exact du groupe hydroxyle est important pour la conversion de la xanthophylle en vitamine A. Vu la structure de la zeinoxanthine, elle

n'a pas d'activité provitaminique A alors que l' α - et la β -cryptoxanthine présentent une activité provitaminique A de 50 %. Cet effet est plus important lorsque ces xanthophylles sont présentes dans des quantités plus élevées dans l'extrait.

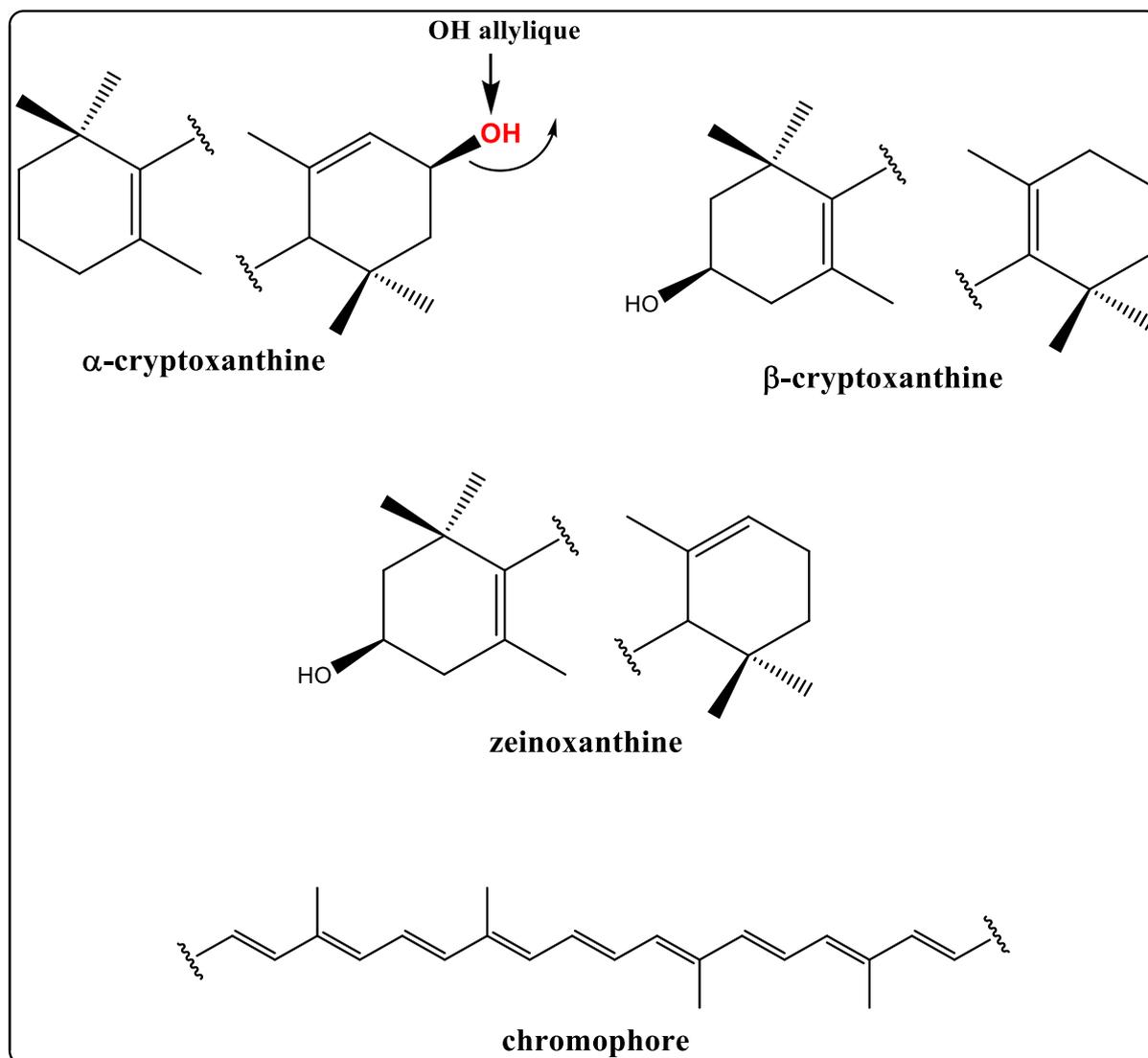


Figure 60 : Structures représentatives de α et β -cryptoxanthine

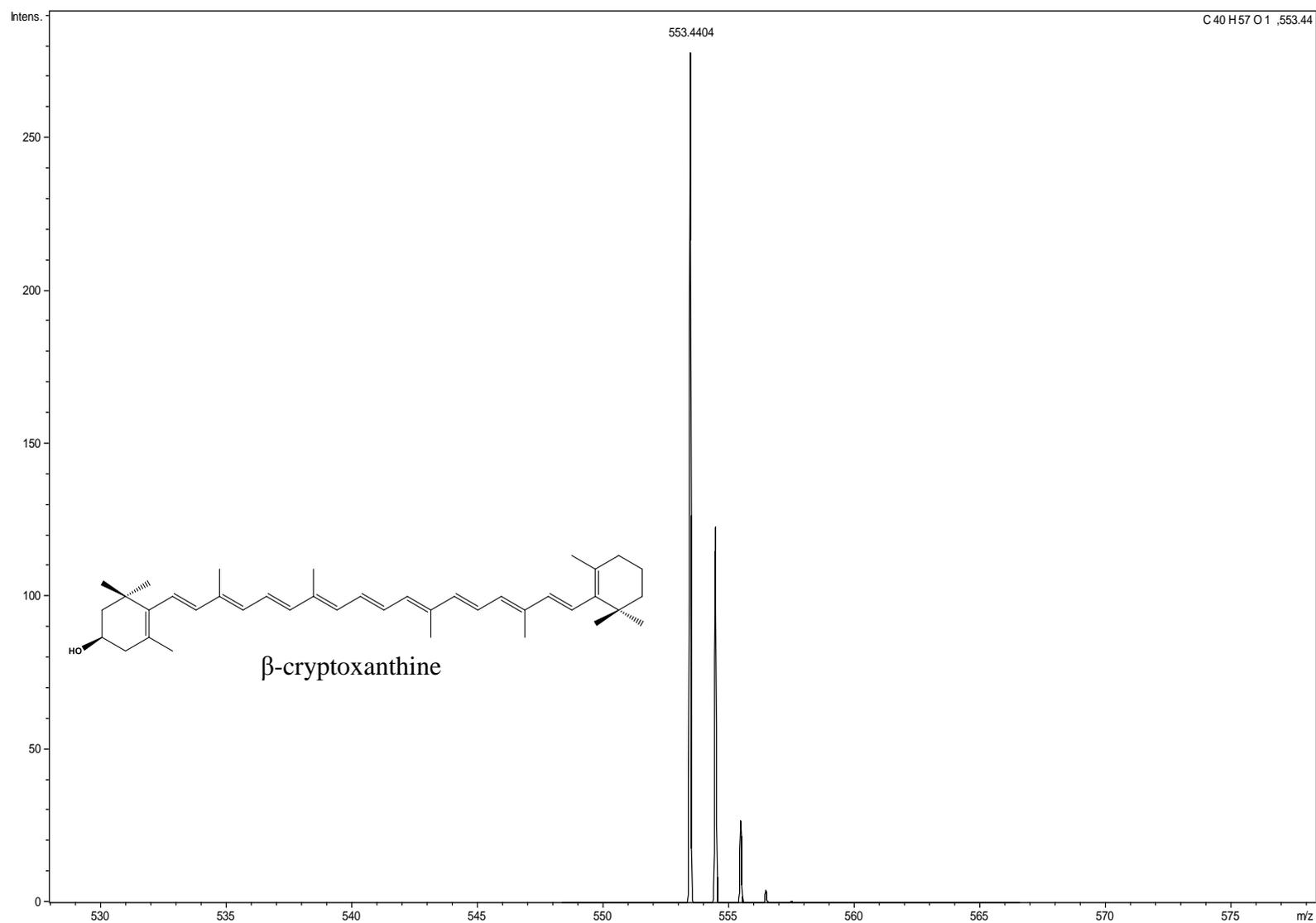


Figure 61 : Spectre MS/MS du pic D m/z 553 $[M+H]^+$

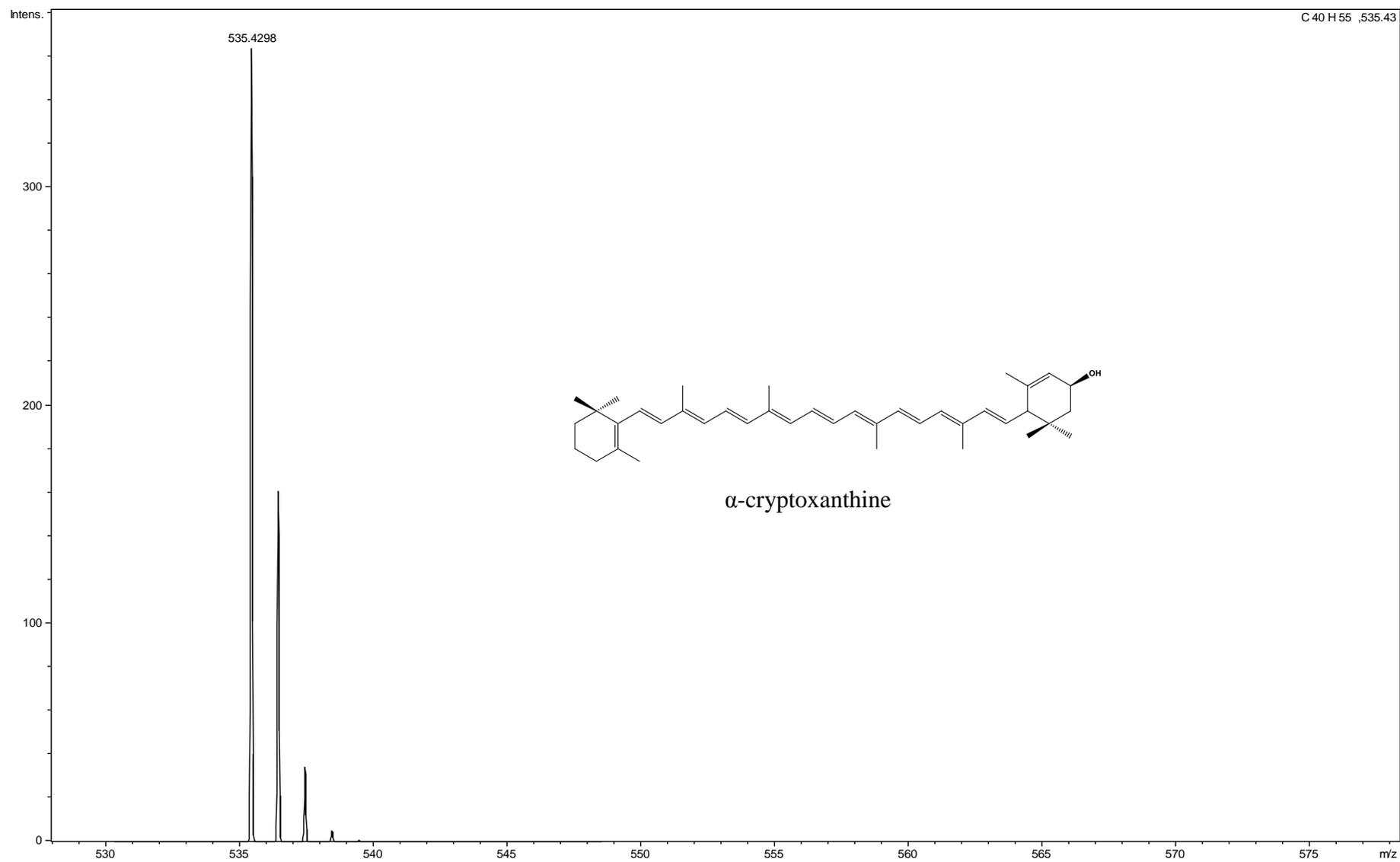


Figure 62 : Spectre MS/MS du pic A m/z 535 $[M+H-H_2O]^+$

II.5.1.1.1.3. Identification du composé B

Le bêta-carotène (pic B) tout comme l'alpha, le gamma, l'épsilon-carotène et le lycopène ont la même formule chimique ($C_{40}H_{56}$) et, par conséquent, un ion moléculaire identique m/z 537,4 $[M+H]^+$ (figures 56 et 64). L'observation de ce spectre de masse (figures 56 et 64) montre que l'ion moléculaire m/z 537,4 $[M+H]^+$ (pic B) est de loin le plus abondant par rapport aux autres. De nombreuses études ont montré que dans la PDCO, le β -carotène est le caroténoïde le plus abondant [95, 98, 110, 160, 161]. Dans la littérature, on a noté la présence de l' α -carotène, le γ -carotène et le lycopène dans certaines variétés de la PDCO mais en très faibles concentrations [98]. I. T. et ses collègues ont pu quantifier par HPLC en plus du β -carotène qui est le caroténoïde le plus abondant, le lycopène et l' α -carotène dans les extraits de plusieurs variétés de PDCO dont la variété Jewel [98]. Ainsi nous pouvons identifier ce composé majoritaire (pic B) comme étant le β -carotène dont la structure est représentée par la figure 63. Les autres carotènes comme le lycopène, l' α -carotène, le γ -carotène, l' ε -carotène sont en très faible teneur.

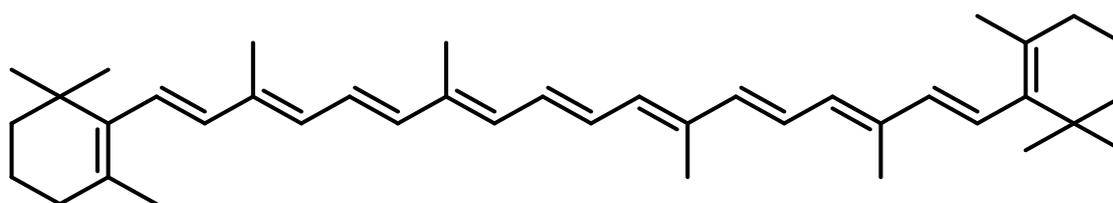


Figure 63 : Structure du β -carotène (pic B)

Conclusion

Nous présentons dans ce travail les résultats de l'évaluation des teneurs en caroténoïdes totaux de dix cultivars de patate douce à chair orange du Burkina Faso. Les variétés Jewel, BF139 et Tiébélé2 présentent respectivement les plus fortes teneurs en caroténoïdes totaux. La variété Jewel, choisie en raison de sa forte teneur en caroténoïdes totaux, renferme en majorité le β -carotène. À l'aide de la chromatographie sur couche mince couplée à la spectrométrie de masse, d'autres caroténoïdes majoritaires comme l' α -cryptoxanthine et la lutéine ont été identifiées. Cette technique est un outil utile et performant pour la confirmation et l'identification de la structure des caroténoïdes élués sur une plaque CCM. Vu leur structure, l' α -, le β -carotène et cryptoxanthine ont une activité provitaminique A faisant ainsi des végétaux qui en produisent en grande quantité, de véritables sources de vitamine A. C'est pour cette raison, en plus de son bon rendement que nous avons choisi la variété Jewel pour la suite de notre étude, c'est-à-dire la production de farine infantile pour la récupération d'enfants malnutris au centre saint Camille à Ouagadougou.

CONCLUSION GÉNÉRALE

La flore burkinabè regorge de nombreuses plantes peu consommées mais très accessibles et très riches en composés phytochimiques. Parmi elles, on a la patate douce à chair orange (PDCO) qui a fait l'objet de notre étude. D'après les données bibliographiques, les caroténoïdes et les polyphénols font l'objet d'un intérêt de plus en plus croissant en raison de leur efficacité antioxydante dans la neutralisation des radicaux libres. Il existe plusieurs méthodes d'évaluation de l'efficacité antioxydante des extraits végétaux. Elles se subdivisent en deux groupes :

- Des mesures basées sur un mécanisme de transfert de proton : HAT (Hydrogen Atom Transfer). Ces méthodes qui regroupent l'ORAC, la Crocine, le TRAP, le TOSC, la LDL, etc. mesurent la capacité d'un extrait à réduire les ERO (Espèces Réactives de l'Oxygène) par un transfert de proton ;
- Des mesures basées sur un mécanisme de transfert d'électron : SET (Single Electron Transfer). Elles regroupent le RFC, le TEAC, le FRAP, le CUPRAC, le DPPH, etc. et déterminent la capacité d'un extrait à piéger les ERO par un transfert d'électron.

Notre étude a porté d'une part, sur l'évaluation des propriétés antioxydantes des extraits de plusieurs variétés de PDCO et à l'identification des paramètres influençant la production des composés qui sont à l'origine de ces propriétés antioxydantes dans la PDCO et d'autre part à l'identification des caroténoïdes majoritaires de la variété Jewel.

- Les propriétés antioxydantes des extraits de PDCO sont non négligeables. Elles varient de 1,07 à 4,12 mg d'ET/g de poids sec. L'extrait de la variété hybride BF92xResisto-14 présente la meilleure activité. Une bonne corrélation a été établie entre la teneur en composés phénoliques et la capacité antioxydante ($R = 0,957$) d'une part et d'autre part entre les caroténoïdes totaux et la capacité antioxydante ($R = 0,867$).

- L'influence des facteurs tels que les fertilisants organiques et minéraux, les zones agro-écologiques et les attaques des « *bio agresseurs* » (charançons) sur la production des caroténoïdes et des phénols totaux de la PDCO a été évaluée. En effet, l'étude de l'influence des fertilisants organiques et minéraux sur les teneurs de ces composés phytochimiques de la PDCO a montré un effet positif. Cependant, les effets majeurs sont obtenus par la combinaison des deux types de fertilisants. L'analyse des extraits de PDCO récoltée dans trois localités du Burkina a montré une variation de près de 30 % et 45 %

respectivement pour les teneurs en composés phénoliques et en caroténoïdes totaux. Toutefois, ces valeurs pourraient fortement être influencées par d'autres facteurs environnementaux non contrôlés tels que la température, le rayonnement. Contrairement aux composés phénoliques, les attaques des charançons ont un effet significatif sur les concentrations des caroténoïdes provitamines A de la PDCO.

- Les résultats obtenus concernant la caractérisation des caroténoïdes majoritaires de la PDCO (variété Jewel) sont conformes aux données bibliographiques : le β -carotène (provitamine A) a été identifié comme le caroténoïde majoritaire de la PDCO. D'autres caroténoïdes provitamines A en faible concentration tels que l' α -carotène, la β -cryptoxanthine ont été identifiés. La lutéine, la zéaxanthine, le lycopène, l' α -cryptoxanthine et la zeinoxanthine qui n'ont aucune activité vitaminique A mais d'autres propriétés biologiques comme l'activité antioxydante, ont été également identifiés.

L'ensemble des résultats, tant sur le plan chimique que biologique, met en évidence les potentialités de toutes ces variétés pour une exploitation de leurs extraits à des fins thérapeutiques ou pour des applications en agroalimentaire ou en cosmétique. Dans le futur, nous comptons :

- ✓ Isoler et caractériser les polyphénols de la PDCO par MS et la RMN ;
- ✓ Evaluer la capacité biodisponible de ces composés dans l'organisme ;
- ✓ Poursuivre l'inventaire des plantes du Burkina Faso riches en composés bioactifs tout en sélectionnant celles qui présenteraient un intérêt en agro-alimentaire ou en phytomédecine;
- ✓ Compléter l'étude des activités biologiques en s'intéressant aux activités antimicrobiennes et antifongiques.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Préparation du matériel végétal

Tableau 22 : Matériel végétal

Plante	Variété	Lieu de récolte
	TIB-440060	
	BF92xResisto-14	
	BF92xCIP-6	
	BF82xTIB-6	
	BF82xCIP-13	Station expérimentale de l'INERA, Kambouinsin (2011-2013)
	BF82xTIB-4	
Patate douce à chair orange	BF82xCIP-18	
	Caromex	
	BF139	
	BF51	
	CIP-199062-1	
	Jewel	Province de la Sissili centre ouest du Burkina Faso (2013)
	Tiébélé2	

II. Propriétés biologiques

Les méthodes de dosage des micronutriments (caroténoïdes totaux, polyphénols) ainsi que l'activité antioxydante des extraits de PDCO ont déjà été développées dans le corps du mémoire. Elles ne seront pas décrites à nouveau dans cette partie.

III. Extraction, séparation et purification des caroténoïdes

III.1. Extraction

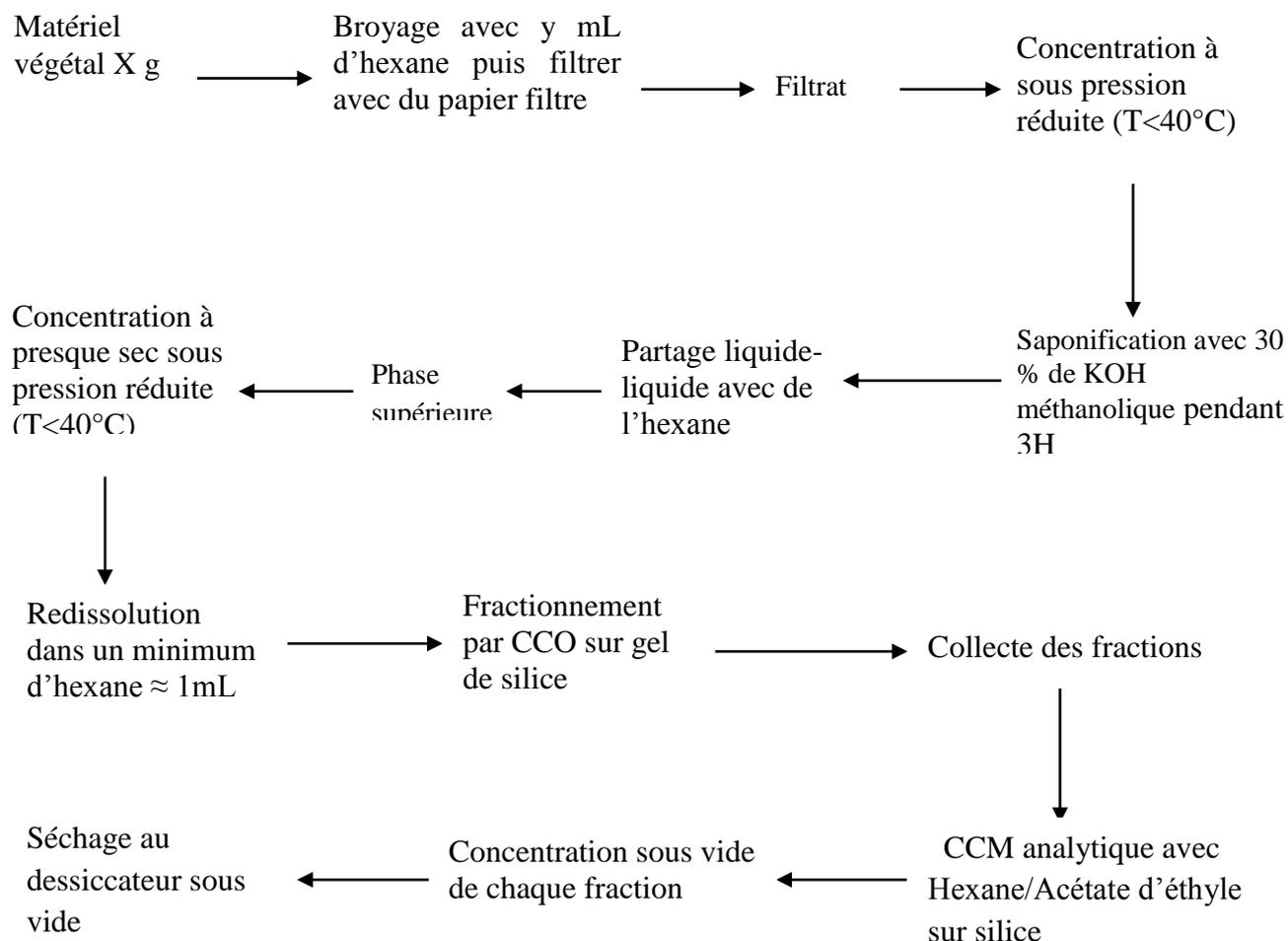


Figure 65 : Schéma général de l'extraction à la séparation des pigments purs

III.2. Méthodes chromatographiques

III.2.1. Chromatographie sur colonne ouverte

Pour la chromatographie sur colonne ouverte, diverses phases ont été utilisées dans des colonnes en verre. Le diamètre et la taille des colonnes sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier.

La phase stationnaire utilisée est la silice en phase normale. L'élution est réalisée par gradient de polarité. La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de silice correspondant à environ 2 fois sa masse et le dépôt de l'extrait a lieu sous forme solide.

Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

III.2.2. Chromatographie sur couche mince

Elle est faite sur des plaques HPTLC. Nous avons utilisé comme solvants d'élution le système hexane/acétate d'éthyle (96 : 4, v/v).

III.3. Spectrométrie de masse (MS)

Les spectres de masse en TLC/MS ont été réalisés sur un spectromètre de masse microTOF-Q de Bruker en mode ESI positif équipé d'une interface CAMAG TLC-MS. Température de la source : 370 °C ; Débit : 15 µL/min ; Energie de collision appliquée pour les fragmentations en MS/MS est réglée de manière à obtenir une transmission optimale des ions fils (en général entre 33 % et 40 % de 5 V).

Ionisation par Electrospray (Electro Spray Ionisation) ESI

L'ionisation est ici produite par application, à pression atmosphérique, d'un fort champ électrique (3 à 6 KeV) sur un liquide traversant un capillaire à un faible débit (1-10 µl.min⁻¹). Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire. La rupture de la phase liquide forme des gouttelettes hautement chargées (Spray). L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer leur rétrécissement jusqu'au sommet où des forces coulombiennes répulsives vont approcher le niveau des forces de cohésion de celle-ci et provoquer leur explosion. Ces gouttelettes subissent alors une cascade de fissions donnant des gouttelettes de plus en plus petites, jusqu'au moment où le champ électrique en leur surface devient suffisant pour provoquer la désorption des ions. Ces ions ainsi produits sont porteurs d'un grand nombre de charges s'il existe plusieurs sites ionisables sur la molécule.

Références bibliographiques

1. A. Sass-Kiss, J. Kiss, P. Milotay, M.M. Kerek, M. Toth-Markus. Differences in anthocyanin and carotenoid content of fruits and vegetables. *Food Research International*, (2005), 38, 1023–1029.
2. Wenqing Xu, Lixiang Liu, Bing Hu, Yi Sun, Hong Ye, Daifu Ma, Xiaoxiong Zeng. TPC in the leaves of 116 sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) varieties and Pushu 53 leaf extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, (2010), 23, 599–604.
3. Ribéreau-Gayon, P. *Les composés phénoliques des végétaux*. Ed. Dunod, (1968) Paris., 254 pages.
4. Palé, E. Contribution à l'étude des composés anthocyaniques des plantes: cas *Hibiscus sabdariffa*, *Lannea microcarpa*, *Vigna subterranea* et *Sorghum caudatum* du Burkina Faso. Thèse de troisième cycle, (1998) Université de Ouagadougou 115 pages.
5. Hema Adama. Études des molécules bioactives isolées de plantes du Burkina Faso. *Thèse de Doctorat*. (2010), Université de Ouagadougou. 170 pages.
6. Dabiré M. Constantin. Composition chimique et activités antioxydantes des huiles essentielles de quelques plantes aromatiques du Burkina Faso. Thèse de Doctorat. (2011), Université de Ouagadougou. 179 pages.
7. Stéphanie MORIN-SAVY. Biosynthèse de caroténoïdes aromatiques hydroxylés par des bactéries non photosynthétiques : Des carotènes aux xanthophylles. *Thèse de Doctorat*, (2005) Université de Bretagne occidentale, 172 pages.
8. Céline CHANFORAN. Stabilité de microconstituants de la tomate (composés phénoliques, caroténoïdes, vitamines C et E) au cours des procédés de transformation : études en systèmes modèles, mise au point d'un modèle stoechio-cinétique et validation pour l'étape unitaire de préparation de sauce tomate. *Thèse de Doctorat*. (2010), Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. 388 pages.
9. Asmus KD, Bonifacic M. Free radical chemistry. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier; (2000). p. 3–53.
10. Christelle Koechlin-Ramonatxo. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydants ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, (2006), 20, 165–177.

11. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Biology and Medicine*. Oxford: Free Radicals in Clarenton Prep; (1989) [543p].
12. Barouki R, Morel Y. [Oxidative stress and gene expression]. *J Soc Biol* (2001), 195: 377–82.
13. Powers SK, Locke AM, Demirel HA. Exercise, heat shock proteins, and myocardial protection from I-R injury. *Med Sci Sports Exerc* (2001), 33: 386–92.
14. Reid MB, Khawli FA, Moody MR. Reactive oxygen in skeletal muscle. III. Contractility of unfatigued muscle. *J Appl Physiol* (1993), 75: 1081–7.
15. Balon TW, Nadler JL. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J Appl Physiol* (1994), 77:2519–21.
16. Macnee W, Rahman I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* (1999), 160:S58–65.
17. Powers SK, Sen CK. Physiological antioxidants and exercise training. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier. (2000) p. 221–41.
18. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. (2000), 50:279–89.
19. Dean RT, Fu S, Stocker, R, Davies MJ. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*, (1997); 324(Pt 1):1–18.
20. Hartmann A, Niess A M. Oxidative DNA damage in exercise. In: Sen CK, Packer L, Hanninen O, editors. *Handbook of Oxidants and Antioxidants in Exercise*. Amsterdam: Elsevier; (2000), p. 195–217.
21. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Cellular Physiol Rev*. (2002), 82:47.
22. Lee KW, Lee HJ. Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis. *Mech Ageing Dev*. (2006), 127(5):424–31.
23. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. (2004), 44:239–67.
24. Norris EH, Giasson BI. Role of oxidative damage in protein aggregation associated with Parkinson's disease and related disorders. *Antioxid Redox Signal*. (2005), 7(5–6):672–84.
25. Moreira PL, Zhu X, Nunomura A, Smith MA, Perry G. Therapeutic options in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. (2006), 6(6):897–910.

26. Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds, Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and α -Carotene and Other Carotenoids: Overview, Antioxidant Definition, and Relationship to Chronic Disease. In Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids; National Academy of Science: Washington, DC, (2000) p 35-57.
27. Gutteridge, J. M., and Halliwell, B. *Antioxydants in nutrition, health and disease*, Oxford University Press, (1994) New York.
28. Valery Afonso, Romuald Champy, Dragoslav Mitrovic, Pascal Collin, and Abderrahim Lomri. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint, Bone, Spine : Revue Du Rhumatisme*, (July 2007), 74(4) :324–329, PMID : 17590367.
29. Nicolas PILLON. Rôle des hydroxy-alkénals, dérivés de peroxydation lipidique, dans la physiopathologie de l'insulino-résistance. *Thèse de Doctorat*. (2010), l'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon. 133 pages.
30. J M Mates, C Perez-Gomez, and I Nunez de Castro. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry*, (November 1999), 32(8):595–603, PMID: 10638941.
31. Meziti. Activité antioxydante des extraits de grains de *Nigella sativa* L. Étude *in vitro* et *in vivo*. Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister en Biochimie appliquée. Option : Molécules Bioactives. Faculté des Sciences ; Département de Sciences Biologiques. Université de EL-HAJLAKDAR 2009 ; 105 pages.
32. Barber, H.N. Selection in natural populations. *Heredity*, (1965), 20, 551.
33. Calvin A. Investigation phytochimique de trois plantes indonésiennes aux propriétés antioxydantes et antiradicalaires. *Tinospora crispa*, *Merremia emarginata* et *Orophea enneandra*. Thèse Université de Lausanne. (2001); 243p.
34. Gabriela Burgos, Walter Amoros, Elisa Salas, Lupita Muñoa, Paola Sosa, Carlos Díaz, Merideth Bonierbale. Carotenoid concentrations of native Andean potatoes as affected by cooking. *Food Chemistry*, (2012), 133, 1131–1137.
35. Belanger, J., & Johns, T. Biological diversity, dietary diversity, and eye health in developing country populations: Establishing the evidence-base. *EcoHealth*, (2008), 5, 244–256.
36. Kospell, D., & Kospell, D. Accumulation and bioavailability of dietary carotenoids in vegetable crops. *TRENDS in Plant Science*, (2006), 11(10).

37. Fraser, P., & Bramley, P. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, (2004), 43, 228–265.
38. Harborne, J. B. Introduction to ecological biochemistry (3rd ed.). London: Academic Press, (1988).
39. Simmonds, M. S. J. Flavonoid-insect interaction: Recent advances in our knowledge. *Phytochemistry*, (2003), 64, 21–30.
40. Bruneton J. Pharmacognosie-phytochimie. Plantes médicinales. 2^{ème} éd. Tec et Doc. Paris : *Lavoisier*. (1993), 915 pages.
41. EHPELE Eugène. Étude des propriétés antiradicalaires d'extraits de *Physalis angulata* L. (solanaceae). *Mémoire de DEA de pharmacologie*. (2013). Université de Ouagadougou, 95 pages.
42. Hedhili L. Microprojet : les antioxydants dans les aliments. Institut Préparatoire aux Études d'Ingénieurs de Nabeul (IPEIN) Tunisie.
43. Nacoulma OG. Plantes médicinales et pratiques médicales traditionnelles au Burkina Faso. Cas du plateau central. *Thèse d'État*. Université de Ouagadougou. (1996), 1 : 320 pages 2 : 261 pages.
44. Amadou BS. Étude de la phytochimie et des activités biologiques de *Combretum glutinosum* Perr. Ex DC (Combretaceae). Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontostomatologie. Université de Bamako (2005), 124 pages.
45. Le Grusse, J., and Watier, B., (Eds.) (1993) *Les vitamines*, Centre d'Etude et d'Information sur les Vitamines, Neuilly-sur-Seine.
46. Ghiselli, A.; Serafini, M.; Maiani, G.; Azzini, E.; Ferro-Luzzi, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biol. Med.* (1995), 18, 29-36.
47. Glazer, A. N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. *Methods Enzymol.* (1990), 186, 161- 168.
48. Cao, G.; Alessio, H. M.; Cutler, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* (1993), 14, 303-311.
49. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, (2001), 49, 4619.
50. Niki, E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods Enzymol.*, (1990), 186, 100.

51. Cao, G.; Prior, R. L. Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Methods Enzymol.*, (1999), 50, 299.
52. Prior, R. L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu, X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch-Woodill, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. *J. Agric. Food Chem.* (2003), 51, 3273-3279.
53. Ou, B.; Prior, R. L.; Huang, D. The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* (2005), 53, 1841-1856.
54. Huang, D.; Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.; Prior, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem.* (2002), 50, 4437-4444.
55. Bors, W.; Michel, C.; Saran, M. Inhibition of bleaching of the carotenoid crocin, a rapid test for quantifying antioxidant activity. *Biochim. Biophys. Acta*, (1984), 796, 312-319.
56. Turaro, F.; Ghiselli, A.; Rapuzzi, P.; Maiorino, M.; Ursini, F. Analysis of plasma antioxidants capacity by competition kinetics. *Free Radical Biol. Med.* (1998), 24, 1228-1234.
57. Bowry, V. W.; Ingold, K. U. The unexpected role of vitamin E (R-tocopherol) in the peroxidation of human low-density lipoprotein. *Acc. Chem. Res.*, (1999), 32, 27.
58. Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U.; Locke, S. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett.* (1985), 187 (1), 33-37.
59. Ghiselli, A.; Serafini, M.; Natella, F.; Scaccini, C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical review and experimental data. *Free Radical Biol. Med.*, (2000), 29, 1106.
60. Howard, J. J.; Taylor, P. J. A.; Ingold, K. U. Inhibited autoxidation of styrene. IV. Solvent effects. *Can. J. Chem.*, (1964), 42, 1044.
61. Valkonen, M.; Kuusi, T. Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. *J. Lipid Res.*, (1997), 38, (4), 823.

62. Wayner, D. D. M.; Burton, G. W.; Ingold, K. U.; Barclay, L. R. C.; Locke, S. J. The relative contribution of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, (1987), 924, 408.
63. Winston, G. W.; Regoli, F.; Dugas, A. J., Jr.; Fong, J. H.; Blanchard, K. A. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biol. Med.* (1998), 24, 480-493.
64. Lichtenthaler, R.; Marx, F. Total oxidant scavenging capacities of common European fruit and vegetable Juices. *J. Agric. Food Chem.* (2005), 53, 103-110.
65. Handelman, G. J.; Cao, G.; Walter, M. F.; Nightingale, Z. D.; Paul, G. L.; Prior, R. L.; Blumberg, J. B. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 1. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation and oxygen radical absorbance capacity. *J. Agric. Food Chem.* (1999), 47, 4888-4893.
66. Neudörffer, A.; Bonnefont-Rousselot, D.; Legrand, A.; Fleury, M.-B.; Largeron, M. 4-Hydroxycinnamic ethyl ester derivatives and related dehydromers: relationship between oxidation potential and protective effects against oxidation of low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* (2004), 52, 2984-2091.
67. Wright, J. S.; Johnson, E. R.; DiLabio, G. A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.* (2001), 123, 1173-1183.
68. Lemanska, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Zielinski, R.; Soffer, A. E. M. F.; Rietjens, I. M. C. M. The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanisms of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Biol. Med.* (2001), 31, 869-881.
69. Sartor, V.; Henderson, P. T.; Schuster, G. B. Radical cation transport and reaction in RNA/DNA hybrid duplexes: effect of global structure on reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* (1999), 121, 11027-11033.
70. Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* (1999), 299, 15-27.
71. Folin, O. Tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *J. Biol. Chem.* (1927), 73, 672-649.

72. Singleton, V. L.; Rossi, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* (1965), 16, 144-158.
73. Stevanato, R.; Fabris, S.; Momo, F. Enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *J. Agric. Food Chem.* (2004), 52, 6287-6293.
74. Box, J. D. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.* (1983), 17, 511-525.
75. Peterson, G. L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowery et al. *Anal. Biochem.* (1979), 18, 201-220.
76. Miller, N. J.; Diplock, A. T.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.* (1993), 84, 407-412.
77. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* (1999), 299, 152-178.
78. Van den Berg, R.; Haenen, G. R. M. M.; Van den Berg, H.; Bast, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* (1999), 66, 511-517.
79. Cano, A.; Hernandez-Ruiz, J.; Garcia-Canovas, F.; Acosta, M. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal.* (1998), 9, 196-202.
80. Pellegrini, P.; Serafini, M.; Colombi, B.; Del Rio, D.; Salvatore, S.; Bianchi, M.; Brighenti, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* (2003), 133, 2812-2819.
81. Pietta, P.; Simonetti, P.; Gardana, C.; Mauri, P. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Ginkgo biloba flavonol and Camellia sinensis catechin metabolites. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2000), 23, 223-226.
82. Benzie I. F.; Strain J. J. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, *Anal. Biochem.*, (1996), 239, 70-76.
83. Pulido, R.; Bravo, L.; Saura-Calixto, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* (2000), 48, 3396-3402.
84. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biol. Med.* (1997), 22, 749-760.

85. Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Food Sci. Technol.-Leb.* (1997), 30 (6), 609-615.
86. Foti, M. C.; Daquino, C.; Geraci, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.* (2004), 69, 2309-2314.
87. Noruma, T.; Kikuchi, M.; Kawakami, Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biochem. Mol. Biol. Int.* (1997), 42, 361-370.
88. Lucarini, M.; Pedrielli, P.; Pedulli, G. F.; Valginigli, L.; Gimes, D.; Tordo, P. Bond dissociation energies of the N-H bond and rate constants for the reaction with alkyl, alkoxy, and peroxy radicals of phenothiazines and related compounds. *J. Am. Chem. Soc.* (1999), 121, 11546-11553.
89. Scherer R., Godoy H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry.* (2009), 112, 654-658.
90. Abuja P. M., Albertini R., Esterbauer H. Simulation of the induction of oxidation of low-density lipoprotein by high copper concentrations: evidence for a non constant rate of initiation. *Chem. Res. Toxicol.* (1997), 10, 644-651.
91. Jiménez-Escrig A.; Jiménez-Jiménez I., Sánchez-Moreno C., Saura-Calixto F. Evaluation of free radical scavenging of dietary carotenoids by the stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *J. Sci. Food Agric.* (2000), 1686-1690.
92. Saranya Srisuwan, Darasinh Sihachakr, Sonja Siljak-Yakovlev. The origin and evolution of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. *Plant Science.* (2006), 171, 424-433.
93. www.cipotato.org/sweetpotato/sweetpotato.htm
94. P.J. van Jaarsveld, De Wet Marais, E. Harmse, P. Nestel, D.B. Rodriguez-Amaya. Retention of β -carotene in boiled, mashed orange-fleshed sweet potato. *Journal of Food Composition and Analysis* (2006), 19, 321-329.
95. Keith Tomlins, Constance Owori, Aurelie Bechoff, Geoffrey Menya, Andrew Westby. Relationship among the carotenoid content, dry matter content and sensory attributes of sweet potato. *Food Chemistry*, (2012), 131, 14-21.

96. Visioli, F., Riso, P., Grande, S., Galli, C., and Porrini, M. Protective activity of tomato products on in vivo markers of lipid oxidation, *European Journal of Nutrition*. (2003), 42, 201-206.
97. Takashi Maoka, Naoshige Akimoto, Koji Ishiguro, Masaru Yoshinaga, Makoto Yoshimoto. Carotenoids with a 5, 6-dihydro-5, 6-dihydroxy-b-end group, from yellow sweet potato “Benimasari”, *Ipomoea batatas* LAM. *Phytochemistry* (2007), 68, 1740–1745.
98. Issa T. Somé, Marie-Noël Zagré, Patrick E. Kafando, Mohamed Ag Bendeck, Shawn K. Baker, Hélène Deslile, Pierre I. Guissou. Validation d’une méthode de dosage des caroténoïdes par CLHP : application à la détermination de teneur en caroténoïdes dans dix variétés de patates douces (*Ipomea batata*). *Comptes Rendus Chimie*, (2004), 7, 1063–1071.
99. Robert Williams, Felisberto Soares, Leandro Pereira, Bosco Belo, Abril Soares, Asep Setiawan, Martin Browne, Harry Nesbitt, William Erskine. Sweet potato can contribute to both nutritional and food security in Timor-Leste. *Field Crops Research*. (2013), 146, 38–43.
100. Steed, L.E., Truong, V.-D. Anthocyanin content, antioxidant activity, and selected physical properties of flowable purple-fleshed sweet potato purees. *Journal of Food Science* (2008), 73, 215–221.
101. Yoshimoto, M., Yahiya, S., Okuno, S., Islam, M.S., Ishiguro, K., Yamakawa, O. Antimutagenicity of mono-, di-, and tricaffeoylquinic acid derivatives isolated from sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) leaf. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* (2002), 66, 2336–2341.
102. Tamaki, K., Tamaki, T., Suzuki, Y. Deodorisation of off-odour during sweet potato juice production by employing physical and chemical deodorants. *Food Chemistry*, (2007), 105, 454–461.
103. Rowena Grace O. Rumbaoa, Djanna F. Cornago, Inacrist M. Geronimo. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties. *Food Chemistry* (2009), 113, 1133–1138.
104. Shih-Chuan Liu, Jau-Tien Lin, Deng-Jye Yang. Determination of cis- and trans- α - and β -carotenoids in Taiwanese sweet potatoes (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) harvested at various times. *Food Chemistry*, (2009), 116, 605–610.
105. Oki, T., Masuda, M., Furuta, S., Nishiba, Y., Terahara, N., & Suda, I. Involvement of anthocyanins and other phenolic compounds in radicalscavenging

- activity of purple-fleshed sweet potato cultivars. *Journal of Food Science*, (2002), 67, 1752–1756.
106. Ana Anastácio, Isabel S. Carvalho. Phenolics extraction from sweet potato peels: Key factors screening through a Placket–Burman design. *Industrial Crops and Products*. (2013), 43, 99–105.
107. Martin Philpott, Lynnette R. Ferguson, Kevin S. Gould, Philip J. Harris. Anthocyanidin-containing compounds occur in the periderm cell walls of the storage roots of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Journal of Plant Physiology* (2009), 166, 1112-1117
108. Lenucci, M. S., Cadinu, D., Taurino, M., Piro, G., and Dalessandro, G. Antioxidant composition in cherry and high-pigment tomato cultivars, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2006), 54, 2606-2613.
109. Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Food Sci. Technol.-Leb.* (1997), 30 (6), 609-615.
110. S.M. Laurie, M. Faber, P.J. van Jaarsveld, R.N. Laurie, C.P. du Plooy, P.C. Modisane. β -carotene yield and productivity of orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam.) as influenced by irrigation and fertilizer application treatments. *Scientia Horticulturae*. (2012), 142, 180–184.
111. Bauernfeind, J.C. Carotenoids as colorants and vitamin A precursors. (1981) 938 pp. Academic Press, New York.
112. Fraser, P.D. and Bramley, P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* (2004), 43, 228-265.
113. Ana Rodríguez-Bernaldo de Quirós, Helena S. Costa. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis* (2006), 19, 97–111.
114. Taungbodhitham, A.K., Jones, G.P., Wahlqvist, M.L., Briggs, D.R. Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables. *Food Chemistry* (1998), 63, 577–584.
115. Lin, C.H., Chen, B.H. Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* (2003), 1012, 103–109.
116. Jordi Oliver, Andreu Palou. Chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A*, (2000), 881, 543–555.

117. de Hoffmann E., Charette J., and Stroobant V. *Spectrométrie de masse*. Dunod. (1999) Paris.
118. Amélie LHUILLIER. Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches : *Agauria salicifolia* hook.f ex oliver, *agauria polyphylla* baker (*ericaceae*), *tambourissa trichophylla* baker (*monimiaceae*) et *embelia concinna* baker (*myrsinaceae*). Thèse de Doctorat. (2007), Institut National Polytechnique de Toulouse, 200 pages.
119. Prasain J.K., Wang C.C., and Barnes S. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine* (2004), 37(9), 1324-1350.
120. A. F. de Faria & V. V. de Rosso & A. Z. Mercadante. Carotenoid Composition of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*), Determined by HPLC-PDA-MS/MS. *Plant Foods Hum Nutr* (2009), 64:108–115.
121. Z. Rodić, B. Simonovska, A. Albreht, I. Vovk. Determination of lutein by high-performance thin-layer chromatography using densitometry and screening of major dietary carotenoids in food supplements. *Journal of Chromatography A*, (2012), 1231, 59– 65.
122. Tomáš Řezanka, Jana Olšovská, Miroslav Sobotka and Karel Sigler. The Use of APCI-MS with HPLC and Other Separation Techniques for Identification of Carotenoids and Related Compounds. *Current Analytical Chemistry*, (2009), 5, 1-25.
123. Clarke, P.A.; Barnes, K.A.; Startin, J.R.; Ibe, F.I.; Shepherd, M.J. High performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry for the determination of carotenoids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, (1996), 10, 1781.
124. Franski R., Eitner K., Sikorska M., Matlawska I., and Stobiecki M. Electrospray mass spectrometric decomposition of some glucuronic acid-containing flavonoid diglycosides. *Phytochemical Analysis* (2003), 14, 170-175.
125. Bénédicte PORTET. Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d'une plante GUYANAISE *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. Thèse de Doctorat. (2007), Université de Toulouse. 249 pages.
126. Marta, A., Maria, H., Concepción, S. M., Carmen, P., Teresa, R., Sonia, P. T. Bioconversion of anthocyanin glycosides by *Bifidobacteria* and *Lactobacillus*. *Food Research International*. (2009), 42, 1453-1461.

127. Somé K., Asante I.K., Gracen V., Jeremy O, 2010. Sweetpotato production constraints and farmers' preferences and acceptance of orange flesh sweetpotatoes in Burkina Faso
128. CHIBANE Hayet. Aptitudes Technologique de Quelques Variétés Communes de Dattes : Formulation d'un Yaourt Naturellement Sucré et Aromatisé. *Thèse de Doctorat*. (2008) Université de M'HAMED BOUGARA-BOUMERDES, 203 pages.
129. Asami K. D., Yun-Jeong H., Diane M. B., and Alyson E. M. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.*, (2003), 51, 1237-1241.
130. Kowalski, R.E., Mergens, W.J., and Scialpi, L.J. Process for manufacture of carotenoid compositions. U.S. patent, (2000), 6, 093, 348.
131. Jun Ye, Lingling Feng, Jian Xiong and Yedan Xiong. Ultrasound-assisted extraction of corn carotenoids in ethanol. *Food Science and Technology*, (2011),46 2131- 2136.
132. Mc Murry, J. Organic Chemistry, 7thedn. California: Brooks/ Cole, (2008), P504 chapter 14.
133. Nihal Turkmen, Y. SedatVelioglu, Ferda Sari and Gokce Polat. Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*, (2007), 12, 484-496.
134. Bengtsson, A., Namutebi, A., Larsson Alminger, M., & Svanberg, U. Effects of various traditional processing methods on the all-trans- β -carotene content of orange-fleshed sweetpotato. *Journal of Food Composition and Analysis*, (2008), 21, 134–143.
135. Namutebi, A., Natabirwa, H., Lemaga, B., Kapinga, R., Matovu, M., Tumwegamire, S., et al. Long-term storage of sweet potato by small-scale farmers through improved post harvest technologies. *Uganda Journal of Agricultural Science*, (2004), 9, 922–930.
136. Maoka, T., Akimoto, N., Ishiguro, K., Yoshinaga, M., & Yoshimoto, M. Carotenoids with a 5, 6-dihydro-5, 6-dihydroxy- β -end group, from yellow sweet potato "Benimasari", Ipomoea batatas LAM. *Phytochemistry*, (2007), 68, 1740–1745.
137. O'Connell, O. F., Ryan, L., & O'Brien, N. M. Xanthophyll carotenoids are more bioaccessible from fruits than dark green vegetables. *Nutrition Research*, (2007), 27, 258–264.

138. Kapinga, R. E., & Carey, E. E. Present status of sweetpotato breeding for eastern and southern Africa. In D. Rees, Q. Oirschot, & R. Kapinga (Eds.), *Sweetpotato post-harvest assessment: Experiences from East Africa*. (2003), 0 85954 5482 (pp. 3–8). Chatham, UK: Natural Resources Institute.
139. Operia, R., & Sun, P. AVRDC Sweet Potato Research Program, In *Improvement of Sweet Potatoes in East Africa: With Some References of Other Tuber and Root Crops: Report*, International Potato Centre (1988).
140. Vimala B., Sreekanth A., Binu H. and Wolfgang G. Variability in 42 Orange-Fleshed Sweet Potato Hybrids for Tuber Yield and Carotene & Dry matter Content. *Gene conserve* (2011), 40, 190 – 200.
141. Hagenimana, V., Carey, E. E., Gichuki, S. T., Oyunga, M. A., & Imungi, J. K. Carotenoid contents in fresh, dried and processed sweetpotato products. *Ecology of Food and Nutrition*, (1998), 37, 455–473.
142. Arnous, A., Makris, D.P., Kefalas, P., Correlation of pigment and flavanol content with antioxidant properties in selected aged regional wines from Greece. *Journal of Food Composition and Analysis* (2002), 15, 655–665.
143. Stéphanie Dudonné, Xavier Vitrac, Philippe Coutière, Marion Woillez, and Jean-michel Mérillon. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem.*, (2009), 57, 1768–1774.
144. Dragovic-Uzelac, V., Levaj, B., Mrkic, V., Bursac, D., and Boras, M. The content of polyphenols and carotenoids in three apricot cultivars depending on stage of maturity and geographical region. *Food Chemistry* (2007), 102 (3), 966-975.
145. Schreiner, M. Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *European Journal of Nutrition* (2005), 44(2), 85-94.
146. Philip C. Stevenson, Harriet Muyinza, David R. Hall, Elaine A. Porter, Dudley I. Farman, Herbert Talwana, and Robert O. M. Mwangi. Chemical basis for resistance in sweetpotato *Ipomoea batatas* to the sweetpotato weevil *Cylas puncticollis*. *Pure Appl. Chem.*, (2009), Vol. 81, No. 1 141–151.
147. Sousa, C., Valentao, P., Rangel, J., Lopes, G., Pereira, J. A., Ferreres, F., Seabra, R. A., and Andrade, P. B. Influence of two fertilization regimens on the amounts of organic acids and phenolic compounds of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. Var. *costata* DC). *Journal of agricultural and food chemistry*. (2005), 53(23) 9128-9132.

148. Sérémé A., Kouda-Bonafos, M., Nacro M. Phenolic compounds in *Sorghum caudatum* tissues during plant development. *Biomass and Bioenergy*, (1993), 4, n°1, p69.
149. Carbonaro, M., Mattera, M., Nicoli, S., Bergamo, P., and Cappelloni, M.. Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear, *Pyrus communis* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* (2002), 50(19), 5458-5462.
150. Britton S. et al., Carotenoids today and challenges for the future, Carotenoids, vol 1A : Isolation and analysis, 1995, Birkhäuser Verlag Basel.
151. Takashi Maoka. Sterically hindered carotenoids with 3Z, 5Z configuration from the seeds of oriental bitter sweet, *Celastrus orbiculatus*. *Phytochemistry*. (2009), 70, 920–923.
152. LSU Ag Center: Sweet potato variety descriptions, (2010) 10p
153. Britton, G., Liaasen-Jensen, S. and Pfander, H. Carotenoids. Volume 1B: *Spectroscopy*, (1995) 360 pp. Birkhäuser, Basel.
154. De Rosso VV, Mercadante AZ Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J Agric Food Chem* (2007), 55, 5062–5072.
155. De Rosso VV, Mercadante AZ HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *J Agric Food Chem* (2007), 55 9135–9141.
156. A. F. de Faria & V. V. de Rosso & A. Z. Mercadante. Carotenoid Composition of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*), Determined by HPLC-PDA-MS/MS. *Plant Foods Hum Nutr* (2009), 64, 108–115.
157. De Rosso VV, Mercadante AZ Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J Agric Food Chem* (2007), 55, 5062–5072.
158. Fraser, P., & Bramley, P. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, (2004), 43, 228–265.
159. Rodić, B. Simonovska, A. Albreht, I. Vovk. Determination of lutein by high-performance thin-layer chromatography using densitometry and screening of major dietary carotenoids in food supplements. *Journal of Chromatography A*, (2012), 1231 59– 65.

160. Mark L. Failla, Sagar K. Thakkar and Jung Y. Kim. In Vitro Bioaccessibility of β -Carotene in Orange Fleshed Sweet Potato (*Ipomoea batatas*, Lam.). *J. Agric. Food. Chem.* (2009), 57, 10922-10927.
161. Haskell MJ, Jamil KM, Hassan F, Peerson JM, Hossain MI, Fuchs GJ, Brown KH. Daily consumption of Indian spinach (Basellaalba) or sweet potatoes has a positive effect on total body vitamin A stores in Bangladeshi men. *Am J Clin Nutr.* (2004 Sep); 80 (3):705-14.

ANNEXES

Evaluation of Eight Orange Fleshed Sweetpotato (OFSP) Varieties for Their Total Antioxidant, Total Carotenoid and Polyphenolic Contents

Moumouni Koala¹, Adama Hema*¹, Koussao Somé², Eloi Palé¹, Abdoulaye Sérémé³, Jérôme Belem²,
 Mouhoussine Nacro¹

¹ Laboratoire de Chimie Organique et de Physique Appliquées, Département de Chimie, UFR-SEA, Université de Ouagadougou 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso

² CNRST/INERA, Département Productions Végétales, 03 BP 7047 Ouagadougou 03 Burkina Faso

³ CNRST/IRSAT, Département des substances naturelles, 03 BP 7047 Ouagadougou 03 Burkina Faso

*Corresponding author: hemaadama@yahoo.fr

The research is financed by "The McKNIGHT Foundation" through the project: "Promotion of Orange-fleshed Sweet potato to Control Vitamin A and Antioxidant Deficiencies in Burkina Faso"

Abstract

Eight varieties of OFSP whose yields ranged from 6 t/ha (Caromex) to 15.22 t/ha (BF82xCIP-18) have a water content less than the current value observed for OFSP (71%). These varieties have been studied for their total antioxidant contents (TAC), total polyphenolic contents (TPC) and total carotenoid contents (TCC) using Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), Folin-Ciocalteu reagent (FCR) and a method described by McMurphy respectively. TAC differed significantly ($p < 0.05$) depending on the variety. Among the varieties obtained by crossing, BF92xResisto-14 and BF92xCIP-6 with the highest levels of total antioxidants (respectively 4.12 and 3.04 mg of Trolox equivalent/g of dw), had also the highest levels of total polyphenols (respectively 2.432 and 2.269 mg of Gallic acid equivalents/g of dw) and total carotenoids (respectively 0.180 and 0.132 mg of Beta-carotene equivalents/g of dw). There was a good correlation first, between the TAC and the TPC ($r^2 = 0.957$) and between the TAC and the TCC ($r^2 = 0.867$) on the other. Antioxidant activities observed may be due to the effect of synergy between polyphenols and carotenoids.

Keywords: Yield, OFSP extracts, total antioxidant content, total polyphenolic content, total carotenoid content, FRAP, FCR

1. Introduction

The sweetpotato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam.) of the Convolvulaceae family is a tuberous plant that grows in tropical and subtropical areas. Native from Latin America (Mark *et al.*, 2009; Davidson, 1999), it occupies an important place in the agricultural production of Sub-Saharan Africa countries, covering about 3.2 million hectares with a production estimated at 13.4 million tons of tubers in 2005 (Faostat, 2005). It grows easily, quickly matures (4-5 months), produces abundant food with respect to the space used for the plant and stores more or less well. In many countries, its culture is essential, because it contributes to reduce food shortages in times of crisis (natural disasters or wars).

In addition, several studies showed that orange-fleshed sweetpotato, the less common variety in sub-Saharan Africa, particularly Burkina Faso, is a potential source of vitamin A (Mark *et al.*, 2009; Haskell *et al.*, 2004), minerals (Fe, Zn, Mn), and other micronutrients such as polyphenols and carotenoids (Haskell *et al.*, 2004). These micronutrients have biological properties of interest for humans, and pharmacological or nutritional properties. Carotenoids in particular, likewise vitamin C, vitamin E or polyphenols, have antioxidant properties (Maruf *et al.*, 2009; Gaston *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2004) and are able of trapping free radicals generated constantly by our organism. Ingested with food, these compounds strengthen our natural defense against oxidative stress and thus prevent various chronic diseases such as cancer, cardiovascular diseases (Huang *et al.*, 2004; Philpott *et al.*, 2004).

Promoting micronutrient-rich orange-fleshed sweetpotato varieties is needed as a strategy to fight malnutrition in sub-Saharan Africa where more than 43 million children under five are at risk of vitamin A deficiency with the precursor β -carotene in orange-fleshed sweetpotato. Through collaborative studies INERA and University of Ouagadougou are working to develop OFSP hybrid varieties better adapted to the agro-

ecological context of Burkina Faso. This work aims to determine the antioxidant, the phenolic and carotenoid contents of these hybrids obtained through crossing as well as their agronomic performance.

2. Material and methods

Chemicals and reagents: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), Gallic acid, Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃ (TPTZ = 2,4,6-tripyridyl-s-triazine), Ferric chloride were obtained from Sigma chemical Inc, USA. All other reagents and chemicals used were of analytical grade.

2.1 Plant material:

Eight varieties of OFSP studied come from two sources. Two varieties (TIB-440060 and Caromex) were introduced from CIP (International Centre of Potato) of East Africa as a source of beta carotene (provitamin A), but not adapted to the agro-ecological context of Burkina Faso. The other six varieties: BF82xCIP-13; BF82xCIP-18; BF82xTIB-4; BF82xTIB-6; BF92xResisto-14; BF92xCIP-6 were developed through hybridization at the of Environmental and Agricultural Research Institute (INERA) by the crosses of two locally adapted parents BF82 and BF92 onto three introduced beta-carotene-rich parents (TIB-440060, Resisto, CIP-199260-1) not adapted to the local environmental. These six varieties were developed in order to have beta carotene-rich orange-fleshed sweetpotato adapted to the agro-ecological context of Burkina Faso that can be used in the fight against recurrent malnutrition especially in the mothers and their children. These eight varieties were evaluated in three ago-ecological zones in Burkina for their performance and stability at: Farakoba in the western region, in a soudanian climatic zone characterized by an average rainfall ranged from 900 to 1200 mm; Loumbila belonging to the central region in the sudano-sahelian climatic zone with an average rainfall ranging from 700 to 800 mm; and Kouaré, located in a sudano-savannah zone in the Eastern Region with an average rainfall ranging from 850 mm to 1050 mm.

2.2 Sampling and sample preparation

Drying of OFSP tubers: the sweetpotatoes storage root was peeled and left to dry at the laboratory for twenty days. To ensure that the samples were dried, the weight of each variety was measured every day until a constant weight was reached. The samples were then sealed in plastic soda-bag.

Extraction of plant material: 3 g of powder obtained by crushing the plant material were extracted three times by maceration with 10 mL of with the following solvent systems: acetone-water-acetic acid (70: 29.5: 0.5 v/v) (Asami *et al.*, 2003) for TAC and TPC assays and acetone-hexane (50: 50, v/v) (Kowalski *et al.*, 2000) for TCC assay. Extracts were vigorously stirred for 30 minutes and then carefully filtered using filter paper Wathman N ° 1 and kept at 4 ° C protected from light in the refrigerator until the determination.

2.3 Determination of TAC using FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay

In this method, a ferric salt, Fe (III) (TPTZ)₂Cl₃ (TPTZ = 2,4,6-tripyridyl-s-triazine) is used as an oxidant (Benzie *et al.*, 1996; Pulido *et al.*, 2000). It is prepared by mixing 1 mL (1 mL, 10 mM in 40 mM) TPTZ, 10 mL of a solution of sodium acetate buffer (pH = 3.6) and 1 mL of solution of Fe (III), H₂O (Pulido *et al.*, 2000). About 30 µL of distilled water was mixed to 20 µL of appropriately diluted extract and then, 200 µL of solution FRAP were added. Absorbances of the intense blue discoloration were measured at 593 nm using a microplate (spectrophotometer SAFAS, MP96) drive about 10 minutes after. A calibration curve was established using Trolox as reference of antioxidant. Results, determined from the calibration curve equation ($y = 28.67 x + 0.066$; $R^2 = 0.999$), were expressed in mg of Trolox Equivalent (TE)/g dried weight. All measurements were performed in triplicate.

2.4 Determination of TPC using Folin-Ciocalteu assay

Total phenolic phytochemical concentration was measured using the Folin-Ciocalteu method (Nihal *et al.*, 2007). Briefly, 60 µL of appropriate diluted samples and a standard solution of gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) were mixed to 60 µL of Folin-Ciocalteu's Reagent (FCR-1: 10 dilution) and left to stand for 8 min at room temperature to allow for the FCR to react completely with the oxidible substances or phenolates. 120 µL of Na₂CO₃ (7.5 % in water) were added to destroy the residual reagent. Absorbances were measured at 760 nm using a 96-well (glass vials 250 µL) microplate spectrophotometer (Microplate Autoreader MP96; SAFAS Instruments) after incubation for 30 min at 37 °C against distilled water as a blank. Total phenolic contents of the samples determined from the calibration curve equation ($y = 46.41 x + 0.063$, $R^2 = 0.998$) were expressed in mg of gallic acid equivalents (GAE) per gram of dried weight. All measurements were performed in three replications.

2.5 Determination of total carotenoid contents (TCC)

Total carotenoid contents of OFSP extracts were evaluated according to the method described by McMurry (Jun *et al.*, 2011; McMurry, 2008) slightly modified. A direct measurement of absorbance was made. After suitable dilution, the absorbances of extracts kept at room temperature and protected from light, were read at 455 nm. Total carotenoid contents were obtained by reporting absorbances of suitable diluted extracts on a curve ($y = 25.56x + 0.016$; $R^2 = 0.999$) established using β -carotene as standard. TCC were expressed in mg of β -carotene Equivalents (BCE)/g of dried weight. All measurements were performed in three replications.

2.6 Statistical analyses

All experiments were conducted in three replications. The results are expressed in mean \pm SD. Analysis of variance (ANOVA) allowed to appreciate the differences between varieties for their antioxidant, polyphenolic and beta carotene contents using the statistical software Genstat, 14th Edition. Multivariate analysis was performed to generate a dendrogram to appreciate the relationship between the varieties for their total antioxidant, polyphenolic and carotenoid contents. The $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

3. Results and discussion

Field evaluation during 2010 and 2011 cropping season in three different agro-ecological zones of Burkina Faso allowed recording the agronomic performance of these eight varieties. Varieties BF82xCIP-18, BF82xTIB-4, BF82xTIB-6, BF92xCIP-6 and the introduced variety TIB-440060 had average yields of 15.22 t/ha, 13.50 t/ha; 11.56 t/ha, 17.11 t/ha and 11.11 t/ha, respectively, higher than the national mean yield of sweetpotato around 10 t/ha (table 1). However, BF82xCIP-13, BF92xResisto-4 and Caromex presented respectively a potential of 9.89 t/ha, 7.50 t/ha and 6.78 t/ha under the national mean performance, but showed tubers of regular form in accordance with the preferences of farmers.

Table 1 presents the results obtained from measurement of the moisture content of the eight OFSP varieties studied. Water contents determined were lower than the average water content in OFSP 70% to 80% encountered in the literature (Vimala *et al.*, 2011). The introduced varieties Caromex and TIB-440060 have the lowest water contents (respectively 27 and 56.06%). Except for BF92XCIP-6 (71.39%), all the varieties had an average water content around 62%; which represents 38% of dry matter content greater than the average value of 29% of the literature. In general, high level of water content is associated to high loss in storage root of OFSP. These crosses have provided less perishable hybrid varieties. The results suggested that the hybrids presented much lower water content (38% of dry matter) than the two introduced varieties (Caromex and TIB-440060) (respectively 73 and 44% of dry matter). However, the water content recorded might have affected by the duration (two days) between the harvesting and the water quantification.

The levels of antioxidants, polyphenols and total carotenoids presented in table 2 were analyzed statistically using Genstat 14th Edition. Significant differences were observed ($P < 0.05$) between the eight varieties of OFSP studied for these three parameters. Indeed, total antioxidant levels varied between 1.07 (BF82xTIB-4) and 4.12 (BF92xResisto-14) mg of TE/g of dry weight; which represents a variation of about 4-fold. The difference between the two introduced varieties (TIB440060 and Caromex) and BF82xCIP-18 was not significant ($P > 0.05$) for total antioxidants (TAC); they had the same TAC of about 1.75 mg of TE/g dry weight more than BF82xCIP-13 (1.62 mg of TE/g dry weight). BF82xTIB-6, BF92xCIP-6 and BF92xResisto-14 had the best total antioxidants contents. However, BF92xResisto-14 which recorded the lowest yields has the higher total antioxidant content.

The study of the TAC in relation with TPC showed that there was a good correlation ($r^2 = 0.957$) between TAC and TPC. Varieties presenting the highest TPC had the highest TAC in agreement with previous studies which showed that polyphenolic compounds are mainly responsible for the antioxidative activities of plant extracts (Ou *et al.*, 2005). In this work, they contributed for more than 91 % in the antioxidant activities of OFSP extracts of varieties studied (table 4). Significant differences ($P < 0.05$) were also observed between these varieties for their TPC content ranging from 1.06 (BF82xTIB-4) to 2.43 mg equivalents of Gallic acid (GAE) /g dry weight (BF92xResisto-14); which represents a variation of about 2-fold (table 3). In addition, the introduced varieties TIB440060 and Caromex had an average of 1.37 and 1.45 mg of GAE per gram of dry weight respectively compared to the highest contents (between 2.30 and 2.43 mg of GAE) and to the lowest (of 1.06 and 1.1843 mg of GAE) observed on the newly developed hybrids varieties.

Polyphenols are not solely responsible of antioxidant activities of plant extracts. Carotenoids are also

powerful natural antioxidants. OFSP are a source of vitamin A available for poor families in Sub-Saharan Africa. Indeed, they contained between 300 and 4620 equivalents of beta carotene (provitamin A) per 100 g of OFSP (Tumwegamire *et al.*, 2004). OFSP, rich in beta carotene is accepted by children and can contribute to increase retinol concentrations in the serum of young consumers (Jan *et al.*, 2007).

Total carotenoid contents assessed in these varieties of OFSP certainly contributed to their TAC. High correlation was noticed between TCC and TAC, confirming the positive impact of TCC on TAC (table 4). TCC (table 3) varied from 0.016 to 0.18 mg of Beta-carotene equivalent (BCE)/g of dried weight (respectively for BF82xTIB-4 and BF92xResisto-14), which represents an increase of more than 11 times and nutritional improvement compared to the introduced varieties TIB-440060 and Caromex.

A multivariate analysis combining different levels (total antioxidants, polyphenols and carotenoids) evaluated and providing an overall assessment of results had been translated using a dendrogram (figure 1). The dendrogram showed an important influence of the parental line on TAC of varieties developed by cross-breeding and the effect of the parents TAC in the descendants. Indeed, both BF82xCIP-13 and BF82xCIP-18 sharing the same parent (BF82 and CIP-199062-1) had similar antioxidant levels. It was the case of BF82-TIB-4 and BF82-TIB-6 (obtained by crossing of BF82 and TIB-440060) which are close to both above (BF82xCIP-13 and BF82xCIP-18) varieties with whom they share the female parent (BF82). The varieties involving BF92 as female parent in crosses are nearby. Genetic analyses have shown that the choice of parents is very important in the development of offspring that accumulates good beta-carotene content; notwithstanding their initial beta carotene content, some parents have a good ability to develop offspring with a high TCC. This could be the case for the levels of antioxidants.

4. Conclusion

This research work fruit of an important collaboration between researchers of INERA and university of Ouagadougou was based on locally adapted OFSP varieties developed in Burkina Faso. The results revealed that the varieties BF92xResisto-14 and BF92xCIP-6 had the highest total antioxidant, polyphenolic and carotenoid contents. Except for BF92xResisto-14, the other OFSP varieties had yields higher than the average yield (9t/ha) recorded in the country. These findings on the antioxidant, polyphenolic and total carotenoid contents obtained from these locally developed OFSP will contribute in the fight against the malnutrition that is endemic in Burkina Faso.

Acknowledgments

The Authors like to acknowledge "The MCKNIGHT Foundation", The University of Ouagadougou and The CNRST/INERA for the achievement of this study.

References

- Asami K. D., Yun-Jeong H., Diane M. B., and Alyson E. M. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1237-1241.
- Benzie I. F.; Strain J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay, *Anal. Biochem.*, 239, 70-76.
- Davidson, A. (1999). Oxford Companion to Food. New York: Oxford Uni. Press, 912p.
- FAOSTAT. (2005). Pig stocks in sub-Saharan African countries in. www. Faostat.fao.org. Last accessed 17 July 2006.
- Gaston A. T., Agne N., John H. Muyonga. (2009). Microstructure and *In Vitro* Beta Carotene Bioaccessibility of Heat Processed Orange Fleshed Sweet Potato. *J. Foods Hum Nutr.*, 64: 312-318.
- Harrison HF, Peterson JK, Snook ME, Bohac JR, Jackson DM. (2003) Quantity and potential biological activity of caffeic acid in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] Storage root periderm. *J Agric Food Chem.* 51(10): 2943-8.
- Haskell MJ, Jamil KM, Hassan F, Peerson JM, Hossain MI, Fuchs GJ, Brown KH. (2004). Daily consumption of Indian spinach (*Basella alba*) or sweet potatoes has a positive effect on total body vitamin A stores in Bangladeshi men. *Am J Clin Nutr.* Sep; 80 (3):705-14.

Huang D.J., Chen H.J., Hou W.C., Lin CD, Lin Y.H. (2004). Active recombinant thioredoxin protein with antioxidant activities from sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam *Tainong 57*) storage roots. *J Agric Food Chem.* 28; 52 (15):4720-4.

Jun Y., Lingling Feng, Jian Xiong, Yedan Xiong (2011). Ultrasound-assisted extraction of corn carotenoids in ethanol. *Food Science and Technology*, 46, 2131- 2136.

Kowalski, R.E., Mergens, W.J., and Scialpi, L.J. (2000). Process for manufacture of carotenoid compositions. U.S. patent, 6,093, 348.

Low J.W., Arimond M., Osman N., Cunguara B., Zano F., Tschirley D. (2007). A Food-Based Approach Introducing Orange-Fleshed Sweet Potatoes Increased Vitamin A Intake and Serum Retinol Concentrations in Young Children in Rural Mozambique. *The Journal of Nutrition*, 1320-1327.

Mark L. F., Sagar K. T. and Jung Y. K. (2009). In Vitro Bioaccessibility of β -Carotene in Orange Fleshed Sweet Potato (*Ipomoea batatas*, Lam.). *J. Agric. Food. Chem.*, 57, 10922-10927.

Maruf A., Sorifa Akter M., Jong-Bang E. (2009). Peeling, drying temperatures, and sulphite-treatment affect physicochemical proprieties and nutritional quality of sweet potato flour. *Food chemistry*, 121, 112-118.

McMurry, (2008) *J. Organic Chemistry*, 7th edn. California: Brooks/ Cole. P504 chapter 14.

Nihal T., Sedat Velioglu Y., Ferda S., Gokce Polat (2007). Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*, 12, 484-496.

Ou B., Prior R.L., Huang D. (2005). The chemistry behind dietary antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1841-1856

Philpott M., Gould K.S., Lim C., Ferguson L.R. (2004). In situ and *in vitro* antioxidant activity of sweetpotato anthocyanins. *J Agric Food Chem.*, 24; 52 (6):1511-3.

Pulido R.; Bravo L.; Saura-Calixto F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3396-3402.

Tumwegamire S., Kapinga R., Zhang D., Crissman C. and Agili S. (2004). Opportunities for promoting Orange Fleshed Sweet Potato as a mechanism for combat vitamin A deficiency in Sub-Saharan Africa. *African crop Science journal*, Vol. 12, No 3, 241-252.

Vimala B., Sreekanth A., Binu H. and Wolfgang G. (2011). Variability in 42 Orange-Fleshed Sweet Potato Hybrids for Tuber Yield and Carotene & Dry matter Content. *Gene conserve* 40 : 190 – 200 .

Yuan S.Q., Zhao Y.M., You Y. (2004). Alkaloids of the hairy roots of *Ipomoea batatas* Lam. *Yao XueXueBao*, 39 (10):818-20.

Table 1: yields and water contents of OFSP

Varieties	yields (t/ha)	water contents (%)
BF82xCIP-18	15,22	64,36
BF82xTIB-4	13,50	62,83
BF82xTIB-6	11,56	62,975
BF92xCIP-6	17,11	71,39
TIB-440060	11,11	56,06
BF82xCIP-13	9,89	55,74
BF92xResisto-14	7,50	63,02
Caromex	6,78	27,15

Table 2 : Calibration curves equations for TAC, TPC and TCC determination

Calibration curve	Standard	equations	Correlation coefficients
TAC	Trolox	$y = 28.67 x + 0.066$	$R^2 = 0.999$
TPC	Gallic Acid	$y = 46.41 x + 0.063$	$R^2 = 0.998$
TCC	Beta-carotene	$y = 25.56 x + 0.016$	$R^2 = 0.999$

Table 3: Total antioxidant, polyphenolic and carotenoid contents

Variétés	TAC (mg TE/g of dw)	TPC (mg GAE/ of dw)	CT (mg BCE/g of dw)
TIB	1,78±0,041 ^{bc}	1,374±0,089 ^{bc'}	0,072±0,0006 ^{b''}
BF92xResisto-14	4,12±0,045 ^e	2,432±0,009 ^{d'}	0,180±0,0004 ^{f''}
BF92xCIP-6	3,04±0,079 ^d	2,269±0,018 ^{d'}	0,132±0,0038 ^{e''}
BF82xTIB-6	1,85±0,072 ^c	1,187±0,005 ^{ab'}	0,075±0,0024 ^{b''}
BF82xCIP-13	1,62±0,011 ^b	1,251±0,067 ^{b'}	0,115±0,0005 ^{c''}
BF82xTIB-4	1,07±0,049 ^a	1,062±0,033 ^{a'}	0,016±0,0007 ^{d''}
BF82xCIP-18	1,77±0,029 ^{bc}	1,431±0,035 ^{c'}	0,024±0,0002 ^{a''}
Caromex	1,71±0,040 ^{bc}	1,459±0,013 ^{c'}	0,068±0,0004 ^{b''}

Data are expressed as means ± SE of triplicate experiments. Means in a column not having a common letter are different ($P < 0.05$).

Table 4: TAC, TPC and TCC correlation of OFSP extracts

correlation	R	R ² %
TAC Vs TPC	0,957	91.58
TAC Vs TCC	0,867	75.16
TCC Vs TPC	0,803	64.48

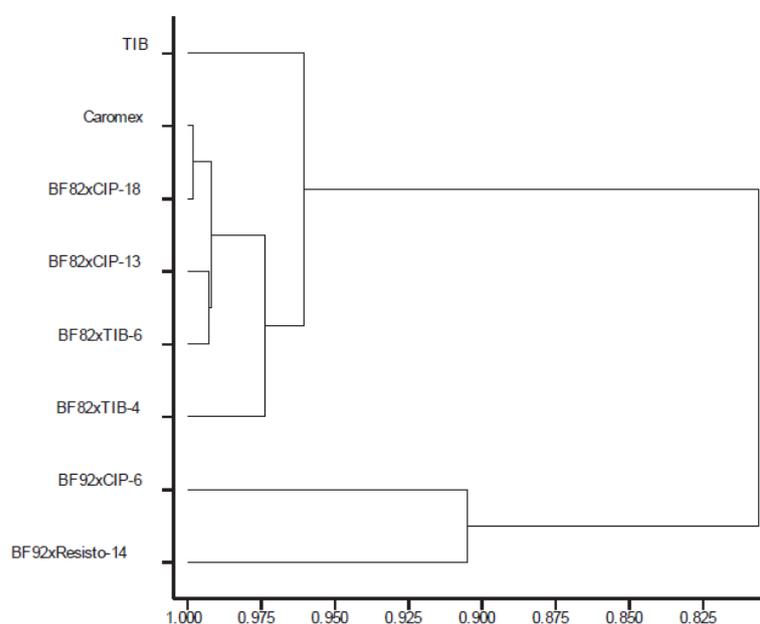


Figure 1 : Dendrogram showing the relationship between the eight varieties for their TAC, TPC and TCC contents

Effects of Organic and Mineral Fertilizers on total Antioxidant, polyphenolic and carotenoid contents of Orange fleshed sweetpotato tubers

Moumouni Koala¹, Adama Hema^{*1}, Koussao Somé², Eloi Palé¹, Abdoulaye Sérémé³, Jérôme Belem², Mouhoussine Nacro¹

¹Laboratoire de Chimie Organique et de Physique Appliquées, Département de Chimie, UFR-SEA, Université de Ouagadougou 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso

²CNRST/INERA, Département Productions Végétales, 03 BP 7047 Ouagadougou 03 Burkina Faso

³CNRST/IRSAT, Département des substances naturelles, 03 BP 7047 Ouagadougou 03 Burkina Faso

*Corresponding author : hemaadama@yahoo.fr

The research is financed by "The MCKNIGHT Foundation" through the project: "Promotion of Orange-fleshed Sweetpotato to Control Vitamin A and Antioxidant Deficiencies in Burkina Faso"

Abstract

A field study was conducted to determine the effect of organic and mineral-based fertilizers on phytochemical contents in the tubers of an orange fleshed sweetpotato variety (TIB-440060). Treatments were arranged in a split plot design with three replicates. Tubers harvested have been studied for their total antioxidant contents (TAC), total polyphenolic contents (TPC) and total carotenoid contents (TCC) using Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), Folin-Ciocalteu reagent (FCR) and a method described by McMurry respectively.

Organic fertilizer had a positive effect on the production of antioxidants, polyphenols and carotenoids whose contents increased significantly ($P < 0.001$) with the quantities of organic fertilizer. Increases about 19.61%, 34.41% and 12.82% due to annual (F1) inputs and increases about 15.94% and 15.46% and 12.17% respectively in total antioxidant, polyphenolic and carotenoid contents when these inputs of organic fertilizer are conducted biennially (F2).

The effect of different doses of mineral fertilizers indicated significant changes ($P < 0.001$) in accumulated antioxidant, polyphenolic and total carotenoids contents of TIB-440060 OFSP tubers.

Total Antioxidant, polyphenolic and carotenoid contents of TIB-440060 varied significantly ($P < 0.001$) with the combination of organo-mineral fertilization used. Combinations using a minimal doses of 15 kg/ha of nitrogen, 30 kg/ha phosphorus and 45 kg/ha of potassium associated with an annual or biennial contribution of 20 t/ha of organic fertilizer gave the highest total antioxidant, polyphenolic and carotenoid concentrations.

Keywords: OFSP extracts, phytochemical contents, polyphénols, antioxidants, carotenoids, organic fertilizer, mineral fertilizers, FRAP, FCR

1. INTRODUCTION

Increasingly, epidemiological studies indicate that consumption of a rich diet food from plant has a protective effect against cardiovascular disease and some forms of cancer (Savita *et al.*, 2010; Augustin *et al.*, 2011; Haiwen *et al.*, 2011). Although plants contain a wide range of compounds that could lead to their beneficial effects on health (proteins, amino acids, vitamins and fibre). Recent works focused on the role of antioxidant secondary metabolites of plants, in particular polyphenols and carotenoids in the prevention of diseases related to oxidative stress (Arts *et al.*, 2005).

Polyphenolic compounds vary considerably in their structure and their standings, but are characterized by the presence of at least one aromatic ring with one or more hydroxyl groups.

Carotenoids in foods are usually tetraterpenoids in C40 formed from eight isoprenoids C5 units interconnected to form a symmetrical molecule (Britton *et al.*, 1995).

Polyphenols and carotenoids are natural antioxidants with beneficial effects on human health (Osganian *et al.*, 2003; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004; Tapiero *et al.*, 2004; Stahl *et al.*, 2005; Haiwen *et al.*, 2011). There is a growing interest to develop simple methods to increase the concentration of polyphenols in foods in order to strengthen their overall nutritional value (Parr *et al.*, 2000; Schreiner *et al.*, 2005; Schreiner *et al.*, 2006). Polyphenols and carotenoids are produced by plants throughout their development for various reasons: the defense against microorganisms, insects, and herbivores (Richard *et al.*, 1995; Crozier *et al.*, 2006); availability of nutrients (Richard *et al.*, 1995); exposure to ultraviolet radiation (Rozema *et al.*, 1997); and because of the allelopathic interactions (Mann *et al.*, 1987). However, because the reactions of plants to these stimuli are varied

and not well understood, the use of these techniques to induce plants to produce secondary metabolites (and therefore potentially increase their nutritional value) is not common.

In particular, the availability of essential macronutrients in the growth of the plants has a significant potential to affect the accumulation of polyphenols (Parr *et al.*, 2000). Although it has been shown that levels of fertilization of nitrogen, phosphorus, potassium and calcium affect the production of secondary metabolites in plants (Osama *et al.*, 2011; Oloyede *et al.*, 2012; Bouchelaghem *et al.*, 2012; Nur *et al.*, 2012; R. Vignesh *et al.*, 2012), mineral nutrition has little or no effect on the production of polyphenols in some plants (Bímová *et al.*, 2008; Gupta-Elera *et al.*, 2012; Marilou *et al.*, 2012).

In this study, we explore how organic fertilizer consisting of well-decomposed livestock fertilizer and mineral fertilizers such as nitrogen (N), of phosphorus (P) and potassium (K) affect the production of total antioxidants, polyphenols and carotenoids from the bits of orange fleshed sweetpotato TIB-440060 variety (Koala *et al.*, 2013). This work was undertaken to evaluate the effects of the accumulation of above phytochemicals of the studied orange-fleshed sweetpotato tubers (OFSP) harvested from soils treated with organic and/or mineral fertilizers.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Material and methods

Chemicals and reagents: 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), Gallic acid, Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃ (TPTZ = 2,4,6-tripyridyl-s-triazine), Ferric chloride were obtained from Sigma chemical Inc, USA. All other reagents and chemicals used were of analytical grade.

2.2 Sampling and sample preparation

The orange fleshed sweetpotato variety TIB-440060 was used the experiment established at the research station of Kamboinsé (INERA), 13 km from Ouagadougou in the centre of Burkina Faso. Two types of fertilizers were used: the organic fertilizer constituted by well-decomposed livestock manure and mineral fertilizers composed by nitrogen (N) fertilizer, phosphorus (P) and potassium (K). The experimental was conducted in a split plot design with in the main plots the organic fertilization in three (3) levels and the secondary plots containing the mineral fertilization in nine (9) levels (table 1). In total twenty-seven (27) combinations of organo-mineral fertilization have been established (table 2).

Drying of OFSP tubers: the sweetpotatoes storage root was peeled and left to dry in the laboratory for twenty days. To ensure that the samples were dried, the weight of each sample was measured every day until a constant weight was reached. The samples were then sealed in plastic soda-bag.

Extraction of plant material: 3 g of powder obtained by crushing the plant material were extracted three times by maceration with 10 mL of the following solvent systems: acetone-water-acetic acid (70: 29.5: 0.5 v/v) (Asami *et al.*, 2003) for TAC and TPC assays and acetone-hexane (50: 50, v/v) (Kowalski *et al.*, 2000) for TCC assay. Extracts were vigorously stirred for 30 minutes and then carefully filtered using filter paper Wathman N ° 1 and kept at 4 ° C protected from light in the refrigerator until the determination.

2.3 Determination of TAC using FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay

In this method, a ferric salt, Fe (III) (TPTZ)₂Cl₃ (TPTZ = 2,4,6-tripyridyl-s-triazine) was used as an oxidant (Benzie *et al.*, 1996; Pulido *et al.*, 2000). It was prepared by mixing 1 mL (1 mL, 10 mM in 40 mM) TPTZ, 10 mL of a solution of sodium acetate buffer (pH = 3.6) and 1 mL of solution of Fe (III), H₂O (Pulido *et al.*, 2000). About 30 µL of distilled water was mixed to 20 µL of appropriately diluted extract and then, 200 µL of solution FRAP were added. Absorbances of the intense blue discoloration were measured at 593 nm using a microplate (spectrophotometer SAFAS, MP96) drive about 10 minutes after. A calibration curve was established using Trolox as reference of antioxidant. Results, determined from the calibration curve equation ($y = 28.67x + 0.066$; $R^2 = 0.999$), were expressed in mg of Trolox Equivalent (TE)/g dried weight. All measurements were performed in three replications.

2.4 Determination of TPC using Folin-Ciocalteu assay

Total phenolic phytochemical concentration was measured using the Folin-Ciocalteu method (Nihal *et al.*, 2007). Briefly, 60 µL of appropriate diluted samples and a standard solution of gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid) were mixed to 60 µL of Folin-Ciocalteu's Reagent (FCR-1: 10 dilution) and left to stand for 8 min at room temperature to allow for the FCR to react completely with the oxidible substances or phenolates. 120 µL of Na₂CO₃ (7.5 % in water) were added to destroy the residual reagent. Absorbances were measured at 760 nm using a 96-well (glass vials 250 µL) microplate spectrophotometer (Microplate Autoreader MP96; SAFAS Instruments) after incubation for 30 min at 37 ° C against distilled water as a blank. Total phenolic contents of the samples determined from the calibration curve equation ($y = 46.41x + 0.063$, $R^2 =$

0.998) were expressed in mg of gallic acid equivalents (GAE) per gram of dried weight. All measurements were performed in three replications.

2.5 Determination of total carotenoid contents (TCC)

Total carotenoid contents of OFSP extracts were evaluated according to the method described by McMurry (McMurry *et al.*, 2008; Jun *et al.*, 2011) slightly modified. A direct measurement of absorbance was made. After suitable dilution, the absorbances of extracts kept at room temperature and protected from light, were read at 455 nm. Total carotenoid contents were obtained by reporting absorbances of suitable diluted extracts on a curve ($y = 25.56x + 0.016$; $R^2 = 0.999$) established using β -carotene as standard. TCC were expressed in mg of β -carotene Equivalents (BCE)/g of dried weight. All measurements were performed in three replications.

2.6 Statistical analyses

All experiments were conducted in three replications. The results are expressed in mean \pm SD. Analysis of variance (ANOVA) allowed to appreciate the differences between varieties for their antioxidant, polyphenolic and beta carotene contents using the statistical software Genstat, 14th Edition. The $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

3. Results and discussion

Effect of organic fertilization: table 7 presents the effect of different doses of organic fertilization on total antioxidant, polyphenolic and carotenoid contents. TAC and TPC increased significantly ($P < 0.001$) (table 3) with the quantities of organic fertilizer. Indeed, on plots that received no supply of organic fertilizer (F0), TIB-440060 presented the lowest levels in antioxidants, polyphenols and carotenoids. The highest levels are recorded on plots receiving annually (F1) 20 t/ha of organic fertilizer. Those receiving the same quantities biennially (F2) of organic fertilizer presented highest levels of antioxidants and polyphenols. Differences were less obvious for total carotenoids between annual (F1) and biennial (F2) inputs contributions of organic fertilizer. Making comparisons of different doses of organic fertilizer in tables 4 and, 5 increases of 19.61%, 34.41% and 12.82% respectively in TAC, TPC and TCC due to annual contributions (F1) were observed. These increases were respectively 15.94%, 15.46% and 12.17% in TAC, TPC and TCC when these inputs of organic fertilizer are conducted biennially (F2).

These results suggested that the contribution of organic fertilizer had a positive effect on the production of total antioxidants, polyphenols and carotenoids. Frequent inputs of organic fertilizer produced the best results. However, biennial organic contributions could still cause a significant accumulation of total carotenoids in TIB-440060 tubers.

Effect of mineral fertilization: the effect of different doses of mineral fertilizers (table 1) indicated a significant variation ($P < 0.001$) (table 3) in accumulated TAC, TPC and TCC of TIB-440060. Results obtained indicated that TAC were influenced by the combined effects of nitrogen and potassium, as showed for T2 and T3 (absence of phosphorus) with values of 3.107 and 3.378 mg/g of dw respectively (table 6). Lowest levels of antioxidants were observed in the presence or absence of nitrogen-phosphorus-potassium. But, for polyphenols, highest levels were obtained in formulations combining phosphorus at a minimal dose of 30 kg/ha, and the lowest levels were recorded when phosphorus was absent. The biosynthesis of polyphenols seemed to be positively influenced by phosphate fertilizers. Soils of Burkina Faso recognized for their poverty in phosphorus (Dembélé *et al.*, 1991) could constitute a limit for the accumulation of polyphenols in OFSP. Supplies of phosphate fertilizer at a minimal dose of 30 kg/ha could be a solution for an improvement of polyphenolic accumulation in OFSP. In addition, total carotenoid contents did not clearly reflect the influence of different doses of mineral fertilizers on their production

Antioxidants, polyphenols and carotenoids biosynthesis would depend jointly on the composition of soil in nitrogen, phosphorus and potassium.

Effect of organo-mineral fertilization: TAC, TPC and TCC from the TIB-440060 OFSP tubers varied significantly ($P < 0.001$) (table 3) in relation with organo-mineral fertilization doses used. In general, combinations using minimal doses about 15 kg/ha of nitrogen, 30 kg/ha of phosphorus and 45 kg/ha of potassium (T2, T3, T5, T7, T8 and T9) associated with an annual (F1) or biennial (F2) contribution of 20 t/ha of organic fertilizer gave the highest values of total antioxidant, polyphenolic and carotenoid concentrations. These results indicated that the impact on the levels of antioxidants is noticeable when fertilizers used are sufficient to allow a synergistic action contributing to raise TAC values. The table 8 showed the contribution (percent) due to the individual effects of the organic fertilizer, mineral fertilizers and the combined effects of organic and mineral fertilizers on the accumulation of total antioxidants, polyphenols and carotenoids in TIB-440060 OFSP tubers. Then, the use of only organic fertilizer was responsible for 14.85%, 21.98% and 4.38% increases of TAC, TPC

and TCC respectively. These increases were about 35.36%, 7.35% and 29.50% respectively when using individual mineral fertilizers. However, for an association of organic and mineral fertilizers increases were respectively about 44%, 68.39% and 62.63% for a maximal production of antioxidants, polyphenols and carotenoids in the studied OFSP tubers. These results highlight the importance of organo-mineral fertilization in the accumulation of phytochemicals contributing to a good nutritional quality. In addition, a strong positive correlation observed between the three parameters studied suggests a positive link between them and the efficiency of the Folin-Ciocalteu method used for their quantification.

CONCLUSION

This study, which is one of the first in West Africa, allowed to highlight the effects of organo-mineral fertilization on the nutritional quality the orange-fleshed sweetpotato. It is clear that the individual use of organic manure and mineral fertilizers have a positive effect on the production of antioxidants, polyphenols and total carotenoids. However, the major effects were obtained by an association of the two types of fertilizer. Annual inputs of organic fertilizer produce effects on the studied parameters. But when carotenoids-rich TIB-440060 OFSP tubers were targeted, biennial inputs of organic fertilizer could be recommended. The accumulation of antioxidants was positively influenced by the binary fertilizers containing nitrogen and potassium; the production of polyphenols was influenced by the phosphate fertilizer while the production of carotenoids was not affected from mineral fertilizers.

Acknowledgments

The Authors like to acknowledge "The MCKNIGHT Foundation", The University of Ouagadougou and The CNRST/INERA for the achievement of this study.

References

- Arts, I.C.W.; Hollman, P.C.H. (2005) Polyphenols and disease risk in epidemiological studies. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 317S-325S.
- Asami K. D., Yun-Jeong H., Diane M. B., and Alyson E. M. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1237-1241.
- Augustin Scalbert, Cristina Andres-Lacueva, Masanori Arita, Paul Kroon, Claudine Manach, X Mireia Urpi-Sarda, and David Wishart (2011) Databases on Food Phytochemicals and Their Health-Promoting Effects. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 4331-4348
- Benzie I. F.; Strain J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 239, 70-76.
- Bimová PAVLA, R. POKLUDA. (2008) Influence of Alternative Organic Fertilizers on the Antioxidant Capacity in Head Cabbage and Cucumber *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 36 (1), 63-67.
- Bouchelaghem Sabrina, Djebar Mohammed Réda and Et Berrebbah Houria. (2012) Induction of Antioxidant Enzyme System by A Nitrogen Fertilizer Npk in Wheat Triticum Durum. *Advances in Environmental Biology*, 6(1): 85-88,
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to Function *FASEB J.* 9, 1551-1558.
- Crozier, A.; Jaganath, I.B.; Clifford, M.N. (2006) Phenols, polyphenols, and tannins: an overview. In *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure, and Role in the Human Diet*; Crozier, A.; Clifford, M.N.; Ashihara, H., Eds.; Blackwell Publishing: Oxford, UK, pp. 1-24.
- DEMBELE Y., SOME L. (1991). Propriétés hydrodynamiques des principaux types de sol du Burkina Faso. *Soil Water Balance in the Sudano-Sahdian Zone* (Proceedings of the Niamey Workshop, February 1991). *IAHS Publ.* no. 199. 217-227.
- Gupta-Elera Gaytri, Andrew Garrett, Andres Martinez, Ryan D. Kraus, Richard Robison & Kim O'Neill. (2012). A Comparison of Antioxidant Properties in Organic and Conventional Blueberries. *Journal of Food Research*; Vol. 1, No. 3; 1-7.
- Haiwen Li, John W. Parry. (2011) Phytochemical Compositions, Antioxidant Properties, and Colon Cancer Antiproliferation Effects of Turkish and Oregon Hazelnut *Food and Nutrition Sciences*, 2, 1142-1149.
- Jun Y., Lingling Feng, Jian Xiong, Yedan Xiong (2011). Ultrasound-assisted extraction of corn carotenoids in ethanol. *Food Science and Technology*, 46, 2131- 2136.
- Kowalski, R.E., Mergens, W.J., and Scialpi, L.J. (2000). Process for manufacture of carotenoid compositions. U.S. patent, 6,093, 348.
- Mann, J. *Secondary Metabolism*, 2nd ed.; Oxford University Press: Oxford, UK, 1987; chapter 7.
- Marilou Mante Benitez and Constancio C. De Guzman. (2012). *Antioxidant Content of Bitter Gourd (Momordica Charantia L.) Grown in Different Nutrient Amendments UMT 11th International Annual Symposium on*

Sustainability Science and Management 09th – 11th, Terengganu, Malaysia

- McMurry, (2008) J. Organic Chemistry, 7th edn. California: Brooks/ Cole.P504 chapter 14.
- Meléndez-Martínez AJ, Vicario IM, Heredia FJ. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Arch Latinoamer Nutr.*, 54: 149-55.
- Moumouni Koala, Adama Hema, Koussao Somé, Eloi Palé, Abdoulaye Sérémé, Jérôme Belem, Mouhoussine Nacro. (2013). Evaluation of Eight Orange Fleshed Sweetpotato (OFSP) Varieties for Their Total Antioxidant, Total Carotenoid and Polyphenolic Contents. Vol.3, No.4, 67-72.
- Nihal T., Sedat Velioglu Y., Ferda S., Gokce Polat (2007). Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*, 12, 484-496.
- Nur Faezah Omar, Siti Aishah Hassan, Umi Kalsom Yusoff, Nur Ashikin Psyquay Abdullah, Puteri Edaroyati Megat Wahab and Uma Rani Sinniah. (2012). Phenolics, Flavonoids, Antioxidant Activity and Cyanogenic Glycosides of Organic and Mineral-base Fertilized Cassava Tubers. *Molecules*, 17, 2378-2387.
- Oloyede F. M., I. O. Obisesan, G. O. Agbaje, and E. M. Obuotor. (2012). Effect of NPK Fertilizer on Chemical Composition of Pumpkin (*Cucurbita pepo* Linn.) Seeds. *The Scientific World Journal Volume 2012*, 1-5.
- Osama A. Aly, A.M. Elsally, H.A. Abd-Elgalil and S.M. Elmasry. (2011). Effect of Different Potassium Fertilizer Sources and Antioxidant Application on Vegetative Growth, Nutrient Status and Fruiting of Balady Mandarin Trees. *Assiut J. of Agric. Sci.*, 42 (Special Issue) (The 5th Conference of Young Scientists Fac. of Agric. Assiut Univ., 8, 317-331.
- Osganian SO, Stampfer MJ, Rimm E, Spiegelman D, Manson JE, & Willet WC. (2003). Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. *Am J Clin Nutr.*; 77: 1390-9
- Parr, A.J.; Bolwell, G.P. (2000) Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content and profile. *J. Sci. Food Agric.*, 80, 985-1012.
- Pulido R.; Bravo L.; Saura-Calixto F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3396-3402.
- Richard A. Dixon and Nancy L. Paiva. (1995). Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism *The Plant Cell*, , Vol. 7, 1085-1097.
- Rozema, J.; van de Staaij, J.; Björn, L.O.; Caldwell, M. (1997). UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends Ecol. Evol.*, 12, 22-27.
- Savita Dixit, Huma Ali. (2010). Antioxidant Potential Some Medicinal Plants of Central India *Journal of Cancer Therapy*, 1, 87-90
- Schreiner, M. Huyskens-Keil, S. (2006) Phytochemicals in fruit and vegetables: health promotion and postharvest elicitors. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 25, 267-278.
- Schreiner, M. (2005). Vegetable crop management strategies to increase the quantity of phytochemicals. *Eur. J. Nutr.*, 44, 85-94.
- Stahl W, Sies H. (2005). Bioactivity and protective effect of natural carotenoids. *Biochim Biophys Acta.*, 1740: 101-7.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother*, 58: 100-10.
- Vignesh R., N.R. Venkatesh, B. Meenakshisundaram and R. Jayapradha. (2012). Novel Instant Organic Fertilizer and Analysis of its Growth Effects on Spinach. *Journal of Biological Sciences* 12(2): 105-110.

Table 1: Details of 9 combinations mineral-based nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K)

Traitement		Nitrogen (kg-N ha ⁻¹)	Phosphorus (kg-P ₂ O ₅ ha ⁻¹)	Potassium (kg-K ₂ O ha ⁻¹)
T1	N ₀ P ₀ K ₀	0	0	0
T2	N ₁₅ P ₀ K ₄₅	15	0	45
T3	N ₃₀ P ₀ K ₉₀	30	0	90
T4	N ₆₀ P ₀ K ₁₀₀	60	0	100
T5	N ₀ P ₃₀ K ₁₀₀	0	30	100
T6	N ₃₀ P ₃₀ K ₀	30	30	0
T7	N ₁₅ P ₃₀ K ₄₅	15	30	45
T8	N ₃₀ P ₃₀ K ₉₀	30	30	90
T9	N ₆₀ P ₃₀ K ₁₀₀	60	30	100

Table 2: The twenty-seven (27) organo-mineral fertilizer combinations tested on sweetpotato the variety TIB-440060

Organic Fertilization	Mineral Fertilization								
F₀=0	N ₀ P ₀ K ₀ T1	N ₁₅ P ₀ K ₄₅ T2	N ₃₀ P ₀ K ₉₀ T3	N ₆₀ P ₀ K ₁₀₀ T4	N ₀ P ₃₀ K ₁₀₀ T5	N ₃₀ P ₃₀ K ₀ T6	N ₁₅ P ₃₀ K ₄₅ T7	N ₃₀ P ₃₀ K ₉₀ T8	N ₆₀ P ₃₀ K ₁₀₀ T9
F₁	T4	T8	T9	T1	T6	T2	T5	T3	T7
F₂	T8	T7	T1	T3	T6	T2	T4	T9	T5

F₀: Control (without organic fertilizer); F₁: application of 20 t / ha of organic fertilizer annually. F₂: application of 20 t/ha every two years

Table 3: ANOVA of Means Square for phytochemical compound in TIB-440060 tubers

	TAC	TPC	TCC
Organic fertilization (O)	1,994***	2,447***	0,00004**
Mineral fertilization (M)	1,187***	0,205***	0,00006***
Organo-mineral fertilization (OxM)	0,745***	0,952***	0,00007***

** pour P=0.008, *** pour P<0.001

Table 4: Influence of different doses of organic fertilization on the production of TAC, TPC and TCC in TIB-440060 tubers

	TAC (mg/g)	TPC (mg/g)	TCC (mg/g)
F₀	2.606	1.749	0.016
F₁	3.118	2.351	0.018
F₂	3.022	2.059	0.018
standard Error	0.027	0.041	0.0004
LSD	0.074	0.115	0.001

Table 5: Increase of antioxidant, polyphenolic and total carotenoid contents on the OFSP variety TIB-440060 according to periodicity of organic manure application

Organic fertilizer	F1	F2
Rate of increase (TAC)/F0	19.61 %	15.94 %
Rate of increase(TPC)/F0	34.41 %	17.69 %

Rate of increase(TCC)/F0	12.82%	12.17 %
--------------------------	--------	---------

F0: Control (without organic fertilizer); F1: application of 20 t / ha of organic fertilizer annually. F2: application of 20 t/ha every two years

Table 6: Influence of different doses of mineral fertilization on the production of TAC, TPC and TCC in TIB-440060 tubers

	TAC(mg/g)	TPC(mg/g)	TCC(mg/g)
T ₁	2.736	1.983	0.019
T ₂	3.107	2.126	0.016
T ₃	3.378	1.877	0.013
T ₄	2.996	1.916	0.019
T ₅	2.953	2.191	0.013
T ₆	2.213	2.128	0.019
T ₇	2.940	2.184	0.017
T ₈	2.324	1.838	0.020
T ₉	2.950	2.237	0.016
standard Error	0.027	0.042	0.0004
LSD	0.073	0.115	0.001

Table 7: Levels of antioxidants, total polyphenols and carotenoids accumulated by the OFSP variety TIB-440060 under different organo-mineral combination

Fertilization	Phytochemicals		
	TAC (mg/g)	TPC (mg/g)	TCC (mg/g)
F ₀ T ₁	2.076±0.049 ^{bc}	1.234±0.018 ^a	0.011±0.001 ^{abc}
F ₀ T ₂	2.622±0.006 ^{def}	1.662±0.023 ^{bcde}	0.014±0.001 ^{cdef}
F ₀ T ₃	3.199±0.080 ^{ghi}	1.720±0.016 ^{cde}	0.016±0.000 ^{fgh}
F ₀ T ₄	3.209±0.061 ^{ghi}	2.442±0.106 ^{jkl}	0.016±2.E05 ^{efg}
F ₀ T ₅	1.641±0.088 ^{ab}	1.415±0.035 ^{abc}	0.011±2.E05 ^{abc}
F ₀ T ₆	2.303±0.039 ^{cd}	2.632±0.052 ^{lm}	0.015±0.000 ^{def}
F ₀ T ₇	2.565±0.100 ^{de}	1.864±0.084 ^{ef}	0.018±0.000 ^{ghij}
F ₀ T ₈	3.101±0.042 ^{fghi}	1.373±0.142 ^{ab}	0.018±0.000 ^{ghij}
F ₀ T ₉	2.736±0.050 ^{defg}	1.396±0.034 ^{ab}	0.018±0.001 ^{fghi}
F ₁ T ₁	3.215±0.044 ^{ghi}	2.567±0.148 ^{lm}	0.022±0.001 ^{kl}
F ₁ T ₂	3.336±0.160 ^{hij}	2.510±0.101 ^{klm}	0.023±0.000 ^l
F ₁ T ₃	3.219±0.147 ^{ghi}	1.863±0.031 ^{ef}	0.008±0.001 ^a
F ₁ T ₄	3.216±0.057 ^{ghi}	1.913±0.049 ^{efg}	0.019±0.000 ^{hijk}
F ₁ T ₅	2.557±0.269 ^{cde}	2.351±0.016 ^{ijkl}	0.019±0.000 ^{ghij}
F ₁ T ₆	2.875±0.171 ^{efgh}	2.126±0.150 ^{fghi}	0.021±0.000 ^{ikl}
F ₁ T ₇	3.496±0.183 ^{ij}	2.962±0.038 ⁿ	0.013±0.000 ^{cde}
F ₁ T ₈	3.455±0.097 ^{ij}	2.632±0.115 ^{lm}	0.018±0.000 ^{ghij}
F ₁ T ₉	2.684±0.157 ^{def}	2.233±0.060 ^{hijk}	0.011±0.000 ^{abc}
F ₂ T ₁	2.916±0.122 ^{efgh}	2.147±0.052 ^{fghij}	0.023±0.000 ^l
F ₂ T ₂	3.362±0.112 ^{hij}	2.204±0.035 ^{ghij}	0.009±0.001 ^{ab}
F ₂ T ₃	3.714±0.023 ^j	2.045±0.056 ^{fgh}	0.012±0.000 ^{bcd}
F ₂ T ₄	2.562±0.017 ^{cde}	1.391±0.013 ^{ab}	0.018±0.000 ^{ghij}
F ₂ T ₅	3.580±0.077 ^{ij}	2.804±0.066 ^{mn}	0.008±0.000 ^a
F ₂ T ₆	1.459±0.025 ^a	1.625±0.044 ^{bcde}	0.019±8.E05 ^{ijk}
F ₂ T ₇	2.757±0.047 ^{defg}	1.724±0.009 ^{de}	0.019±0.001 ^{hijk}
F ₂ T ₈	3.414±0.151 ^{ij}	1.506±0.020 ^{abcd}	0.023±0.000 ^l
F ₂ T ₉	3.429±0.254 ^{ij}	3.077±0.011 ⁿ	0.021±0.001 ^{ikl}

Data are expressed as means ± SE of triplicate experiments. Means in a column not having a common letter are different ($P < 0.05$).

Table 8: contribution (per cent) of the type of fertilization on the accumulation of TAC, TPC and TCC in TIB-440060 tubers

Type of fertilization	Contribution (%)		
	TAC	TPC	TCC
Organic fertilization	14.85	21.98	4.38
Mineral fertilization	35.36	7.35	29.50
Organo-mineral fertilization	44.38	68.39	62.63
Residual	5.41	2.28	3.49

Table 9: Correlation (R^2) between the different quality parameters in sweetpotato

	TPC	TAC
TAC	0.8947	
TCC	0.7885	0.9784

Farine de la Patate Douce à Chair Orange : caractérisation des caroténoïdes et conservation

Moumouni Koala¹, Adama Hema^{1*}, Eloi Palé¹, Rosella Spina², François Dupire²,
Chrétien Françoise², Abdoulaye Sérémé³, Mouhoussine Nacro¹, Yves Chapleur²,
Dominique Laurain-Mattar²

¹ Laboratoire de Chimie Organique et de Physique Appliquées, Département de Chimie, UFR-SEA, Université de Ouagadougou 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso

² UMR 7565 CNRS, Faculté des Sciences et Techniques, BP 70239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy

³ CNRST/IRSAT, Département des substances naturelles, 03 BP 7047 Ouagadougou 03 Burkina Faso

(Reçu le 15/08/2014 – Accepté après corrections le 25/12/ 2014)

Résumé : La patate douce à chair orange renferme des caroténoïdes qui sont responsables de sa valeur nutritionnelle et des effets bénéfiques sur la santé des consommateurs. Par un couplage TLC/MS effectué avec le système CAMAG TLC-MS interface, cinq molécules de caroténoïdes telles que le β -carotène, l' α -cryptoxanthine, la β -cryptoxanthine, la lutéine et la zéaxanthine et éventuellement les isomères du β -carotène (α -carotène, ε -carotène, γ -carotène, lycopène) ont été identifiées dans les extraits de la farine de patate douce à chair orange. Les taux de rétention des caroténoïdes totaux sont passés de 84,13% dans les conditions de conservation au congélateur à 27,39% et 26,10% dans les conditions de conservation CMART et CMARS respectivement pendant quatorze semaines. Fortement corrélées ($R=0,94$) aux caroténoïdes totaux, les teneurs en antioxydants totaux sont préservées à 73 % ($P<0,05$) dans les conditions de conservation au congélateur qui sont les plus convenables pour préserver les caroténoïdes des phénomènes de photooxydation. Dans ces conditions, les micronutriments antioxydants responsables de sa valeur nutritionnelle pourraient être préservés jusqu'à 72% pendant six mois de conservation. Ce type de conservation apparaît donc comme une alternative pour les transformatrices confrontées à des difficultés de conservation des tubercules frais.

Mots clés : TLC-MS, réactif de Folin-Ciocalteu, antioxydant, polyphénols

Orange Fleshed Sweet potato flour: characterization of carotenoids and conservation

Abstract : Orange fleshed sweetpotato contains carotenoids that are responsible for its nutritional value and beneficial effects on the health of consumers. By coupling TLC/MS made with CAMAG TLC-MS interface, five molecules of carotenoids such as β -carotene, α -cryptoxanthin, β -cryptoxanthin, lutein, and zeaxanthin and possibly the isomers of β -carotene (α -carotene, ε -carotene, γ -carotene and lycopene) have been identified in extracts of Orange fleshed sweet potato flour. Total carotenoid retention rates are passed from 84.13% under freezer conservation conditions to 27.39% and 26.10% under CMART and CMARS conservation conditions respectively for fourteen weeks. Strongly correlated ($R = 0.94$) to total carotenoids contents, total antioxidant levels are preserved at 73% ($P < 0.05$) in freezer conservation conditions, the most suitable to prevent carotenoids from photooxidation phenomena. In these conditions, antioxidant micronutrients which are responsible of its nutritional value could be preserved up to 72% for six months of storage. This type of conservation thus appears to be an alternative for the transformative facing difficulties of conservation of fresh tubers.

Keys words : TLC-MS, Folin-Ciocalteu Reagent, antioxidant, polyphenols

* Auteur correspondant : hemaadama@yahoo.fr

1. Introduction

Les tubercules de patate douce à chair orange (PDCO), du fait de leur grande teneur en eau, sont très hautement périssables dans les conditions tropicales et ont par conséquent une courte durée de conservation [1,2]. La préservation des aliments par le séchage est l'une des méthodes les plus courantes utilisées dans les pays en développement. La conservation des tubercules frais dans le sol est une autre méthode courante en Afrique au sud du Sahara. Cependant, le séchage permet la conservation en saison sèche et donc permet de consommer la patate douce à travers toute l'année au Burkina Faso où la culture est saisonnière [3]. La patate douce à chair orange est une culture en promotion au Burkina Faso et la transformation est un maillon stratégique qui pourrait impulser une dynamique de développement de la consommation, de la commercialisation et de la production. Mais la conservation des tubercules frais à travers les différentes chaînes de valeur reste encore problématique [4]. Cette culture très riche en provitamines A dont certains caroténoïdes, fait de plus son entrée dans la biofortification de farines infantiles par les transformatrices locales. Afin de garantir toute la valeur nutritionnelle de ces farines biofortifiées, il convient de proposer des conditions de conservation de ces produits semi-finis. Le présent travail a consisté à une collaboration entre le Laboratoire de Chimie Organique et de Physique Appliquées et une transformatrice locale « *SEN BE PUGE BE NEERE* » pour identifier des conditions de conservation convenables de la farine de PDCO.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

La farine de PDCO qui fait l'objet de notre étude, provient des tubercules de la variété Jewel. Ils sont récoltés dans la région du centre-ouest du Burkina Faso à environ 140 km de Ouagadougou (Léo). Ces tubercules sont transformés en farine par une unité de transformation des produits agroalimentaires « *SEN BE PUGE BE NEERE* » dans la ville de Ouagadougou.

2.2. Conditions de conservation

Une masse de 200 g de farine de PDCO est conservée en milieu ambiant (laboratoire) dans des récipients transparents (CMART), dans des récipients sombres (CMARS) ainsi qu'au réfrigérateur (CR) et au congélateur (CC). Dix (10) mg de cette farine sont prélevés, extraits et dosés

toutes les deux semaines.

2.3. Extraction

Les extraits au système acétone-eau-acide acétique (70 : 29,5 : 0,5 v/v) [1,5] ont servi à doser les teneurs en antioxydants totaux (TAO) et les teneurs en polyphénols totaux (TPP). Les extraits au système acétone-hexane (50 : 50 v/v) [1,6] ont servi à doser les caroténoïdes totaux (CT).

2.4. Identification des caroténoïdes

La CCM sur silice en phase normale a été effectuée en utilisant le système de solvants hexane/acétate d'éthyle (96/4 v/v) comme phase mobile. Un couplage TLC/MS effectué avec le système CAMAG TLC-MS interface au laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Nancy. Le spectromètre de masse utilisé est un microTOF-Q de Bruker en mode ESI positif.

2.5. Teneurs en antioxydants totaux (TAO) : FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Dans cette méthode, un sel ferrique, le Fe(III) (TPTZ)₂Cl₃ (TPTZ= 2,4,6-tripyridyl-s-triazine) est utilisé comme oxydant [7,8]. On mesure l'absorbance de la décoloration en bleue intense à 593 nm avec le lecteur microplaque (spectrophotomètre MP96, SAFAS). Une courbe d'étalonnage est établie en utilisant le Trolox comme antioxydant de référence. Les résultats, déterminés à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage ($y = 28,67x + 0,066$; $R^2 = 0,999$), ont été exprimés en mg d'Equivalent de Trolox (ET) par gramme de matériel végétal. Toutes les mesures sont répétées trois fois.

2.6. Teneurs en polyphénols totaux (TPP) : RFC (réactif de Folin-Ciocalteu)

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits sont déterminées en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu (RFC) [9]. Un volume de 60 µL d'extrait convenablement dilué est mélangé à 60 µL de réactif de Folin-Ciocalteu dilué dix fois. Le mélange est laissé à la température ambiante pendant huit minutes pour permettre la réaction complète du réactif de Folin-Ciocalteu sur les substances oxydables ou sur les phénolates. On y a ajouté ensuite 120 µL de Na₂CO₃ (7,5% dans l'eau) pour neutraliser les réactifs résiduels. Les absorbances des extraits ont été mesurées à 765 nm avec une microplaque en quartz 96 puits (spectrophotomètre MP96, SAFAS) après incubation pendant 30 minutes à 37°C. En utilisant l'acide gallique comme référence, une courbe d'étalonnage est

établie. Les résultats, déterminés à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage ($y = 46,41x + 0,063$; $R^2 = 0,998$), sont exprimés en mg d'Equivalent d'acide gallique (EAG) par gramme de matériel végétal. Toutes les mesures sont répétées trois fois.

2.7. Teneurs en caroténoïdes totaux (CT)

Les teneurs en caroténoïdes totaux des extraits de PDCO sont évaluées suivant la méthode décrite par McMurry et ses collègues^[10;11] mais légèrement modifiée. Après une dilution convenable, les absorbances des extraits gardés à la température ambiante et à l'abri de la lumière, sont lues à 450 nm. Les teneurs en caroténoïdes totaux sont obtenues en rapportant les absorbances des extraits sur une courbe-étalon ($y = 25,56x + 0,016$; $R^2 = 0,999$) établie en utilisant le β -carotène comme standard. Les teneurs en caroténoïdes sont exprimées en Equivalents de β -carotène par gramme d'échantillon. Toutes les mesures sont répétées trois fois.

2.8. Etude statistique

Les expériences sont répétées au moins trois fois et les résultats présentés sont exprimés sous la forme moyenne \pm écart-type calculés au seuil de probabilité inférieur ou égal à 95%. Une analyse de variance (ANOVA) a permis d'apprécier les différences entre les quatre conditions de conservation pour leurs teneurs en antioxydants, en polyphénols et en caroténoïdes totaux en utilisant le logiciel statistique Genstat, édition 14. Des lettres différentes d'une colonne indiquent une différence significative ($P < 0,001$) entre les teneurs en fonction de la durée de conservation.

3. Résultats et discussion

3.2. Identification des caroténoïdes majoritaires présents dans l'extrait de Jewel

Les caroténoïdes de l'extrait de Jewel isolés par la CCM, sont identifiés sur la base des informations combinées obtenues à partir du chromatogramme CCM et du spectre de masse. L'analyse des spectres CCM-MS/MS du spot 1 ($R_f = 0,48$) montre que cette tache est constituée de plusieurs caroténoïdes. En effet, sur le spectre de masse en Electrospray mode positif (ESI⁺), nous observons cinq ions (A, B, C, D et E) à m/z 535,4 [M+H]⁺, m/z 537,4 [M+H]⁺, m/z 551,4 [M+H]⁺, m/z 553,4 [M+H]⁺ et m/z 569,4 [M+H]⁺ suggérant des masses moléculaires de 534, 536, 551, 552 et 568 respectivement (figure 1). Ces masses sont caractéristiques du poids moléculaire de certains

caroténoïdes connus dans la littérature. En analysant les spectres de masse, il ressort qu'outre les pics des ions sus-cités, il existe des pics très intenses. Leur forte intensité traduit leur plus grande stabilité^[12-14]. Aussi, la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) sur chacun des signaux (A, B, C, D et E) a permis de procéder à leur attribution.

Ainsi, le MS/MS sur les pics à m/z 569,4 (E), m/z 553,4 (D), m/z 551,4 (C), m/z 537,4 (B) et m/z 535,4 (A) (figure 1) ne montre aucun fragment secondaire lié à chacun de ces derniers. Ainsi les pics A, B, C et D correspondent à des pics moléculaires. La tache CCM analysée en spectrométrie de masse est donc constituée d'un mélange de caroténoïdes. Ainsi, l'ion moléculaire [M+H]⁺ m/z 569,4 en accord avec la formule brute $C_{40}H_{56}O_2$ correspond à la zéaxanthine tandis l'ion moléculaire [M+H]⁺ m/z 553,4 pourrait correspondre à l' α -cryptoxanthine ou à la β -cryptoxanthine. En effet, la seule différence structurale entre ces deux dernières réside au niveau de la position du groupe hydroxyle et de la double liaison du deuxième noyau de la molécule (tableau I). Le groupement hydroxyle de l' α -cryptoxanthine est allylique donc facile à éliminer par rapport à celui de la β -cryptoxanthine qui est lié à un atome de carbone secondaire voisin des liaisons saturées carbone-carbone. La différenciation entre ces deux molécules (α - et β -cryptoxanthine) se fait par comparaison de l'intensité du pic de l'ion moléculaire m/z 553 (figure 1 et tableau I) à celle de l'ion à m/z 535. Le spectre de masse de l'extrait de Jewel révèle que le pic de l'ion fragment m/z 535 est plus intense (pic A, figure 1) que celui de l'ion moléculaire m/z 553. Ceci confirme la stabilité de l'ion à m/z 535^[14]. Ainsi, dans l'extrait de la farine de la variété Jewel (PDCO), le composé du pic A est identifié comme étant l' α -cryptoxanthine tandis que celui du pic D m/z 553 est la β -cryptoxanthine, la xanthophylle provitamine A la plus couramment rencontrée. Le pic caractéristique à m/z 551,4 est en accord avec la masse calculée à l'aide de la formule brute $C_{40}H_{54}O$ correspond à la lutéine.

L'ion moléculaire à m/z 537,4 [M+H]⁺ (pic B) (figure 1) de formule brute ($C_{40}H_{56}$) pourrait correspondre au bêta-carotène tout comme à l'alpha, au gamma, à l'épsilon-carotène ou au lycopène. Ce signal est de loin le plus abondant par rapport aux autres. De nombreuses études ont montré que dans les tubercules de PDCO, le β -carotène est le caroténoïde le plus abondant^[15-18;19;20]. En effet, il y représente environ 80-90 % des caroténoïdes totaux^[21]. C'est pour cette raison que P.J. van Jaarsveld^[22], dans une récente étude, a indiqué que la substitution des variétés à chair

blanche par les variétés à chair orange (très riches en β -carotène) pourrait sauver plus de 50 millions d'enfants de moins de six ans en Afrique subsaharienne qui sont actuellement sous le risque des maladies associées à la carence en vitamine A [23;24]. Dans la littérature, on a noté la présence de l' α -carotène, du γ -carotène et du lycopène dans certaines variétés de la PDCO mais en très faibles concentrations [17; 25-28]. Ainsi, l'ion moléculaire $[M+H]^+$ m/z 537,4 (pic B) suggère prioritairement le β -carotène puis, le lycopène, l' α -carotène, le γ -carotène, l' ϵ -carotène.

3.3.Évolution des teneurs en caroténoïdes, polyphénols et en antioxydants totaux

La préservation de la qualité nutritionnelle de la farine de patate douce à chair orange (PDCO) dépend des conditions de conservation. En effet, les teneurs en caroténoïdes, polyphénols et en

antioxydants totaux diminuent à des degrés divers avec les conditions de conservation.

L'exposition de la farine de PDCO en milieu ambiant dans des récipients transparents (CMART) pendant trois mois et demi (14 semaines) provoque une réduction considérable d'environ 64% (figure 2) des teneurs en caroténoïdes totaux. Cette réduction est atténuée lorsque la farine est conservée dans le même milieu ambiant mais dans des récipients sombres (CMARS). La lumière et la température sont des facteurs qui influencent la conservation des caroténoïdes dont les structures sont caractérisées par la présence d'une conjugaison de polyènes [29]. En effet, toute perte ou changement de couleur pendant la conservation, peut-être clairement attribué à une dégradation ou à une modification de structure des caroténoïdes [30]. Ces deux facteurs se manifestent soit par une isomérisation soit par une oxydation.

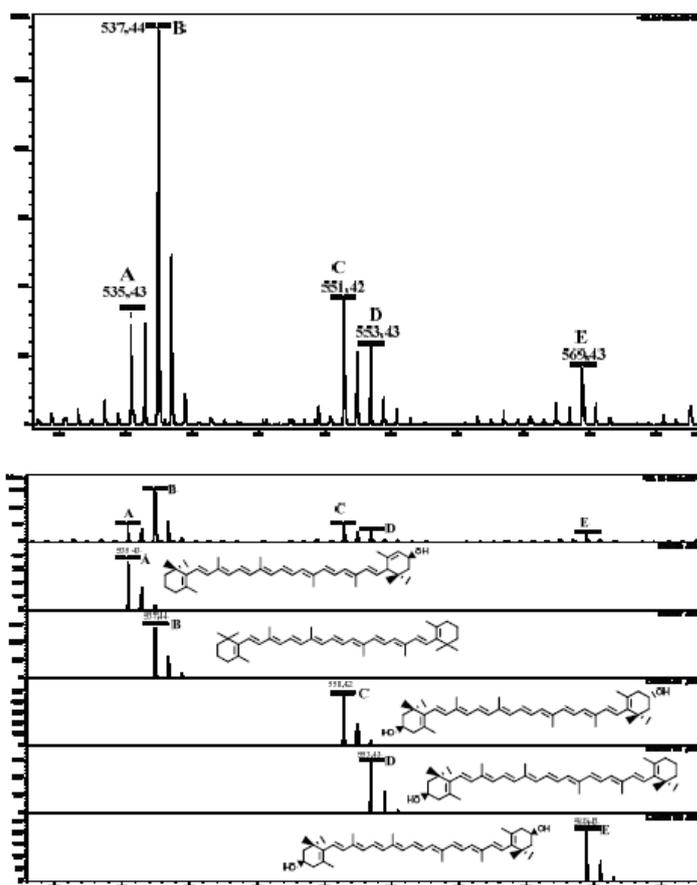
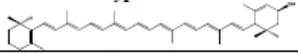
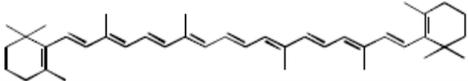
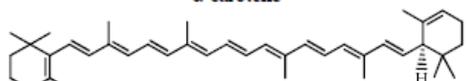
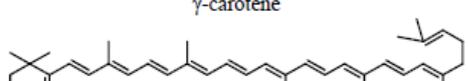
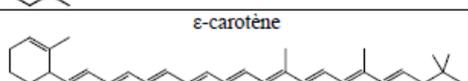
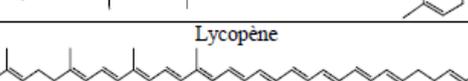
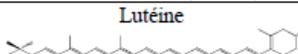
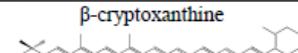
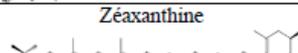


Figure 1 : Spectres de masse des caroténoïdes

Tableau I : Structures de caroténoïdes identifiées

Pics de l'ion moléculaire	m/z [M+H] ⁺	Formule brute	Ions pseudo moléculaires	Structures de caroténoïdes suggérées
A	553,4	C ₄₀ H ₅₆ O	535,4 [M-H-18] ⁺ *	<p>α-cryptoxanthine</p> 
B	537,4	C ₄₀ H ₅₆	-	<p>β-carotène</p> 
				<p>α-carotène</p> 
				<p>γ-carotène</p> 
				<p>ε-carotène</p> 
				<p>Lycopène</p> 
C	569,4	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	551,4 [M-H-18] ⁺ *	<p>Lutéine</p> 
D	553,4	C ₄₀ H ₅₆ O	-	<p>β-cryptoxanthine</p> 
E	569,4	C ₄₀ H ₅₆ O ₂	-	<p>Zéaxanthine</p> 

* : le pic pseudomoléculaire plus intense (plus stable)

L'isomérisation conduit à la transformation des trans-caroténoïdes naturels en cis-caroténoïdes et l'oxydation conduit à des apo-béta-caroténals ainsi qu'à des norisoprénoïdes^[31].

De plus, la température du milieu de conservation a un effet sur la préservation de la qualité nutritionnelle de la farine de PDCO. Ainsi, pour les échantillons de farine conservés au réfrigérateur et au congélateur, on observe une rétention de caroténoïdes de 55,71% et 84,13% (figure 2) respectivement contre seulement 27,39% et 26,10% de rétention dans les CMARS et CMARS respectivement. Les pourcentages de rétention dans les conditions de réfrigérateur et du congélateur reflètent les effets combinés de la température et de la lumière. Pour mieux préserver les caroténoïdes totaux (provitamine A), il convient de conserver la farine à l'abri de la lumière et à -4°C.

En revanche, lors de ces 14 semaines, les teneurs en polyphénols ont été très peu affectées lorsqu'on passe du milieu ambiant au congélateur. Il ressort une rétention relative de 71,42% au CMARS, 73,04% au CMARS et environ 75% (figure 3) pour les conservations au réfrigérateur et au congélateur.

Les activités antioxydantes des extraits des échantillons conservés dans ces différentes conditions, seraient dues aux effets combinés des polyphénols, des caroténoïdes et de certains oligoéléments non évalués dans cette étude. Ainsi, les teneurs en antioxydants totaux (TAO) connaissent des variations notables lors de la conservation. En effet, les plus grandes baisses en antioxydants totaux ont été enregistrées pour les échantillons CMARS (environ de 71% de perte) ; un peu moins dans les CMARS et CR. La CC demeure la meilleure condition de conservation pour préserver 73% des antioxydants totaux de la

farine de PDCO (figure 4).

L'analyse statistique par la version 14 du logiciel Genstat révèle que les différences entre les teneurs en polyphénols totaux en fonction des conditions de conservation ne sont pas significatives ($P > 0,05$). En revanche, il existe des différences très significatives ($P < 0,001$) entre les caroténoïdes totaux lors de la conservation de la farine de PDCO dans ces conditions. Ces différences sont assez significatives pour les teneurs en antioxydants totaux. Les teneurs en polyphénols totaux demeurant quasi-constantes en fonction de la condition de conservation, on pourrait affirmer que les activités antioxydantes de la farine de PDCO sont très dépendantes des teneurs en caroténoïdes totaux ; soit un coefficient de corrélation d'environ 94%. Les molécules de caroténoïdes plus ou moins identifiées dans les

extraits de cette farine pourraient être responsables des activités antioxydantes évaluées dans cette étude. Ces molécules sont caractérisées par une forte conjugaison de polyènes (tableau I) qui se prêtent à des réactions d'oxydation et de photo-oxydation.

Dans la pratique, une conservation de la farine aux conditions de température du laboratoire (25°C) préserve les molécules de polyphénols tandis que les caroténoïdes sont drastiquement altérés à une vitesse moyenne de $0,0281 \text{ mg d'EBC/g}$ de farine pour atteindre un faible niveau d'environ 28 % soit une destruction de 72% des caroténoïdes initiaux (Tableau II). Ainsi, la vitesse moyenne de disparition des caroténoïdes décroît du CMART à la CC qui permet de préserver plus de 84% (figure 2) des caroténoïdes totaux.

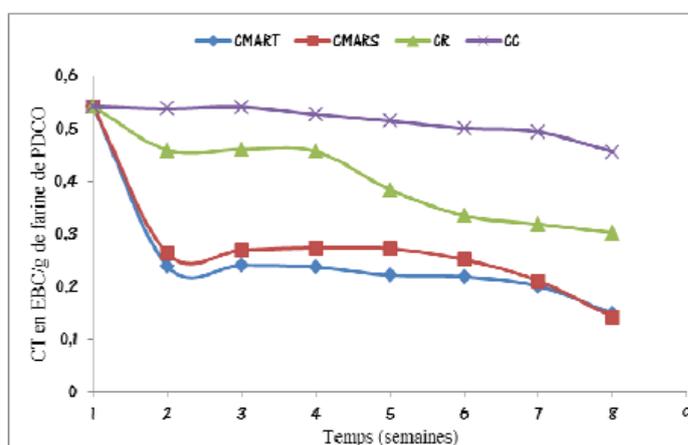


Figure 2 : Évolution des teneurs en caroténoïdes totaux de la PDCO en fonction des conditions de conservation

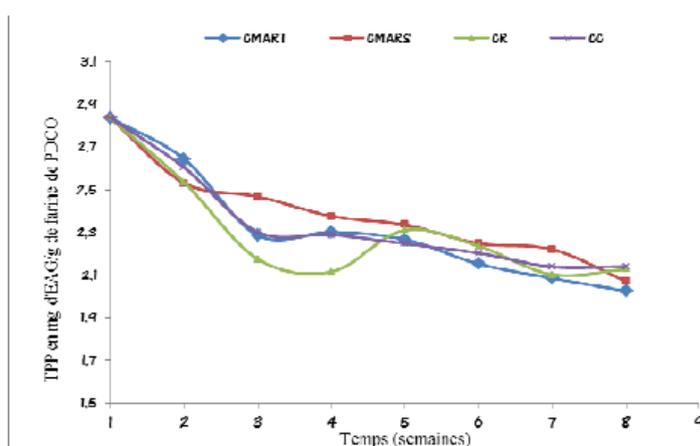


Figure 3 : Évolution des teneurs en polyphénols totaux de la farine de PDCO en fonction des conditions de conservation

J. Soc. Ouest-Afr. Chim. (2014) 038 ; 42 - 49

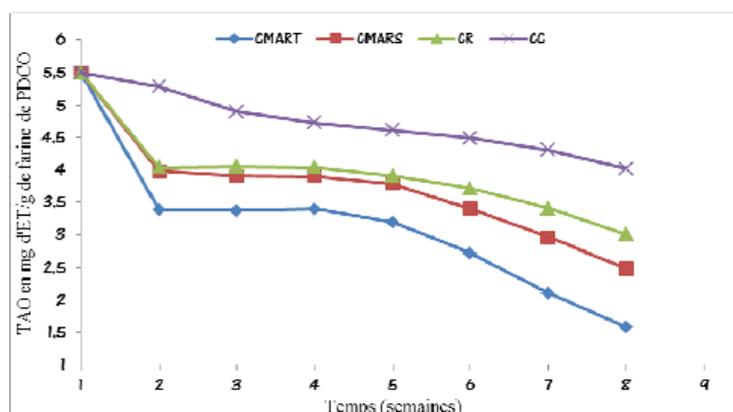


Figure 4 : Évolution des teneurs en antioxydants totaux de la farine de PDCO en fonction des conditions de conservation

Tableau II : Pourcentage de rétention et vitesses moyennes de dégradation des CT, TAO et TPP en fonction des conditions de conservation

Conditions de conservation	CMART	CMARS	CR	CC
Rétention CT (%)	27,39	26,10	55,71	84,13
Rétention TAO (%)	28,74	45,16	54,56	73,08
Rétention TPP (%)	71,42	73,04	75,03	75,48
VMD _{CT} /semaine (mg d'EBC/g de farine)	0,0281	0,0286	0,0171	0,0061
VMD _{TAO} /semaine (mg d'ET/g de farine)	0,2800	0,2155	0,1785	0,1057
VMD _{TPP} /semaine (mg d'EAG/g de farine)	0,0578	0,0546	0,0505	0,0496

4. Conclusion

Pour conserver la qualité nutritionnelle de la farine de PDCO, il convient de la placer à l'abri de la lumière et des fortes élévations de température. Elle se conserve ainsi mieux au congélateur (-4°C) et un peu moins au réfrigérateur. En effet, dans ces conditions, on observe respectivement les meilleurs taux de rétention d'environ 84 % et 55 % de caroténoïdes totaux. Compte tenu de la très haute périssabilité des tubercules frais, la conservation des produits semi-finis de la PDCO apparaît comme une alternative pour rendre disponible la PDCO pendant toute la durée de la saison sèche. Pourvoyeurs de micronutriments provitamine A, ces produits semi-finis de la PDCO entrant dans la biofortification de farines infantiles, peuvent être conservés au congélateur pendant trois mois et demi. Sur la base de la vitesse moyenne de disparition des caroténoïdes totaux (VMD_{CT}/semaine), on peut extrapoler que cette farine pourrait être conservée au congélateur pendant six mois et disposer de près de 72 % de sa valeur nutritionnelle en micronutriments antioxydants.

Remerciements

Les auteurs de ce travail remercient l'Université de Ouagadougou, le Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Lorraine et « THE MCKNIGHT FOUNDATION » pour avoir financé ce travail à travers le projet « Promotion de la patate douce à chair orange pour contrôler la carence en Vitamine A et en Antioxydant au Burkina Faso »

Bibliographie

- [1] Moumouni K, Adama H, Koussao S, Eloi P, Abdoulaye S, Jerome B, Mouhoussine N. Evaluation of Eight Orange Fleshed Sweetpotato (OFSP) Varieties for Their Total Antioxidant, Total Carotenoid and Polyphenolic Contents. *Journal of Natural Sciences Research* (2013) 3 (4), 67-72.
- [2] Fowler, MH and Stabrawa, AM. A Rapid Appraisal of Sweetpotato Marketing in Uganda. (1992) 253-275 in *Product Development for Root and Tuber Crops Vol III-Africa. Proceedings of the Workshop on Processing, Marketing and Utilisation of Root and Tuber Crops in Africa*, October 26- November 2, 1991 at the International Institute for Tropical Agriculture (IITA) Scott, G.J., Freguson, P.I. and Herrera, J.E. editors. Ibadan, Nigeria.
- [3] Hall A, Bockett G and Nahdy S. *Sweetpotato Postharvest Systems in Uganda: Strategies, Constraints, and Potentials*. International Potato Center Social Science Department Working (1998) Paper No. 1998-7. 81pages.

- [4] Gayathri GN, Platel K, Prakash J and Srinivasan K. Influence of antioxidant spices on the retention of β -carotene in vegetables during domestic cooking processes. *Food Chemistry* (2004) 84, 35-43.
- [5] Asami KD, Yun-Jeong H, Diane MB, and Alyson EM. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *J. Agric. Food Chem.* (2003) 51, 1237-1241.
- [6] Kowalski RE, Mergens WJ, and Scialpi, LJ. Process for manufacture of carotenoid compositions. U.S. patent, (2000) 6, (93), 348.
- [7] Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* (1996) 239, 70-76.
- [8] Pulido R, Bravo L, Saura-Calixo F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* (2000) 48, 3396-3402.
- [9] Nihal T, Sedat VY, Ferda S and Gokce P. Effect of Extraction Conditions on Measured Total Polyphenol Contents and Antioxidant and Antibacterial Activities of Black Tea. *Molecules*, (2007) 12, 484-496.
- [10] Jun Y, Lingling F, Jian X and Yedan X. Ultrasound-assisted extraction of corn carotenoids in ethanol. *Food Science and Technology*, (2011) 46, 2131-2136.
- [11] McMurry, J. *Organic Chemistry*, Brooks/Cole 7th edition. 2008, P504 chapter 14, California.
- [12] De Rosso VV, Mercadante AZ. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J Agric Food Chem* (2007) 55, 5062-5072.
- [13] De Rosso VV, Mercadante AZ. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. *J Agric Food Chem* (2007) 55, 9135-9141.
- [14] De Faria AF, De Rosso VV, Mercadante AZ. Carotenoid Composition of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*), Determined by HPLC-PDA-MS/MS. *Plant Foods Hum Nutr* (2009) 64, 108-115.
- [15] Mark LF, Sagar KT and Jung YK. *In Vitro* Bioaccessibility of β -Carotene in Orange Fleshed Sweet Potato (*Ipomoea batatas*, Lam.). *J. Agric. Food. Chem.* 2009, 57, 10922-10927.
- [16] Haskell MJ, Jamil KM, Hassan F, Peerson JM, Hossain MI, Fuchs GJ, Brown KH. Daily consumption of Indian spinach (*Basella alba*) or sweet potatoes has a positive effect on total body vitamin A stores in Bangladeshi men. *Am J Clin Nutr.* (2004) 80 (3), 705-14.
- [17] Kapinga, RE, Carey, EE. Present status of sweetpotato breeding for eastern and southern Africa. In D. Rees, Q. Oirschot, & R. Kapinga Edition 2003, Sweetpotato post-harvest assessment: Experiences from East Africa. Chatham, UK: Natural Resources Institute.
- [18] Operia R, Sun P. AVRDC Sweet Potato Research Program, In Improvement of Sweet Potatoes in East Africa: With Some References of Other Tuber and Root Crops: Report, International Potato Centre (1988).
- [19] Keith T, Constance O, Aurelie B, Geoffrey M, Andrew W. Relationship among the carotenoid content, dry matter content and sensory attributes of sweet potato. *Food Chemistry* (2012) 131, 14-21.
- [20] Bechoff A, Westby A, Owori C, Menya, G, Dhuique-Mayer C, Dufour D. Effect of drying and storage on the degradation of carotenoids in orange-fleshed sweet potato varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2010) 90, 622-629.
- [21] Bengtsson A, Namutebi A, Larsson Alminger M, Svanberg, U. Effects of various traditional processing methods on the all-trans- β -carotene content of orange-fleshed sweetpotato. *Journal of Food Composition and Analysis* (2008) 21, 134-143.
- [22] Low JW, Arimond M, Osman N, Cunguara B, Zano F, Tschirley D. A Food-Based Approach Introducing Orange-Fleshed Sweet Potatoes Increased Vitamin A Intake and Serum Retinol Concentrations in Young Children in Rural Mozambique. *The Journal of Nutrition* (2007) 1320-1327.
- [23] Van Jaarsveld PJ, De Wet M, E. Harmse, PN, Rodriguez-Amaya DB. Retention of β -carotene in boiled, mashed orange-fleshed sweet potato. *Journal of Food Composition and Analysis* (2006) 19, 321-329.
- [24] Low J, Walker T, Hijmans, R. The potential impact of orange-fleshed sweet potatoes on vitamin A intake in Sub-Saharan Africa. Paper presented at a regional workshop on food-based approaches to human nutritional deficiencies. The VITAA Project, vitamin A and orange-fleshed sweet potatoes in Sub-Saharan Africa, 9-11 May, 2001 Nairobi, Kenya. Retrieved January 19, 2004 from the World Wide Web: http://www.cipotato.org/vitaa/publications_vitaa.htm.
- [25] Issa TS, Marie-Noël Z, Patrick EK, Mohamed AB, Shawn KB, Hélène D, Pierre IG. Validation d'une méthode de dosage des caroténoïdes par CLHP : application à la détermination de teneur en caroténoïdes dans dix variétés de patates douces (*Ipomoea batata*). *Comptes Rendus Chimie* (2004) 7, 1063-1071.
- [26] Kidmose U, Christensen LP, Agili, SM, Thilsted, SH. Effect of home preparation practices on the content of provitamin A carotenoids in coloured sweet potato varieties (*Ipomoea batatas* Lam.) from Kenya. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* (2007) 8, 399-406.
- [27] Rodić Z, B. Simonovska AA, Vovk I. Determination of lutein by high-performance thin-layer chromatography using densitometry and screening of major dietary carotenoids in food supplements. *Journal of Chromatography A*, (2012) 1231, 59-65.
- [28] Rodriguez Amaya D.B. and Kimura M. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. Copyright HarvestPlus 2004, Washington.
- [29] Yang WT, Lee JH and Min DB. Quenching Mechanisms and Kinetics of α -Tocopherol and β -Carotene on the Photosensitizing Effect of Synthetic Food Colorant FD & C Red No.3. *J. Food Sci.* (2002), 67 (2), 507-510.
- [30] Rodriguez Amaya DB. *A Guide to Carotenoid Analysis in Food*. ILSI Press 2001, Washington.
- [31] Rodriguez, EB and Rodriguez-Amaya, DB. Formation of apocarotenals and epoxy-carotenoids from β -carotene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed foods. *Food Chemistry* (2007) 101, 563-572.

Résumé

Le travail exposé dans ce mémoire est une contribution à l'étude des substances naturelles d'origine végétale à propriétés pharmacologiques et nutritionnelles au Burkina Faso. Les extraits de diverses variétés de patate douce à chair orange (PDCO) ont des propriétés bioactives liées à des molécules dont certaines ont été identifiées par des méthodes modernes d'analyse TLC-MS.

Les activités antioxydantes des extraits de diverses variétés de PDCO, évaluées par trois méthodes : FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et le radical-cation ABTS, diffèrent significativement ($P < 0,05$) en fonction de la variété et de la méthode utilisée. Cependant, on a observé une bonne corrélation entre ces méthodes ($R = 0,968$ entre FRAP et DPPH, $R = 0,935$ entre DPPH et ABTS et $R = 0,875$ entre FRAP et ABTS). Parmi ces variétés, la variété BF92xResisto-14 contient le plus d'antioxydants quelque soit la méthode utilisée (0,661 ; 3,528 et 4,12 mg d'ET/g respectivement par la méthode ABTS, DPPH et FRAP). D'autre part, les teneurs en polyphénols (TPP) et en caroténoïdes totaux (TCT) ont été évalués par des méthodes colorimétriques. Ils varient de 1,062 à 2,432 mg d'EAG/g (respectivement pour les variétés BF82xTIB-4 et BF92xResisto-14) pour les polyphénols totaux et de 0,016 à 0,180 mg d'EBC/g (respectivement pour les variétés BF82xTIB-4 et BF92xResisto-14) pour les caroténoïdes totaux.

L'étude de l'influence des fertilisants organiques et minéraux sur l'efficacité antioxydante (EAO) des extraits de PDCO ainsi que leurs TPP et leurs TCT a montré un effet positif. Cependant, les effets majeurs sont obtenus par la combinaison des deux types de fertilisants. Toutefois, ces valeurs pourraient fortement être influencées par d'autres facteurs environnementaux non contrôlés tels que la température, le rayonnement. Contrairement aux composés phénoliques, les attaques des charançons ont un effet négatif sur les concentrations des caroténoïdes provitamines A de la PDCO.

L'analyse de l'extrait hexanique de la variété Jewel par la spectrométrie de masse couplée à la CCM a révélé que le β -carotène est le caroténoïde provitaminique A majoritaire. D'autres caroténoïdes comme la lutéine, la zéaxanthine et l' α -cryptoxanthine sont également détectées.

Mots clés : Patate douce à chair orange, variété, extrait, caroténoïdes, polyphénols totaux, propriétés antioxydantes, identification, TLC-MS.