

Sommaire

Liste des abréviations	v
Liste des tableaux	vi
Liste des figures.....	viii
Liste des annexes	ix
 Introduction générale.....	1
Partie I : Synthèse bibliographique	3
I. Légumes feuilles.....	3
I.1. Importance des légumes feuilles à Madagascar	4
I.2. Culture et consommation de légume feuille à Madagascar	4
II. Importance nutritionnelle du fer et du zinc.....	4
II.1. Fonctions du fer dans l'organisme	4
II.2. Fonctions du zinc dans l'organisme.....	5
II.3. Besoins et apports recommandés en fer	6
II.4. Besoins et apports recommandés en zinc.....	6
II.5. Absorption et transport du fer	7
II.6. Absorption et transport du zinc	8
II.7. Les conséquences des carences en fer.....	9
II.8. Les conséquences des carences en zinc	9
III.Prévalence des déficiences en fer et en zinc dans le monde et à Madagascar.....	9
III.1. Situation dans le monde	9
III.2. Situation à Madagascar	10
IV.Notion de biodisponibilité et de bioaccessibilité	10
IV.1. Définition : biodisponibilité, bioaccessibilité	10
IV.2. Les méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des nutriments	10
IV.2.1 Méthodes d'estimation indirecte	10
IV.2.2 Les méthodes <i>in vivo</i>	11
IV.2.3. Les méthodes <i>in vitro</i>	11
V. Les facteurs influençant la biodisponibilité du fer et du zinc	12
V.1.Les inhibiteurs de la bioaccessibilité du fer et du zinc	11
V.1.1. Les polyphénols.....	12
V.1.2. L'acide phytique.....	13

V.1.3. Les fibres	14
V.1.4. Autres inhibiteurs	15
V.2. Les activateurs de la bioaccessibilité du fer et du zinc	14
V.2.1. L'acide ascorbique et d'autres acides organiques	14
V.2.2. Les protéines animales	15
V.3. Effets des traitements technologiques	16
V.3.1. Traitement thermique : la cuisson	16
V.3.2. Traitement physique : le broyage	16
Partie II : Matériels et méthodes	17
I. Echantillonnage	17
I.1. Choix des légumes feuilles	17
I.2. Description botanique des légumes feuilles étudiés	17
I.2.1. <i>L'anamamy</i>	17
I.2.2. <i>L'anandrano</i>	18
I.2.3. <i>L'ananambo</i>	19
I.2.4. <i>Le ravimbomanga</i>	19
I.2.5. <i>Le ravitoto</i>	20
I.3. Préparation des feuilles	21
I.4. Cuisson des feuilles	21
II. Analyse de la composition nutritionnelle des légumes feuilles	22
II.1. Détermination de la teneur en eau et en matière sèche des légumes feuilles	22
II.1.1. Principe	22
II.1.2. Mode opératoire	22
II.1.3. Mode de calcul	22
II.2. Détermination de la teneur en cendres brutes	23
II.2.1. Principe	23
II.2.2. Mode opératoire	23
II.2.3. Mode de calcul	24
II.3. Détermination de la teneur totale en fer et en zinc des légumes feuilles	24
II.3.1. Principe	24
II.3.2. Mode opératoire	25
III. Méthode de digestion in vitro	26
III.1. Principe	26
III.2. Mode opératoire	27
III.2.1. Préparation des solutions de pepsine et de pancréatine/extrait biliaire	27

III.2.2. Digestion gastrique.....	28
III.2.3. Mesure de l'acidité titrable.....	28
III.2.4. Préparation des boudins de dialyse	29
III.2.5. Digestion intestinale.....	30
Partie III Résultats	31
I. Valeurs cuisatrices mesurées au cours de la cuisson de légumes feuilles.....	31
II. Caractéristiques nutritionnelles des légumes feuilles	31
II.1. Teneur en eau des feuilles	32
II.2. Teneur en matière sèche des feuilles et des eaux de cuisson	33
II.3. Teneur en protéines totales	34
II.4. Teneur en lipides	35
II.5. Teneur en cendres brutes des feuilles et des eaux de cuisson.....	35
II.6. Teneur en fer des feuilles et des eaux de cuisson	37
II.7. Teneur en zinc des feuilles et des eaux de cuisson	38
II.8. Teneur en composés antinutritionnels (acide phytique, pectines, tannins condensés, composés phénoliques)	39
III. Bioaccessibilité du fer et du zinc dans les légumes feuilles.....	42
III.1. Teneur en minéraux des différentes fractions de digestion.....	42
III.2. Bioaccessibilité du fer dans les feuilles.....	45
III.3. Bioaccessibilité du zinc dans les feuilles	47
III.4. Influence des composés antinutritionnels des feuilles sur la bioaccessibilité du fer et du zinc	49
Partie IV Discussion	51
Conclusion & perspective	54
Références bibliographiques.....	55
Annexes	

Liste des abréviations

ACP	Analyse de Composante Principale
AFNOR	Association Française de Normalisation
ANOVA	Analyse of Variance
DIV	Digestion <i>in vitro</i>
EUP	Eau Ultra Pure
JF	Jeune feuille
FM	Feuille mature
FAN	Facteur antinutritionnel
GRET	Groupe de Recherche et d'Echanges Technologiques
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
LF	Légume feuille
LRI	Laboratoire des Radio-Isotopes
MB	Matière brute
MS	Matière sèche
PIPES	Piperazine N, N'-bis-[2-Ethanesulfonic acid] Sodium salt
ppm	partie par million
p/v	poids/volume
rpm	rotation par minute
Vc	Valeur cuisatrice

Liste des tableaux

Tableau N°1 :	Composition en minéraux de quelques légumes feuilles	3
Tableau N°2 :	Besoins en fer pour la croissance, les pertes basales, et total des besoins absolus en fer pour les différents groupes d'individu	6
Tableau N°3 :	Biodisponibilité du zinc en fonction de la composition du régime alimentaire	7
Tableau N°4 :	Besoins en zinc ($\mu\text{g/Kg/j}$) selon la biodisponibilité du zinc dans les aliments, et selon l'âge des individus	7
Tableau N°5 :	Solutions de gamme étalon	26
Tableau N°6 :	Calcul de la concentration de la solution tampon PIPES en fonction de l'acidité titrable	29
Tableau N°7 :	Valeurs cuisatrices	31
Tableau N°8 :	Teneur en eau des différents légumes feuilles	32
Tableau N°9 :	Teneur en matière sèche des légumes feuilles et des eau de cuisson et épaisseur des feuilles	33
Tableau N°10 :	Teneurs en protéines totales des légumes feuilles	34
Tableau N°11 :	Teneurs en lipides totaux des légumes feuilles	35
Tableau N°12 :	Teneur en cendres brutes des jeunes feuilles, feuilles matures crues, feuilles matures cuites, des feuilles pilées et des eaux de cuisson	36
Tableau N°13 :	Teneur en fer des jeunes feuilles, des feuilles matures crues, des feuilles mature cuites, des feuilles pilées et des eaux de cuisson	37
Tableau N°14 :	Teneur en zinc des jeunes feuilles, des feuilles matures crues des feuilles matures cuites, des feuilles pilées et des eaux de cuisson	38
Tableau N°15 :	Teneur en agents chélateurs des feuilles (Acide phytique, pectines, tannins condensés, composés phénoliques)	39
Tableau N°16 :	Quantité de fer mesurée dans les résidus, les filtrats et les dialysats	43
Tableau N°17 :	Quantité de zinc mesurée dans les résidus, les filtrats et les dialysat	44

Tableau N°18 :	Teneur en fer bioaccessible des feuilles selon leur degré de maturité et le traitement technologique	45
Tableau N°19 :	Différence de la bioaccessibilité du fer en fonction du degré de maturité ou du traitement technologique appliqué aux légumes feuilles	46
Tableau N°20 :	Teneur en zinc bioaccessible des feuilles selon leur degré de maturité et le traitement technologique	47
Tableau N°21 :	Différence de la bioaccessibilité du zinc en fonction de la maturité ou du traitement technologique appliqué aux légumes feuilles	48

Liste des figures

Figure 1 :	Structure de l'acide gallique et d'un tannin condensé	13
Figure 2 :	Structure de l'acide phytique, <i>myo</i> -inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis phosphate, à pH neutre et d'un sel d'acide phytique	14
Figure 3 :	<i>Solanum nodiflorum</i>	18
Figure 4 :	<i>Nasturtium officinale</i>	18
Figure 5 :	<i>Moringa oleifera</i>	19
Figure 6 :	<i>Ipomoea batatas</i>	20
Figure 7 :	<i>Manihot esculenta</i>	20
Figure 8 :	Plan factoriel d'analyse en composantes principales des feuilles crues	49
Figure 9 :	Plan factoriel d'analyse en composantes principales des feuilles cuites	49

Liste des annexes

Annexe 1 : Suivre de l'évolution du pH lors des DIV	ii
Tableau A : pH du digesta des feuilles d'anamamy (Ay)	ii
Tableau B : pH du digesta des feuilles d'anandrano (Ad).....	iii
Tableau C : pH du digesta des feuilles d'ananambo (Ab).....	iv
Tableau D : pH du digesta des feuilles de ravimbomanga (Rv).....	v
Tableau E : pH du digesta des feuilles de ravitoto (Rt)	vi
Annexe 2 : Traitement thermique : exemples de profil de cuisson.....	vii
Figure a : Cuisson avant la digestion in vitro des feuilles d'ananambo	vii
Figure b : Cuisson avant la digestion in vitro des feuilles d'anamamy	vii
Figure c : Cuisson en grande quantité des feuilles d'anandrano	viii
Figure d : Cuisson en grande quantité des feuilles de ravimbomanga	viii
Annexes 3 : Calculs de la bioaccessibilité du fer et du zinc	ix
Tableau F : Masse de fer dialysé.....	xi
Tableau G : Bioaccessibilité du fer	xii
Tableau H : Masse de zinc dialysé	xiii
Tableau I : Bioaccessibilité du zinc.....	xiv

Introduction générale

Introduction générale

A travers le monde, les carences en micronutriments constituent des problèmes de santé publique, et les carences en fer, en zinc et ainsi qu'en vitamines touchent particulièrement les pays en voie de développement (**FAO, 2004**).

Bien que l'anémie puisse être provoquée par des hémorragies, des infections, des problèmes génétiques ou par des maladies chroniques, elle est due le plus souvent à un apport insuffisant de fer dans l'alimentation. A Madagascar, les carences en micronutriments, en particulier le fer, touchent principalement les femmes et les enfants, la prévalence de l'anémie est de 35 % chez les femmes et 50% pour les enfants de 6-59 mois (**EDSMD-IV, 2008-2009**).

Dans les pays en voie de développement, le retard de croissance, le retard de développement psychiques, et la susceptibilité aux maladies infectieuses (souvent mortelles) sont de grands problèmes, dont le manque de zinc dans l'alimentation est une des causes (**Hambidge, 2000**).

La raison principale des carences en fer et en zinc est la pauvreté de la ration alimentaire habituelle en ces éléments. En plus de cela, les facteurs antinutritionnels (comme les phytates, polyphénols, oxalates...) présents dans les aliments consommés peuvent complexer le fer et le zinc et réduire ainsi leur assimilabilité biologique, aggravant davantage les carences en ces micronutriments (**Bothwell et al, 1989 ; Solomons, 2001**).

Des stratégies ont été élaborées afin de lutter contre les carences nutritionnelles (notamment les carences en micronutriments). L'une d'elles consiste à valoriser et promouvoir la consommation d'aliments riches en micronutriments, de manière à augmenter les ingérés en ces micronutriments chez les individus (**FAO/WHO, 2002**).

Les légumes feuilles apportent plus de minéraux que les autres légumes (**Kahane, 2005**). En plus de leur importance nutritionnelle, les légumes feuilles présentent un intérêt économique et social non négligeable en raison de leur coût d'achat relativement bas et de la facilité et rapidité de leur préparation (**Gupta et Wagle, 1988**). A Madagascar, les légumes feuilles sont disponibles sur les marchés toute l'année, à faible coût, et entrent dans la composition de nombreux plats familiaux consommés par la majorité des ménages urbains et ruraux (**Randrianatoandro, 2010**). Cependant, l'apport réel en micronutriments de ces aliments est à considérer. Pour cela, une étude de la digestibilité du fer et du zinc des légumes feuilles est nécessaire afin d'évaluer l'apport de micronutriments biodisponibles dans ces aliments.

Ce stage s'est déroulé dans le cadre du programme « Voies alimentaires d'amélioration des situations nutritionnelles à Madagascar », initié par l'IRD (UMR 204 NUTRIPASS) en 2006, en partenariat avec le Laboratoire de Biochimie Appliquée aux Sciences de l'Alimentation et à la Nutrition (Labasan) et le GRET. Ce programme a pour objectifs d'identifier des modes de préparation et de consommation des aliments pouvant contribuer à la prévention des diverses formes de malnutrition, chez les groupes les plus vulnérables de la population à Madagascar.

L'objectif de ce travail était de mesurer la bioaccessibilité (digestibilité) du fer et du zinc au sein de cinq espèces différentes de légumes feuilles consommés à Madagascar :

- en effectuant des digestions *in vitro* sur ces feuilles afin d'établir la bioaccessibilité du fer et du zinc, selon le degré de maturité des feuilles (jeunes ou matures),
- en évaluant l'effet des traitements thermiques (cuisson) et des traitements physiques (pilage) sur la bioaccessibilité de ces deux minéraux,
- en déterminant les constituants des feuilles ayant une influence sur la bioaccessibilité du fer et du zinc.

En parallèle, une analyse de composition nutritionnelle de ces mêmes espèces de feuilles a été effectuée dans le cadre d'un autre stage de DEA (**Ranovona, 2012**), et certains de ces résultats seront également présentés dans ce mémoire, en complément des résultats de bioaccessibilité.

Synthèse bibliographique

Partie I : Synthèse bibliographique

I. Les légumes feuilles

On appelle « légumes feuilles » les feuilles de certaines plantes, arbustes, ou arbres, pouvant être consommées par l'homme, sous forme crue ou après cuisson. Certains auteurs ont estimé que parmi les 45 000 espèces végétales présentes en Afrique sub-saharienne, environ un millier peuvent être consommées comme légumes feuilles (Maundu *et al*, 1999).

Au moins deux groupes de légumes feuilles sont distingués : les feuilles d'arbres, végétaux de grande taille (souvent pérennes), et les feuilles de végétaux de moins d'un mètre de haut, à cycle de reproduction court ou bien annuels, et qui requièrent le plus souvent les soins de l'homme pour mieux se reproduire (maraîchage).

Du point de vue nutritionnel, la composition des légumes feuilles est diversifiée reflétant une grande disparité entre les différentes espèces des feuilles. Mais de manière générale les légumes feuilles sont riches en eau, et renferment des micronutriments (vitamines, minéraux) qui contribuent au fonctionnement de l'organisme (FAO, 1988). Les feuilles se caractérisent également par la présence de facteurs antinutritionnels : les feuilles de patate douce et d'amarante rouge contiennent respectivement 308 mg /100g MS (Antia *et al*, 2006) et 1270 mg /100 g MB d'oxalates, ces mêmes feuilles d'amarante peuvent contenir 106 mg /100g MB de tannins et 1,95 mg/100g MB d'acide phytique (Gupta *et al*, 2005).

Tableau N°1 : Composition en minéraux de quelques légumes feuilles

Légume feuille	Cendres (g/100g MS)	Ca (mg/100g MS)	P (mg/100g MS)	Fe (mg/100g MS)	Zn (mg/100g MS)
Feuille de patate douce (<i>Ipomoea batatas</i>)	11,1	28,4	37,2	16	0,08
Feuille de manioc (<i>Manihot esculenta</i>)	5,6	747,7	386,9	19,9	12,3
Morelle noire (<i>Solanum nigrum</i>)	2,2	2067	478	85	23
Feuille de baobab (<i>Adansonia spp</i>)	4,9	1582,3	106	65,3	1,7
Amarante rouge (<i>Amaranthus tricolor</i>)	17,6	400	103	8,8	4,2

Sources : Antia *et al* (2006), Odhav (2007), Oduro *et al* (2008), Chadare *et al* (2009).

I.1.Importance des légumes feuilles à Madagascar

Les légumes feuilles jouent un rôle important dans les régimes alimentaires de toutes les populations du monde, particulièrement en Afrique, en Asie et en Océanie, où ils assurent une part essentielle des besoins nutritionnels et médicaux (**Kahane, 2005**). Leur production est assurée plutôt par de petits agriculteurs, pour lesquels la production de légumes feuilles représente un apport de petits revenus complémentaires, mais cette production génère aussi des emplois pour des populations marginalisées des villes.

Le rôle des légumes feuilles dans l'alimentation des ménages malgaches est variable, et dépend de facteurs tels que la pauvreté, le degré d'urbanisation, la distance des marchés de légumes frais et la période de l'année (**Randrianatoandro, 2010**).

I.2.Culture et consommation de légumes feuilles à Madagascar

Généralement, les légumes feuilles sont produits en zone urbaine ou périurbaine. A Madagascar, ces légumes feuilles figurent traditionnellement parmi les composants de nombreux plats couramment consommés. Ils sont consommés frais, sous forme cuite ou crue, aussi bien en milieu urbain que rural et ils servent surtout à accompagner les plats quotidiens, plus particulièrement le riz (**Rahajanirina, 2009**). Très rarement, les feuilles sont séchées pour la conservation et la vente à long terme.

II. Importance nutritionnelle du fer et du zinc

II.1.Fonctions du fer dans l'organisme

Le fer est l'oligoélément* le plus abondant dans l'organisme puisqu'un individu adulte en contient normalement entre 4 et 5g (**Nathanson et al, 1999**). C'est un élément essentiel, nécessaire pour toutes les cellules humaines, il assure un rôle actif dans de nombreuses fonctions de l'organisme. Le fer est un composant de l'hémoglobine des cellules sanguines et de la myoglobine des cellules musculaires, et leur confère la capacité de fixer l'oxygène. Au sein des cellules, au niveau de la chaîne respiratoire, le fer sert de transporteur d'électrons. Le fer est un élément primordial pour le système immunitaire, le système neuronal et le métabolisme musculaire (**Beard, 2001**).

* Oligoélément : substance regroupée parmi les micronutriments, n'ayant pas de valeur énergétique et se trouvant en très faible quantité ou à l'état de trace dans les aliments.

Le fer héminique représente 68 à 70% du fer total de l'organisme, où son rôle est principalement fonctionnel (**Hercberg *et al*, 2001**). Il est principalement présent dans l'hémoglobine des érythrocytes qui est une molécule composée de quatre unités, chaque unité contenant un groupement hème et une chaîne protéique. La myoglobine est une protéine de stockage de l'oxygène dans les muscles, également constituée par le fer héminique, sa structure est similaire à celle de l'hémoglobine mais avec une seule unité hème.

Le fer non héminique représente environ 30% du fer total de l'organisme et entre dans la composition de la ferritine, de l'hémosidérine, la transferrine qui sont des molécules de stockage et de transport du fer. Le foie stocke réversiblement le fer en le combinant avec les molécules de ferritine et d'hémosidérine alors que la transferrine constitue la forme de transport du fer dans les différents compartiments de l'organisme (**Miret *et al*, 2003**).

II.2.Fonctions du zinc dans l'organisme

Le zinc est après le fer l'oligoélément quantitativement le plus important pour l'être humain. L'organisme contient entre 1,5 à 2,5g de zinc répartis principalement entre le foie, les muscles et les os. On retrouve également le zinc dans le milieu intracellulaire. (**Jackson, 1989**). Le zinc est indispensable à la croissance et au développement, il joue un rôle important dans l'expression des gènes, la régulation de la croissance et la différenciation cellulaire (**Hambidge, 2000**), il interagit avec les hormones impliquées dans la croissance des os telles que la somatomédine, l'ostéocalcine, la testostérone, les hormones thyroïdiennes et l'insuline (**Ortega, 1999**).

Au niveau moléculaire, le zinc remplit des tâches structurelles, régulatrices et catalytiques dans de très nombreuses enzymes et est important pour la configuration de protéines non enzymatiques (**Imoberdorf *et al*, 2010**). En effet, c'est un cofacteur de plus de 300 enzymes, on le retrouve associé aux 6 classes d'enzymes existantes (oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases, ligases).

Tous ces rôles du zinc dans l'organisme expliquent son importance, surtout chez les jeunes enfants lors de leur développement physique et psychique. L'organisme ne dispose d'aucune réserve notable de zinc, pour cette raison un apport régulier par l'alimentation est indispensable.

II.3. Besoins et apports recommandés en fer

Les pertes en fer sont estimées à 1 mg par jour chez l'homme adulte, soit 0,02% du fer total, qui est excrété par voie digestive, et du fait de l'exfoliation des cellules de la peau et des cheveux. Chez la femme en période de menstruations, les pertes sont plus importantes, évaluées en moyenne à 2 mg par jour, mais sont relativement variables d'une femme à une autre. Chez le nourrisson, les pertes physiologiques sont très faibles, estimées à 20µg/kg/j.

Ceci explique pourquoi, aussi bien chez l'homme que chez la femme, l'organisme a besoin d'absorber environ 1 mg de fer par jour à partir de l'alimentation (Nathanson *et al*, 1999). Les besoins recommandés en fer dépendent donc du sexe, de l'âge, et de l'état physiologique de l'individu. Ces besoins sont présentés dans le tableau N°2.

Tableau N° 2 : Besoins en fer pour la croissance, les pertes basales, et total des besoins absolus en fer pour les différents groupes d'individu.

Groupe	Age (ans)	Masse corporelle moyenne (kg)	Besoins en fer pour la croissance (mg/j)	Pertes basales en fer (mg/j)	Pertes menstruelles (mg/j)	Besoins absolus totaux (mg/j)
Nourrissons et Enfants	0,5-1	9	0,55	0,17		0,72
	1-3	13	0,27	0,19		0,46
	4-6	19	0,23	0,27		0,50
	7-10	28	0,32	0,39		0,71
Garçons	11-14	45	0,55	0,62		1,17
	15-17	64	0,60	0,90		1,50
Filles	11-14	46	0,55	0,65	0,48	1,68
	15-17	56	0,35	0,79	0,48	1,62
Hommes	18+	75		1,05		1,05
Femmes	18+	62		0,87	0,48	1,35

Source : modifié d'après FAO/WHO (2002)

II.4. Besoins et apports recommandés en zinc

Les besoins et apports recommandés en zinc sont fonction de sa biodisponibilité supposée dans le régime, elle-même fonction de la composition du régime, comme présenté dans les tableau N°3 et tableau N°4.

Tableau N°3 : Biodisponibilité du zinc en fonction de la composition du régime alimentaire (Imoberdorf, 2010)

Catégorie	Aliments/Régimes
Biodisponibilité élevée Ratio phytate/zinc <5	Apport protéique essentiellement d'aliments non végétaux Aliments préparés avec faible teneur en fibres et phytate
Biodisponibilité moyenne Ratio phytate/zinc 5–15	Régime varié avec protéines animales (viande, poisson) Régime végétarien sans farine blanche ni céréales transformées
Biodisponibilité faible Ratio phytate/zinc >15	Régime avec beaucoup de céréales non transformées, non fermentées et non germées. Régimes à base de protéines de soja. Aliments riches en phytate

Tableau N°4 : Besoins en zinc (µg/Kg/j) selon la biodisponibilité du zinc dans les aliments, et selon l'âge des individus

Groupe	Age (ans)	Biodisponibilité élevée	Biodisponibilité moyenne	Biodisponibilité faible
Enfant	0,5-1	186	311	621
	1-3	138	230	459
	3-6	114	190	380
	6-10	90	149	299
Fille	10-12	68	113	227
	12-15	64	107	215
	15-18	56	93	187
Garçon	10-12	80	133	267
	12-15	76	126	253
	15-18	61	102	205
Femme	18+	36	59	119
Homme	18+	43	72	144

Source : modifié d'après FAO/WHO (2002)

II.5. Absorption et transport du fer

Le fer est absorbé essentiellement dans l'intestin grêle, au niveau du duodénum et du jéjunum proximal (**House, 1999**). La biodisponibilité du fer ne dépend pas uniquement de la quantité du fer dans l'aliment mais surtout de sa forme chimique et de l'équilibre entre les facteurs qui

favorisent ou inhibent l'absorption du fer. Au niveau de l'estomac, l'acidité et les enzymes gastriques dissocient le fer des complexes alimentaires. En effet, seul le fer solubilisé constitue la fraction apte à être absorbée et transportée dans le cytoplasme de l'entérocyte par l'intermédiaire du transporteur de cations divalents DMT1 (Divalent Metal Transporter). Le DMT1 ne transporte que le fer ferreux alors que la plus grande partie de fer arrivé au niveau du duodénum est sous la forme ferrique, donc le fer ferreux doit d'abord être réduit par la fer réductase DCYTB (Duodenal Cytochrome b), ou réduit par d'autres agents réducteurs comme l'acide ascorbique (**Zimmerman & Hurrell, 2007**).

Le fer héminique étant absorbé intact avec l'hème, il est capté directement par un récepteur spécifique puis dissocié à l'intérieur de l'entérocyte par une hème-oxygénase. L'absorption du fer héminique n'est pas influencée par le pH gastro-intestinal, et relativement peu par les sécrétions gastriques et les autres constituants des repas. Elle est facilitée par les protéines animales et inhibée par le calcium. Toutefois, le fer héminique ne constitue que 10 à 15% de l'apport en fer (**Hallberg et Bjorn-rasmussen, 1981**). La biodisponibilité du fer non héminique, présent dans les aliments d'origine animale et végétale (mais qui comprend aussi le fer dû aux contaminations et à l'enrichissement) est nettement plus faible (1 à 5%). Contrairement à la forme héminique, le fer non héminique est fortement influencé par les divers composants du repas : d'une part, les activateurs qui favorisent l'absorption, d'autre part, les inhibiteurs qui la diminuent.

II.6.Absorption et transport du zinc

La partie distale du duodénum et le jéjunum proximal constituent les principaux sites d'absorption du zinc exogène (**Krebs *et al*, 1998 ; Lee *et al*, 1989**). Ce dernier provient de l'alimentation, tandis que le zinc endogène est celui qui est excrété par l'organisme pour contribuer à l'équilibre homéostatique. L'absorption du zinc dépend surtout de sa solubilité qui elle-même dépend de la forme chimique du zinc et de la présence dans le bol alimentaire d'inhibiteurs ou d'activateurs d'absorption.

L'absorption du zinc dans les entérocytes met en jeu deux mécanismes : l'un fait intervenir des transporteurs de cations divalents (transport actif). Ce transport peut être saturé par de fortes concentrations de cations. Il peut également y avoir compétition avec d'autres cations divalents tels que le fer, le magnésium et le calcium. L'autre mécanisme consiste en un transport passif dépendant du gradient de concentration et qui se fait par simple diffusion (**Hambidge et Krebs, 2001**).

Moins de 0,2 % du zinc total circule dans le sang, ce qui représente approximativement une concentration de 15µmol/L (**Brown, 2001**). L'albumine est le principal transporteur du zinc dans le plasma, mais il se lie également à l' α 2-macroglobuline et aux oligopeptides moyennement (**Cousins, 1996**).

II.7. Conséquences des carences en fer

La carence en fer est la principale cause d'anémie ferriprive, caractérisée par des désordres hématologiques importants comme une hypoxie chronique ou des risques d'hémorragie. Il est certain que la carence en fer conduit à un stade très avancé à l'anémie, par contre, les conséquences d'une carence modérée sur l'ensemble de ces processus physiologiques sont encore mal connues : réduction de la capacité physique et des performances intellectuelles (**Rouault, 2001**), moindre résistance aux infections, perturbations au cours de la gestation, anomalies dans le maintien de la température corporelle (**Marx, 1997**).

II.8. Conséquences des carences en zinc

Plusieurs études ont mis en évidence la responsabilité de la carence en zinc en matière de retard de croissance et également de risque sévère de maladies infectieuses (**Black, 1998**). La carence en zinc peut entraîner également des anomalies de la maturation sexuelle, des troubles du goût, des problèmes immunitaires, des problèmes de peau et de cicatrisation.

III. Prévalence des déficiences en fer et en zinc dans le monde et à Madagascar

III.1. Situation dans le monde

Selon une estimation de l'OMS (**WHO, 2001**), 600 à 700 millions de personnes sont touchées par la carence en fer. Cette carence est observée chez les nourrissons, les jeunes enfants et les femmes en âge de procréer surtout dans les pays en voie de développement (**De Maeyer et Tegman, 1985**), ceux où les apports en fer proviennent principalement d'une alimentation à base végétale. Le nombre de personnes touchées par la carence en zinc est difficile à évaluer car les symptômes sont ceux d'une malnutrition chronique, les signes spécifiques à cette carence sont inexistantes, et aucun bon indicateur n'est disponible actuellement pour évaluer le statut d'un individu (**FAO/WHO, 2002**).

III.2. Situation à Madagascar

À Madagascar, la moitié des enfants de 6-59 mois sont atteints d'anémie: 30 % sous la forme légère, 19 % sous la forme modérée et 1 % souffrent d'anémie sévère, la prévalence de l'anémie est plus élevée en milieu rural (51 %).

Un peu plus d'un tiers des femmes (35 %) sont anémiques : 29 % sous forme légère et 6 % sous forme modérée. La proportion de femmes anémiques augmente avec le nombre d'enfants, variant de 32 % chez les nullipares à 40 % chez les mères de 6 enfants ou plus. La prévalence de l'anémie est élevée chez les femmes enceintes (38 %) et celles qui allaitent (39%) (**EDSMD IV, 2008-2009**).

Les déficiences en zinc n'ont pas encore fait l'objet d'études particulières à Madagascar, on ne dispose pas encore d'informations précises sur les prévalences de la carence en zinc.

IV. Notion de bioaccessibilité et de biodisponibilité

IV.1. Définitions

La bioaccessibilité correspond à la libération des micronutriments de la matrice alimentaire au cours de la digestion, et leur solubilisation dans le tractus intestinal (**Benito et Miller, 1998**). La notion de biodisponibilité regroupe plusieurs phénomènes : i) la bioaccessibilité ; ii) l'absorption et le transport des micronutriments dans l'organisme ; et iii) la bioactivité, correspondant à leur assimilation par l'organe cible. La biodisponibilité est donc la proportion de la quantité totale d'un nutriment, présent dans un aliment, qui est absorbée sous une forme métaboliquement active, utilisable par l'organisme (**Parada, 2007 ; Argyri et al, 2011**).

La biodisponibilité des micronutriments, notamment celle du fer et du zinc, est faible dans les aliments d'origine végétale. La biodisponibilité du fer ne dépend pas uniquement de la quantité du fer héminique et non héminique dans l'aliment mais surtout de l'équilibre entre les facteurs qui favorisent et ceux qui inhibent l'absorption du fer (**Hallberg, 1981**).

IV.2. Méthode d'évaluation de la biodisponibilité

IV.2.1. Méthode d'estimation indirecte

La biodisponibilité des minéraux peut être évaluée indirectement par le calcul des rapports molaires phytate/minéral (**Umeta et al, 2005**). Cette méthode est surtout utilisée pour estimer la biodisponibilité du zinc. D'autres modèles plus complexes ont été proposés en prenant en

compte différents facteurs antinutritionnels et activateurs d'absorption des minéraux (**Reddy et al, 2000**). Cependant ces méthodes nécessitent de connaître précisément la composition de l'aliment étudié.

IV.2.2. Les méthodes *in vivo*

Ces méthodes sont basées sur l'utilisation de marqueurs isotopiques incorporés dans des aliments qui sont par la suite ingérés par des sujets humains ou animaux. Elles sont très fiables, néanmoins elles nécessitent un équipement spécifique et des volontaires humains, et sont confrontées aux limites imposées par l'éthique, notamment sur l'utilisation prolongée d'isotopes sur les volontaires humains et l'interdiction d'effectuer les tests sur les nourrissons ou les jeunes enfants.

IV.2.3. Les méthodes *in vitro*

L'extractibilité HCl

Cette méthode simule les conditions de pH et de température de l'estomac en soumettant les aliments à une hydrolyse durant 3 h dans une solution d'acide chlorhydrique 0,03 N à 37°C, suivie d'une filtration et d'un séchage du filtrat à 100°C (**Duhan, 2002**). Le pourcentage d'extractibilité correspond à la quantité de minéraux dans l'HCl. Mais cette méthode semble être peu fiable et serait de moins en moins utilisée.

La méthode de digestion *in vitro*

La mesure de biodisponibilité *in vitro* des éléments minéraux à partir des aliments consiste à simuler les conditions physiologiques de la digestion gastro-intestinale et à mesurer la fraction de minéraux solubles ou les minéraux dialysables à travers une membrane semi perméable (**Wienk et al, 1999**).

Cette méthode repose essentiellement sur la mesure des minéraux qui seraient libérés au niveau du tractus gastro-intestinal (**Salovaara, 2002**), elle est de plus en plus utilisée car les résultats obtenus sont proches de ceux trouvés lors des analyses *in vivo* (**Wienk et al, 1999**). La méthode a été initialement décrite par Miller *et al.* (1981) et a sans cesse été modifiée. L'utilisation d'une dialyse lors de la digestion *in vitro* permet une augmentation progressive du pH ce qui mime mieux les conditions du passage du bol alimentaire de l'estomac au duodénum (**Miller et al, 1981**).

V. Facteurs influençant la biodisponibilité des minéraux

V.1. Inhibiteurs de la biodisponibilité du fer et du zinc

Les inhibiteurs influencent de manière négative, directement ou indirectement, la dégradation, la solubilisation, ou l'absorption des nutriments, et diminuent donc leur biodisponibilité. La réactivité de ces composés est surtout induite par la particularité de leur nature chimique et les conditions dans lesquelles ils sont en présence des (micro)nutriments. Les inhibiteurs de la biodisponibilité du fer (non héminique) et du zinc, connus comme les plus puissants dans les légumes feuilles, sont les polyphénols, l'acide phytique et les fibres et les oxalates (**Gupta, 2006 ; Savage et Martensson, 2010**).

V.1.1. Les polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules largement présente dans le règne végétal, caractérisés comme l'indique leur nom, par la présence de plusieurs groupements phénoliques associés en structures plus ou moins complexes généralement de haut poids moléculaires. Ils ne sont impliqués directement dans aucun processus métabolique et sont donc considérés comme des métabolites secondaires. Ces composés jouent plutôt un rôle en tant que produits chimiques de défense protégeant la plante contre les attaques d'insectes, de virus et de champignons pathogènes (**Friendman et Jürgens, 2000**) et contre les radiations ultraviolettes (**Manach *et al*, 2004**). Les composés phénoliques sont responsables du goût astringent des aliments d'origine végétale. Ils exercent surtout un effet négatif sur la biodisponibilité des nutriments notamment les minéraux. Parmi ces polyphénols, les tannins constituent les chélateurs les plus puissants, inhibant l'absorption des minéraux en particulier le fer et le zinc. Les tanins se subdivisent en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. La capacité des acides tanniques à complexer les minéraux dépend de la présence des groupements catéchols : 3',4' dihydroxyl (**Lestienne, 2004**) réduisant fortement l'absorption de ces minéraux.

Malgré leur effet antinutritionnel sur les minéraux, les polyphénols ont des propriétés antioxydantes qui permettent de prévenir plusieurs maladies associées au stress oxydatif telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (**Manach *et al*, 2004**).

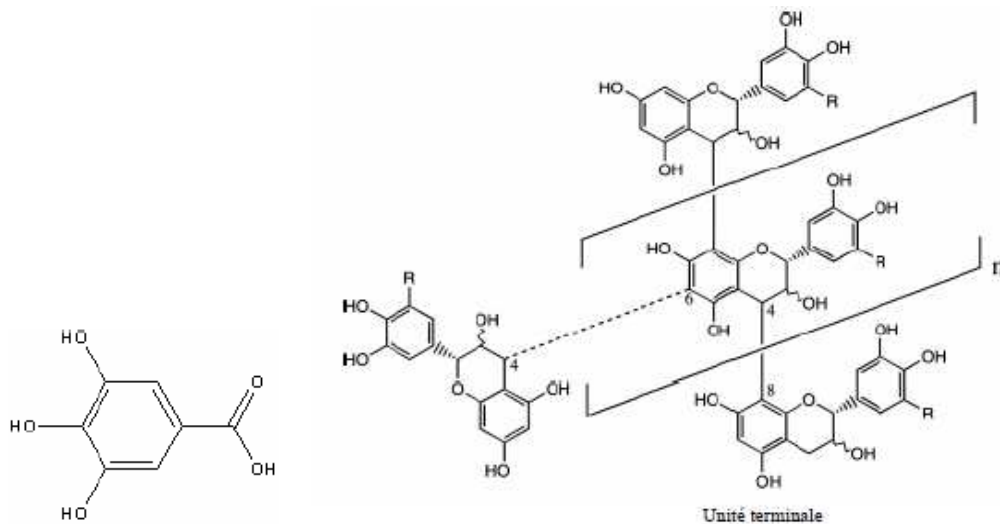


Figure N°1 : Structure de l'acide gallique (à gauche) et d'un tannin condensé (à droite)

V.1.2. L'acide phytique

L'acide phytique constitue 1-2% de la plupart des céréales et des légumes et représente la principale forme de réserve de phosphore chez ces plantes. Il possède une forte capacité de liaison, agit avec les groupements des protéines et des cations multivalents et peut donc constituer des complexes avec ces derniers, diminuant ainsi leur disponibilité biologique. La capacité de la molécule de phytate à se lier aux minéraux dépend du nombre de groupements phosphates qu'elle porte et du pH de la solution dans laquelle elle se trouve. Seuls les *myo*-inositols 6-phosphates (IP6) et les *myo*-inositols 5-phosphates (IP5) auraient une influence significative sur la solubilité *in vitro* du fer et sur l'absorption du zinc chez l'homme (Sandberg et al, 1989). L'effet des phytates sur la biodisponibilité des minéraux dépend également de la concentration en minéraux et en phytates dans l'aliment. Les complexes phytate-protéine et phytate-minéral-protéine influencent négativement la digestion des protéines et la biodisponibilité du zinc qui se trouve en général fixé aux protéines végétales. L'acide phytique forme des complexes insolubles avec des cations divalents entre un pH 5 - 7 aussi bien dans les conditions *in vitro* qu'au niveau du duodénum (Persson, 1998).

L'acide phytique forme les complexes les plus stables avec le zinc, suivi par le cuivre, le nickel, le cobalt, le manganèse, le calcium, et les complexes les moins stables étant ceux formés avec le fer (Cheryan, 1980). Le zinc est ainsi l'élément qui risque d'être le plus affecté par la présence de phytates, à l'inverse le fer est plus épargné.

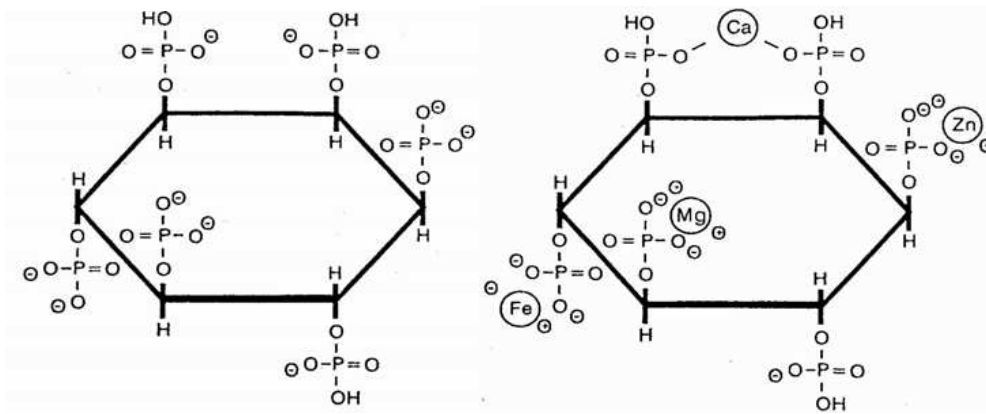


Figure N°2 : Structure de l'acide phytique, *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6 hexakis phosphate, à pH neutre (à gauche) et d'un sel d'acide phytique (à droite).

V.1.3. Les fibres

Les fibres alimentaires sont définies soit comme étant (i) des polymères glucidiques d'origine végétale, associés ou non dans la plante à de la lignine ou à d'autres constituants non glucidiques (polyphénols, cires, saponines, cutine, phytates...), soit (ii) des polymères glucidiques transformés (physiquement, enzymatiquement ou chimiquement) ou synthétiques (AFSSA, 2002). En outre les fibres ne sont ni digérées (non hydrolysées par les enzymes digestives de l'homme), ni absorbées dans l'intestin grêle. Chez les plantes, les fibres sont classées en deux catégories : les polysaccharides structuraux comprenant la cellulose, l'hémicellulose, les substances pectiques, et les polysaccharides non structuraux incluant les gommes et les mucilages.

Les diminutions de la biodisponibilité des minéraux et de l'absorption des électrolytes présents dans des aliments riches en fibres sont attribuées à la capacité des fibres à créer des liaisons avec ces minéraux et électrolytes, entraînant une augmentation de leur excrétion (Schneeman, 1986). Le nombre de groupements carboxyliques des sucres et la teneur en acide uronique des polysaccharides semblent être reliés à cette capacité des fibres à fixer les cations. Le pH influencerait aussi le comportement des fibres, car en présence de différents types de fibres, le fer, le zinc et le cuivre seraient totalement solubles à pH 0,65 et deviendraient progressivement insolubles par augmentation du pH jusqu'à une insolubilisation totale à pH 6,8 (Thompson et Weber, 1979), cette insolubilisation étant synonyme de diminution de la biodisponibilité des minéraux.

V.1.4. Autres inhibiteurs

Au sein des aliments, une grande partie des minéraux peut se retrouver liée aux autres nutriments tels que les protéines, les peptides, les acides aminés, les sucres ou les lipides. Ces nutriments forment des complexes solubles ou insolubles avec les minéraux au niveau du tractus gastrointestinal affectant ainsi leur biodisponibilité (**Gupta, 2006**).

V.2. Activateurs de la biodisponibilité des minéraux

V.2.1. L'acide ascorbique et les autres acides organiques

L'acide ascorbique est l'acide organique connu comme étant le plus puissant activateur de la biodisponibilité du fer et est présent dans la plupart de fruits et légumes frais sous la forme d'acide L-ascorbique [2-(1,2-dihydroxyéthyl)-4,5-dihydroxyfuran-3-one].

L'acide ascorbique améliore l'absorption du fer grâce à ses propriétés réductrices qui empêchent la formation d'hydroxyde ferrique insoluble et sa capacité à former des complexes solubles avec les ions ferriques, qui préservent la solubilité du fer aux pH alcalins du duodénum (**Conrad et al, 1967**). La présence des trois groupements carboxyliques confère à l'acide ascorbique la capacité de complexer les minéraux dont le fer et zinc (**Ekholm et al, 2003**).

Les agents chélateurs qui auraient normalement complexés le fer n'ont pas d'effet inhibiteur en présence d'acide ascorbique, l'affinité préférentielle du fer pour ce composé par rapport aux autres composés chélateurs, se manifeste d'autant plus quand les aliments sont riches en phytates ou en composés phénoliques (**Siegenberg et al, 1991**).

Outre l'acide ascorbique, d'autres acides organiques ont la capacité d'améliorer la biodisponibilité des minéraux. Des auteurs tels que **Gillooly (1983)** et **Ekholm (2003)** ont pu établir que l'ajout de l'acide citrique ou de l'acide malique dans un aliment normalement à faible biodisponibilité de minéraux pouvait améliorer l'absorption du fer et du zinc.

V.2.2. Les protéines animales

Les repas riches en protéines, spécialement ceux à base de protéines animales, sont connus pour favoriser la biodisponibilité des oligoéléments, les peptides de faible poids moléculaire et les acides aminés forment des complexes avec le zinc et le fer intrinsèques et facilitent ainsi leur absorption (**Hurrell et al, 2006 ; Patted et al, 2010**).

V.3.Effets des traitements technologiques sur la biodisponibilité des minéraux

V.3.1. Effets des traitements thermiques

La cuisson des légumes permet d'en améliorer la digestibilité en modifiant la structure des fibres alimentaires. Cependant, elle induit des modifications de couleur mais entraîne surtout une diminution plus ou moins marquée de la valeur nutritionnelle, soit par diffusion de constituants hydrosolubles dans l'eau de cuisson, soit par destruction de substances thermolabiles et/ou oxydables. Les pertes augmentent avec le volume d'eau utilisé et la durée de la cuisson (**Causeret, 1986**).

Les effets des traitements thermiques sur la biodisponibilité du fer et du zinc sont très variables, ils peuvent être positifs ou négatifs et dépendent de la sévérité du traitement (temps, température), du type de matrice alimentaire étudiée et surtout de la composition de cette matrice. **Camara (2004)** a pu établir que malgré une forte teneur en acide phytique, les plats à base de légume contiennent une quantité importante de minéraux dialysables (bioaccessibles), dans le seul cas où les légumes ont subi un traitement thermique provoquant la diminution de l'acide phytique. L'acide phytique étant thermiquement stable, la diminution de sa teneur lors de la cuisson est sûrement due à la diffusion de molécule de phytates dans l'eau de cuisson, ce qui conduit à diminuer les contraintes inhibitrices sur les minéraux.

V.3.2. Effets des traitements physiques

Les procédés physiques induisent des modifications au niveau des microstructures de la matrice alimentaire. Les microstructures sont en fait le résultat de l'agencement naturel des constituants de l'aliment, un remaniement ou une perturbation occasionné par cisaillement, compression (forces rencontrées lors du broyage ou du pilage). Le broyage est un traitement physique qui entraîne (i) une diminution de la taille des particules d'aliment, (ii) la réduction de la concentration des agents chélateurs (iii) et une relocalisation des minéraux dans la matrice qui les rendent plus extractibles lors de la digestion, et donc plus biodisponibles (**Watzke, 1998 ; Parada et Aguilera, 2007**).

Matériels & méthodes

Partie II : Matériels et méthodes

I. Echantillonnage

I.1.Choix des matériels d'études

Parmi les 5 échantillons étudiés, 4 espèces de légumes feuilles (Anamamy, Anandrano, Ravimbomanga, Ravitoto) sont régulièrement consommées à Antananarivo. En effet, selon une enquête effectuée par **Rakotonirainy (2008)**, plus de 40 % des ménages tananariviens consomment le ravimbomanga au moins une fois par semaine, 30 à 40 % des ménages consomment l'anandrano et l'anamamy par semaine ; le ravitoto est consommé hebdomadairement par plus de 25 % des ménages. De plus, ils sont représentatifs des légumes feuilles les plus consommés à Madagascar. Ces légumes feuilles sont caractérisés par des teneurs en nutriments élevées :

- 14-20 g de protéines dans 100 g de MS pour l'anamamy et l'anandrano
- 19-37 mg de fer dans 100 g de MS pour le ravimbomanga et le ravitoto.

Moringa oleifera a été considéré pour l'intérêt grandissant qu'on lui porte dans l'alimentation en Afrique et à Madagascar, étant donné ses caractéristiques nutritionnelles particulièrement intéressantes, que l'on essaie d'exploiter en utilisant ses feuilles comme complément alimentaire ou élément de fortification. Effectivement, les feuilles de *Moringa oleifera* se distinguent des autres légumes feuilles par leur forte teneur en protéines, en vitamine A et en fer (**Foidl et al, 2001 ; Dalia et al, 2010**).

I.2.Description générale des légumes feuilles étudiés

I.2.1. L'Anamamy (Brède morelle)

C'est une plante potagère herbacée annuelle atteignant 70 cm de haut, à tige retombante ou érigée, vertes à noirâtres, à rameaux dressés ou étalés. Ses feuilles sont ovales à lancéolées, entières ou légèrement lobées, alternes et parfois opposées.

Légèrement amer avec un arrière goût agréable, anamamy signifie « brède douce ». Ce goût subtil doux amer est beaucoup apprécié.

Classification (www.wikipedia.com)

Règne : Plantae
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Sons-classe : Asteridae
Ordre : Solanales
Famille : Solanaceae
Genre : *Solanum*
Espèce : *nodiflorum*

Nom vernaculaire : brède morelle, anamamy



Figure 3 : *Solanum nodiflorum*

I.2.2. L'Anandrano (Cresson)

C'est une plante herbacée vivace, rampante ou flottante, sa tige atteignant 1 m de long est creuse, juteuse et très ramifiée. Les feuilles émergentes sont pennées et charnues, alternes, vert foncé, munies d'un long pétiole. Elles sont composées de cinq folioles ovales plus ou moins arrondies, la foliole terminale étant plus grande que les autres. Le cresson est présent dans les milieux humides et aquatiques (mares, étangs, ruisseaux). Il a besoin d'une eau peu profonde, non acide, à courant lent.

Classification (www.wikipedia.com)

Règne : Plantae
Sous-règne : Tracheobionta
Division : Magnoliophyta
Classe : Magnoliopsida
Sous-classe : Dilleniidae
Ordre : Capprales
Famille : Brassicaceae
Genre : *Nasturtium*
Espèce : *officinale*

Nom vernaculaire : cresson, anandrano



Figure 4 : *Nasturtium officinale*

I.2.3. L'Ananambo (*Moringa oleifera*)

Moringa oleifera est une espèce de petit arbre, rarement des arbustes, à feuillage caduque, souvent tubéreux, au moins à l'état juvénile. Les feuilles, alternes, sont 1 à 4 fois imparipennées, parfois pubescentes, composées de folioles opposées, aux marges entières. Elle est originaire du nord de l'Inde et est maintenant acclimatée dans presque toutes les régions tropicales, elle résiste bien à la sécheresse et a une croissance rapide.

Classification (www.wikipedia.com)

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Dilleniidae

Ordre : Capparales

Famille : Moringaceae

Genre : *Moringa*

Espèce : *oleifera*

Nom vernaculaire : brède monringue,
ananambo



Figure 5 : *Moringa oleifera*

I.2.4. Le Ravimbomanga (Feuille de patate douce)

La patate douce est largement cultivée dans les régions tropicales et subtropicales pour ses tubercules et feuilles comestibles. C'est une plante vivace à tiges rampantes pouvant atteindre 2,5 à 3 m de long. Les feuilles alternes sont entières, au pétiole relativement long et au limbe de forme variable à bord sinué ou denté, ou bien lobées, formant 5 à 7 lobes aigus, à nervation palmée.

Classification (www.wikipedia.com)**Règne :** Plantae**Sous-règne :** Tracheobionta**Division :** Magnoliophyta**Classe :** Magnoliopsida**Sous-classe :** Asteridae**Ordre :** Solanales**Famille :** convolvulaceae**Genre :** *Ipomoea***Espèce :** *batatas***Nom vernaculaire :** feuille de patate douce, ravimbomanga.**Figure 6 : *Ipomoea batatas*****I.2.5. Le ravi-mangahazo / ravitoto (Feuille de manioc)**

Le manioc est un arbuste vivace originaire d'Amérique du Sud. Il est aujourd'hui largement cultivé et récolté comme plante annuelle dans les régions tropicales et subtropicales. Les feuilles sont caduques, alternes et palmilobées (5 à 11 lobes) les lobes sont plus ou moins larges et mesurent 10 à 20 cm de long. A Madagascar, les feuilles sont pilées avant d'être consommées, ce pilage permet d'attendrir les feuilles améliorant leur digestion mais il contribue également à éliminer l'acide cyanhydrique et les tannins (Achidi *et al*, 2008).

Classification (www.wikipedia.com)**Règne :** Plantae**Sous-règne :** Tracheobionta**Division :** Magnoliophyta**Classe :** Magnoliopsida**Sous-classe :** Rosidae**Ordre :** Euphorbiales**Famille :** Euphorbiaceae**Genre :** *Manihot***Espèce :** *esculenta***Nom vernaculaire :** feuille de manioc, ravimangahazo, ravitoto (feuille pilée)**Figure 7 : *Manihot esculenta***

I.3.Préparation des feuilles

Les feuilles ont été achetées au marché «tsena an'tantsaha» Andravoahangy et issues d'un même lot (provenant d'un même champ), et fournies par un producteur unique pour s'assurer d'une meilleure homogénéité (et éviter les variations de composition biochimique pouvant être entraînées par des variations de conditions agro-climatiques).

Les feuilles sont débarrassées des parties indésirables (grosse tige, feuilles endommagées,...) et triées en deux lots : jeunes feuilles et feuilles matures. Ces dernières ont été différenciées en fonction de leur aspect morphologique : les jeunes feuilles sont reconnaissables à leur petite taille, une couleur parfois plus claire, une épaisseur plus fine, et un contour relativement régulier. A l'inverse, les feuilles matures sont plus grandes, plus épaisses, très découpées sur leur contour et ont une couleur plus foncée.

Après un lavage à l'eau distillée, les feuilles ont été essorées et pesées puis réparties en plusieurs lots pour les différentes analyses. Une partie de ces feuilles a été utilisée sous cette forme fraîche (pour la cuisson, la détermination de la matière sèche, la digestion *in vitro*...). Le reste a été lyophilisé et stocké au congélateur, pour les analyses ultérieures telles que le dosage des minéraux, qui ne nécessitent pas de feuilles fraîches.

I.4.Cuisson des légumes feuilles

Les feuilles matures ont été soumises à une cuisson hydrothermique, proche du mode de préparation traditionnel «ro», caractérisé par une proportion élevée d'eau de cuisson. Ce mode de cuisson a été adapté à partir des recettes décrites par Randrianatoandro et al. (2010), et reproduit en laboratoire avec un ratio feuille/eau de 0,12 (p/v).

Pour les analyses de composition une cuisson en grande quantité a été réalisée. Pour cela, 600 g de feuilles étaient nécessaires pour pouvoir effectuer les différentes analyses, donc 5 L d'eau distillée ont été nécessaires. Le tout est mélangé dans une cocotte en aluminium et cuit sur une plaque chauffante réglée pour atteindre 100°C, la cuisson durant 35 minutes. Afin de mesurer la valeur cuisatrice, une sonde picovacq a été plongée parmi les feuilles lors de la cuisson. Au terme de la cuisson, la cocotte a été retirée de la plaque, les feuilles ont été égouttées, essorées et pesées. L'eau de l'essorage et de l'égouttage a été récupérée et ajoutée à l'eau de cuisson et le volume de l'ensemble a été mesuré à l'aide d'une éprouvette graduée.

Une cuisson en petite quantité a aussi été effectuée en triple, directement dans les flacons de digestion. Dans chaque flacon 3 g de feuille sont mélangés avec 25 ml d'eau distillée, en

respectant toujours le ratio 0,12 (p/v). La sonde picovacq a été déposée dans un quatrième flacon, et les flacons ont été placés sur la plaque chauffante pour une cuisson de 35 minutes. A la fin de la cuisson, les flacons contenant les feuilles cuites ont été refroidis et placés dans le bain de digestion. Les données recueillies par la sonde ont été enregistrées.

La valeur cuisatrice (V_c) permet d'évaluer la sévérité d'un traitement thermique. Elle correspond au temps qu'un aliment devrait être cuit à une température référence de 100°C pour présenter le même « degré de cuisson » (Hemery, 2005).

II. Analyse de la composition nutritionnelle des légumes feuilles

II.1.Détermination de la teneur en eau et en matière sèche

II.1.1. Principe

L'eau est le principal constituant de la matière vivante. La détermination de la teneur en eau des aliments est nécessaire pour ramener les résultats d'analyse à une base fixe qui est la matière sèche, cette teneur est établie à partir de la perte de poids subie après étuvage à une température de $103\pm 2^\circ\text{C}$ et ce jusqu'à l'obtention d'un poids constant (Bizot et Martin, 1991).

II.1.2. Mode opératoire

Environ 5 g d'échantillon sont placés dans des capsules en aluminium préalablement tarées, puis mis à sécher dans l'étuve réglée 103°C pendant au moins 12 heures et/ou jusqu'à la stabilisation du poids de l'échantillon (écart<10%).

II.1.3. Mode de calcul

La teneur en eau est obtenue par la différence entre le poids initial de la capsule avec l'échantillon et le poids final de la capsule avec l'échantillon après étuvage.

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

La teneur en matière sèche est déduite à partir de la teneur en eau

$$MS\% = 100 - H\%$$

H% : teneur en eau pour 100g d'échantillon

m₀ : masse de la capsule vide (g)

m₁ : masse de la capsule contenant l'échantillon avant étuvage (g)

m₂ : masse de la capsule contenant l'échantillon après étuvage (g)

MS% : teneur en matière sèche pour 100g de l'échantillon

Détermination de la composition nutritionnelle des échantillons

Ce travail a été réalisé par Ranovona Zoelinoronirina, sur les mêmes échantillons que ceux ayant été utilisés pour les digestions *in vitro* et analyses de minéraux dans le cadre de notre étude. Il a donc été jugé utile de présenter certains de ces résultats afin d'expliquer les résultats obtenus pour la bioaccessibilité du fer et du zinc.

Les analyses ayant été réalisées sont :

- La teneur en protéines
- La teneur en lipides
- La teneur en phytates
- La teneur en pectines
- La teneur en composés phénoliques
- La teneur en tannins condensés

Les détails des modes opératoires employés lors de ces analyses peuvent donc être trouvés dans le mémoire de DEA de Ranovona Zoelinoronirina (2012).

II.2.Détermination de la teneur en cendres brutes

II.2.1. Principe

Les cendres totales (brutes) sont les résidus de composés minéraux qui restent après l'incinération d'un échantillon de substance organique végétale ou animale. Ces substances organiques subissent une combustion complète et sont transformées en CO₂ et H₂O tandis que les substances minérales restent dans les cendres (AFNOR, 1989).

II.2.2. Mode opératoire

Environ 5 g d'échantillon sont mis dans une capsule en quartz préalablement pesée, puis placés dans le four froid, incinérés pendant 5 heures à une température de 550°C. La calcination est terminée lorsqu'on obtient des cendres blanches, gris clair apparemment

dépourvues de particules charbonneuses. La capsule est laissée à refroidir dans un dessiccateur puis pesée.

II.2.3. Mode de calcul

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

C% : teneur en cendres en g pour 100g de matières brutes

m₀ : masse (g) de la capsule d'incinération vide

m₁ : masse (g) de la capsule d'incinération avec l'échantillon avant incinération

m₂ : masse (g) de la capsule d'incinération avec l'échantillon après incinération

II.3.Détermination de la teneur totale en fer et en zinc

II.3.1. Principe

Le dosage du fer et du zinc est effectué avec un spectrophotomètre d'absorption atomique à partir des cendres brutes issues de l'incinération des échantillons. La spectrophotométrie d'absorption atomique permet de quantifier les éléments métalliques en solutions. L'échantillon est vaporisé par aspiration de la solution dans une flamme. La flamme est dirigée vers une lumière émise par une lampe appropriée émettant les longueurs d'onde caractéristiques de l'élément recherché. En traversant la flamme, les ondes lumineuses dont les longueurs d'onde correspondent à l'élément dosé sont absorbées par les ions excités présents dans la flamme. Lorsque les atomes d'un élément ont été excités, leur retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission de lumière d'une fréquence bien définie et propre à cet élément. Le même élément dispersé dans une flamme possède la propriété d'absorber tout rayonnement de même fréquence. Il en résulte une absorption du rayonnement incident liée à la concentration de l'élément considéré, exprimé suivant la loi de Beer Lambert.

$$\text{Log} \frac{I_0}{I} = \epsilon(LC)$$

I₀ : intensité lumineuse incidente

I : intensité lumineuse à la sortie de la flamme

ε : coefficient d'absorption atomique

L : longueur du brûleur

C : concentration en minéraux de la solution

II.3.2. Mode opératoire

Minéralisation par voie sèche

Environ 500 mg de matériel végétal sont introduits dans des capsules en quartz. Celles-ci sont placées dans un four dont la température est augmentée progressivement jusqu'à 550°C et qui est ainsi maintenue pendant 2 heures. Un pallier de 30 minutes est effectué lorsque la température atteint successivement 150°C, 250°C, 300°C, 400°C.

Après le refroidissement des capsules, les cendres sont humectées par quelques gouttes d'eau ultra pure (EUP) froide et 1 à 2ml de HCl concentré. Les capsules sont ensuite déposées sur une plaque chauffante pour une évaporation à sec, elles y sont retirées dès l'apparition des premières vapeurs.

Puis les cendres sont reprises avec de l'acide chlorhydrique concentré, l'acide étant laissé en contact avec les cendres pendant 10 minutes. Les solutions de cendres sont ensuite filtrées sur papier filtre sans cendres Whatman n°41 et récupérées dans des fioles jaugées de 50ml. Afin de récupérer la totalité des minéraux, les capsules sont rincées avec l'eau ultra pure (EUP) tiède plusieurs fois, le papier filtre est aussi rincé à la fin de la filtration mais avec de l'EUP froide.

Les solutions de cendres sont ajustées à 50 ml avec de l'EUP et homogénéisées par agitation manuelle puis transvasées dans des piluliers sur lesquels le numéro de l'échantillon est inscrit. Enfin, les solutions sont prêtes pour la lecture sur le spectrophotomètre d'absorption atomique (AA Thermo). La longueur d'onde 248,3 nm est choisie pour l'élément fer et 213,9 nm pour le zinc, la flamme est produite avec un mélange air-acétylène.

Préparation des gammes étalon

Solutions mères : Fe et zinc 1000 ppm

Solutions à préparer : Fer : Fe 0,4 ; Fe 0,2 ; Fe 0,1 ; Fe 0,05 ; Fe 0,02

Zinc Zn 0,4 ; Zn 0,2 ; Zn 0,1 ; Zn 0,05 ; Zn 0,01

Tableau N°5 : Solutions de gamme étalon

	Vf (ml)	HCl 36% (ml)	EUP (ml)	1000 ppm (Fe ou Zn) ml
Fe 0,4	100	5	94,06	0,04
Fe 0,2	100	5	94,08	0,02
Fe 0,1	100	5	94,09	0,01
Fe 0,05	100	5	94,095	0,005
Fe 0,02	100	5	94,098	0,002
Zn 0,4	100	5	94,06	0,04
Zn 0,2	100	5	94,08	0,02
Zn 0,1	100	5	94,09	0,01
Zn 0,05	100	5	94,095	0,005
Zn 0,01	100	5	94,099	0,001

Vf : volume final ; HCl : acide chlorhydrique ; EUP : eau ultra pure ; ppm : partie par million

III. Méthode de digestion *in vitro*

III.1. Principe

La méthode de digestion *in vitro* consiste à simuler les conditions physiologiques de la digestion. Les aliments, en l'occurrence les légumes feuilles, sont soumis aux traitements biochimiques et mécaniques ayant lieu lors de deux étapes majeures, qui sont la digestion gastrique et la digestion intestinale (intestin grêle).

En dégradant les macronutriments (protéines, glucides, lipides), les enzymes digestives libèrent simultanément les minéraux emprisonnés dans la matrice alimentaire. L'intégration d'une dialyse lors de la digestion intestinale permet d'une part l'ajustement progressif du pH grâce à la solution de tampon PIPES (Piperazine –N, N'-bis-[2-Ethanesulfonic acid] Sodium salt) qui neutralise l'acidité du digesta gastrique imitant ainsi le transit du chyme gastrique à pH acide (1.8 à 2) vers un milieu moins acide (pH 5 à 6) au niveau du duodénum. D'autre part, elle permet de mesurer la quantité de minéraux dialysables, libérés sous l'action des enzymes, dont la valeur détermine la proportion de fer et de zinc bioaccessibles.

III.2. Mode opératoire

Avant utilisation, chaque matériel tel que les flacons de digestion et les béchers, qui seront en contact de manière directe ou indirecte avec les échantillons, sont trempés dans de l'acide nitrique 6,5 % pendant au moins une nuit afin de dissoudre et éliminer le fer et le zinc issus de contamination, incrustés sur la paroi de ces matériels.

La digestion est effectuée en triple sur 3 séries différentes d'un même LF : jeunes feuilles, feuilles matures crues et feuilles matures cuites, ainsi pour chaque LF, 9 digestions sont menées simultanément avec un «blanc réactif». En principe, le blanc réactif contient tous les réactifs utilisés lors de la digestion sans y ajouter l'échantillon, il sert à connaître la quantité de minéraux apportés par l'ensemble des réactifs.

III.2.1. Préparation des solutions de pepsine et de pancréatine/extrait biliaire

Juste avant la digestion, 0,8 g de poudre de pepsine sont dissous dans 10 ml de HCl 0,1 M puis agités quelques secondes sur le vortex, 2 g de résine Chelex-100 sont ajoutés à la solution et l'ensemble est mélangé pendant 30 minutes sur un agitateur rotatif à environ 60 rpm. La résine Chelex-100 purifie la solution de pepsine en piégeant les cations résiduels présents dans la solution d'enzyme. La résine et la solution d'enzyme sont séparées par filtration sur un papier filtre Whatman n°41 en utilisant une pompe à vide, cette dernière permet de récupérer le plus de solution possible et accélère également la filtration. A la fin de cette filtration, le papier filtre est rincé avec 5 ml d'HCl 0,1 M qui est récupéré dans la solution de pepsine. Le volume final de la solution d'enzyme est d'environ 15 ml.

Pour la deuxième solution enzymatique, 0,2 g de pancréatine et 1,2 g d'extrait biliaire sont dissous dans 50 ml de NaHCO₃ 1 M et mélangés à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 10 minutes, le volume final de la solution est d'environ 51 ml.

L'utilisation de la résine Chelex-100 sur la solution pancréatine/extrait de bile n'est pas nécessaire car elle est presque dépourvue de résidus et une étude antérieure (Ogou, 2009) a montré que la résine n'avait aucun effet pour cette solution. En revanche, un blanc réactif a été réalisé lors de chaque digestion et a servi pour les calculs, de manière à soustraire des échantillons le fer et le zinc éventuellement apportés par les réactifs.

Les solutions d'enzymes sont conservées au frigo jusqu'à leur utilisation.

III.2.2. Digestion gastrique

Après avoir été découpés en morceaux d'environ 5 mm sur 5 mm, 3 g de feuilles sont placés dans chacun des flacons de digestion puis additionnés de 25 ml d'eau ultra pure. Les flacons sont déposés dans un bain marie à 37°C associé à un agitateur magnétique multiposte permettant d'effectuer plusieurs digestions en même temps. Après 5 minutes d'agitation, lorsque la température a atteint 37°C, le pH est ajusté à 2 avec une solution HCl 1 M, 1 ml de solution de pepsine est ajouté aux échantillons et le mélange incubé à la même température pendant 1 heure, le pH est mesuré toutes les 15 minutes.

III.2.3. Mesure de l'acidité titrable

Cette étape n'est effectuée qu'une seule fois, pendant les mises au point, les valeurs obtenues seront nécessaires pour calculer la concentration du tampon PIPES.

Une partie du digesta gastrique est prélevée afin de déterminer son acidité titrable, pour cela une solution de KOH 0,1 M est versée goutte à goutte dans le digesta jusqu'à atteindre un pH 6-7, et le volume de KOH 0,1 M nécessaire à la titration est relevé.

A partir de l'acidité titrable du digesta gastrique, la molarité de la solution tampon est calculée afin qu'au bout de 2 heures de digestion intestinale le digesta atteigne un pH 7.

La molarité du tampon PIPES est déterminée sur toutes les matrices testées à l'aide de la formule inspirée de **Wolfgor *et al.* (2002)** :

$$C_{\text{PIPES}} = \frac{[\text{total} \cdot \text{meq} + (f \times \text{total} \cdot \text{meq})]}{f \times V_{\text{PIPES}}}$$

C_{PIPES} : concentration du tampon PIPES en mol.L⁻¹

total . meq : volume de KOH (en L) nécessaire pour atteindre un pH compris entre 6,5 et 7

f : constante = 10 - pH visé / 10 - pKa du PIPES = 0,631

V_{PIPES} : volume de PIPES que l'on veut introduire dans la membrane de dialyse (en L)

Etant donné que les valeurs d'acidité relevées pour chaque échantillon diffèrent peu les unes des autres, une seule molarité du tampon PIPES a été utilisée par la suite, cette molarité étant la moyenne des molarités calculées pour chaque échantillon (à partir de leur acidité titrable).

Tableau N° 6 : Calcul de la concentration de la solution tampon PIPES en fonction de l'acidité titrable

Légume feuille	Anamamy	Anandrano	Ravitoto	Ananambo	Ravimbomanga
total . meq (L)	0,0004	0,00065	0,00135	0,00295	0,0011
f	0,631				
V_{PIPES} (L)	0,01				
f x V_{PIPES}	0,00631				
f x total meq	0,00025	0,00041	0,00085	0,00186	0,00069
total meq + (f x total meq)	0,00065	0,00106	0,00220	0,00481	0,00179
C_{PIPES} (mol/L)	0,10339	0,16801	0,34895	0,76251	0,28433
Moyenne C_{PIPES} (mol/L)	0,33344				

PM_{PIPES}	346,33
C_{PIPES} (mol/ L)	0,3334
V_{PIPES} nécessaire (L)	0,065
PM x C_{PIPES}	115,47
Masse de poudre PIPES (g)	7,5053

Afin de préparer 65ml de solution tampon qui serviront à confectionner 10 boudins de dialyse, il faut donc 7,5053 g de poudre de tampon PIPES que l'on dissout dans 65 ml d'eau distillée.

III.2.4. Préparation des membranes de dialyse

Afin d'éviter les contaminations, la membrane de dialyse (Spectra/Por, seuil de coupure 12000-14000) est manipulée avec des gants. Des segments de membrane de dialyse sont découpés à une longueur de 15cm, puis humidifiés et lavés à l'eau ultra pure. Après un lavage soutenu, les segments de membrane sont conservés dans de l'eau ultra pure.

Pour la confection des boudins de dialyse, une extrémité de la membrane de dialyse est nouée, la solution de tampon PIPES y est ensuite introduite puis l'autre extrémité est aussi nouée en évitant de laisser des bulles dans le boudin de dialyse.

III.2.5. Digestion intestinale

A la fin de la digestion gastrique, les boudins de dialyse sont déposés dans les flacons de digestion en les immergeant complètement dans le digesta pour optimiser la surface de contact de la membrane avec ce dernier. Les flacons sont placés dans un bain équipé d'un agitateur latéral, et agités pendant 30 minutes ou jusqu'à ce que un pH de 5 à 6 soit atteint. Puis 5 ml de solution de pancréatine/extrait biliaire sont ajoutés au digesta, et le mélange est incubé pendant 2 heures à 37°C sous agitation latérale douce. Le pH est mesuré toutes les 15 minutes. Lorsque la digestion intestinale est achevée, les flacons de digestion sont placés dans de la glace pour inactiver les enzymes et stopper définitivement la digestion.

Les boudins de dialyse sont retirés des flacons, puis leur contenu est recueilli en perçant les boudins à l'aide d'une aiguille, dans des tubes de 15 ml (stériles). Les digestats sont ensuite filtrés sur un papier filtre Whatman n°40 sans cendres et recueillis dans d'autres tubes de 50 ml (stériles). Le papier Whatman contenant le reste de digesta solide est récupéré et conservé dans un sachet plastique ou dans du papier aluminium.

A l'issue de la digestion trois fractions distinctes sont obtenues :

- le dialysat qui contient les minéraux solubles et dialysables
- le filtrat qui contient à la fois des minéraux solubles et dialysables et les minéraux solubles non dialysables
- les résidus contenant tous les nutriments insolubles.

Les teneurs en fer et zinc de chaque fraction sont déterminées par spectrophotométrie d'absorption atomique selon la méthode décrite plus haut. Les différents calculs relatifs à la détermination de la bioaccessibilité du fer et du zinc sont présentés dans l'annexe 3.

Résultats

Partie III : Résultats

I. Valeurs cuisatrices mesurées au cours de la cuisson des légumes feuilles

Au cours de la cuisson, la température a été mesurée en continu par une sonde picovacq qui a permis de déterminer la valeur cuisatrice pour chaque légume feuille, ces valeurs sont présentées dans le tableau N°7.

Tableau N° 7 : Valeurs cuisatrices

		Anamamy	Anandrano	Ananambo	Ravim-bomanga	Ravitoto
Valeurs cuisatrices (min)	Cuisson avant DIV	29,390	26,199	28,778	26,984	27,387
	Cuisson en grande quantité	26,245	27,478	27,813	26,071	25,167
	Moyenne	27,317	26,838	28,295	26,527	26,77
	Ecart type	2,22	0,90	0,68	0,64	1,56

Les valeurs cuisatrices n'ont pas varié significativement entre les deux types de cuisson (cuisson en petite quantité et en grande quantité). Ces données renseignent surtout que les légumes feuilles ont subi la même sévérité de cuisson.

II. Caractéristiques nutritionnelles des légumes feuilles

Les dosages ont été effectués en triple ou en double, selon les conditions expérimentales. Les données présentées sont les moyennes de ces déterminations plus ou moins l'écart type. Les traitements statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Statgraphics Plus 5.0. Les analyses de variance (ANOVA) ont permis de déterminer les différences entre les teneurs en nutriments des échantillons des différentes espèces de légumes feuilles. Les comparaisons de deux échantillons appariés ont été également réalisées sur Statgraphics Plus 5.0. lorsqu'il a été nécessaire de mettre en évidence l'effet du degré de maturité ou du traitement technologique sur la bioaccessibilité du fer et du zinc.

II.1. Teneur en eau des légumes feuilles

Le tableau N°8 présente la teneur en eau des différentes feuilles selon leur degré de maturité, et le traitement technologique qu'elles ont subi.

Tableau N°8: Teneur en eau des différents légumes feuilles

Légume feuille	Humidité % MB			
	Jeune feuille	Feuille mature crue	Feuille mature cuite	Feuille pilée
Anamamy	88,9 ^c ± 0,66	89,17 ^b ± 0,81	91,47 ^{bc} ± 0,77	-
Anandrano	92,2 ^d ± 0,35	92,62 ^b ± 0,39	93,43 ^c ± 0,17	-
Ananambo	74,82 ^a ± 3,47	74,64 ^a ± 2,85	88,78 ^b ± 11,22	-
Ravimbomanga	89,18 ^{cd} ± 0,60	86,69 ^b ± 0,71	92,63 ^c ± 0,32	-
Ravitoto	77,08 ^b ± 1,21	76,97 ^a ± 0,32	83,76 ^a ± 0,78	76,34 ± 0,26

moyenne ± écart-type des résultats réalisés en double. Dans une même colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) (ANOVA)

La teneur en eau des légumes feuilles est élevée, elle varie nettement d'une espèce à une autre (de 74,64% pour l'ananambo jusqu'à 92,62% chez l'anandrano).

Entre les deux stades de maturité (jeune feuille, feuille mature), la teneur en eau est relativement identique.

Chez les feuilles cuites, l'augmentation de la teneur en eau provient surtout de l'eau de cuisson, et le broyage ne modifie pas la teneur en eau des feuilles pilées.

Les légumes feuilles sont des aliments à forte teneur en eau, ils sont donc fragiles et ne peuvent garder leur état frais que pendant une courte durée.

II.2. Teneurs en matière sèche et épaisseur des légumes feuilles

Le tableau N°9 présente la teneur en matière sèche des différentes feuilles selon leur degré de maturité, et le traitement technologique qu'elles ont subi.

Tableau N°9 Teneur en matière sèche des légumes feuilles et des eaux de cuisson et épaisseur des feuilles

Matière sèche (% MB)	Légume feuille				
	Anamamy	Anandrano	Ananambo	Ravimbomanga	Ravitoto
Jeune feuille	11,09 ^b ± 0,66	7,79 ^a ± 0,39	25,18 ^d ± 3,47	10,82 ^b ± 0,60	22,92 ^c ± 1,21
Feuille mature crue	10,83 ^b ± 0,81	7,38 ^a ± 0,39	25,36 ^d ± 2,85	13,31 ^b ± 0,71	23,03 ^c ± 0,32
Feuille mature cuite	8,53 ^b ± 0,77	6,57 ^a ± 0,17	11,22 ^c ± 3,18	7,37 ^a ± 0,32	16,24 ^d ± 0,78
Feuille pilée	-	-	-	-	23,66 ± 0,26
Eau de cuisson (g/L)	5,89 ^{ab} ± 0,13	1,90 ^a ± 0,02	19,3 ^c ± 3,29	3,9 ^{ab} ± 0,09	8,96 ^b ± 3,30
Epaisseur (mm)					
Jeune feuille	0,19 ^b ± 0,01	0,16 ^a ± 0,02	0,16 ^a ± 0,02	0,23 ^c ± 0,03	0,16 ^a ± 0,02
Feuille mature	0,22 ^b ± 0,03	0,21 ^b ± 0,01	0,17 ^a ± 0,02	0,29 ^c ± 0,06	0,21 ^b ± 0,03

moyenne ± écart-type des résultats réalisés en double sauf pour la mesure des épaisseurs effectuée sur 20 feuilles. Dans une même ligne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (p < 0,05) (ANOVA)

Les légumes feuilles contiennent de faibles teneurs en matière sèche qui est la traduction de la teneur en eau élevée. Ces teneurs varient de 7,38 g/100g MB pour l'anandrano à 25,36 g/100g MB pour l'ananambo.

Le degré de maturité n'influence pas la teneur en matière sèche des feuilles sauf pour le ravimbomanga chez lequel cette teneur est plus élevée dans les feuilles matures que dans les jeunes feuilles. La cuisson induit une diminution de la matière sèche plus ou moins marquée selon l'espèce. On peut remarquer que la matière sèche est transférée dans l'eau de cuisson indiquant qu'une partie des nutriments est solubilisée lors de la cuisson des feuilles. Un important transfert de matière sèche a lieu pour les feuilles d'ananambo pour lesquelles la teneur en matière sèche de l'eau de cuisson atteint 19,3g/L, ce qui est 10 fois supérieur à celle de l'anandrano (1,9g/L).

Le pilage du ravitoto ne modifie pas la teneur en matière sèche. Ce traitement mécanique engendre la destruction des structures et l'ouverture des cellules des feuilles, mais n'occasionne pas de pertes en nutriments.

Concernant l'épaisseur des feuilles, elle varie de 0,16 à 0,23 mm pour les jeunes feuilles et de 0,17 à 0,29 mm pour les feuilles matures. Les mesures effectuées ont permis de déterminer une corrélation ($R = 0,65$) entre la quantité de matière sèche perdue dans l'eau de cuisson et l'épaisseur des feuilles. Ainsi, les feuilles de faible épaisseur perdraient plus de matière sèche que les feuilles plus épaisses lors de la cuisson.

II.3. Teneur en protéines totales des légumes feuilles

La teneur en protéines totales des différentes feuilles est consignée dans le tableau suivant.

Tableau N°10 : Teneurs en protéines totales des feuilles

Légume feuille	Protéines (% MB)			
	Jeune feuille	Feuille mature crue	Feuille mature cuite	Feuille pilée
Anamamy	1,61 ^b ± 0,01	1,53 ^a ± 0,02	1,58 ^b ± 0,02	-
Anandrano	1,82 ^c ± 0,01	1,60 ^b ± 0,02	1,85 ^c ± 0,06	-
Ananambo	5,34 ^e ± 0,03	5,47 ^d ± 0,04	2,42 ^e ± 0,03	-
Ravimbomanga	1,54 ^a ± 0,02	2,02 ^b ± 1.10 ⁻³	1,25 ^a ± 1.10 ⁻³	-
Ravitoto	2,79 ^d ± 0,04	2,49 ^c ± 0,04	2,04 ^d ± 0,02	2,76 ± 0,02

moyenne ± écart-type des résultats réalisés en triple. Dans une même colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) (ANOVA)

(Ranovona, 2012)

La teneur en protéines des légumes feuilles varie selon les espèces, elle est la plus élevée chez l'ananambo (5,47g/100g MB) et la plus faible chez l'anamamy (1,53g/100g MB). On constate que le degré de maturité ne fait pas varier de manière significative la teneur en protéines.

La cuisson modifie peu la teneur en protéines de l'anamamy, de l'anandrano, du ravitoto (feuille entière) et des feuilles pilées, par contre elle réduit celle de l'ananambo et du ravimbomanga. Dans ces feuilles les pertes de protéines résulteraient de la destruction des

molécules de protéiques et peptidiques et ou de leur solubilisation dans l'eau de cuisson. L'action mécanique ne semble pas influencer sur la teneur en protéines, le pilage n'entraîne pas modification significative sur la teneur en protéine du ravitoto.

II.4.Valeur lipidique des légumes feuilles

Tableau N°11 : Teneurs en lipides totaux des feuilles

Légume feuille	Lipides (% MB)			
	Jeune feuille	Feuille mature crue	Feuille mature cuite	Feuille pilée
Anamamy	0,77 ^{bc} ± 0,02	0,70 ^a ± 0,02	1.08 ^b ± 0,02	-
Anandrano	0,67 ^a ± 0,04	0,71 ^a ± 0,06	0,78 ^b ± 0,02	-
Ananambo	2,37 ^d ± 0,09	2,49 ^b ± 0,19	2,02 ^c ± 0,02	-
Ravimbomanga	0,89 ^c ± 0,07	0,97 ^a ± 0,04	0,48 ^a ± 0,04	-
Ravitoto	2,15 ^d ± 0,01	3,13 ^c ± 0,23	2,57 ^d ± 0,04	2,66 ± 0,26

moyenne ± écart-type des résultats réalisés en double. Dans une même colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) (ANOVA)

(Ranovona, 2012)

Les légumes feuilles contiennent de très faibles teneurs en lipides, qui varient selon les espèces : le ravitoto (3,13g/100g MB) et l'ananambo (2,49g/100g MB) semblent contenir plus de lipides par rapport aux autres légumes feuilles dont la teneur en lipides ne dépasse pas 1%. Le pilage et la cuisson diminuent la teneur en lipides des feuilles sauf pour l'anamamy.

II.5.Teneurs en cendres brutes des légumes feuilles

La teneur en cendres reflète la proportion globale en minéraux dans les feuilles incinérées. On a procédé au dosage de la teneur en cendres dans l'eau de cuisson de chaque espèce de feuilles afin mettre en évidence le transfert des minéraux ayant lieu lors de la cuisson. Les résultats des dosages de la teneur en cendres totales des feuilles et des eaux de cuisson sont résumés dans le tableau N°12.

Tableau N°12 : Teneur en cendres brutes des jeunes feuilles, feuilles matures crues, feuilles matures cuites, des feuilles pilées et des eaux de cuisson

Légume feuille	Cendres brutes (g /100g de MB)				
	Jeune feuille	Feuille mature crue	Feuille mature cuite	Feuille pilée	Eau de cuisson
Anamamy	1,31 ^b ± 0,01	1,25 ^b ± 0,01	0,38 ^b ± 3.10 ⁻³	-	0,14 ^d ± 3.10 ⁻³
Anandrano	0,88 ^a ± 0,01	0,98 ^a ± 0,01	0,32 ^a ± 1.10 ⁻³	-	0,07 ^b ± 4.10 ⁻³
Ananambo	2,06 ^d ± 0,01	2,07 ^d ± 1.10 ⁻³	0,52 ^c ± 0,01	-	0,12 ^c ± 3.10 ⁻³
Ravimbomanga	1,23 ^b ± 0,03	1,63 ^c ± 0,09	0,50 ^c ± 0,01	-	0,06 ^a ± 8.10 ⁻³
Ravitoto	1,90 ^c ± 0,06	2,47 ^c ± 0,02	1,50 ^d ± 0,04	1,83 ± 0,02	0,09 ^b ± 3.10 ⁻³

moyenne ± écart-type des résultats réalisés en double sauf pour les eaux de cuisson qui ont été réalisés en triple.

Dans une même colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) (ANOVA)

Le ravitoto et l'ananambo sont riches en cendres contenant respectivement 2,47 et 2,07g/100g MB. De manière générale, l'écart entre la teneur en cendres des feuilles matures et celle des jeunes feuilles est faible. A l'exception de l'anamamy, la quantité de cendres des feuilles matures est légèrement supérieure comparée à celle des jeunes feuilles.

Les résultats montrent que la cuisson diminue considérablement la teneur en cendres des feuilles, et une partie de ces cendres diffuse dans l'eau de cuisson.

Le broyage entraîne également une perte en cendres, les feuilles entières de ravitoto contiennent 2,47 g de cendres/100g MB alors qu'après le broyage il n'en reste que 1,83g/100g MB.

II.6. Teneurs en fer total des légumes feuilles

Tableau N°13 : Teneur en fer des jeunes feuilles, des feuilles matures crues, des feuilles mûres cuites, des feuilles pilées et des eaux de cuisson

Légume feuille	Fer (mg/100g de MB)				Fer (mg/L)
	Jeune feuille	Feuille mature crue	Feuille mature cuite	Feuille pilée	Eau de cuisson
Anamamy	$3,14^c \pm 5.10^{-3}$	$2,81^{ab} \pm 0,03$	$2,31^b \pm 0,13$	-	$1,59^a \pm 0,11$
Anandrano	$1,52^a \pm 0,21$	$1,90^a \pm 0,06$	$1,40^a \pm 0,03$	-	$0,60^a \pm 0,01$
Ananambo	$3,52^d \pm 0,06$	$4,34^d \pm 1,13$	$1,64^{ab} \pm 0,07$	-	$0,80^a \pm 0,02$
Ravimbomanga	$2,68^b \pm 0,09$	$2,34^{ab} \pm 0,03$	$1,32^a \pm 0,11$	-	$1,39^a \pm 0,40$
Ravitoto	$2,55^b \pm 0,21$	$3,38^{dc} \pm 0,01$	$3,32^c \pm 0,70$	$7,27 \pm 0,65$	$1,39^a \pm 0,21$

moyenne \pm écart-type des résultats réalisés en double. Dans une même colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) (ANOVA)

La teneur en fer présente une grande variabilité entre les différents légumes feuilles. Les feuilles matures d'ananambo et de ravitoto sont riches en fer, elles contiennent respectivement 4,3mg et 3,8mg/100g MB de fer. Il existe un léger écart entre la teneur en fer des jeunes feuilles et celles des feuilles matures, les jeunes feuilles d'anamamy et de ravimbomanga contiennent plus de fer par rapport à leurs feuilles matures.

Après le pilage, la teneur en fer du ravitoto a pratiquement doublé (7,27 mg/100g MB). Le pilage est un procédé mécanique qui consiste à transformer la texture et l'aspect des feuilles, qui n'est pas en lui même susceptible d'augmenter la teneur des feuilles en fer. Cette teneur n'a donc pu varier qu'en raison d'une contamination au cours de la préparation (pilage). Les principales sources de contamination sont la poussière et les équipements ou ustensiles utilisés au cours de la préparation.

A l'issue de la cuisson, le contenu en fer de toutes les feuilles se retrouve diminué, de manière générale, le fer diffuse dans l'eau de cuisson selon différentes proportions.

Après avoir établi le bilan des minéraux dans les feuilles cuites et les eaux de cuisson, le pourcentage de fer transféré dans l'eau de cuisson est de :

- 36% pour l'anamamy
- 26% pour l'anandrano
- 27% pour l'ananambo
- 38% pour le ravimbomanga
- 23% pour le ravitoto

II.7. Teneurs en zinc total des légumes feuilles

Tableau N°14 : Teneur en zinc des jeunes feuilles, des feuilles matures crues des feuilles matures cuites, des feuilles pilées et des eaux de cuisson

Légume feuille	Zinc (mg/100g de MB)			Zinc (mg/L)	
	Jeune feuille	Feuille mature crue	Feuille mature cuite	Feuille pilée	Eau de cuisson
Anamamy	0,58 ^a ± 0,03	0,45 ^a ± 0,02	0,31 ^{ab} ± 0,01	-	0,37 ^b ± 0,01
Anandrano	0,62 ^a ± 1.10 ⁻³	0,51 ^a ± 0,03	0,31 ^b ± 0,02	-	0,24 ^a ± 0,01
Ananambo	0,81 ^b ± 0,04	0,73 ^b ± 0,01	0,27 ^{ab} ± 0,04	-	0,38 ^b ± 0,04
Ravimbomanga	0,57 ^a ± 0,02	0,47 ^a ± 0,02	0,18 ^a ± 0,03	-	0,37 ^b ± 0,04
Ravitoto	2,17 ^c ± 0,01	2,87 ^c ± 0,07	1,84 ^c ± 0,1	1,6 ± 0,2	0,71 ^c ± 0,04

moyenne ± écart-type des résultats réalisés en double. Dans une même colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$ (ANOVA))

La teneur en zinc des légumes feuilles est faible, l'anamamy l'anandrano, l'ananambo et le ravimbomanga contiennent tous moins de 1 mg /100g MB de zinc. On remarque que les feuilles d'anamamy, d'anandrano et de ravimbomanga présentent des teneurs en zinc proches. En outre, la teneur en zinc des deux stades de maturité des feuilles est presque identique. Le ravitoto se distingue des autres feuilles par une teneur en zinc assez élevée autant dans les

jeunes feuilles que dans les feuilles matures. Cependant la teneur en zinc est diminuée pour chaque espèce de feuilles après la cuisson. Le pourcentage de zinc diffusé dans l'eau de cuisson est de :

- 49% pour l'anamamy
- 39% pour l'anandrano
- 52% pour l'ananambo
- 54% pour le ravimbomanga
- 21% pour le ravitoto

Le pilage des feuilles de ravitoto entraîne la diminution de la teneur en zinc qui est sans doute associée à une perte de cet élément au cours de la préparation.

II.8. Teneur en composés antinutritionnels

Tableau N°15 : Teneur en agents chélateurs des feuilles (Acide phytique, pectines, tannins condensés, composés phénoliques)

Légume feuille	Acide phytique mg/100g de MB			
	Jeune feuille	Feuille mature crue	Feuille mature cuite	Feuille pilée
Anamamy	1,48 ^a ± 0,10	1,87 ^a ± 0,04	0,68 ^b ± 0,01	-
Anandrano	0,21 ^a ± 0,02	0,25 ^a ± 0,02	0,20 ^a ± 5.10 ⁻⁴	-
Ananambo	2,75 ^a ± 0,62	4,13 ^b ± 0,30	1,64 ^b ± 0,11	-
Ravimbomanga	4,15 ^b ± 0,16	8,42 ^c ± 0,48	4,16 ^c ± 0,09	-
Ravitoto	12,33 ^c ± 0,05	12,05 ^d ± 0,40	8,70 ^d ± 0,36	9,00 ± 0,43
	Pectines g/100g de MB			
	Jeune feuille	Feuille mature crue	Feuille mature cuite	Feuille pilée
Anamamy	0,77 ^b ± 0,19	1,07 ^b ± 0,08	0,80 ^b ± 0,19	-
Anandrano	0,48 ^a ± 0,10	0,60 ^a ± 0,04	0,73 ^b ± 0,01	-
Ananambo	2,35 ^c ± 0,07	2,16 ^c ± 0,04	1,39 ^{bc} ± 0,06	-
Ravimbomanga	0,83 ^b ± 0,09	1,15 ^b ± 0,09	0,55 ^a ± 0,04	-
Ravitoto	1,95 ^{bc} ± 0,06	1,47 ^b ± 0,22	1,37 ^{bc} ± 0,01	1,14 ± 0,05

Légume feuille	Tannins condensés g/100g de MB			
	Jeune feuille	Feuille mature crue	Feuille mature cuite	Feuille pilée
Anamamy	0,18 ^a ± 0,003	0,18 ^a ± 0,004	0,17 ^a ± 0,009	-
Anandrano	0,15 ^a ± 0,002	0,17 ^a ± 0,007	0,16 ^a ± 0,003	-
Ananambo	1,6 ^b ± 0,034	1,66 ^b ± 0,083	0,92 ^{ab} ± 0,045	-
Ravimbomanga	0,15 ^a ± 0,008	0,27 ^a ± 0,008	0,14 ^a ± 0,006	-
Ravitoto	2,67 ^c ± 0,13	2,54 ^c ± 0,068	2,06 ^c ± 0,013	2,34 ± 0,11

Légume feuille	Composés phénoliques g/100g de MB			
	Jeune feuille	Feuille mature crue	Feuille mature cuite	Feuille pilée
Anamamy	0,36 ^b ± 0,01	0,46 ^{bc} ± 0,01	0,09 ^a ± 0,004	-
Anandrano	0,13 ^a ± 0,01	0,11 ^a ± 0,01	0,04 ^a ± 0,003	-
Ananambo	0,33 ^b ± 0,02	0,33 ^b ± 0,03	0,08 ^a ± 0,01	-
Ravimbomanga	0,18 ^a ± 0,02	0,16 ^a ± 0,008	0,04 ^a ± 0,004	-
Ravitoto	0,75 ^{bc} ± 0,01	0,70 ^{bc} ± 0,03	0,25 ^b ± 0,023	0,69 ± 0,02

moyenne ± écart-type des résultats réalisés en double. Dans une même colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) (ANOVA)

(Ranovona, 2012)

Le degré de maturité n'influence pas la teneur en acide phytique de l'anandrano et le ravitoto, alors que pour l'ananambo et le ravimbomanga la teneur en acide phytique des feuilles matures (respectivement 4,13 et 8,42 mg/100g MB) atteint près du double de celle des jeunes feuilles (2,75 et 4,15 mg/100g MB). L'anandrano contient très peu d'acide phytique (0,21mg/100g MB), alors que les feuilles de ravitoto se distinguent particulièrement par une forte teneur en acide phytique (12,33mg/100g MB). Une baisse notable en acide phytique est remarquée dans les feuilles matures cuites d'ananambo, de ravimbomanga et de ravitoto. Les feuilles pilées de ravitoto contiennent moins d'acide phytique par rapport aux feuilles entières. Le pilage permet par la destruction des cellules végétales la libération et l'élimination d'une partie de l'acide phytique.

Les légumes feuilles sont pauvres en pectines, cependant, les feuilles de ravimbomanga contiennent plus de 2g de pectines /100g MB. La teneur en pectine des feuilles diminue lors du pilage et de la cuisson exceptée dans les feuilles d'anandrano. Parmi les 5 légumes feuilles, seul le ravitoto contient plus de 2g de tannins / 100g MB. Toutefois, le pilage réduit légèrement les tannins dans le ravitoto. Le degré de maturité semble n'influer que sur la teneur en tannins des feuilles de ravimbomanga. La cuisson affecte la teneur en tannins condensés des feuilles de ravitoto, d'ananambo et de ravimbomanga, en revanche elle ne modifie pas celle de l'anamamy et de l'anandrano qui contiennent déjà très peu de tannins (<0,19%/MB). Les teneurs en composés phénoliques des feuilles sont en dessous de 1 %. Elles varient très peu suivant le degré de maturité et sont réduites par la cuisson.

III. Bioaccessibilité du fer et du zinc dans les légumes feuilles

L'évolution du pH a été suivie lors de la digestion gastrique et la digestion intestinale (annexe 1). Lors de chaque digestion, on observe que le pH augmente progressivement mais reste toujours dans les limites fixées.

A l'issue de la digestion, le fer et le zinc se retrouvent dans trois fractions distinctes : les résidus, le filtrat et le dialysat.

- les minéraux contenus dans les résidus constituent une partie des minéraux insolubles, non disponibles et représentent les minéraux non absorbés au niveau du duodénum.
- le filtrat contient à la fois les minéraux solubles non dialysables et une partie des minéraux solubles et dialysables.
- le dialysat qui contient uniquement des minéraux solubles et dialysables.

Chaque fraction a été minéralisée puis les teneurs en fer et en zinc ont été lues à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique.

III.1. Teneurs en minéraux des différentes fractions de digestion

Après l'établissement d'un bilan de la masse de fer dans les résidus, les filtrats et les dialysats, on a pu relever que la quantité de fer dans la plupart des filtrats est anormalement élevée. On peut penser que ces fractions du digesta ont été probablement contaminées lors de la filtration ou d'une étape ultérieure. Les dialysats n'ayant pas été contaminés, on a donc surtout pris en compte les quantités de fer et de zinc dialysés, qui nous ont permis de calculer les proportions de minéraux bioaccessibles.

La répartition du fer et du zinc dans les résidus, les filtrats et des dialysats est présentée dans le tableau N°16 et le tableau N°17.

Tableau N°16 : Quantité de fer mesurée dans les résidus, les filtrats et les dialysats

Jeune feuille	Masse de fer dans les fractions (µg)		
	Résidus	Filtrat	Dialysat
Anamamy	84,53 ± 0,97	7,41 ± 3,08	1,52 ^{ab} ± 0,21
Anandrano	50,04 ± 0,04	11,27 ± 7,88	1,48 ^{ab} ± 0,16
Ananambo	28,93 ± 0,98	35,63 ± 1,7	1,21 ^{ab} ± 0,15
Ravimbomanga	93,83 ± 1,13	82,74 ± 47,7	1,00 ^a ± 0,79
Ravitoto	104,34 ± 0,49	-3,53 ± 14,12*	1,18 ^{ab} ± 0,55
Feuille mature crue			
Anamamy	67,43 ± 1,22	20,29 ± 0,30	1,06 ^{ab} ± 0,06
Anandrano	30,65 ± 1,54	92,15 ± 4,61	1,91 ^b ± 0,48
Ananambo	25,39 ± 2,11	65,48 ± 4,61	0,91 ^a ± 0,50
Ravimbomanga	38,45 ± 0,91	6,59 ± 34,71	1,94 ^b ± 0,66
Ravitoto	73,95 ± 0,03	0,21 ± 0,03	1,64 ^{ab} ± 0,16
Feuille mature cuite			
Anamamy	73,56 ± 3,70	19,55 ± 0,95	0,99 ^a ± 0,01
Anandrano	0,54 ± 1,10-3	53,54 ± 8,73	1,74 ^{ab} ± 0,40
Ananambo	44,11 ± 1,13	110,36 ± 0,28	4,28 ^c ± 0,65
Ravimbomanga	46,32 ± 1,11	13,48 ± 3,23	3,60 ^c ± 3,03
Ravitoto	78,70 ± 0,77	32,15 ± 2,56	13,18 ^c ± 0,18
Feuille pilée			
Ravitoto	246,63 ± 2,37	-5,48 ± 3,40*	11,00 ^d ± 1,40

*moyenne ± écart-type des résultats réalisés en double Dans une même colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05) (ANOVA). * : valeur aberrante, pouvant signifier l'absence de fer dans la fraction.*

Le fer dialysé constitue une partie relativement faible du fer présent dans le digesta. On observe relativement peu de variation entre les quantités de fer dialysé des différentes espèces et également des deux stades de maturité des feuilles. La cuisson tend à augmenter la teneur en fer dialysable pour les feuilles d'ananambo, de ravimbomanga et de ravitoto. Par contre, la cuisson ne semble pas influencer les teneurs en fer dialysable des feuilles d'anamamy et

d'anandrano. On constate que le pilage des feuilles de ravitoto augmente la quantité de fer dialysable.

Tableau N°17 : Quantité de zinc mesurée dans les résidus, les filtrats et les dialysat

Jeune feuille	Masse de zinc dans les fractions (µg)		
	Résidus	Filtrat	Dialysat
Anamamy	113,12 ± 1,28	31,15 ± 6,60	1,92 ^{abcd} ± 0,47
Anandrano	9,90 ± 0,23	36,94 ± 2,56	1,83 ^{ad} ± 0,52
Ananambo	3,17 ± 0,36	28,30 ± 7,61	2,60 ^{defg} ± 0,22
Ravimbomanga	5,46 ± 0,17	13,06 ± 3,72	1,56 ^{abc} ± 0,51
Ravitoto	36,33 ± 1,09	32,19 ± 0,14	4,72 ^h ± 1,11
Feuille mature crue			
Anamamy	76,21 ± 1,65	41,04 ± 19,69	2,03 ^{bcd} ± 0,13
Anandrano	7,44 ± 0,23	56,85 ± 1,16	1,20 ^{ab} ± 0,44
Ananambo	2,40 ± 0,18	90,94 ± 29,54	2,39 ^{cdef} ± 1,17
Ravimbomanga	6,87 ± 0,01	12,79 ± 1,87	2,06 ^{be} ± 0,34
Ravitoto	47 ± 0,4	27,42 ± 0,27	3,47 ^g ± 0,29
Feuille mature cuite			
Anamamy	67,24 ± 6,39	41,47 ± 9,82	2,39 ^{cdef} ± 0,34
Anandrano	-0,35 ± 0, 11*	13,76 ± 0,63	1,55 ^{abc} ± 0,47
Ananambo	3,32 ± 0,26	24,92 ± 7,02	0,90 ^a ± 0,66
Ravimbomanga	6,40 ± 0,06	15,45 ± 3,64	2,08 ^{bcde} ± 0,63
Ravitoto	50,61 ± 0,12	44,04 ± 9,26	3,17 ^{fg} ± 0,24
Feuille pilée			
Ravitoto	43,02 ± 1,07	22,41 ± 3,89	3,08 ^{eg} ± 1,05

*moyenne ± écart-type des résultats réalisés en double. Dans une même colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes (p<0,05) (ANOVA). * : valeur aberrante, pouvant signifier l'absence de zinc dans la fraction.*

De manière générale, la quantité de zinc dialysé est nettement supérieure à celle du fer. Elle varie significativement selon les feuilles.

La cuisson modifie le zinc dialysable uniquement pour les feuilles d'ananambo. Le pilage des feuilles de ravitoto semble avoir peu d'influence sur la dialysabilité du zinc.

III.2. Bioaccessibilité du fer dans les légumes feuilles

Tableau N°18 : Teneur en fer bioaccessible des feuilles selon leur degré de maturité et le traitement technologique

	Jeunes feuilles crues			Feuilles matures crues		
	Masse Fe (µg) initial	Masse Fe (µg) bioaccessible	Bioaccessibilité du Fe (%)	Masse Fe (µg) initial	Masse Fe (µg) bioaccessible	Bioaccessibilité du Fe (%)
Anamamy	94,22	6,14	6,52 ^a	81,36	4,15	4,90 ^{ab}
Anandrano	45,61	5,76	12,62 ^b	57,17	7,55	13,22 ^c
Ananambo	105,94	4,49	4,23 ^a	130,48	3,66	2,81 ^a
Ravimbomanga	80,52	3,75	4,66 ^a	70,19	7,67	10,92 ^{bc}
Ravitoto	76,52	4,78	6,25 ^a	101,45	6,45	6,36 ^{ab}
	Feuilles matures cuites			Feuilles matures pilées		
	Masse Fe (µg) initial	Masse Fe (µg) bioaccessible	Bioaccessibilité du Fe (%)	Masse Fe (µg) initial	Masse Fe (µg) bioaccessible	Bioaccessibilité du Fe (%)
Anamamy	81,22	3,88	4,60 ^a	-	-	-
Anandrano	57,12	6,57	11,51 ^{ab}	-	-	-
Ananambo	130,38	18,83	14,44 ^{bc}	-	-	-
Ravimbomanga	70,19	13,82	19,70 ^c	-	-	-
Ravitoto	101,56	53,42	52,59 ^d	218,68	45,23	20,63

moyenne des résultats réalisés en double Dans une même colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) (ANOVA)

Tableau N°19 : Différence de bioaccessibilité du fer en fonction du degré de maturité ou du traitement technologique appliqué aux légumes feuilles

Légume feuille	Degré de maturité	Cuisson	Pilage
Anamamy	=	=	-
Anandrano	=	=	-
Ananambo	=	**	-
Ravimbomanga	*	*	-
Ravitoto	=	**	*

= : pas de différence significative, * : $p < 0,05$ (différence significative), ** : $p < 0,01$ (différence fortement significative), - : feuilles n'ayant pas été pilées (Comparaison de deux échantillons appariés)

On observe très peu de variabilité entre la bioaccessibilité du fer des jeunes feuilles, sauf pour l'anandrano pour lequel la bioaccessibilité du fer est 2 à 3 fois supérieure à celle des autres espèces. A l'inverse, chez les feuilles matures, la bioaccessibilité du fer est assez variable entre les différentes espèces, mais on note que l'anandrano possède encore la bioaccessibilité de fer la plus élevée (13%). Par contre, la maturité n'influence pas significativement la bioaccessibilité du fer des légumes feuilles (à part pour le ravimbomanga).

La cuisson agit de manière sélective sur la bioaccessibilité du fer des différentes feuilles. Elle n'affecte pas la bioaccessibilité du fer de l'anamamy et de l'anandrano. En revanche, la cuisson augmente significativement la bioaccessibilité du fer de l'ananambo, du ravimbomanga et du ravitoto. Ainsi, pour le ravimbomanga et l'ananambo cuits, la bioaccessibilité du fer est multipliée respectivement par 2 et par 5 par rapport aux feuilles crues.

De même, le pilage des feuilles de ravitoto influence la bioaccessibilité du fer et accroît la quantité de fer bioaccessible, celle-ci passe de 6,3% à 20,6%.

On constate que la quantité de fer bioaccessible n'est pas proportionnelle à la quantité de fer initial contenu dans les feuilles. Bien que les feuilles matures d'ananambo renferment 130,4µg de fer, seul 3,66µg de ce fer est bioaccessible ; à l'inverse les feuilles matures d'anandrano contiennent beaucoup moins de fer (57,1µg) alors que leur fer bioaccessible est de 7,55µg. Cela montre que la bioaccessibilité du fer n'est pas déterminée par la teneur en fer total des légumes feuilles.

III.3. Bioaccessibilité du zinc dans les légumes feuilles

Tableau N°20 : Teneur en zinc bioaccessible des feuilles selon leur degré de maturité et le traitement technologique

	Jeunes feuilles crues			Feuilles matures crues		
	Masse Zn (µg) initial	Masse Zn (µg) bioaccessible	Bioaccessibilité du Zn (%)	Masse Zn (µg) initial	Masse Zn (µg) bioaccessible	Bioaccessibilité du Zn (%)
Anamamy	17,36	7,03	40,45 ^a	16,37	11,76	47,39 ^{bc}
Anandrano	18,77	4,76	25,33 ^a	15,34	4,19	27,30 ^{ab}
Ananambo	24,24	9,21	37,97 ^a	21,88	11,36	51,91 ^c
Ravimbomanga	17,00	7,06	41,53 ^a	14,08	7,96	56,50 ^c
Ravitoto	65,31	17,09	26,19 ^a	86,07	14,19	16,49 ^a
	Feuilles matures cuites			Feuilles pilées		
	Masse Zn (µg) initial	Masse Zn (µg) bioaccessible	Bioaccessibilité du Zn (%)	Masse Zn (µg) initial	Masse Zn (µg) bioaccessible	Bioaccessibilité du Zn (%)
Anamamy	16,34	8,90	54,50 ^c	-	-	-
Anandrano	15,33	5,51	35,93 ^b	-	-	-
Ananambo	21,87	5,22	23,85 ^a	-	-	-
Ravimbomanga	14,09	6,76	47,98 ^c	-	-	-
Ravitoto	86,17	13,04	15,14 ^a	48,03	14,45	30,08

moyenne des résultats réalisés en double. Dans une même colonne, les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$) (ANOVA)

Tableau N°21 : Différence de bioaccessibilité du zinc en fonction de la maturité ou du traitement technologique appliqué aux légumes feuilles

Légume feuille	Degré de maturité	Cuisson	Pilage
Anamamy	=	*	-
Anandrano	=	=	-
Ananambo	*	*	-
Ravimbomanga	*	=	-
Ravitoto	*	=	*

= : pas de différence significative, * : $p < 0,05$ (différence significative), - : feuilles n'ayant pas été pilées ;
(Comparaison de deux échantillons appariés)

Il existe une grande variation entre la bioaccessibilité du zinc des feuilles matures en fonction de l'espèce, par contre la bioaccessibilité du zinc varie peu d'une espèce de jeunes feuilles à l'autre.

A part pour l'anandrano et l'anamamy, le degré de maturité influence significativement la bioaccessibilité du zinc dans les feuilles. Les feuilles matures d'ananambo et de ravimbomanga présentent une bioaccessibilité de zinc nettement supérieure par rapport à leurs jeunes feuilles. A l'inverse, les jeunes feuilles de ravitoto ont une meilleure bioaccessibilité du zinc par rapport aux feuilles matures (26,2% pour les JF contre 16,4% pour les FM).

Malgré une réduction de moitié de la teneur en zinc après le pilage, le zinc bioaccessible du ravitoto augmente considérablement et passe de 16,4% à 30%.

A l'instar du fer, la bioaccessibilité du zinc ne dépend pas de la quantité initiale des minéraux dans les légumes feuilles. En revanche, le zinc présente une bioaccessibilité nettement supérieure à celle du fer autant dans les feuilles crues que les feuilles cuites.

III.2.1. Influence des composés antinutritionnels des feuilles sur la bioaccessibilité du fer et du zinc

Les plans factoriels d'analyse en composantes principales (ACP) ont été établis afin d'évaluer l'effet des chélateurs sur la bioaccessibilité du fer et du zinc dans les feuilles matures crues et cuites.

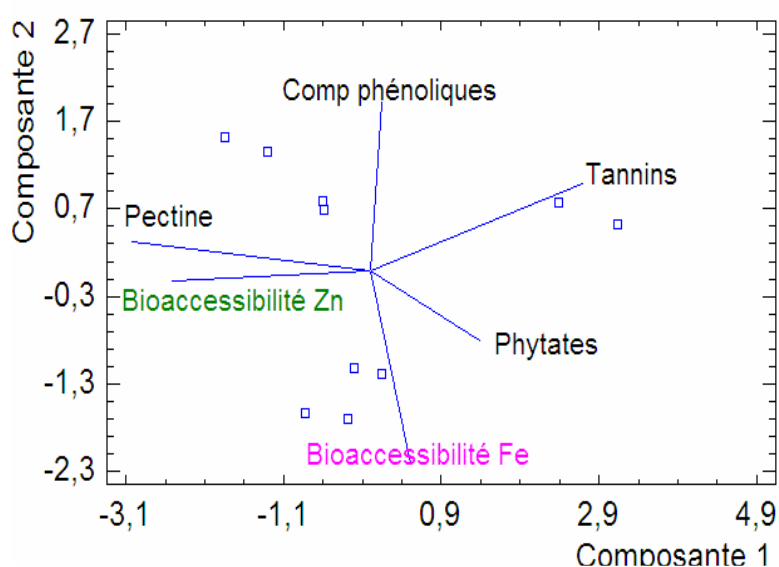


Figure 8 : Plan factoriel d'analyse des composantes principales des feuilles crues

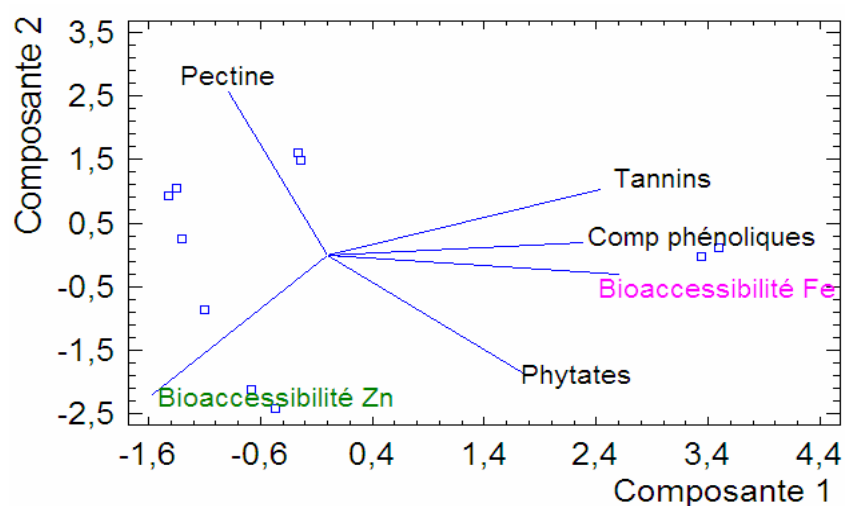


Figure 9 : Plan factoriel d'analyse des composantes principales des feuilles cuites

Les plans factoriels représentent respectivement 85,38% et 90,42% de la variabilité des données pour les feuilles crues et les feuilles cuites.

Ces plans factoriels montrent qu'il semble y avoir une relation étroite entre les teneurs en chélateurs et la modulation de la bioaccessibilité du fer et du zinc.

Ainsi, on constate que pour les feuilles crues les composés phénoliques semblent influencer principalement la bioaccessibilité du fer de manière négative (le graphique montre que plus la teneur en composés phénoliques est élevée, plus la bioaccessibilité du fer est faible), tandis que les phytates et les tannins semblent avoir le plus d'influence sur la bioaccessibilité du zinc.

Au cours de la cuisson, les chélateurs auraient moins d'effet sur le fer, ce qui expliquerait l'augmentation de la teneur en fer bioaccessible dans les feuilles cuites. Par contre, les tannins conservent leur influence négative sur la bioaccessibilité du zinc après cuisson.

Afin de déterminer l'effet réel des différents chélateurs sur la bioaccessibilité du fer et du zinc, une analyse de régression multiple a été établie. On a pu estimer que l'ensemble des phytates, des pectines, des composés phénoliques et des tannins condensés sont responsables à 93% de l'inhibition de la bioaccessibilité du fer et du zinc.

Discussion

Partie IV : Discussion

La composition des légumes feuilles étudiés est très variable. En effet il a été établi dans d'autres études que les teneurs en nutriments des feuilles sont influencées par le génotype de chaque espèce et les conditions pédoclimatiques auxquelles les plantes ont été soumises (Yang *et al*, 2002 ; Gupta *et al*, 2005).

La caractérisation de la composition nutritionnelle des légumes feuilles a mis en évidence que les teneurs en matière sèche ne varient pas en fonction du degré de maturité, toutefois les traitements technologiques affectent la concentration des nutriments et la bioaccessibilité des minéraux. Selon les résultats obtenus, l'âge physiologique (maturité) des feuilles ne semble pas avoir d'influence significative sur leur composition nutritionnelle, notamment concernant les protéines, les lipides et les minéraux. De ce fait, les jeunes feuilles seraient donc autant nutritives que les feuilles matures.

La teneur en protéines des légumes feuilles, en particulier celle du ravitoto et de l'anamambo semble intéressante (2,4 - 5,4g protéines /100g MB). La teneur en lipides totaux est très faible dans les légumes feuilles, avec moins de 1g lipides /100g MB pour l'anamamy, l'anandrano et le ravimbomanga. Cependant, l'anamambo et le ravitoto contiennent légèrement plus de lipides que les autres feuilles.

De manière générale, les légumes feuilles constituent une bonne source de minéraux, car les teneurs en cendres sont relativement élevées et peuvent atteindre plus de 2g cendres /100g MB, notamment pour les feuilles d'anamambo et de ravitoto. De même, ces deux légumes feuilles présentent des teneurs en fer et en zinc assez intéressantes.

En plus des nutriments, les feuilles contiennent également des composés antinutritionnels, en l'occurrence les phytates, les composés phénoliques (dont les tannins) et les pectines. Il s'agit principalement d'agents chélateurs, ayant la capacité de se lier aux minéraux, en particulier avec le fer et le zinc, selon une affinité spécifique à chacun de ces deux minéraux. Chaque légume feuille est caractérisé par une composition propre en agents chélateurs. On retrouve ces chélateurs en quantité non négligeable dans les feuilles analysées. Ainsi, l'anamambo et le ravitoto sont plutôt riches en phytates (>8 mg/100g MB), en tannins condensés (>1,6% MB) et en pectines (>1,4% MB). En revanche, les teneurs en agents chélateurs sont plus faibles dans les feuilles d'anandrano, d'anamamy et de ravimbomanga.

Dans les légumes feuilles, la disponibilité *in vitro* du fer ne dépend pas de la teneur totale en fer ni de la présence d'activateur (acide ascorbique) mais elle est affectée surtout par la présence des agents chélateurs (**Chawla, 1988**).

La réalisation de digestions *in vitro* a permis de déterminer la bioaccessibilité du fer et du zinc pour cinq espèces de légumes feuilles. En mimant la digestion gastro-intestinale, il a été possible de mesurer la quantité de fer et de zinc solubilisés et dialysables pour chaque type de feuilles. On a pu également distinguer les effets de la cuisson et du pilage sur la bioaccessibilité du fer et du zinc dans ces feuilles.

L'âge physiologique des feuilles ne modifie pas la bioaccessibilité du fer. Ceci pourrait être dû au fait que l'on retrouve autant d'agents chélateurs du fer (en particulier les composés phénoliques) dans les jeunes feuilles que dans les feuilles matures. En revanche, la bioaccessibilité du zinc est influencée par le degré de maturité, pour certaines espèces de feuilles notamment l'anamamy, l'ananambo et le ravimbomanga.

Comparativement, la bioaccessibilité du zinc dans les feuilles crues est largement supérieure à celle du fer. En effet, sur l'ensemble des feuilles, la meilleure bioaccessibilité du fer atteint à peine 13%, alors que le zinc présente une bioaccessibilité supérieure à 16%, pouvant atteindre les 56%. Toutefois, la totalité du zinc contenu dans les aliments végétaux existe uniquement dans un état divalent, dans cet état le zinc possède une meilleure solubilité, ce qui pourrait expliquer sa forte bioaccessibilité (**Patted, 2010**).

La digestion *in vitro* des légumes feuilles crus a permis de les classer selon la bioaccessibilité du fer dans l'ordre suivant : anandrano > ravimbomanga > ravitoto > anamamy > ananambo. Ce classement semble être cohérent étant donné que les feuilles d'anandrano et de ravimbomanga contiennent le moins de composés phénoliques, de tannins condensés et de pectines. De ce fait, les effets inhibiteurs sur le fer sont moins importants, ce qui engendre une meilleure bioaccessibilité chez ces feuilles.

Pour la bioaccessibilité du zinc, les légumes feuilles sont classés de la manière suivante : ravimbomanga > ananambo > anamamy > anandrano > ravitoto. L'acide phytique constitue le principal agent chélateur du zinc, or le ravitoto en est particulièrement riche, de ce fait il apparaît normal qu'il présente la bioaccessibilité en zinc la plus faible.

Généralement, avant d'être consommés, les légumes feuilles sont cuits. La cuisson modifie la composition des feuilles et influence la concentration et la biodisponibilité des minéraux (**Miglio, 2008**). Elle engendre des modifications plus ou moins complexes des interactions

entre minéraux et matrice alimentaire, induisant ainsi des variations de la bioaccessibilité des minéraux. La cuisson des feuilles a été effectuée dans les mêmes conditions, avec la même quantité d'eau de cuisson, la même durée, et surtout une valeur cuisatrice presque constante sur l'ensemble des cuissons. Ainsi, la variation des effets observés lors de la cuisson dépend principalement de chaque matrice, et non pas des conditions d'application du traitement.

La cuisson entraîne un transfert de matière dont l'ampleur varie suivant le légume feuille. Ainsi l'ananambo et le ravimbomanga perdent la moitié de leur matière sèche traduisant une forte diminution de la teneur en protéines, en cendres brutes. Les pertes sont néanmoins relativement modérées pour les autres feuilles.

Au cours de la cuisson, la bioaccessibilité du fer et celle du zinc évoluent différemment suivant l'espèce de légume feuille. Ainsi, chez l'anamamy et l'anandrano la bioaccessibilité du fer n'a pas été affectée par la cuisson. En revanche le fer bioaccessible a augmenté fortement pour les feuilles d'ananambo, de ravitoto et de ravimbomanga. Dans ce dernier cas, l'amélioration de la bioaccessibilité du fer pourrait être associée à deux facteurs consécutifs. En premier lieu, la cuisson peut engendrer une réduction des interactions entre le fer et les polyphénols, se produisant lors de la destruction des cellules végétales. Ensuite, l'amélioration de la bioaccessibilité du fer pourrait résulter de la solubilisation du fer en question, qui se produit lorsqu'il diffuse dans l'eau de cuisson.

Si la cuisson n'a pas modifié la bioaccessibilité du zinc de l'anandrano, du ravimbomanga et du ravitoto, par contre elle augmente celle de l'anamamy. De même, après la cuisson on remarque une diminution du zinc bioaccessible pour les feuilles d'ananambo, pour lesquelles on retrouve une concentration non négligeable de phytates.

A la différence de la cuisson, le pilage modifie simultanément la bioaccessibilité du fer et du zinc des feuilles de ravitoto. Ce traitement est responsable de la dégradation partielle des chélateurs. Au cours du pilage, la teneur en chaque agent chélateur diminue (en particulier l'acide phytique), par conséquent la bioaccessibilité du fer et du zinc se trouvent améliorées. On a supposé que le surplus de fer retrouvé dans les feuilles de ravitoto pilées provenait d'une contamination. La bioaccessibilité de ce fer semble être relativement élevée malgré son origine exogène. **Achidi (2008)** attribue l'augmentation de la teneur en fer dans les feuilles pilées de manioc à l'apport de fer issu du frottement des feuilles sur l'ustensile en métal avec le quel le pilage est effectué. Cependant, différentes études ont montré que la bioaccessibilité du fer de contamination dépend surtout de l'origine du fer.

Conclusion & perspectives

Conclusion et perspectives

La bioaccessibilité des minéraux est à considérer afin d'évaluer la proportion potentiellement absorbable de ces micronutriments dans les aliments. Ce travail a permis de déterminer la bioaccessibilité du fer et du zinc de légumes feuilles consommés à Madagascar. On a pu évaluer l'influence du degré de maturité et l'effet de la cuisson et du pilage sur le pourcentage de fer et de zinc bioaccessibles. Dans les légumes feuilles, la bioaccessibilité du fer et celle du zinc évoluent différemment au cours de la maturation. Le pourcentage de fer bioaccessible n'est pas affecté par l'âge physiologique des feuilles sauf pour le ravimbomanga. En revanche, la bioaccessibilité du zinc est modifiée par la maturité pour les feuilles d'ananambo, de ravimbomanga et de ravitoto.

La cuisson influence de manière sélective la bioaccessibilité du fer et du zinc. Lors de la cuisson, une nette amélioration du pourcentage de fer bioaccessible est observée dans les feuilles d'ananambo, de ravimbomanga et de ravitoto. Alors que la bioaccessibilité du zinc de l'anandrano, du ravimbomanga et du ravitoto n'est pas modifiée par la cuisson. On a pu observer que le pilage améliorait simultanément la bioaccessibilité du fer et du zinc.

La bioaccessibilité du fer et celle du zinc sont affectées principalement par les teneurs en agents chélateurs dont les variations induisent des modifications positives ou négatives sur le fer et le zinc bioaccessibles.

En terme de perspective, au vu des contaminations observées dans les filtrats, il semble nécessaire d'apporter des modifications au niveau des étapes de récupération de ces fractions.

Il est possible d'envisager d'effectuer des digestions *in vitro* des plats à base de légumes feuilles, sachant que l'addition d'autres ingrédients dans les légumes feuilles peut modifier la bioaccessibilité des minéraux.

L'étude de l'effet d'autres traitements technologiques, tels que le séchage ou la cuisson à haute pression, sur la biodisponibilité des minéraux pourrait être considéré.

Il est aussi envisageable d'appliquer la méthode de digestion *in vitro* sur les aliments de compléments afin d'évaluer l'efficacité de la fortification en minéraux.

Références bibliographiques

1. Achidi, A.U., Ajayi A.A., Dixon B.M., Bokanga, M. (2008). The effect of processing on the nutrient content of cassava (*Manihot esculenta*) leaves. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32 486–502.
2. AFNOR, (1989). Contrôle de la qualité des produits alimentaires. *Méthodes d'analyse officielle, 1ère éd. AFNOR*. Paris, 374p.
3. AFNOR, (1993). Corps gras, graines oléagineuses, produits dérivés, AFNOR, 663p.
4. AFSSA, (2002). Les fibres alimentaires : définition, méthode de dosage, allégations nutritionnelles. Rapport du comité d'experts spécialisé Nutrition humaine.
5. Antia, B.S., Akpan, E.J, Okon, P.A, Umoren, I.U, (2006). Nutritive and anti-nutritive evaluation of sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) leaves. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5 (2) : 166-168.
6. Argyri, K., Birba, A., Miller D.D., Komaitis, M., Kapsokefalou, M., (2009). Predicting relative concentrations of bioavailable iron in foods using *in vitro* digestion: New developments. *Food Chemistry* 113 : 602–607.
7. Beard, J.L., (2001). Iron Biology in Immune Function, Muscle Metabolism and Neuronal Functioning. *Journal of Nutrition*, 131: 568S–580S.
8. Benito, P., Miller, D., (1998). Iron absorption and bioavailability: an updated review. *Nutrition Research*, 18:581-603.
9. Black, M.M., (1998). Zinc deficiency and child development. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68, 464S-508S.
10. Bothwell, T.H., Baynes, R.D., MacFarlane, B.J., MacPhail, A.P., (1989). Nutritional iron requirements and food iron absorption. *Journal International of Medicine*, 65, p 226-357.
11. Brown, K.H., Wuehler, S.E., Peerson, J.M., (2001). The importance of zinc in human nutrition and estimation of the global prevalence of zinc deficiency. *Food Nutrition. Bulletin*. 22: 113–125.
12. Camara, F., Amaro, M.A., Barbera, R., Clemente, G., (2004). Bioaccessibility of minerals in school meals: Comparison between dialysis and solubility methods. *Food chemistry*.

13. Causeret, J., (1986), Caractéristiques nutritionnelles et bon usage de nos aliments. In : L'alimentation humaine. Evolution et tendances. *Documents INRA P 60*, Dijon, 1 – 15.
14. Chadare, F.J., Linnemenn, A.R., Hounhouigan, J.D, 1 M. J. R. Nout, M.J.R, Van Boekel, M.A., (2009) Baobab Food Products: A Review on their Composition and Nutritional Value, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49:254–274.
15. Chawla, S., Saxena, A. and Seshadri, S., (1988). *In vitro* availability of iron in various green leafy vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 46: 125-127.
16. Cheryan, M., (1980). Phytic acid interactions in food systems. CRC Critical Reviews. *Food Science and Nutrition*, 297-335.
17. Conrad, M.E., Benjamin, B.I., Williams, H.L., Foy, A.L., (1967). Human absorption of hemoglobin-iron, *Gastroenterol.* 55 5-10.
18. Cousins, R.J., (1996). Zinc. In: Ziegler EE, Filer LJ, Jr, eds. Present knowledge in nutrition. 7th ed, Washington DC, USA: *International Life Sciences Institute Press*, p293–306.
19. Dalia, I., Machado, S., José A., (2010). Nutritional quality of edible parts of *Moringa oleifera*. *Food Analysis. Methods*, 3:175–180.
20. De Maeyer, E., Adiels-Tegman, M., (1985). The prevalence of anemia in the world. *World Health 25 Statist Quart* 38: 302-316.
21. Duhan, A., Khetarpaul, N., Bishnoi, S., (2002). Content of phytic acid and HCl-extractability of calcium, phosphorus and iron as affected by various domestic processing and cooking methods. *Food Chemistry*, 78, 9–14.
22. EDSMD IV. Enquête Démographique et de Santé de Madagascar 2008-2009, Institut National de la Statistique (INSTAT) et ICF Macro 2010 Antananarivo, Madagascar.
23. Ekholm, P., Virkki, L., Ylinen, M., Johansson, L., (2003). The effect of phytic acid and some natural chelating agents on the solubility of mineral elements in oat bran. *Food Chemistry*, 80 165–170.
24. FAO, (1988). Traditional food plants. Food and nutrition. FAO, ROME. 42p.

25. FAO / WHO (2002). Human vitamin and mineral requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand. FAO, Rome, pp 257-267.
26. FAO, (2004). Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Second edition, *Food and Nutrition Series*, No. 23.
27. Foidl, N., Makkar, H.P.S., Becker K., (2001). The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. Dar Es Salaam, 20 p.
28. Friedman, M., Jürgens H.S., (2000). Effect of pH on the Stability of Plant Phenolic Compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, Vol. 48, No. 6.
29. Gibson, R.S., Donovan. U.M., Heath, A.L, (1997). Dietary strategies to improve the iron and zinc nutriture of young women following a vegetarian diet. *Plant Foods for Human Nutrition* 51: 1–16.
30. Gillooly, M., Bothwell, T.H., Torrance, J.D, (1983). The effects of organic acids, phytates and polyphenols on the absorption of iron from vegetables. *British Journal of Nutrition*, 49: 331-335.
31. Gupta, S., Lakshmi, A.J, Manjunath, M.N, Prakash, J., (2005). Analysis of nutrient and antinutrient content of underutilized green leafy vegetables. *LWT*, 38, 339–345
32. Gupta, S., Lakshmi, A.J, Prakash, J., (2006). *In vitro* bioavailability of calcium and iron from selected green leafy vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 2147–2152.
33. Hallberg, L., Bjorn-rasmussen, E. (1981). Measurement of iron absorption from meals contaminated with iron. *American Journal of Clinical Nutrition*, 34, 2808-2815.
34. Hambidge, M., (2000). Human zinc deficiency. *American Society for Nutritional Sciences*, p 1344S-1349S.
35. Hambidge, M., Krebs, N.F., (2001). Zinc metabolism and requirements. *Food and Nutrition Bulletin*, vol. 22, no. 2.
36. Hemery, Y., (2005). Digestibilité *in vitro* du fer et du zinc dans une sauce sahélienne à base de gombo (*Hibiscus esculentus L.*): effets de la composition en ingrédients et de la durée de cuisson. Mémoire de DEA en Sciences des aliments, Université de Montpellier.

37. Hercberg, S., Cailhol, J., Franchisseur, C., Maurel, M., (2001). La déficience en fer et l'anémie ferriprive dans la population française. *Revue Française des Laboratoires*, N° 334.
38. House, W.A. (1999). Trace element bioavailability as exemplified by iron and zinc. *Field crop research*, 60 : 115-141.
39. Hurrell, R.F., Reddy, M.B., Juillerat, M., Cook, J.D., (2006). Meat protein fractions enhance nonheme iron absorption in humans. *Journal of Nutrition*, 136: 2808-2812.
40. Imoberdorf, R., Rühlin, M., Ballmer, P.E., (2010). Zinc – un oligoélément vital à grand potentiel. *Forum Med Suisse*, 10(44):764–768.
41. Jackson, M.J., (1989). Physiology of zinc: general aspects. In : Mills CF, ed. *Zinc in human biology*. London: Springer- Verlag, p1–14.
42. Kahane, R., Temple, L, Brat, P., De Bon, H., (2005). Les légumes feuilles des pays tropicaux : diversité, richesse économique et valeur santé dans un contexte très fragile. Colloque Angers : Les légumes: un patrimoine à transmettre et à valoriser, 7-9 septembre 03-14.
43. Krebs, N.F., Westcott, J.E., Huffer, J.W. & Miller, L.V, (1998). Absorption of exogenous zinc and secretion of endogenous zinc in the human small intestine, *FASEB J*. 12: A345.
44. Lee, H.H., Prasad, A.S., Brewer, G.J., Owyang, C., (1989). Zinc absorption in human small intestine. *American Journal of Physiology*. 256: G87–G91.
45. Lestienne, I., (2004). Contribution à l'étude de la biodisponibilité du fer et du zinc dans le grain de mil et conditions d'améliorations dans les aliments de complément. Mémoire de Doctorat en Sciences des aliments. Université de Montpellier II: Montpellier.
46. Lönnerdal, B., (1996). Iron-zinc-copper interactions. Proceedings of the workshop ILSI, Micronutrient interactions: Impact on child health and nutrition. Washington DC, USA, p3-10.
47. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L., (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Society for Clinical Nutrition*, 79:727-747.

48. Marx, J.J.M., (1997). Iron deficiency in developed countries: prevalence, influence of lifestyle factors and hazards of prevention. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51, 491-494.
49. Maundu, P.M., Ngugi, G.W., Kabuye, C.H.S., (1999). Traditional Food Plants in Kenya. Kenya Resource Centre for Indigenous Knowledge. National Museums of Kenya, Nairobi, p 270.
50. Miller, D., Schricker, B.R., Asmussen, R., Van Campen, D., (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals, *American Journal of Clinical Nutrition*, 34:2248-2256.
51. Miret, S., Simpson, R.J., McKie A.T., (2003). Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. *Annual Review of Nutrition*, 23: 283–301.
52. Nathanson, S., Deschênes, G., Bensman, A., (1999). Les outils biochimiques et hématologiques de l'exploration du métabolisme du fer. *Archive of Pédiatrie*, 6 : 1199-1204.
53. Odhav B., Beekrum S., Akula U., Baijnath H., 2007. Preliminary assessment of nutritional value of traditional leafy vegetables in KwaZulu-Natal, South Africa. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 430-435.
54. Oduro I., Ellis W.O., Owusu D., (2008). Nutritional potential of two leafy vegetables: Moringa oleifera and Ipomoea batatas leaves. *Scientific research and essay*, 3(2), 057-060.
55. Ogou, F., (2009). Estimation de la biodisponibilité des minéraux: Méthode de digestion in vitro avec dialyse. Mémoire de Master en Bio-ingénierie. Université de Montpellier.
56. Ortega, R.M., Quintas, M.E., Andres, P., (1999). Zinc status of a group of pregnant Spanish women: effects on anthropometric data and Apgar score of neonates. *Nutrition Research*, 19:1423.
57. Parada, J., Aguilera, J.M., (2007). Food Microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science* Vol. 72, No. 2, R21-R32.
58. Patted, M., Bharati, P., Naik, R., Chimmad, B., (2010). Bioaccessibility of iron and zinc from green leafy vegetable based products. *Karnataka Journal of Agriculture*, 23 (5): 769-773.

59. Persson, H., Türk, M., Nyman, M., Sandberg, A.S., (1998). Binding of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3194-3200.
60. Rahajanirina, G., (2009). Elaboration du profil sensoriel des 12 légumes feuilles les plus consommés à Antananarivo et étude de la valeur nutritionnelle de plats à base de ces légumes feuilles. Mémoire de DEA, Université d'Antananarivo.
61. Randrianatoandro, V.A., (2010). Identification et caractérisation des plats sources en micronutriments consommés en milieu urbain (Manjakaray, Madagascar) : étude des plats à base de légumes-feuilles. Mémoire de Doctorat en Science de la vie, Université d'Antananarivo.
62. Randrianatoandro, V.A., Avallone, S., Picq, C., Ralison, C., Treche, S., (2010). Recipes and nutritional value of dishes prepared from green-leafy vegetables in an urban district of Antananarivo (Madagascar). *International Journal of Food Science and Nutrition*, 61, 404-16.
63. Ranovona, Z., (2012). Caractéristiques nutritionnelles, capacité antioxydante et facteurs antinutritionnels de quelques légumes feuilles Malgaches. Mémoire de DEA, Université d'Antananarivo.
64. Reddy M.B., Hurrell R.F., Cook J.D. (2000). Estimation of nonheme-iron bioavailability from meal composition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 937-943.
65. Rouault, T.A, (2001). Systemic Iron Metabolism: A Review and Implications for Brain Iron Metabolism. *Pediatric neurology*, Vol. 25 No. 2 : 130-137.
66. Salovaara, S., Sandberg, A. S., & Andlid, T. (2002). Organic acids influence iron uptake in the human epithelial cell line Caco-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50, 6233–6238.
67. Sandberg, A.S., Carlsson, N.G., Svanberg, U., (1989). Effects of inositol tri-, tetra-, penta- and hexaphosphates on in vitro estimation of iron availability. *Journal of Food Science*, 54, 159-186.
68. Savage, G.P., Martensson, L., (2010). Comparison of the estimates of the oxalate content of taro leaves and corms and a selection of Indian vegetables following hot water, hot acid and in vitro extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23:13–117.

69. Schneeman, B.O., (1986). Dietary fiber: physical and chemical properties, methods of analysis and physiological effects. *Food Technology*, 40, 104-110.
70. Siegenberg, D., Baynes, R.D., Bothwell, T.H., Macfarlane, B.J., Lamparelli, R., Car, N., MacPhail, P., Schmidt, U., Tal, A., Mayet, F., (1991). Ascorbic acid prevents the dose-dependent inhibitory effects of polyphenols and phytates on nonheme-iron absorption. *American Journal of Clinical Nutrition*, 53: 5 37-41.
71. Solomons, N.W., (2001). Dietary sources of zinc and factors affecting its bioavailability. *Food and Nutrition Bulletin*, vol. 22, 2: p 138-154.
72. Thompson, S.A., Weber, C.W., (1979). Influence of pH on the binding of cooper, zinc and iron in six fiber sources. *Journal of Food Science*, 44, 752-754.
73. Umeta, M., West, C.E, Fufa, H., (2005). Content of zinc, iron , calcium and their absorption inhibitors in foods commonly consumed in Ethiopia, *Journal of Food Composition and Analysis*, 18 : 803-817.
74. Watzke, H.J., (1998). Impact of processing on bioavailability examples of minerals in foods. *Food Science and Technology*, 9:320-327.
75. Wienk, K.J.H, Marx, J.J.M, Beynen, A.C, (1999). The concept of iron bioavailability and its assessment. *European Journal of Nutrition*, 38:51–75.
76. WHO, (2001), Iron Deficiency Anemia Assessment, Prevention and Control.
77. Wolfgor, R., Drago, S.R, Rodriguez, V., Pellegrino, N.R. Valencia, M.E., (2002). In vitro measurement of availability iron fortified foods, *Food Research International* 35, pp. 85–90.
78. Yang, R.Y., Chang, L.C., Hsu, J.C., Weng, B.C., Palada, M.C., Chadha, M.L., Levasseur, V., (2006), Propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des feuilles de Moringa – Du germoplasme, à la plante, à l'aliment et à la santé. Moringa et autres végétaux à fort potentiel nutritionnel : Stratégies, normes et marchés pour un meilleur impact sur la nutrition en Afrique. Accra, Ghana, 16-18 novembre 2006, 9 p.
79. Zimmermann, M.B., Hurrell, R.F., (2007). Nutritional iron deficiency. *The lancet*, August 11, Vol 370.

Annexes

Annexe 1 : Suivre de l'évolution du pH lors des DIV

Le pH de chaque matrice a été mesuré avant le début de la digestion. Des mesures de pH ont été également effectuées au cours de la digestion gastrique, après l'introduction des boudins de dialyse (ajustement du pH 5-6) et lors de la digestion intestinale.

Tableau A : pH du digesta des feuilles d'anamamy (Ay)

Code	JFAy1	JFAy2	JFAy3	FMCrAy1	FMCrAy2	FMCrAy3	FMCTAy1	FMCTAy2	FMCTAy3
pH avant digestion	6,08	6,07	6	6	6,05	6,05	6,17	6,14	6,08
pH ajusté (1,8-2)	2,07	2,08	2,06	2,08	2,12	2,08	1,98	2,06	2,08
pH digestion gastrique	2,38	2,35	3,05	2,33	2,45	2,39	2	2,08	2,1
	2,48	2,44	3,19	2,39	2,4	2,54	2,1	2,13	2,14
	2,52	2,48	3,27	2,45	2,59	2,53	2,15	2,16	2,18
	2,57	2,54	3,36	2,52	2,65	2,58	2,12	2,17	2,19
pH ajusté (5-6)	6,05	6,01	6,8	5,76	5,92	6,05	4,2	4,36	4,12
	6,43	6,46	6,91	6,49	6,42	6,37	5,01	5,49	5,45
pH digestion intestinale	6,86	6,8	7,12	6,88	6,89	6,86	6,36	6,53	6,45
	7,05	6,99	7,3	7,04	7,05	7,02	6,71	6,79	6,8
	7,19	7,14	7,39	7,2	7,22	7,17	6,91	6,95	6,96
	7,27	7,25	7,48	7,29	7,31	7,27	7,01	7,07	7,08
	7,34	7,31	7,5	7,34	7,35	7,3	7,07	7,11	7,1
	7,37	7,26	7,54	7,4	7,42	7,38	7,17	7,2	7,19
	7,44	7,41	7,59	7,47	7,46	7,42	7,18	7,21	7,21
	7,43	7,4	7,61	7,46	7,47	7,43	7,2	7,22	7,22

Tableau B : pH du digesta des feuilles d'anandrano (Ad)

Code	JFAd1	JFAd2	JFAd3	FMCrAd1	FMCrAd2	FMCrAd3	FMCTAd1	FMCTAd2	FMCTAd3
pH avant digestion	6,37	6,32	6,31	6,38	6,36	6,38	6,016	6,18	6,15
pH ajusté (1,8-2)	1,97	1,96	1,95	1,95	1,95	1,94	2,06	2,04	2,12
pH digestion gastrique	2,22	2,13	2,11	2,22	2,19	2,17	2,12	2,06	2,16
	2,14	2,12	2,11	2,2	2,2	2,17	2,13	2,08	2,18
	2,19	2,13	2,12	2,24	2,21	2,19	2,19	2,12	2,2
	2,16	2,14	2,13	2,23	2,22	2,2	2,18	2,13	2,22
pH ajusté (5-6)	4,83	5,72	5,28	5,91	5,56	5,61	4,75	4,04	4,94
	6,32	6,39	6,36	6,5	6,41	6,42	6,31	5,84	6,23
pH digestion intestinale	7,18	7,1	7,11	7,18	7,14	7,13	7,13	7,03	7,1
	7,25	7,22	7,24	7,26	7,21	7,24	7,23	7,14	7,18
	7,32	7,29	7,31	7,36	7,31	7,3	7,33	7,25	7,27
	7,37	7,34	7,36	7,37	7,34	7,34	7,35	7,28	7,3
	7,43	7,41	7,41	7,45	7,41	7,41	7,49	7,42	7,41
	7,44	7,38	7,4	7,4	7,37	7,39	7,43	7,35	7,34
	7,44	7,43	7,45	7,446	7,43	7,45	7,44	7,39	7,38
	7,51	7,46	7,42	7,57	7,45	7,47	7,49	7,41	7,42

Tableau C : pH du digesta des feuilles d'ananambo (Ab)

Code	JFAb1	JFAb2	JFAb3	FMCrAb1	FMCrAb2	FMCrAb3	FMCTAb1	FMCTAb2	FMCTAb3
pH avant digestion	6,04	6,03	6,01	5,85	5,86	5,84	5,44	5,56	5,56
pH ajusté (1,8-2)	2,03	1,96	1,96	2,08	2,11	2,07	2	1,98	2,03
pH digestion gastrique	2,13	2,06	2,04	2,1	2,16	2,11	2,01	2,06	2,04
	2,15	2,07	2,05	2,1	2,17	2,13	2,04	2,06	2,05
	2,12	2,06	2,05	2,11	2,16	2,13	2,05	2,07	2,05
	2,15	2,08	2,07	2,11	2,18	2,14	2,06	2,08	2,05
pH ajusté (5-6)	4,24	3,87	3,65	4,83	4,79	4,03	3,95	4,67	4,45
	5,75	5,35	5,19	6,14	6,31	5,68	5,92	6,21	6,04
pH digestion intestinale	6,56	6,45	6,42	6,74	6,79	6,61	6,62	6,74	6,71
	6,61	6,54	6,48	6,73	6,83	6,65	6,74	6,8	6,73
	6,73	6,66	6,6	6,88	6,92	6,78	6,83	6,9	6,86
	6,85	6,77	6,72	6,94	7	6,88	6,89	6,95	6,93
	6,89	6,84	6,79	7,02	7,05	6,93	6,98	7,02	7
	6,91	6,84	6,79	7,03	7,07	6,96	7,06	7,08	7,04
	6,95	6,88	6,83	7,08	7,11	7,01	7,1	7,13	7,09
	6,96	6,93	6,87	7,13	7,14	7,04	7,12	7,16	7,12

Tableau D : pH du digesta des feuilles de ravimbomanga (Rv)

Code	JFRv1	JFRv2	JFRv3	FMCrRv1	FMCrRv2	FMCrRv3	FMCTRv1	FMCTRv2	FMCTRv3
pH avant digestion	5,96	5,8	5,74	5,91	5,77	5,72	6,35	6,4	6,42
pH ajusté (1,8-2)	1,86	1,84	1,89	1,85	1,97	1,94	1,94	1,92	1,91
pH digestion gastrique	2,27	2,21	2,16	2,27	2,13	2,25	2,06	2,04	2
	2,43	2,35	2,29	2,45	2,23	2,38	2,02	2,04	1,98
	2,49	2,41	2,34	2,5	2,24	2,39	2,03	2,03	1,99
	2,64	2,55	2,48	2,54	2,31	2,49	2,05	2,06	2,04
pH ajusté (5-6)	6,79	6,77	6,73	6,61	6,08	6,36	5,06	5,35	5,07
pH digestion intestinale	7,38	7,36	7,35	7,31	7,09	7,16	6,98	6,94	6,86
	7,41	7,42	7,39	7,47	7,26	7,31	7,1	7,04	6,99
	7,54	7,52	7,46	7,53	7,42	7,47	7,3	7,22	7,14
	7,5	7,5	7,45	7,61	7,47	7,5	7,25	7,2	7,12
	7,6	7,63	7,58	7,63	7,47	7,49	7,33	7,28	7,23
	7,6	7,61	7,55	7,7	7,57	7,62	7,45	7,35	7,28
	7,61	7,64	7,59	7,7	7,56	7,6	7,44	7,35	7,28
	7,64	7,68	7,62	7,72	7,64	7,63	7,46	7,4	7,35

Tableau E : pH du digesta des feuilles de ravitoto (Rt)

Code	JFRt1	JFRt2	JFRt3	FMCrRt1	FMCrRt2	FMCrRt3	FMCrRt1	FMCrRt2	FMCrRt3
pH avant digestion	6,14	6,13	6,12	6,13	6,2	6,19	5,89	5,83	5,92
pH ajusté (1,8-2)	1,82	1,8	1,83	1,86	1,83	1,81	2,1	2,07	2,04
pH digestion gastrique	2,1	2,07	2,06	2,22	2,19	2,18	2,32	2,33	2,21
	2,12	2,11	2,11	2,28	2,26	2,25	2,32	2,31	2,18
	2,29	2,24	2,19	2,38	2,34	2,38	2,33	2,33	2,2
	2,3	2,26	2,22	2,44	2,43	2,4	2,37	2,34	2,2
pH ajusté (5-6)	4,75	4,96	4,79	4,94	5,07	4,89	4,53	4,44	4,19
	6	6,08	6,02	6,02	6,01	5,99	5,76	5,58	5,22
pH digestion intestinale	6,67	6,71	6,73	6,8	6,78	6,71	6,72	6,65	6,55
	6,79	6,8	6,81	6,89	6,88	6,83	6,81	6,77	6,68
	6,9	6,9	6,91	7	6,98	6,94	6,9	6,88	6,78
	7,01	6,95	6,95	7,06	7,07	7,04	6,98	6,95	6,86
	7	7,01	7,02	7,12	7,09	7,07	7,02	7	6,91
	7,04	7,03	7,04	7,14	7,12	7,09	7,06	7,03	6,95
	7,1	7,08	7,1	7,15	7,16	7,14	7,1	7,07	6,99
	7,12	7,1	7,12	7,2	7,19	7,17	7,12	7,09	7,01

Annexe 2 : Traitement thermique : exemples de profil de cuisson

L'allure générale des profils de cuisson est relativement identique entre les différents légumes feuilles, la durée de chaque cuisson était identique (35min) et la proportion d'eau de cuisson correspondait à un ratio feuille/eau 0,12.

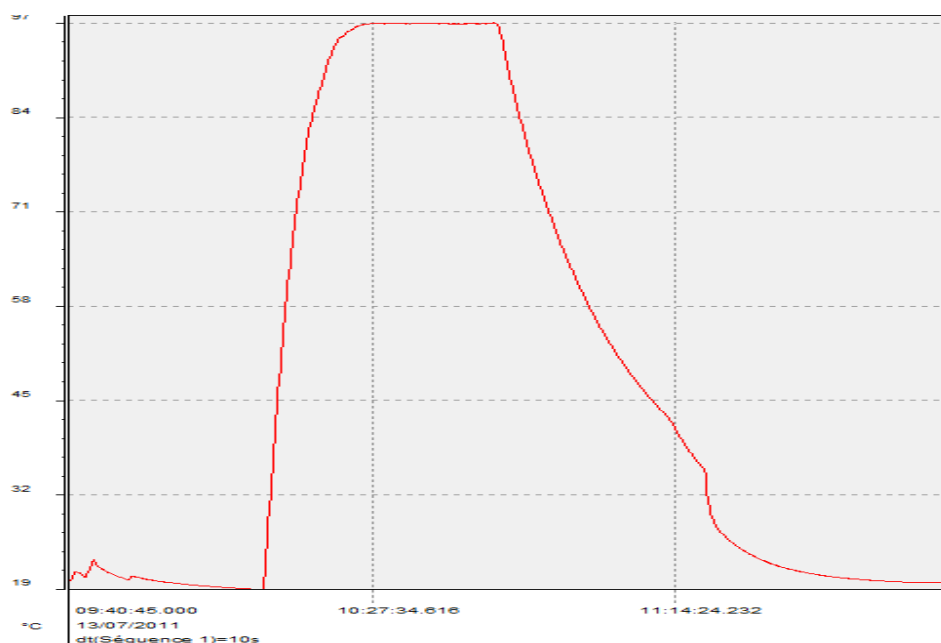


Figure a : Cuisson avant la digestion *in vitro* des feuilles d'ananambo

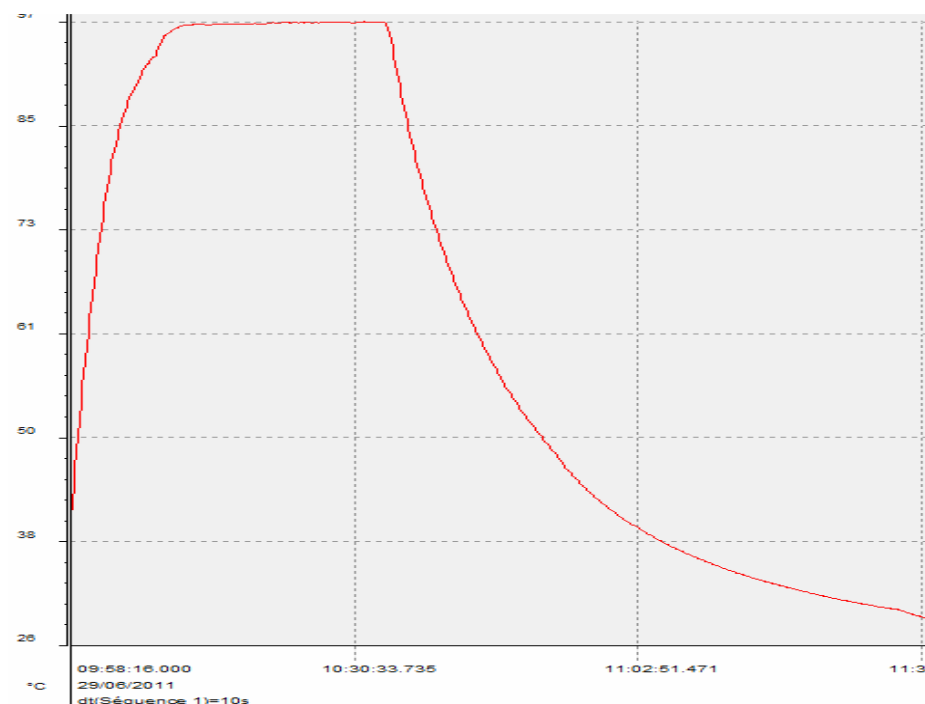


Figure b : Cuisson avant la digestion *in vitro* des feuilles d'anamamy

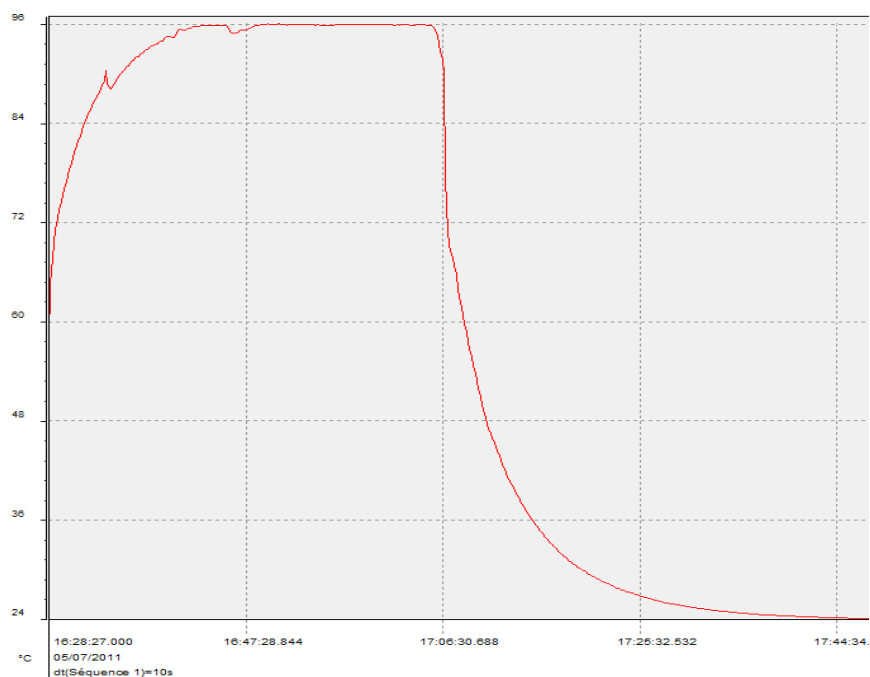


Figure c : Cuisson en grande quantité des feuilles d'anandrano

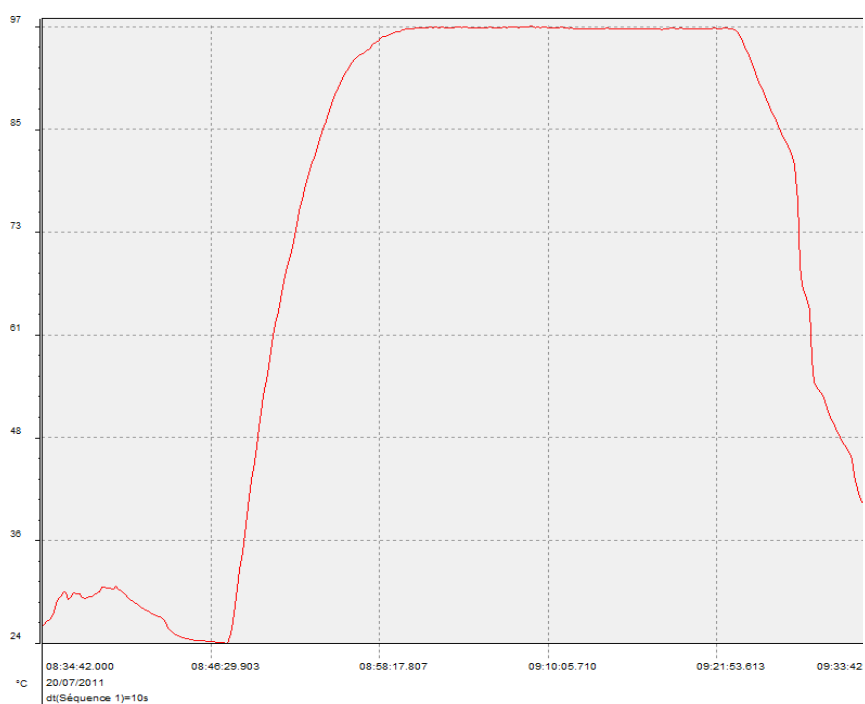


Figure d : Cuisson en grande quantité des feuilles de ravimbomanga

Annexes 3 : Calculs de la bioaccessibilité du fer et du zinc

Une série de calcul a été effectuée avant de pouvoir déterminer la bioaccessibilité du fer et du zinc.

1. Calcul de la masse de fer dans la prise d'essai

$$M_c \text{ Fe} = \text{Conc. Fe} \times V \text{ dissolution}$$

$M_c \text{ Fe}$: masse de fer mesuré dans les cendres de 5 ml de prise d'essai (mg)

Conc. Fe : concentration de fer mesurée par le spectrophotomètre dans 5 ml de prise. (mg/L)

V dissolution : volume d'EUP ayant servi à dissoudre les cendres de la prise d'essai (ml)

2. Calcul de la masse de fer dialysé

$$M_d \text{ Fe} = \frac{M_c \text{ Fe} \times V_d}{V \text{ prise}}$$

V_d : Volume du dialysat (ml)

$M_d \text{ Fe}$: masse de fer dialysé (mg)

V prise : volume de la prise d'essai (volume du dialysat prélevé pour le dosage du fer) (ml)

3. Calcul de la masse de fer réellement dialysé

$$M_{rd} \text{ Fe} = M_d \text{ Fe} - \text{Masse Fe moyen dans les blancs réactifs}$$

$M_{rd} \text{ Fe}$: masse de fer réellement dialysé (µg)

4. Calcul de la masse de fer soluble dans le liquide non dialysé

$$M_{LND} \text{ Fe} = \frac{V_d \times M_{rd} \text{ Fe}}{V_{LND}}$$

$M_{LND} \text{ Fe}$: Masse de fer soluble dans le liquide non dialysé (µg)

V_d : Volume du dialysat (ml)

V_{LND} : Volume du liquide non dialysé (ml)

5. Calcul de la masse de fer bioaccessible

$$M_b \text{ Fe} = M_{rd} \text{ Fe} + M_{LND} \text{ Fe}$$

$M_b \text{ Fe}$: masse de fer bioaccessible (μg)

$M_{rd} \text{ Fe}$: masse de fer réellement dialysé (μg)

$M_{LND} \text{ Fe}$: masse de fer soluble dans le liquide non dialysable (μg)

6. Calcul de la bioaccessibilité du fer

$$\text{Bioaccessibilité Fe \%} = \frac{M_b \text{ Fe} \times 100}{M_p \text{ Fe}}$$

$M_b \text{ Fe}$: masse de fer bioaccessible (μg)

$M_p \text{ Fe}$: masse de fer dans la prise d'essai (dans les 3g de légume feuille digéré) (μg)

Tableau F : Masse de fer dialysé

Légume feuille	Conc. Fe mg/L	V.dissolution (ml)	M Fe dans cendres (mg)	V prise (ml)	V dialysat (ml)	M Fe (mg) dialysé	M Fe (µg) réellement dialysé
JFAy	0,08828498	50	0,0044142	5	10,0867	0,0089	1,37
	0,08787577	50	0,0043938	5	10,4745	0,0092	1,67
FMCrAy	0,07677699	50	0,0038388	5	11,2482	0,0086	1,11
	0,08410246	50	0,0042051	5	10,1592	0,0085	1,01
FMCtAy	0,07782908	50	0,0038915	5	10,9498	0,0085	0,99
	0,08298868	50	0,0041494	5	10,2571	0,0085	0,98
JF Ad	0,08391438	50	0,0041957	5	10,6014	0,0089	1,37
	0,08465677	50	0,0042328	5	10,7679	0,0091	1,59
FMCrAd	0,09832083	50	0,0049160	5	9,9482	0,0098	2,25
	0,07954318	50	0,0039772	5	11,4473	0,0091	1,58
FMCtAd	0,08208875	50	0,0041044	5	10,9513	0,0090	1,46
	0,08408875	50	0,0042044	5	11,3674	0,0096	2,03
JFAb	0,0720793	50	0,0036040	5	11,9770	0,0086	1,10
	0,07906867	50	0,0039534	5	11,1905	0,0088	1,32
FMCrAb	0,08762242	50	0,0043811	5	9,2273	0,0081	0,55
	0,0807868	50	0,0040393	5	10,8824	0,0088	1,26
FMCtAb	0,12445743	50	0,0062229	5	9,9350	0,0124	4,83
	0,11606035	50	0,0058030	5	9,5664	0,0111	3,57
JFRv	0,07957674	50	0,0039788	5	10,3302	0,0082	0,69
	0,07569913	50	0,0037850	5	11,6662	0,0088	1,30
FMCrRv	0,08907806	50	0,0044539	5	11,1544	0,0099	2,41
	0,09502056	50	0,0047510	5	9,4674	0,0090	1,47
FMCtRv	0,10294638	50	0,0051473	5	10,8359	0,0112	3,62
	0,10177138	50	0,0050886	5	10,9221	0,0111	3,59
JFRt	0,08813387	50	0,0044067	5	10,3232	0,0091	1,57
	0,08173527	50	0,0040868	5	10,1768	0,0083	0,79
FMCrRt	0,08681796	50	0,0043409	5	10,6898	0,0093	1,75
	0,085688	50	0,0042844	5	10,5647	0,0091	1,52
FMCtRt	0,20764129	50	0,0103821	5	10,0361	0,0208	13,31
	0,19707653	50	0,0098538	5	10,4481	0,0206	13,06
FPRt	0,19248217	50	0,0096241	5	10,1438	0,0195	11,99
	0,1748921	50	0,0087446	5	10,0311	0,0175	10,01
Blanc Ay	0,10770979	50	0,0053855	5	11,7646	0,0127	
Blanc Ad	0,07796773	50	0,0038984	5	10,1404	0,0079	
Blanc Ab	0,07054472	50	0,0035272	5	10,2292	0,0072	
Blanc Rv	0,05879522	50	0,0029398	5	8,7752	0,0052	
Blanc Rt	0,04876136	50	0,0024381	5	9,6364	0,0047	

Tableau G : Bioaccessibilité du fer

Légume feuille	V dialysat (ml)	M. Fe (μ g) réellement dialysé	Volume LND (ml)	M. Fe (μ g) dans LND	M. Fe (μ g) bioaccessible	M. Fe (μ g) dans la prise	Bioaccessibilité Fe (%)
JF Ay	10,09	1,37	31,19	4,25	5,62	94,21	5,97
	10,47	1,67	31,19	4,99	6,66	94,31	7,06
FMCrAy	11,25	1,11	31,19	3,07	4,17	84,58	4,93
	10,16	1,01	31,19	3,11	4,13	84,64	4,87
FMCtAy	10,95	0,99	31,09	2,82	3,81	84,49	4,51
	10,26	0,98	31,09	2,98	3,96	84,46	4,69
JF Ad	10,60	1,37	31,01	3,99	5,36	45,62	11,75
	10,77	1,59	31,01	4,57	6,15	45,59	13,49
FMCrAd	9,95	2,25	30,99	7,01	9,26	57,11	16,22
	11,45	1,58	30,99	4,26	5,84	57,13	10,22
FMCtAd	10,95	1,46	30,99	4,13	5,59	57,10	9,79
	11,37	2,03	30,99	5,53	7,56	57,07	13,24
JFAb	11,98	1,10	31,23	2,87	3,98	106,09	3,75
	11,19	1,32	31,23	3,68	5,00	105,98	4,71
FMCrAb	9,23	0,55	31,26	1,88	2,43	130,54	1,86
	10,88	1,26	31,26	3,62	4,88	130,38	3,75
FMCtAb	9,93	4,83	31,29	15,23	20,06	130,44	15,38
	10,54	4,44	31,29	13,17	17,61	130,33	13,51
JFRv	10,33	0,69	30,89	2,06	2,75	80,42	3,42
	11,67	1,30	30,89	3,44	4,75	80,53	5,89
FMCrRv	11,15	2,41	30,94	6,67	9,08	70,23	12,93
	9,47	1,47	30,94	4,79	6,26	70,14	8,92
FMCtRv	10,84	3,62	30,84	10,32	13,94	70,21	19,86
	10,92	3,59	30,84	10,12	13,71	70,16	19,54
JFRt	10,32	1,57	31,39	4,77	6,34	76,43	8,29
	10,18	0,79	31,44	2,43	3,22	76,44	4,21
FMCrRt	10,69	1,75	31,29	5,12	6,87	101,43	6,78
	10,56	1,52	31,29	4,51	6,03	101,58	5,94
FMCtRt	10,04	13,31	31,24	41,43	54,74	101,53	53,91
	10,45	13,06	31,24	39,05	52,11	101,64	51,27
FPRt	10,14	11,99	31,39	37,12	49,11	219,01	22,42
	10,03	10,01	31,39	31,33	41,35	219,43	18,84

Tableau H : Masse de zinc dialysé

Ech	Conc. mg/L	V. de dissolution (ml)	M. Zn dans cendres (mg)	Prise (ml)	Volume total du dialysat (ml)	M. Zn (mg) dialysé	M. Zn (µg) réellement dialysé
JFAy	0,044920	50	0,00225	5	10,72	0,0048	2,26
	0,044514	50	0,00223	5	10,47	0,0046	2,10
FMCrAy	0,041614	50	0,00208	5	11,22	0,0046	2,09
	0,041976	50	0,00210	5	11,25	0,0046	2,12
FMCtAy	0,047777	50	0,00239	5	10,95	0,0050	2,53
	0,048698	50	0,00243	5	10,95	0,0051	2,64
JFAd	0,024100	50	0,00121	5	10,60	0,0025	1,34
	0,029170	50	0,00146	5	10,37	0,0030	1,78
FMCrAd	0,024511	50	0,00123	5	10,87	0,0026	1,43
	0,023881	50	0,00119	5	11,45	0,0027	1,48
FMCtAd	0,028993	50	0,00145	5	10,95	0,0032	1,95
	0,025646	50	0,00128	5	11,37	0,0029	1,67
JFAb	0,044838	50	0,00224	5	10,86	0,0048	2,82
	0,041679	50	0,00208	5	11,19	0,0046	2,60
FMCrAb	0,039425	50	0,00197	5	10,89	0,0042	2,25
	0,052063	50	0,00260	5	10,88	0,0056	3,62
FMCtAb	0,033950	50	0,00170	5	9,93	0,0034	1,39
	0,030033	50	0,00150	5	10,54	0,0032	1,18
JFRv	0,029027	50	0,00145	5	10,33	0,0030	1,00
	0,036572	50	0,00183	5	10,09	0,0037	1,68
FMCrRv	0,041184	50	0,00206	5	9,47	0,0039	1,90
	0,040651	50	0,00203	5	9,47	0,0038	1,83
FMCtRv	0,034303	50	0,00172	5	10,84	0,0037	1,68
	0,037573	50	0,00188	5	10,00	0,0037	1,73
JFRt	0,063171	50	0,00316	5	10,32	0,0065	4,96
	0,049863	50	0,00249	5	10,18	0,0050	3,52
FMCrRt	0,048811	50	0,00244	5	10,69	0,0052	3,65
	0,048765	50	0,00244	5	10,59	0,0052	3,62
FMCtRt	0,044964	50	0,00225	5	10,10	0,0045	3,00
	0,044187	50	0,00221	5	10,45	0,0046	3,07
FPRt	0,044510	50	0,00223	5	10,19	0,0045	3,00
	0,035993	50	0,00180	5	10,03	0,0036	2,08
Blanc Ay	0,021115	50	0,00106	5	11,76	0,0025	
Blanc Ad	0,011784	50	0,00059	5	10,14	0,0012	
Blanc Ab	0,019542	50	0,00098	5	10,23	0,0020	
Blanc Rv	0,015018	50	0,00075	5	8,78	0,0013	
Blanc Rt	0,015839	50	0,00079	5	9,64	0,0015	

Tableau I : Bioaccessibilité du zinc

	V dialysat (ml)	M Zn (µg) réellement dialysé	Volume LND (ml)	M Zn (µg) dans LND	M Zn (µg) Bioaccessible	M Zn (µg) dans la prise	Bioaccessibilité Zn %
JFAy	10,09	1,39	31,19	4,30	5,69	17,36	32,76
	10,47	2,10	31,19	6,26	8,37	17,38	48,14
FMCrAy	11,22	2,09	31,09	5,79	7,88	16,37	48,15
	10,16	1,88	31,19	5,76	7,63	16,37	46,64
FMCtAy	10,95	2,53	31,09	7,17	9,70	16,34	59,34
	10,26	2,01	31,09	6,10	8,11	16,33	49,66
JFAd	10,60	0,97	31,01	2,82	3,79	18,78	20,18
	10,37	1,44	31,01	4,29	5,73	18,78	30,49
FMCrAd	10,87	1,07	30,99	3,06	4,14	15,35	26,94
	11,45	1,14	30,99	3,10	4,24	15,33	27,66
FMCtAd	10,95	1,59	30,99	4,49	6,07	15,32	39,62
	11,37	1,33	30,99	3,61	4,94	15,32	32,25
JFAb	11,98	2,37	31,23	6,19	8,56	24,27	35,27
	11,19	2,60	31,23	7,26	9,86	24,25	40,68
FMCrAb	10,89	2,25	31,26	6,45	8,69	21,90	39,69
	10,88	3,62	31,26	10,40	14,02	21,87	64,12
FMCtAb	9,93	1,39	31,29	4,36	5,75	21,87	26,27
	10,54	1,18	31,29	3,50	4,68	21,86	21,43
JFRv	11,67	2,00	30,89	5,29	7,29	17,00	42,84
	10,09	1,68	30,89	5,16	6,84	17,00	40,22
FMCrRv	9,47	1,90	30,94	6,20	8,10	14,09	57,47
	9,47	1,83	30,94	5,99	7,82	14,07	55,54
FMCtRv	10,84	1,68	30,84	4,78	6,46	14,09	45,88
	10,00	1,73	30,84	5,33	7,06	14,10	50,09
JFRt	10,32	4,93	31,39	15,00	19,93	65,23	30,55
	10,18	3,48	31,44	10,77	14,25	65,24	21,84
FMCrRt	10,69	3,63	31,29	10,62	14,25	86,06	16,56
	10,59	3,58	31,29	10,56	14,14	86,09	16,42
FMCtRt	10,04	3,41	31,24	10,60	14,01	86,14	16,26
	10,10	2,95	31,24	9,13	12,08	86,19	14,02
FPRt	10,19	2,95	31,39	9,08	12,02	47,96	25,07
	10,14	4,12	31,39	12,76	16,88	48,10	35,10

Author : ANDRIANALIZAH Tsiry Aina

Title : « Measure of *in vitro* digestibility of iron and zinc of some Malagasy green leafy vegetables »

Advisor and co-advisor : Pr.RALISON Chalotte and Dr.HEMERY Youna

Abstract

An *in vitro* digestion method, which simulates the physiological conditions of the human gastro-intestinal digestion, was applied on 5 species of Malagasy green leafy vegetables (GLV). This method allowed measuring the variations of iron and zinc bioaccessibility, depending on the maturity stage of the leaves. The influence of two processes (hydrothermal cooking and grinding of the leaves) was also evaluated. The biochemical analysis of the leaves allowed to determine which antinutritional factors influenced the most the bioaccessibility of iron and zinc, and to show that GLV are relatively rich in minerals.

Mature leaves of Anandrano were found to contain the most bioaccessible iron (13%), while the Ananambo leaves presented the lowest iron bioaccessibility (2.8%). The proportion of bioaccessible iron increased depending on the maturity of Ravimbomanga leaves, whereas the maturity stage did not influence the iron bioaccessibility for the 4 other species (Anandrano, Anamamy, Ananambo and Ravitoto). However, hydrothermal cooking improved greatly the bioaccessibility of iron for the leaves of Ananambo, Ravimbomanga and Ravitoto.

The proportion of zinc bioaccessibility was high for all the GLV studied : up to 50% for some of the crude or cooked leaves. The proportion of bioaccessible zinc increased with the leaves maturity, except for the Anandrano. After hydrothermal cooking, the bioaccessibility of zinc was increase for the species Anandrano and Ravimbomanga, whereas it was decreased in the case of Ananambo leaves.

The grinding of Ravitoto leaves simultaneously improved the bioaccessibility of zinc and iron. More generally, the variations of iron and zinc bioaccessibility were correlated to the phenolic, phytic acid, tannin, and pectin contents of the leaves.

Key words: *in vitro* digestion, bioaccessibility, iron, zinc, green leafy vegetables, maturity antinutritional factors, hydrothermal cooking, grinding.

Auteur : ANDRIANALIZAH Tsiry Aina

Titre : « Mesure de la digestibilité *in vitro* du fer et du zinc de quelques légumes feuilles Malgaches »

Encadreur et co-encadreur : Pr.RALISON Charlotte et Dr.HEMERY Youna

Résumé

Une méthode de digestion *in vitro*, simulant les conditions physiologiques de la digestion gastro-intestinale, a été appliquée à 5 légumes feuilles Malgaches. Cette technique a permis de mesurer les variations de la bioaccessibilité (*i.e.* digestibilité) du fer et du zinc suivant le degré de maturité des feuilles. L'effet de deux traitements technologiques (la cuisson et le pilage) sur le pourcentage de fer et de zinc bioaccessible a été évalué. Ensuite, les principaux facteurs antinutritionnels influençant la bioaccessibilité du fer et du zinc ont été déterminés. Les analyses de composition ont permis de constater que les légumes feuilles sont relativement riches en minéraux.

Les feuilles matures d'anandrano contiennent le plus de fer bioaccessible (13%) et les feuilles d'ananambo présentent la plus faible bioaccessibilité de fer (2,8%). Le pourcentage de fer bioaccessible s'accroît au cours de la maturation des feuilles de ravimbomanga. En revanche le degré de maturité n'a aucune influence sur la bioaccessibilité du fer dans les feuilles d'anandrano, d'anamamy, d'ananambo et de ravitoto. La cuisson améliore considérablement la bioaccessibilité du fer dans les feuilles d'ananambo, de ravimbomanga et de ravitoto.

Le pourcentage de zinc bioaccessible est élevé dans les légumes feuilles étudiés, pouvant atteindre plus de 50% pour certaines feuilles crues ou cuites. Le zinc bioaccessible augmente avec l'âge physiologique des feuilles, excepté pour l'anandrano. Au cours de la cuisson, la bioaccessibilité du zinc dans les feuilles d'anandrano et de ravimbomanga augmente, par contre elle diminue chez l'ananambo.

Le pilage améliore simultanément la bioaccessibilité du fer et du zinc des feuilles de ravitoto.

De manière générale, les variations de la bioaccessibilité du fer et du zinc sont corrélées à la teneur en composés phénoliques, en phytates, en tannins condensés et en pectines.

Mots clés : digestion *in vitro*, bioaccessibilité, fer, zinc, légumes feuilles, maturité, facteurs antinutritionnels, cuisson, pilage.

