



**HAL**  
open science

**Propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des protéines  
de tourteaux, de concentrats et d'isolats de  
Ricinodendron heudelotii (Bail.) Pierre ex Pax et de  
Tetracarpidium conophorum (Müll. Arg.)**

Laurette Blandine Mezajoug Kenfack

► **To cite this version:**

Laurette Blandine Mezajoug Kenfack. Propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des protéines de tourteaux, de concentrats et d'isolats de Ricinodendron heudelotii (Bail.) Pierre ex Pax et de Tetracarpidium conophorum (Müll. Arg.). Biotechnologies. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2010. Français. NNT : 2010INPL013N . tel-01748823

**HAL Id: tel-01748823**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748823v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**INSTITUT**

**NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules

**UNIVERSITE DE NGAOUNDERE**

Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro - Industrielles

Laboratoire de Biochimie et Technologie Alimentaire

---

**THESE**

Présentée devant l'institut National Polytechnique de Lorraine

Pour obtenir le grade de

Docteur de L'INPL et Docteur Ph.D de l'Université de Ngaoundéré

*Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires*

Par

**Laurette Blandine MEZAJOUG KENFACK**

---

**PROPRIETES NUTRITIONNELLES ET FONCTIONNELLES DES PROTEINES DE  
TOURTEAUX, DE CONCENTRATS ET D'ISOLATS DE *Ricinodeudron heudelotii*  
(Bail.) Pierre ex Pax ET DE *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg)**

---

Soutenue publiquement le 07 avril 2010 devant la commission d'examen

**Directeur de thèse :** Michel LINDER Professeur, LIBio, ENSAIA-INPL de Nancy

**Co – directeur de thèse :** Clergé TCHIEGANG Professeur, ENSAI de Ngaoundéré

**Composition du jury :**

*Président du jury :* Michel PARMENTIER Professeur, LIBio, ENSAIA-INPL de Nancy

*Rapporteurs :* Pierre Yves PONTALIER Maître de conférences, ENSIACET, Toulouse  
Paul MOUNDIPA FEWOU Maître de conférences, Faculté des science  
Yaoundé

*Examineurs :* Paul Henri AMVAM ZOLLO Professeur, Recteur de l'Université de  
Ngaoundéré  
Carl Moses MBOFUNG Professeur, Directeur ENSAI de Ngaoundéré  
Jacques FANNI Professeur, LIBio, ENSAIA-INPL de Nancy

## REMERCIEMENTS

Cette Thèse a été élaborée dans les Laboratoires de Science et Génie Alimentaires (LSGA), d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) de l'ENSAIA-INPL de Nancy et dans le laboratoire de Biochimie et Technologie Alimentaire (LBTA) de l'unité de formation doctorale et de spécialisation en Sciences Alimentaires et Nutrition de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences Agro-industrielles de l'Université de Ngaoundéré.

Ce travail a bénéficié du financement de l'IFS (International Foundation for Science), de la Coopération française et du Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules de l'ENSAIA-INPL- Nancy (France).

J'exprime mes sincères remerciements aux:

- Professeur Stéphane DESOBRY pour m'avoir accueillie au sein du LSGA de l'ENSAIA-INPL (France),
- Professeur Joël SCHER, Directeur du LIBio de l'ENSAIA - INPL (France). Je suis reconnaissante pour le soutien apporté par le laboratoire pour la finalisation de cette thèse,
- Professeur Clergé TCHIEGANG, enseignant à l'ENSAI et responsable du LBTA de l'Université de Ngaoundéré, pour l'intérêt porté à ce travail. Je lui reconnais l'initiation à la recherche depuis mon mémoire de maîtrise en Biologie Appliquée et la diversité de mes sujets,
- Professeur Michel LINDER, enseignant à l'ENSAIA - INPL (France), pour avoir accepté de co - diriger cette thèse et pour l'intérêt particulier apporté à ce sujet,
- Pr. Michel Parmentier pour avoir contribué à la réalisation de ces travaux en me confiant au Pr. Linder,
- Professeur Paul Henri AMVAM ZOLLO, Recteur de l'Université de Ngaoundéré pour avoir accepté de signer cette co – tutelle et participer à mon jury,

- Professeur Carl Moses MBOFUNG, Directeur de l'ENSAI et Responsable de la formation doctorale pour ses nombreux conseils, suggestions et sa participation à mon jury,
- Professeur Robert NDJOUENKEU, Chef du Département de Sciences Alimentaires et Nutrition, pour sa disponibilité et ses nombreux conseils,
- Tous les Enseignants de l'ENSAI et particulièrement les Professeurs Richard KAMGA, Jean Bosco TCHATCHUENG, pour leur collaboration et leur écoute.

Ma reconnaissance et ma profonde gratitude vont également à :

- Professeur Jacques FANNI et Dr. Elmira Arab – Tehrany pour leur disponibilité
- Mesdames Anne LAPLACE- CHASSARD, Carole JEANDEL, Carole PERROUD et Marie Noëlle MAUCOURT du LiBio,
- Cédric Paris du LiBio, pour les analyses HPLC / SM
- Les doctorants du LiBio pour leur convivialité particulièrement, Smail, Nabila, Tin-hinam, Leila
- Mes camarades de l'Université de Ngaoundéré (Dr. Carine TCHANKOU, Dr. Hélène Carole EDIMA, Dr. Désiré MBOUGUENG, Dr. Elie Djantou, Horliane GHOMDZIM),
- Tous les étudiants du LBTA de l'ENSAI de l'Université de Ngaoundéré,
- Tous mes frères et sœurs particulièrement Pascaline et Sandrine,
- Tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude.

## COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

### Communications scientifiques

**Mezajoug Kenfack L. B.,** Tchiégang C. (2005). Propriétés physico – chimiques et fonctionnelles des tourteaux de deux Euphorbiacées du Cameroun: *Riconodendron heudelotii* (Bail) and *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg.). In : 3<sup>ème</sup> Séminaire sur la Technologie de l'information au service de la Nutrition en Afrique à Cape Town en Afrique du Sud : 14 – 20 Septembre 2005.

**Mezajoug Kenfack L. B.,** Clergé Tchiegang (2005). Influence de la cuisson sur quelques substances antinutritionnelles et la digestibilité « *in Vitro* » des protéines des tourteaux de deux Euphorbiacées du Cameroun : *Riconodendron heudelotii* (Bail) and *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg.). 12<sup>ème</sup> conférence annuelle du comité camerounais de biosciences du 15 au 17 décembre 2005 ; CNRES yaoundé – cameroun.

**Mezajoug Kenfack L. B.,** M. Linder, C. Tchiégang (2010). Qualité nutritionnelle des protéines des isolats de deux oleoprotéagineux du Cameroun : *Ricinodendron heudelotii* et *Tetracarpidium conophorum*. Séminaire Ecole doctorale RP2E du 28 janvier 2010, Faculté des Sciences, Vandoeuvre Nancy.

### Publications

C. Tchiegang, **L. B. Mezajoug Kenfack,** D. Tenin, R. Ndjouenkeu (2005). Physicochemical and functional properties of defatted cakes of two Euphorbiaceae from Cameroon:

*Riconodendron heudelotii* (Bail) and *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg.). *Journal of Food Technology*, **4** (2): 96 – 100.

**L.B. Mezajoug Kenfack**, E. Arab – Tehrany, C. Tchiégang, M. Linder (2010). Compositional and nutritional studies of two defatted flours obtained from *Ricinodendron heudelotii* (Bail.) and *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg.). Soumis à *Journal of Food Science*.

## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	i
COMMUNICATIONS ET PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	iii
SOMMAIRE.....	v
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xvi
LISTE DES FIGURES.....	xviii
LISTE DES PLANCHES.....	xxi
LISTE DES TABLEAUX.....	xxii
RESUME.....	xxiv
ABSTRACT.....	xxv
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>5</b>
CHAPITRE I : GENERALITES SUR <i>Ricinodendron heudelotii</i> ET <i>Tetracarpidium conophorum</i> .....	5
I. Rappels botaniques et ethnobotaniques.....	5
1. <i>Ricinodendron heudelotii</i> (Bail.).....	5
2. <i>Tetracarpidium conophorum</i> (Müll. Arg.).....	6
II. Obtention et utilisations des amandes de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> .....	8
III. Quelques résultats de recherche sur les amandes des deux plantes.....	8
1. <i>Ricinodendron heudelotii</i> (Bail.).....	8
2. <i>Tetracarpidium conophorum</i> (Müll. Arg.).....	9
CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES PROTEINES ALIMENTAIRES.....	11
I. Les albumines.....	11
II. Les globulines.....	11
III. Les prolamines.....	12

IV. Les glutélines.....	12
CHAPITRE III : SITUATION MONDIALE DE L'ALIMENTATION EN	
PROTEINES VEGETALES.....	13
I. Production mondiale des sources de protéines végétales	13
II. La malnutrition protéique et ses conséquences en Afrique	14
CHAPITRE IV : GENERALITES SUR LE METABOLISME DES PROTEINES.....	
I. Besoins de l'homme en protéines alimentaires.....	16
II. Digestion des protéines	17
1. Modes d'action de la pepsine, de la chymotrypsine et de la trypsine.....	18
1.1. La pepsine.....	18
1.2. La trypsine.....	18
1.3. La chymotrypsine.....	18
III. Absorption intestinale de l'azote issu des protéines digérées.....	19
CHAPITRE V : EFFETS DES FIBRES ALIMENTAIRES SUR LA DIGESTION DES	
PROTEINES.....	21
I. Définition.....	21
II. Les différentes classes de fibres alimentaires.....	21
III. Propriétés physiologiques des fibres.....	21
1. Effets sur l'ingestion.....	22
2. Effets gastriques et effets sur l'intestin – grêle.....	22
3- Effets sur le côlon.....	22
4. Effets des différentes classes de fibres.....	23
4.1. Effets digestifs des fibres ADF	23
4.2. Effets digestifs des fibres NDF	24
CHAPITRE VI : GENERALITES SUR LA VALEUR NUTRITIONNELLE DES	

PROTEINES ALIMENTAIRES ET SUR LES METHODES DE SA MESURE.....	25
I. Teneurs en protéines.....	25
II. Qualité de la protéine et disponibilité des acides aminés.....	25
III. Facteurs pouvant influencer la digestibilité des protéines.....	26
1. Facteurs intrinsèques.....	26
1.1. Les substances antinutritionnelles.....	26
1.1.1. Interactions protéines – inhibiteurs de protéases.....	27
1.1.2. Interactions protéines – phytates.....	27
1.1.3. Interactions protéines – composés phénoliques.....	29
1.1.4. Interactions protéines – tanins.....	29
1.1.4. Interactions protéines – oxalates.....	31
2. Facteurs extrinsèques.....	32
2.1. Les traitements thermiques.....	32
2.2. Les traitements alcalins.....	33
2.3. Les traitements mécaniques : le broyage.....	34
IV. Méthodes de mesure de la valeur nutritionnelle des protéines.....	34
1. Méthodes biologiques.....	35
1.1. La digestibilité <i>in vitro</i> .....	35
1.2. La digestibilité <i>in vivo</i> .....	36
1.2.1. Choix et justificatif de l'animal.....	36
1.2.2. Notions préliminaires sur l'expérimentation animale.....	37
1.2.3. Paramètres de mesure de la croissance des rats : méthode des poids...	37
1.2.4. Paramètres de mesure de l'azote retenu : méthode des bilans.....	38
2. Méthodes chimiques.....	39
3. Méthode du PDCAAS.....	39

<b>PARTIE II : ETUDE DE LA CUISSON DES GRAINES.....</b>	<b>41</b>
I. Introduction.....	41
II. Matériel vegetal.....	42
III. Méthodologie expérimentale.....	42
1. Cuisson des graines et broyage des amandes.....	42
2. Détermination de la matière sèche.....	44
3. Délipidation des amandes broyées.....	44
4. Teneurs en cendres totales.....	44
5. Teneurs en lysine disponible et en quelques substances antinutritionnelles .....	45
5.1. Teneurs en lysine disponible.....	45
5.2. Teneurs en tanins.....	46
5.2.1. Extraction des tanins.....	46
5.2.2. Dosage des tanins.....	46
5.3. Teneurs en oxalates solubles et en oxalates totaux.....	47
5.4. Teneurs en inhibiteurs de trypsine.....	47
5.4.1. Préparation des solutions et étalonnage.....	47
5.4.2. Expression des résultats.....	48
6. Cinétique de digestibilité <i>in vitro</i> des protéines brutes des tourteaux .....	48
IV. Analyses statistiques.....	49
V. Résultats et discussion.....	50
1. Matière sèche.....	50
2. Teneurs en cendres totales.....	52
3. Teneurs en protéines brutes totales.....	52
4. Teneurs en lysine disponible.....	53
5. Teneurs en oxalates solubles et en oxalates totaux.....	53

5.1. Oxalates solubles.....	53
5.2. Oxalates totaux.....	54
6. Activité inhibitrice de la trypsine.....	55
7. Teneurs en tanins.....	55
8. Digestibilité in vitro des protéines brutes.....	56
VI. CONCLUSION PARTIELLE.....	58

**PARTIE III : INFLUENCE DE LA GRANULOMETRIE SUR LA  
COMPOSITION PHYSICO - CHIMIQUE DES TOURTEAUX DE**

*Ricinodendron heudelotii* ET DE *Tetracarpidium*

<i>conophorum</i> .....	60
I. Introduction.....	60
II. Matériel vegetal.....	61
III. Méthodologie expérimentale.....	61
1. Etude la répartition granulométrique des tourteaux.....	61
2. Densité des tourteaux.....	63
3. Détermination de l'azote total et de l'azote protéique.....	63
4. Teneurs en cendres totales.....	63
5. Teneurs en sucres solubles et en sucres totaux.....	63
6. Teneurs en fibres brutes.....	64
7. Teneurs en fibres NDF.....	65
8. Teneurs en fibres ADF.....	65
9. Teneurs en composés phénoliques bruts totaux et en tanins.....	65
9.1. Dosage des composés phénoliques bruts totaux.....	65
9.2. Dosage des tanins.....	66

10. Teneurs en phytates.....	66
10.1. Extraction des phytates.....	66
10.2. Dosage des phytates.....	67
11. Teneurs en oxalates solubles et en oxalates totaux.....	68
IV. Analyses statistiques .....	68
V. Résultats et discussion.....	68
1. Répartition granulométrique des tourteaux.....	68
2. Densité des tourteaux.....	69
3. Teneurs en protéines brutes totales.....	70
4. Teneurs en protéines totales vraies.....	71
5. Teneurs en cendres totales.....	73
6. Teneurs en sucres solubles et en sucres totaux.....	73
7. Teneurs en fibres brutes, ADF et NDF.....	74
7.1. Fibres brutes.....	74
7.2. Fibres ADF.....	75
7.3. Fibres NDF.....	75
8. Teneurs en quelques substances antinutritionnelles dans les fractions des tourteaux.....	76
8.1. Teneurs en composés phénoliques bruts totaux et en tanins.....	76
8.1.1. Teneurs en composés phénoliques bruts totaux.....	76
8.1.2. Teneurs en tanins.....	77
8.2. Teneurs en phytates.....	79
8.3. Teneurs en oxalates solubles et en oxalates totaux .....	79
VI. Conclusion partielle.....	80

## **PARTIE IV : PREPARATION DES CONCENTRATS ET DES**

# ISOLATS PROTEIQUES ET LEURS CARACTERISATIONS

<b>CHIMIQUES ET FONCTIONNELLES.....</b>	<b>81</b>
I. Introduction.....	81
I. Les protéines brutes des tourteaux : solubilité, préparation des concentrats et des isolats protéiques.....	82
1. Solubilité des tourteaux broyés et tamisés.....	82
2. Choix d'un pH isoélectrique des protéines des tourteaux.....	83
3. Préparation des concentrats protéiques.....	83
4. Préparation des isolats protéiques.....	85
II. Caractérisation chimique et fonctionnelle des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques.....	88
1. Composition en quelques constituants chimiques des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques.....	88
1.1. Teneurs en minéraux.....	88
1.1.1. Dosage du sodium, potassium, calcium et magnésium.....	89
1.1.2. Dosage du phosphore.....	89
1.2.3. Dosage du fer.....	90
2. Mesure des paramètres trichromatiques.....	91
3. Electrophorèse des protéines sur SDS – PAGE.....	91
3.1. Préparation du gel de séparation.....	92
3.2. Préparation du gel de concentration.....	92
3.3. Préparation des extraits protéiques.....	92
3.4. Migration proprement dite.....	93
4. Extraction et analyse des lipides résiduels des tourteaux.....	93
4.1. Extraction des lipides résiduels.....	94

4.2. Analyse des lipides résiduels.....	94
4.2.1. Chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme.....	94
4.2.1.1. Principe de la chromatographie à flamme – Iatroscan.....	95
4.2.1.2. Quantification des phospholipides.....	95
4.2.2. Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse.....	96
4.2.2.1. Préparation des esters méthyliques.....	96
4.2.2.2. Analyse par chromatographie en phase gazeuse.....	97
4.2.3. Identification des classes de phospholipides par HPLC – SM.....	97
5. Indice de solubilité et solubilité des protéines brutes, des concentrats et des isolats protéiques.....	98
6. Capacités de rétention d'eau et d'huile.....	98
7. Capacité gélifiante.....	99
8. Capacité émulsifiante et stabilité des émulsions.....	99
9. Capacité moussante et stabilité des mousses.....	100
III. Analyses statistiques.....	100
IV. Résultats et discussion.....	100
1. Solubilité des protéines brutes des tourteaux.....	100
2. Choix d'un point isoélectrique minimum des protéines des tourteaux.....	105
3. Préparation des concentrats et des isolats protéiques.....	106
4. Caractérisation physico – chimique des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques préparés.....	106
4.1. Teneurs en protéines brutes totales.....	106
4.2. Teneurs en cendres totales.....	107

4.3. Teneurs en minéraux.....	108
4.4. Teneurs en sucres solubles et en sucres totaux.....	109
4.5. Teneurs en fibres brutes, ADF et NDF.....	109
4.6. Teneurs en phytates et en composés phénoliques.....	110
4.6.1. Teneurs en phytates.....	110
4.6.2. Teneurs en composés phénoliques.....	111
5. Analyse des couleurs.....	111
6. Electrophorèse des protéines sur SDS – PAGE.....	113
7. Teneurs en lipides résiduels des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques.....	116
7.1. Profil chromatographique des lipides extraits des tourteaux, des concnetrats et des isolats protéiques.....	118
7.2. Composition en acides gras des phospholipides des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques.....	118
7.3. Classe des phospholipides des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques.....	121
8. Propriétés fonctionnelles des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques...	122
8.1. Indice de solubilité.....	122
8.2. Solubilité des protéines brutes.....	123
8.3. Capacité de rétention d'eau et d'huile.....	124
8.3.1. Capacité de rétention d'eau.....	124
8.3.2. Capacité de rétention d'huile.....	126
8.4. Capacité gélifiante.....	126
8.5. Capacité émulsifiante et stabilité des émulsions.....	127
8.6. Capacité moussante et stabilité des mousses.....	128

V. Conclusion Partielle.....	129
<b>PARTIE V : COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET DIGESTIBILITE DES PROTEINES DE TOURTEAUX, DE CONCENTRATS ET D'ISOLATS</b>	
<b>PROTEIQUES.....</b>	<b>130</b>
I. Introduction.....	130
II. Matériel végétal.....	131
III. Méthodologie expérimentale.....	131
1. Composition en acides aminés.....	131
2. Détermination du tryptophane.....	132
2.1. Hydrolyse des échantillons.....	132
2.2. Dosage colorimétrique.....	133
3. Calcul de l'indice chimique.....	134
4. Digestibilités enzymatiques <i>in vitro</i> des protéines.....	134
4.1. Mesure du degré d'hydrolyse par la méthode du pH – stat.....	134
4.2. Mesure de la digestibilité après dialyse.....	136
5. Digestibilité <i>in vivo</i> des protéines.....	136
5.1. Préparation des aliments pour la digestibilité <i>in vivo</i> .....	137
5. 2. Procédure expérimentale.....	138
5.3. Paramètres de mesure de la croissance des rats.....	141
5. 4. Paramètres de mesure de l'azote retenu.....	141
IV. Correction des résultats de la digestibilité protéique par la méthode du PDCAAS.....	142
V. Analyses statistiques.....	142
VI. Résultats et discussion.....	143
1. Composition en acides aminés et indices chimiques.....	143
2. Digestibilités enzymatiques.....	147

2.1. Mesure de la digestibilité par degré d'hydrolyse.....	147
2.2. Digestibilité <i>in vitro</i> des protéines dans des sacs à dialyse.....	149
2.3. Digestibilité réelle <i>in vitro</i> corrigée par l'indice chimique.....	152
3. Digestibilité <i>in vivo</i> .....	153
3- 1 – Aliment ingéré, azote ingéré, azote excrété.....	153
3- 2 – Evolution du poids.....	156
3- 3 – Indice de consommation.....	157
3- 4 – Coefficient d'efficacité protéique.....	159
3- 5 - Coefficient d'efficacité protéique net.....	160
3 - 6 – Coefficient de digestibilité.....	160
3 – 7 – Valeur biologique.....	162
3 – 8 – Utilisation protéique nette.....	163
3- 9 – Correlations <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> .....	164
VII. Conclusion partielle.....	166
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>167</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>170</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>I</b>
<b>ANNEXE 1:</b> Extraction et dosage des oxalates solubles et des oxalates totaux.....	<b>I</b>
<b>ANNEXE 2 :</b> Résultats bruts de la digestibilité <i>in vitro</i> des protéines brutes en présence de la pepsine et de la pancréatine.....	<b>IV</b>
<b>ANNEXE 3:</b> Répartitions granulométriques des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> .....	<b>V</b>
<b>ANNEXE 4 :</b> Evolution de poids des rats durant l'expérimentation.....	<b>VI</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

AAE : Acides Aminés Essentiels

AGMI : Acide Gras Monoinsaturé

AGPI : Acide Gras polyinsaturé

AGS : Acide Gras Saturé

AAT : Acides Aminés Totaux

AZ : Azote libéré

CDCAAS : Coefficient de Digestibilité corrigé par l'indice chimique des acides aminés

CEP : Coefficient d'Efficacité Protéique

CEPCAAS : Coefficient d'Efficacité Protéique Corrigé par l'indice chimique des acides aminés

CEPN : Coefficient d'Efficacité Protéique Net

CEPNCAAS : Coefficient d'Efficacité Protéique Net corrigé par l'indice chimique des acides aminés

CR : Coefficient de Rétention

CORH : Concentrat protéique de *R. heudelotii*

COTC : Concentrat protéique de *T. conophorum*

CUD : Coefficient d'Utilisation Digestive

DH : Degré d'Hydrolyse

IC : Indice Chimique

IC<sub>1</sub> : plus faible indice chimique

ICons : Indice de Consommation

ISRH : Isolat protéique de *R. heudelotii*

ISTC : Isolat protéique de *T. conophorum*

MM : Marqueur Moléculaire

MS : Matière Sèche

PDCAAS : Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score

TORH : Tourteau de *R. heudelotii*

TOTC : Tourteau de *T. conophorum*

UPNCAAS: Utilisation Protéique Nette corrigée par l'indice chimique des acides aminés

VB : Valeur Biologique

VBCAAS: Valeur biologique corrigée par l'indice chimique des acides aminés

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : métabolisme protéique et différentes formes d'azote excrétées (Culioli, 1999)	19
Figure 2 : interactions protéines phytates à pH acide et à pH neutre (Anderson, 1985)	28
Figure 3 : réactions des composés phénoliques avec les protéines (Hurrell et <i>al.</i> , 1982)	30
Figure 4: réactions des oxalates avec les protéines	32
Figure 5 : réactions de formation des produits d'Amadori et de Heyns (réaction de Maillard)	33
Figure 6 : équations de formation de la déhydroalanine (DHA) et de la lysinoalanine	34
Figure 7 : schéma expérimental pour l'étude de la cuisson des graines de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> en fonction du temps	43
Figure 8 : digestibilité <i>in vitro</i> des protéines des amandes délipidées de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i>	57
Figure 9 : schéma synoptique pour l'étude de l'influence de la granulométrie sur la composition physico – chimique des tourteaux de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i>	62
Figure 10 : proportions des tourteaux de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> en fonction des fractions granulométriques	69
Figure 11 : densités des tourteaux tamisés ou non de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i>	70
Figure 12: procédé de préparation des concentrats protéiques à partir des fractions 400 – 500 µm des tourteaux broyés et tamisés de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i>	85
Figure 13 : procédé de préparation des isolats protéiques à partir des fractions 400 – 500 µm des tourteaux broyés et tamisés de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i>	87
Figure 14: équation de réaction du fer ferreux avec l'orthophénantroline	90
Figure 15: schéma du principe de l'analyseur Iatroscan MK – 5	95
Figure 16 A : courbes de solubilité des protéines brutes de <i>R. heudelotii</i> en fonction du pH à différentes concentrations en NaCl	102
Figure 16 A : courbes de solubilité des protéines brutes de <i>R. heudelotii</i> en fonction du pH à	

différentes concentrations en NaOH	102
Figure 17 A : solubilité des protéines brutes de <i>T. conophorum</i> en fonction du pH à différentes concentrations en NaCl	103
Figure 17 B : solubilité des protéines brutes de <i>T. conophorum</i> en fonction du pH à différentes concentrations en NaOH	103
Figure 18: Solubilité des protéines des tourteaux de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> en fonction du pH dans une solution de NaOH 0,2 %	105
Figure 19 : profils électrophorétiques des protéines des tourteaux, des concentrats et des isolats de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> sur gel SDS-PAGE	114
Figure 20 : profil CCM Iatroskan des extraits au chloroforme / méthanol (2 / 1 : v / v) du tourteau de <i>R. heudelotii</i>	116
Figure 21 A : solubilité en fonction du pH et du NaCl 0,2 M des protéines brutes du tourteau, du concentrat et de l'isolat protéique de <i>R. heudelotii</i>	123
Figure 21 B : solubilité en fonction du pH et du NaCl 0,2 M des protéines brutes du tourteau, du concentrat et de l'isolat protéiques de <i>T. conophorum</i>	123
Figure 22 : organigramme pour l'étude de la digestibilité <i>in vivo</i>	140
Figure 23 A : azote libéré après digestion des protéines du tourteau, du concentrat et de l'isolat protéique de <i>R. heudelotii</i> pendant 6 h.	150
Figure 23 B : azote libéré après digestion des protéines du tourteau, du concentrat et de l'isolat protéique de <i>T. conophorum</i> pendant 6 h.	150
Figure 24 A : évolution de poids des rats nourris aux échantillons de <i>R. heudelotii</i> pendant 15 jours d'expérimentation	156
Figure 24 B : évolution de poids des rats nourris aux échantillons de <i>T. conophorum</i> (B) pendant 15 jours d'expérimentation	156
Figure 25 : CD et CDCAAS des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de <i>R.</i>	

<i>heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> comparés à ceux de la caséine	161
Figure 26 : VB et VBCAAS des tourteaux, des concentrats et d'isolats protéiques de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> comparés à ceux de la caséine	162
Figure 27 : UPN et UPNCAAS des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de <i>R.</i> <i>heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> comparés à ceux de la caséine	163

## LISTE DES PLANCHES

Planche 1 : photo des amandes et graines de <i>R. heudelotii</i>	6
Planche 2 : photo des capsules de <i>T. conophorum</i>	7
Planche 3 : photo des amandes et graines de <i>T. conophorum</i>	7

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : besoins humains en acides aminés essentiels (FAO / WHO, 2007)	17
Tableau 2: préparation des tubes pour le dosage des inhibiteurs de trypsine	48
Tableau 3 : teneurs en quelques constituants chimiques des tourteaux obtenus des graines cuites de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> (% MS)	51
Tableau 4: densité et constituants physico – chimiques (g %MS) des tourteaux tamisés ou non de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i>	72
Tableau 5 : substances antinutritionnelles (mg % MS) des tourteaux tamisés ou non de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i>	78
Tableau 6 : gradient d'élution des classes de phospholipides par HPLC-SM	98
Tableau 7 : composition physico – chimique des tourteaux de granulométrie 400 – 500 µm, des concentrats et des isolats protéiques de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> (% MS)	107
Tableau 8 : paramètres de couleur L*a*b* des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i>	112
Tableau 9 : teneurs en lipides résiduels et en phospholipides des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i>	117
Tableau 10 : composition en acides gras des phospholipides des tourteaux, des concentrats et d'isolats protéiques de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> comparée à celle des triglycérides de <i>R. heudelotii</i> , <i>T. conophorum</i> , <i>E. guineensis</i> , <i>Z. mays</i> , <i>C. edulis</i> , <i>C. schweinfurthii</i> , <i>A. hypogea</i>	120
Tableau 11 : classes des phospholipides identifiés dans les échantillons analysés	121
Tableau 12 : capacités de rétention d'eau, d'huile de gélification, capacités émulsifiantes et moussantes des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> .	125
Tableau 13: gradient d'élution des acides aminés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse	132

Tableau 14 : composition des rations pour l'alimentation des rats (Giami, 2005)	137
Tableau 15: compositions en acides aminés (mg /g de protéines) des tourteaux, des concentrats, des isolats protéiques de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> comparée à celle de la protéine de référence (FAO / WHO, 2007)	144
Tableau 16 : indices chimiques des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i>	145
Tableau 17: degré d'hydrolyse (%), volumes de NaOH (0,1 M) des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i> comparés à celui de la caséine	148
Tableau 18: équations des différentes cinétiques de digestibilité <i>in vitro</i> et coefficients de détermination ( $r^2$ )	151
Tableau 19 : digestibilité <i>in vitro</i> corrigée (DACAAS et DHCAAS) des tourteaux, des concentrats, des isolats protéique de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i>	152
Tableau 20 : aliment et azote ingérés, excrétion totale et gain de poids (g / rat / 15 jours) des groupes de rats nourris aux régimes caséine, TORH, CORH, ISRH, TOTC, COTC et ISTC	155
Tableau 21 : paramètres de digestibilité bruts et corrigés (par l'indice chimique des acides aminés) des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de <i>R. heudelotii</i> et de <i>T. conophorum</i>	158
Tableau 22: corrélations entre le Degré d'Hydrolyse (DH), l'Azote Libéré (AL) et le Coefficient de Digestibilité (CD), la Valeur Biologique (VB), l'Utilisation Protéique Nette (UPN)	165

## RESUME

Cette étude a été menée dans le but d'explorer les nouvelles sources de protéines à valeur nutraceutique. Les graines de *Ricinodendron heudelotii* (Bail. Pierre ex Pax) et *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg) ont d'abord été cuites dans de l'eau bouillante pendant 90 et 30 min qui sont respectivement leurs temps optimums de cuisson. Après délipidation et tamisage des tourteaux, la fraction 400 - 500 µm s'est révélée la plus représentative avec plus de 70 % et riche en azote protéique (6 - 7 % MS). Les concentrats et les isolats protéiques ont été préparés à partir des tourteaux respectivement dans l'eau distillée à pH 4,5 et dans une solution de NaOH à 0,2 % (*R. heudelotii*), une solution de NaCl 0,6 M (*T. conophorum*) à pH 11. Ces concentrats (65 - 75 % MS de protéines) et ces isolats protéiques (81 - 92 % MS de protéines) ont une composition physico-chimique différente ( $P < 0,05$ ) de celle des tourteaux. Pour les deux Euphorbiacées, les capacités de rétention d'eau (367 - 467 g / 100 g d'échantillon), de rétention d'huile (256 - 410 g / 100 g d'échantillon) et moussante (68 - 71 %) sont maximales dans les isolats protéiques tandis que les capacités gélifiante (6 - 14 %) et émulsifiante (63 - 87 %) le sont dans les concentrats protéiques. Les teneurs en acides aminés essentiels des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sont comparables à celle de la protéine de référence. L'étude de la digestibilité enzymatique *in vitro* a montré que l'azote libéré après 6 h est supérieur à 90 % dans les concentrats et les isolats protéiques. La digestibilité protéique *in vivo* indique que le gain de poids des rats mâles âgés de  $21 \pm 3$  jours durant 15 jours d'expérimentation ainsi que les paramètres de rétention azotée sont plus importants avec les régimes à base de l'aliment de référence (caséine) et du tourteau de *T. conophorum*. Les valeurs corrigées des paramètres de digestibilité par l'indice chimique des acides aminés laissent apparaître que le tourteau de *T. conophorum* renferme les protéines de très bonne qualité nutritionnelle, autant que la caséine.

Mots clés : *R. heudelotii*, *T. conophorum*, tourteaux, concentrats protéiques, isolats protéiques, compositions en acides aminés, digestibilité *in vitro*, digestibilité *in vivo*.

## ABSTRACT

This study was conducted in order to look for alternative sources of proteins having nutraceutical value. The grains of *Ricinodendron heudelotii* (Bail.) and *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg) were first cooked in boiled water at their optimal cooking time for 90 and 30 min respectively. After defating, sieving of the defatted cakes showed that samples with a granulometry of 400 - 500  $\mu\text{m}$  were most representative (more than 70 %), containing more proteic nitrogen (6 – 7 %). Protein concentrates and protein isolates were prepared from defatted cakes respectively in distilled water at pH 4.5 and in NaOH 0.2 % (*R. heudelotii*) and NaCl 0.6 M (*T. conophorum*) at pH 11. Physico-chemical properties of protein concentrates (65 – 75 % of proteins) and protein isolates (81 – 92 % of proteins) were different from those of the defatted cakes. Water holding (367 – 467 g / 100 g of sample), oil holding (256 – 410 g / 100 g of sample) and foaming capacities (68 – 71 %) were highest with protein isolates whereas gelling (6 – 14 %) and emulsion capacities (63 – 87 %) were highest with the concentrates. The amounts of essential amino acids in both defatted flours were comparable to the value in FAO / WHO (2007) scoring pattern. Nitrogen liberated after 6 h of enzymatic digestibility was more than 90 % both in the proteins concentrates and isolates. *In vivo* studies carried out on  $21 \pm 3$  days old Sprague Dawley male rats for 15 days showed that gain of weight and nitrogen retention parameters were higher for rats that consumed casein and *T. conophorum* defatted cake. Corrected values of nitrogen digestibility of the analysed samples showed that *T. conophorum* defatted cake contains protein source with good nutritional quality.

Keywords: *R. heudelotii*, *T. conophorum*, defatted cake, protein concentrates, protein isolates, amino acids compositions, *in vitro* digestibility, *in vivo* digestibility.

## INTRODUCTION GENERALE

*R. heudelotii* (Bail.) et *T. conoporum* (Müll. Arg) sont deux oléagineux de la famille des Euphorbiacées des forêts de l'Afrique centrale.

*R. heudelotii* est un grand arbre couvrant une grande aire au Cameroun, au Congo, au Gabon, en Sierra Leone, en Côte d'Ivoire et à Madagascar (Noumi, 1984). Ses amandes sont utilisées comme épices épaississantes dans la cuisine des populations des pays des zones de production (Tchiégang et al., 1997; Mosso et al., 1998).

*T. conoporum* est une liane ligneuse d'environ 30 m de longueur présente au Cameroun (dans les forêts secondaires), au Congo et au Nigeria. Ses graines sont bouillies et les amandes consommées comme fruits de bouche (Vivien et Faure, 1996).

La commercialisation des fruits de ces deux plantes constitue une importante source de revenus pour les populations des différentes zones de production au Cameroun.

Des travaux ont été initiés tant sur les amandes de *R. heudelotii* que sur celles de *T. conoporum* sur le plan physico – chimique. L'huile de *R. heudelotii* contient principalement, l'acide gras  $\alpha$ -élaéostéarique (C18:3) conjugué qui représente près de 50 % des acides gras totaux (Kapseu et Tchiégang, 1995 ; Tchiégang et al., 1997). Le tourteau de *R. heudelotii* a une teneur en protéines brutes variant de 55 à 62 % MS avec un équilibre chimique satisfaisant des acides aminés constitutifs (Tchiégang et al., 1997 ; Tchiégang et Mezajoug Kenfack, 2003).

*T. conoporum* a également fait l'objet de plusieurs études au Nigeria, au Congo et au Cameroun. Les différents résultats indiquent que l'huile extraite des amandes de *T. conoporum* est riche en acides gras polyinsaturés dont un C18:3  $\omega$ 3 présent à près de 70 % (Ige et al., 1984 ; Kinkela et Bezard, 1993 ; Tchiégang et al., 2001). Son tourteau contient plus de 50 % de protéines brutes (Ige et al., 1984 ; Tchiégang et Mezajoug Kenfack, 2003).

Au regard des teneurs élevées en protéines, les amandes de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* constitueraient une source potentielle de protéines végétales pour les populations du tiers monde dont le régime alimentaire en est déficient (Schmidhuber, 2003). En dehors des utilisations de *R. heudelotii* comme épices et de *T. conophorum* comme fruits de bouche, les études n'ont pas encore été menées pour apprécier le rôle que pourraient jouer leurs protéines dans le métabolisme *in vivo*.

Le besoin mondial en tourteaux d'oléagineux est croissant. En effet, leur production est passée de 185,5 millions de tonnes en 2002 à 308 millions de tonnes en 2008. La demande en tourteaux est directement corrélée à la demande mondiale en protéines animales dans la mesure où ils sont utilisés pour l'alimentation du bétail (Dronne, 2001). Or, dans les pays en développement comme ceux de l'Afrique subsaharienne, du fait de leur prix élevé, les protéines animales sont inaccessibles aux couches sociales les plus démunies et nécessiteuses. L'alimentation se caractérise ainsi par un déficit en protéines dont les conséquences se manifestent surtout chez les enfants en bas âge. Au moment du sevrage, ces derniers passent sans transition du lait maternel à des régimes familiaux déséquilibrés à base de céréales (maïs, riz, mil) et de tubercules (manioc, igname, patate) pauvres en protéines. Ces enfants en croissance nécessitent donc une supplémentation en protéines. L'analyse des causes de la malnutrition en Afrique laisse apparaître que le problème nutritionnel le plus préoccupant est celui de la carence alimentaire en protéines. A la faim physiologique correspond une carence en protéines engendrant une mortalité infantile élevée, des maladies caractérisées, un retard de croissance physique, intellectuel et des séquelles permanentes (FAO, 2008).

Le taux de mortalité des enfants de moins de 5 ans en Afrique subsaharienne suite à une malnutrition protéique est de 42 % (FAO, 2008). Dans cette partie de l'Afrique, la population augmente en moyenne de 2,6 % par an. Ce taux de croissance démographique est lourd de conséquences pour l'approvisionnement de ces pays en aliments (WHO, 2008). La

progression de la malnutrition infantile nécessite la conception de solutions rapides dont l'une est la recherche de nouvelles sources locales de protéines végétales. Pour augmenter leur disponibilité, la valorisation des produits forestiers non ligneux surtout pour le cas de l'Afrique centrale peut être envisageable vu les potentialités forestières en produits non ligneux.

La non – exploitation des tourteaux de certaines plantes oléagineuses en Afrique et plus particulièrement au Cameroun amène entre autres à s'attarder sur ceux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* dont les amandes constituent une constante dans l'alimentation de base de certaines populations des zones de production. Pour ces deux plantes, les conditions d'extraction de l'huile, la teneur et la composition physico – chimique de l'huile sont connues (Mbofung et al., 1994 ; Tchiégang et al., 2003 ; Aboubakar Dandjouma et al., 2008). Des études récentes ont montré que les huiles extraites des amandes des deux plantes pouvaient être une alternative pour la diversification des sources de lipides. C'est ainsi que l'huile de *R. heudelotii* pourrait être valorisé dans un but nutraceutique et thérapeutique (Tchankou Leudeu et al., 2009). Une fois les huiles de ces amandes extraites, comment pourra-t-on valoriser leurs tourteaux? Les matières protéiques végétales trouvent depuis quelques années des valorisations diverses sur les plans nutritionnel et fonctionnel dans l'alimentation humaine (Moure et al., 2006). Pourra-t-on utiliser les tourteaux de ces plantes comme nouvelles sources de protéines végétales après étude de leurs propriétés fonctionnelles et nutritionnelles?

L'objectif général de la recherche est la valorisation des protéines des tourteaux d'oléagineux non conventionnels autour duquel se dégagent cinq objectifs spécifiques suivants :

- 1 - Détermination du temps de cuisson des graines de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*.

*Hypothèse 1*: Le temps de cuisson des graines de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* influence la digestibilité *in vitro* des protéines de leurs tourteaux.

2 - Influence de la granulométrie sur la composition chimique des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*.

*Hypothèse 2*: La composition chimique des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* varie avec la granulométrie.

3 - Solubilité des protéines brutes des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*, préparation des concentrats et des isolats protéiques.

*Hypothèse 3*: Les courbes de solubilité des protéines des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* permettent la préparation de leurs concentrats et leurs isolats protéiques.

4 - Caractérisation physico-chimique des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*.

*Hypothèse 4*: Les caractéristiques physico-chimiques des concentrats et des isolats protéiques sont comparables à celles des tourteaux.

5 - Composition en acides aminés, digestibilité *in vitro* et digestibilité *in vivo* des protéines des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*.

*Hypothèse 5*: Les acides aminés des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* présentent un équilibre chimique satisfaisant entre eux.

*Hypothèse 6*: La digestibilité protéique *in vitro* des concentrats et des isolats est supérieure à celle des tourteaux correspondants.

*Hypothèse 7*: La digestibilité *in vivo* des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques préparés est comparable à celle de la caséine.

# PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## CHAPITRE I : GENERALITES SUR *Ricinodendron heudelotii* ET *Tetracarpidium*

### *conophorum*

#### I. Rappels botaniques et ethnobotaniques

##### 1. *Ricinodendron heudelotii* (Bail.)

*R. heudelotii* est un arbre pouvant atteindre 30 m de hauteur avec une circonférence de 3 m (Noumi, 1984). Il a jadis connu plusieurs appellations scientifiques à savoir: *Jatropha mahafalense* (Heim et al., 1919), *R. africanum* (Fairchild et al. 1955), *Jatropha heudelotii* et enfin *R. heudelotii* (Bail.) (Noumi, 1984).

*R. heudelotii* pousse dans les écosystèmes de la forêt équatoriale de Madagascar, de la côte ouest de l'Afrique. Au Cameroun, il se rencontre dans la zone continentale sud, dans la région côtière et dans la savane de l'ouest (Noumi, 1984 ; Vivien et Faure, 1996). Il est identifié comme un indice de fertilité du sol (Fondoun et al., 1998). A cause de la nature dioïque de cette espèce, le bouturage peut être envisagé pour améliorer sa propagation (Mapongmetsem et al., 1998). La croissance du jeune plant est très rapide en pleine lumière et la première fructification a lieu 4 ans après plantation (Vivien et Faure, 1996). Les fruits ont une morphologie qui varie en fonction de la configuration de l'hilium, la forme sphérique étant la plus prédominante. Ce sont des drupes ayant 1 à 4 lobes au maximum et renfermant 1 à 4 amandes (Fondoun et al., 1998). Les dénominations locales de *R. heudelotii* dépendent des régions et des pays. Ainsi on a :

- *betratra* à Madagascar (Maheu et Husson, 1920);

- *ezezang* et *njansang* respectivement en langues locales *ewondo* ou *eton*, et *bassa* au Cameroun (Fondoun et al., 1998).

La planche 1 montre la photo des amandes et des graines de *R. heudelotii*.



**Planche 1:** photo des amandes (A) et des graines (B) de *R. heudelotii*

## **2. *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg.)**

*T. conophorum*, synonyme de *Plukenetia conophora* (Okafor, 2002) est un arbre sarmenteux. C'est une liane ligneuse forte pouvant atteindre 30 m de longueur. Les feuilles sont alternes, simples, glabres, à pétiole jusqu'à 5 cm de longueur (Vivien et Faure, 1996).

Les fruits de *T. conophorum* encore appelés noisettes en français ou *kaso* en *bush english* sont comme des capsules striées vertes puis jaunes de diamètre compris entre 6 à 10 x 3 à 4 cm (planche 2). Chaque capsule a en moyenne un poids de 110 g avec 2 à 4 graines. Ces graines sont globuleuses brunes avec de petites côtes (3 à 3,5 x 2 à 2,5 cm) (Vivien et Faure, 1996). Chaque graine renferme une amande (planche 3).

*T. conophorum* connu sous le nom de *Conophor seeds* au Nigeria (Ige et al., 1984 ; Edem et al., 2009), *Cassa seeds* au Congo (Kinkela et Bezard, 1993), a plusieurs appellations selon les tribus au Cameroun (Vivien et Faure, 1996):

- *ngag* en langue locale *bangangte* (ouest du Cameroun)

- *ngak* en langue locale *dschang* (ouest du Cameroun)



**Planche 2** : photo des capsules de *T. conophorum*



**Planche 3** : photo des amandes (A) et des graines (B) de *T. conophorum*

## **II. Obtention et utilisation des amandes de *R. heudelotii* et de *T. conophorum***

L'obtention des amandes des fruits de *R. heudelotii* se fait selon le savoir - faire des femmes. Les drupes qui tombent de l'arbre sont entassées et laissées à la fermentation pendant environ deux semaines ou plus pour favoriser la pourriture de la pulpe (Dupriez et De Leener, 1987; Tiki Manga et *al.*, 2000). Les graines dépulpées sont bouillies dans de l'eau pendant au moins 2 h pour fragiliser la coque scléreuse. La cuisson dure souvent toute une nuit. Les amandes obtenues par ouverture de cette coque entre deux cailloux ou à l'aide d'un couteau ou de tout autre objet pointu sont séchées au grenier ou au soleil. Une fois séchées, ces amandes peuvent être conservées pendant plusieurs années (Dupriez et De Leener, 1987 ; Tchiégang et *al.*, 1997). Elles sont utilisées comme épices pour épaissir et assaisonner les sauces (Tchiégang et *al.*, 1997 ; Mosso et *al.*, 1998).

Les amandes de *T. conophorum* s'obtiennent après décorticage manuel par simple coup sec sur les fruits. Leur consommation se fait généralement après grillage sous la braise ou cuisson des fruits à la vapeur. A l'état cru, elles ont un goût proche de celui de *Coula edulis* (amer et tonique comme la kola) (Vivien et Faure, 1996). Ces amandes sont essentiellement consommées comme un fruit de bouche ou de grignotage.

## **III. Quelques résultats de recherche sur les amandes des deux plantes**

### **1. *Ricinodendron heudelotii* (Bail.)**

Les amandes de *R. heudelotii* sont riches en lipides totaux (plus de 54 %), en protéines brutes (plus de 20 % MS) (Tchiégang et Mezajoug Kenfack, 2003).

Ces lipides renferment 78 % d'acides gras polyinsaturés (Kapseu et *al.*, 1998) et possèdent une importante valeur nutritionnelle du fait de leur propriété hypocholestérolémiant et hypotriglycéridémiant (Moundipa Fewou et *al.*, 1998).

Les effets nutritionnels des protéines de *R. heudelotii* sont comparables à ceux de la caséine (Tchakam, 1995). Ses acides aminés présentent un équilibre chimique satisfaisant bien que un peu limités en leucine, lysine, thréonine, tyrosine et tryptophane (Tchiégang et *al.*, 1997).

L'étude de la solubilité des protéines brutes du tourteau en fonction du pH, de la température et de la force ionique montre deux points de solubilité minimale (pH 4 et pH 8) et un maximum de solubilité à pH 11 dans le NaCl 0,6 et 0,8 M (Tchiégang et Mezajoug Kenfack, 2003). Les capacités de rétention d'eau (287,25 %) et d'huile (47 %) du tourteau de *R. heudelotii* sont importantes bien que la plus petite concentration gélifiante soit de 18 %. Les capacités moussante et émulsifiante sont respectivement de 5 et 33 % (Tchiégang et *al.*, 2006).

## **2. *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg.)**

Les amandes de *T. conophorum* ont fait l'objet de quelques investigations dans le domaine de la physico-chimie au Nigeria, au Congo et au Cameroun. Les différents résultats soulignent que les amandes sont riches en lipides (plus de 50 % MS) et en acides gras polyinsaturés (79,4 % des acides gras totaux) (Ige et *al.*, 1984 ; Kinkela et Bezard, 1993 ; Tchiégang et *al.*, 2001).

Les protéines brutes du tourteau de *T. conophorum* sont solubles à plus de 50 % dans l'eau à pH acide. En fonction du pH, de la température et de la force ionique, ces protéines ont deux points de solubilité minimale (pH 4 et pH 8), un point de solubilité maximale à pH 11 dans les solutions de NaCl 0,6 et 0,8 M (Tchiégang et Mezajoug Kenfack, 2003). Les capacités de rétention d'huile et d'eau des tourteaux sont élevées avec des valeurs respectives de 54 et 280,95 %. Il en est de même de la plus petite concentration gélifiante (8 %), des capacités moussantes (40 %) et émulsifiantes (51 %) (Tchiégang et *al.*, 2006).

La cuisson des amandes de *T. conophorum* entraîne une perte en quelques éléments nutritifs (protéines, cendres) et en substances antinutritionnelles (tanins, oxalates totaux, acide hydroxycinannique) (Edem et *al.*, 1994).

## CHAPITRE II : DIFFERENTES FRACTIONS PROTEIQUES DES VEGETAUX

Les albumines, les globulines, les prolamines et les glutélines sont les principales fractions protéiques des végétaux (Branlard et Bancel, 2007).

### I. Les albumines

Les albumines sont des protéines solubles dans l'eau pouvant être précipitées dans les solutions salines saturées. Les albumines regroupent la plupart des protéines présentant une activité biologique. Elles ont en général des teneurs plus élevées en acides aminés soufrés (cystéine, cystine et méthionine), en lysine et en histidine (Gueguen et Azanza, 1983).

Leur poids moléculaire est estimé entre 11 et 30 KDa mais la valeur moyenne est de l'ordre de 16 KDa. On les trouve généralement dans l'œuf, le lait, les graines, le sang, etc. Les albumines représentent 10 à 15 % de protéines de légumineuses, 22 et 40 % des protéines de colza (*Brassica napus* L., *Brassica campestris* L.) et de tournesol (*Helianthus annuus* L.) respectivement. La fraction albumine de ces graines est constituée d'enzymes (lipoxgénases, uréases, amylases), de lectines (hémagglutinines) et d'inhibiteurs d'enzymes (facteurs antitrypsiques) (Chavan et al., 2001).

### II. Les globulines

Les globulines sont les protéines solubles dans des solutions alcalines diluées. Chez les végétaux, les globulines constituent les protéines de réserve de la graine. Elles ont une composition caractéristique des protéines de réserve riches en acides aspartique, glutamique et leurs amides, et en arginine (Gueguen et Azanza, 1983). Leur poids moléculaire est en moyenne de 90 KDa (Gupta et al., 2010).

Les globulines constituent 60 à 90 % de protéines de légumineuses où elles sont constituées en majorité de conglycinine et de glycinine. Dans les graines de tournesol (*H.*

*annuus* L.), et de Colza (*Brassica napus*, L., *B. campestris*) les fractions globulines représentent respectivement 28 et 56 % des protéines totales de la graine.

### **III. Les prolamines**

Les prolamines sont solubles dans des solutions aqueuses à teneur élevée en éthanol et constituées de protéines de poids moléculaires compris entre 25 et 75 KDa (Gessendorfer et *al.*, 2009). Les prolamines sont majoritairement (85 %) représentées dans le blé, le seigle et l'orge (Chavan et *al.*, 2001). Ce sont des protéines de réserve des céréales. On les retrouve dans le gluten. Elles déterminent en grande partie l'aptitude à la panification du blé en jouant un rôle majeur dans l'élasticité et la résistance à la déformation de la pâte.

### **IV. Les glutélines**

Les glutélines représentent 45 % des protéines du blé. Ce sont des protéines solubles dans des solutions acides ou basiques de poids moléculaire variant entre 100 et 1000 KDa (Gupta et *al.*, 2010). Les glutélines et les prolamines sont des fractions protéiques ayant fait l'objet de peu d'études.

## CHAPITRE III : SITUATION MONDIALE DE L'ALIMENTATION EN PROTEINES VEGETALES

### I. Production mondiale des sources de protéines végétales

Les principales sources de protéines végétales sont : les légumineuses (haricot, pois chiche, petit pois), les oléagineux, les céréales et les algues. La production mondiale en 2005 en oléagineux tels que le soja, le colza, le coton, le tournesol, les noix de palme, l'arachide est de 219,6; 48,3; 42,5; 29,7; 9,4 et 23,7 millions de tonnes respectivement (Foster *et al.*, 2009). La production en tourteaux est environ de 270 millions de tonnes durant la même période. Le soja, le colza, le tournesol et l'arachide sont les sources protéiques les plus utilisées. Ces oléagineux sont cultivés pour la production d'huile à des fins alimentaires et industrielles. Le tourteau obtenu après extraction de l'huile est riche en protéines et très apprécié en alimentation animale. Leur utilisation représente 69 ; 12,4 ; 6,9 ; 5,3 et 2,8 % respectivement (Moure *et al.*, 2006).

Au début du 21<sup>ème</sup> siècle, les tourteaux et les graines de soja restent les principales sources de protéines pour l'aliment des animaux. Les Etats-Unis, le Brésil et l'Argentine à eux seuls produisent 80 % de la production mondiale de soja. La culture des oléagineux est soutenue depuis les années 1974, ceci dans le but également d'obtenir des tourteaux destinés à l'alimentation animale. Avec l'interdiction des farines de viande dans les années 1990, l'Union Européenne a importé 23,2 millions de tonnes de tourteaux de soja en 2004 – 2005. En 2005, le soja a occupé de très loin la première place en termes de graines produites avec environ 182 millions de tonnes, soit plus de 57 % de la production totale d'oléagineux, devant le colza (36,7 millions de tonnes), l'arachide (23,7 millions de tonnes) puis le tournesol (21,4 millions de tonnes) (Montfort, 2005).

De tout temps, les besoins en protéines sont grands et les protéines végétales sont de plus en plus recherchées. Le déficit mondial en protéines est chiffré en millions de tonnes. Il devient urgent de découvrir de nouvelles sources dont la production ne soit pas dépendante des conditions physiques, géographiques et climatiques. Le développement des cultures et de l'élevage ne pourrait probablement pas suffire à satisfaire les besoins en protéines rendus croissants par l'expansion de la population mondiale.

## **II. La malnutrition protéique et ses conséquences en Afrique**

La malnutrition dans un sens général est une nutrition inadéquate qui est causée par une suralimentation, une sous-alimentation ou un déséquilibre alimentaire. La malnutrition protéique est un déséquilibre de l'état nutritionnel dans lequel les protéines font défaut. Lorsque la carence en protéines est associée à un autre aliment énergétique, glucides et lipides, on parle de malnutrition protéino – énergétique (Deen et *al.*, 2003).

Chaque année, en Afrique subsaharienne, environ 3,5 millions d'enfants de moins de 5 ans meurent à cause de la malnutrition. Les malnutritions protéique et protéino-énergétique sont responsables respectivement de 34,6 et 50 % de décès de ces enfants. Le kwashiorkor et le marasme sont deux exemples respectifs de malnutrition protéique et protéino – énergétique (OMS, 2000; Deen et *al.*, 2003).

Dans les pays en voie de développement, l'apport en huiles et en protéines alimentaires demeure insuffisant. On note pour cela des répercussions sur la nutrition et la santé des populations. La production de graines oléagineuses telles que le tournesol et le sésame y a toujours été minimale, et il n'existe pas d'entreprises de transformation des protéines végétales en milieu rural comme parfois en milieu urbain (FAO, 2006).

En Afrique subsaharienne, le problème de malnutrition protéique est récurrent parce que l'alimentation des populations est caractérisée par un déficit en protéines dont les

conséquences se manifestent chez les enfants en bas âge (Deen et *al.*, 2003). Les protéines animales sont inaccessibles aux populations rurales pauvres. Après le sevrage l'alimentation des enfants est à base de céréales (maïs, riz, mil) et de tubercules (igname, patate douce, manioc). Cette carence alimentaire en protéines cause le kwashiorkor qui entraîne non seulement une mortalité infantile élevée mais aussi un retard de croissance physique, intellectuel et des séquelles permanentes (Spector, 2009).

Le problème de malnutrition protéino – infantile en Afrique subsaharienne est due à l'absence d'une politique gouvernementale de transformation des oléagineux, étant entendu que les forêts tropicales regorgent de beaucoup d'espèces végétales sous – exploitées. En effet, dans les pays en voie de développement, la transformation des produits vivriers est l'affaire des femmes et vient s'ajouter aux travaux agricoles qui leur reviennent dans la division du travail qui caractérise la société rurale. Ils sont le prolongement naturel d'attributions et de responsabilités d'un héritage socioculturel auxquels elles sont fièrement attachées. C'est le cas de l'aiélé (*Canarium schweifurthii*), du safou (*Dacryodes edulis*), du karité (*Butyrospermum parkii*), de l'arachide (*Arachis hypogea*) du djansang (*R. heudelotii*) (Kapseu, 2009).

## **CHAPITRE IV : GENERALITES SUR LE METABOLISME DES PROTEINES**

Les protéines sont des polypeptides ayant un ordre déterminé de résidus d'acides aminés reliés les uns aux autres par des liaisons covalentes appelées liaisons peptidiques. La fonction première des protéines présentes dans un aliment est d'apporter par des processus digestifs les acides aminés pour la synthèse des protéines corporelles et d'autres substances azotées (Culioli, 1996).

### **I. Besoins de l'homme en protéines alimentaires**

Les protéines étant de biopolymères d'acides aminés, les besoins en protéines se résument aux besoins en acides aminés. Parmi les acides aminés qui constituent les protéines, huit sont indispensables à l'homme et doivent provenir nécessairement des protéines alimentaires. Ce sont : la lysine, la thréonine, le tryptophane, la méthionine, la leucine, l'alanine, la phénylalanine, la valine. En plus de ces huit acides aminés, le nourrisson a besoin d'un apport alimentaire en histidine. Ces besoins diminuent avec l'âge et représentent environ le 1 / 10 en poids chez l'adulte (FAO / WHO, 2007).

La ration alimentaire en protéines varie selon l'état physiologique. D'une manière générale elle doit être de 0,66 g de protéines par kg de poids corporel par jour chez des sujets à l'équilibre énergétique et avec une activité physique modérée (FAO / WHO, 2007). Chez le jeune, une composante de croissance doit être ajoutée. La femme enceinte et la femme allaitante ont un besoin supplémentaire. Le tableau 1 indique chez l'être humain les teneurs en acides aminés essentiels conseillées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (FAO / WHO, 2007).

**Tableau 1** : besoins humains en acides aminés essentiels (FAO / WHO, 2007)

<b>Acides aminés essentiels</b>	<b>Besoins quotidiens (en mg / kg /j)</b>
Isoleucine	30
Leucine	59
Lysine	45
Méthionine + Cystéine	22
Phénylalanine + Tyrosine	38
Thréonine	23
Tryptophane	6
Valine	39
Histidine	15

## **II. Digestion des protéines**

Les protéines alimentaires sont digérées par les enzymes protéolytiques ou protéases le long du tractus gastro – intestinal. Ces enzymes catalysent pour la plupart l’hydrolyse des liaisons peptidiques spécifiques. On distingue les endopeptidases et les exopeptidases. Les endopeptidases sont des enzymes qui catalysent l’hydrolyse des liaisons peptidiques à l’intérieur des chaînes. Il y en a trois qui sont plus importantes : la pepsine, la trypsine et la chymotrypsine. Les exopeptidases sont des enzymes qui catalysent l’hydrolyse des liaisons peptidiques à l’extrémité des chaînes. Parmi elles, on cite : les carboxypeptidases pancréatiques, les aminopeptidases et les dipeptidases intestinales (Roufik et *al.*, 2006).

La digestion des protéines commence par la pepsine présente dans le suc gastrique, se poursuit et s’achève par les protéases du suc pancréatique (trypsine, chymotrypsine, élastase, carboxypeptidases A et B) et par les cellules de la muqueuse intestinale (aminopeptidases, dipeptidases) (Roufik et *al.*, 2006).

## **1. Modes d'action de la pepsine, de la chymotrypsine et de la trypsine**

### **1.1. La pepsine**

La pepsine est sécrétée par la muqueuse gastrique sous forme de pepsinogène inactif, lequel est transformé par enlèvement d'un certain nombre de petits peptides en enzyme actif dont le pH optimum est très bas (aux environs de 2). La pepsine hydrolyse préférentiellement la liaison peptidique où est engagé le groupement aminé d'un aminoacide aromatique (phenylalanine, tyrosine) (Nalinanon et *al.*, 2010).

### **1.2. La trypsine**

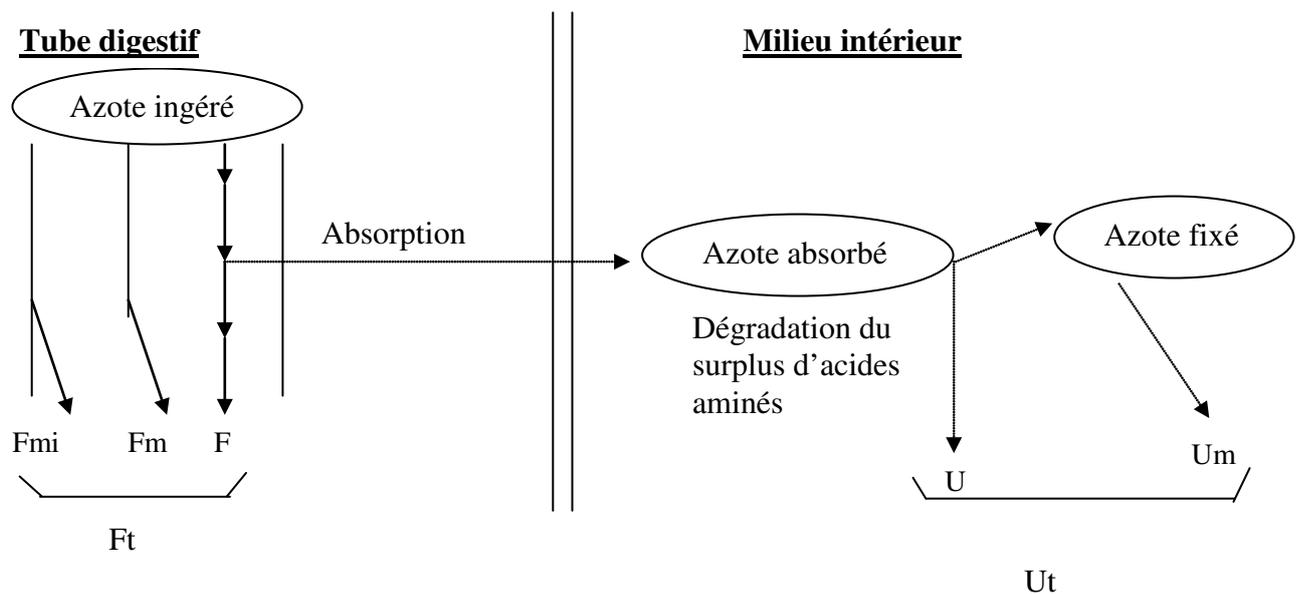
La trypsine est contenue dans le suc pancréatique et poursuit dans l'intestin la digestion des protéines amorcée dans l'estomac par la pepsine. Elle est sécrétée par le pancréas également sous forme d'un précurseur inactif : le trypsinogène. Sa transformation en trypsine est une activation soit autocatalytique (sous l'influence de la trypsine elle - même), soit catalysée par une autre enzyme protéolytique telle que l'entérokinase sécrétée par la muqueuse duodénale. La trypsine a un pH optimum voisin de 8. Elle hydrolyse de préférence les liaisons peptidiques auxquelles un aminoacide basique (arginine, lysine) participe par son carboxyle (Khantaphant et Benjakul, 2010).

### **1.3. La chymotrypsine**

La chymotrypsine est également sécrétée par le pancréas sous forme d'un zymogène, le chymotrypsinogène, transformé en chymotrypsine sous l'action de la trypsine. Elle a aussi un pH optimum voisin de 8. Elle coupe préférentiellement les liaisons peptidiques auxquelles participent les groupements carboxyliques des aminoacides aromatiques (tryptophane, tyrosine, phénylalanine) (Khantaphant et Benjakul, 2010).

### III. Absorption intestinale de l'azote issu des protéines digérées

L'azote résultant de la digestion des protéines alimentaires dans le tractus gastro – intestinal peut avoir deux destinées principales (figure 1) : une partie est absorbée à travers la villosité intestinale et passe dans le circuit sanguin (milieu intérieur), le reste est rejeté dans les matières fécales sous forme d'azote fécal (F) (Culioli, 1996).



**Figure 1 :** métabolisme protéique et différentes formes d'azote excrétés (Culioli, 1996)

***Fmi** = azote provenant des synthèses microbiennes du tractus ; **F** = azote fécal provenant directement des aliments ; **Fm** = azote fécal métabolique ; **Ft** = azote fécal total ( $Fmi + F + Fm$ ) ; **U** = azote urinaire d'origine alimentaire (catabolisme exogène) ; **Um** = azote urinaire métabolique (catabolisme endogène) ; **Ut** = azote urinaire total ( $U + Um$ ).*

Le fonctionnement normal du tube digestif engendre la production de protéines (enzymes et muqueuses du tube digestif) qui constituent l'azote fécal métabolique (Fm) et forment une partie de l'azote fécal total (Ft). L'azote fécal métabolique est en général en quantité faible par rapport à celui provenant de l'aliment et dépend des caractéristiques du

régime dans lequel est incorporée la protéine et de l'état physiologique de l'organisme. Cependant, lors des essais nutritionnels, on estime généralement que l'azote fécal métabolique a une valeur constante dans des conditions expérimentales données. La plus grande part du rejet fécal total est constituée de cellules de la flore intestinale. Ces cellules sont essentiellement constituées de protéines microbiennes. L'azote résultant de la digestion de ces protéines est présent dans les fèces sous forme d'azote fécal microbien (Fmi). L'azote fécal total (Ft) est donc la somme de l'azote provenant directement de l'alimentation (F) additionnée de l'azote fécal métabolique (Fm) et de l'azote fécal microbien (Fmi) (Culioli, 1996).

L'azote éliminé dans les urines et provenant de l'alimentation constitue l'azote urinaire d'origine alimentaire (U) (figure 1). La continuelle resynthèse des protéines par l'organisme à partir des protéines présentes se fait avec une perte d'azote ne dépendant pas directement de l'azote urinaire : c'est l'azote endogène urinaire ou azote métabolique urinaire (Um). L'azote urinaire d'origine alimentaire et d'origine métabolique est excrété sous forme d'urée, d'acide urique, de créatinine et d'ammoniac. Lorsque l'apport protéique alimentaire est supérieur aux besoins de l'organisme, une grande quantité d'azote urinaire est excrétée. L'azote urinaire total (Ut) est donc la somme de l'azote provenant directement de l'alimentation (U) et de l'azote métabolique urinaire (Um) (Culioli, 1996).

# **CHAPITRE V: EFFETS DES FIBRES ALIMENTAIRES SUR LA DIGESTION DES PROTEINES**

## **I. Définition**

Les fibres alimentaires sont des résidus de glucides non digérables et indispensables au bon fonctionnement du transit intestinal. Ce sont des polymères végétaux non hydrolysables par les enzymes endogènes de l'animal en raison de la nature des liaisons chimiques entre les chaînes (De Vries et *al.*, 1999).

## **II. Les différentes classes de fibres alimentaires**

La structure biochimique des fibres alimentaires permet de distinguer plusieurs classes de fibres dont la plupart sont les constituants de la paroi des cellules végétales. On distingue les fibres solubles (pectines) des fibres insolubles (hémicellulose, lignine, cellulose). Il est cependant possible d'extraire les fibres insolubles dans des solutions détergentes neutres et dans des solutions détergentes acides. Ce sont respectivement les fibres NDF (Neutral Detergent Fiber) constituées de lignine et de cellulose et les fibres ADF (Acid Detergent Fiber) constituées de lignine, cellulose et d'hémicellulose (Gaëtan et *al.*, 2000).

## **III. Propriétés physiologiques des fibres**

Les propriétés physiologiques et la fermentation des fibres ont des effets directs sur la structure et la fonction des muqueuses digestives. Ces propriétés ne peuvent être dues qu'à leur structure chimique car elles sont surtout fonction de leur solubilité ou de leur non solubilité (Eastwood et Morris, 1992). Les fibres ont des effets sur la quantité d'aliment ingérée et le long du tractus gastrointestinal.

### **1. Effets sur l'ingestion**

Les aliments à haute teneur en fibres ont des textures et des propriétés physiques qui modifient leur acceptabilité. Ces régimes sont généralement plus volumineux, leur densité et leur énergie (en Kcal / g) sont également plus faibles en raison de la présence prédominante d'eau. Les régimes riches en fibres nécessitent souvent une grande mastication précédant la déglutition. Cet effort peut entraîner une baisse de la quantité totale d'aliment ingérée (Southgate, 1990).

### **2. Effets gastriques et effets sur l'intestin grêle**

Les aliments riches en fibres sont éliminés plus lentement de l'estomac. Le volume gastrique augmenté est un état post – ingestif qui permet d'atteindre plus rapidement un état de satiété (Al – Dobaib, 2009).

Toutes les fibres en dehors de la lignine ont une action régulatrice du transit intestinal grâce à leur pouvoir hygroscopique. Le transit intestinal est accéléré par excitation mécanique directe de la paroi du tube, excitation liée à l'augmentation du contenu intestinal. Les fibres sont hygroscopiques et leur gonflement facilite le péristaltisme. La pectine, la lignine et la cellulose ont des propriétés hypocholestérolémiantes à moyen terme, en diminuant l'absorption des acides biliaires, altérant ainsi le métabolisme des stérols. Les fibres en général réduisent le taux de glucose sanguin, de cholestérol HDL, LDL et contribuent ainsi à réduire les maladies coronariennes. La pectine n'affecte pas la sécrétion d'enzymes comme la lipase, la protéinase, la trypsine ou la chymotrypsine (Jalili et *al.*, 2000).

### **3. Effets sur le côlon**

Les fibres alimentaires forment la majeure partie des composés arrivant dans le côlon avec les sécrétions intestinales composées essentiellement de mucus et de protéines. La

pectine particulièrement retarde l'absorption des lipides par complexation avec les acides biliaires nécessaires à la formation des micelles lipidiques et avec les micelles elles-mêmes. Cette complexation augmente la quantité d'acides biliaires dans les fèces (Eastwood et Morris, 1992). Les études ont montré une corrélation inverse entre la consommation des fibres alimentaires et le cancer du colon. En effet, les fibres ont la capacité de se complexer aux molécules cancérogènes, empêchant ainsi leur contact avec le colon et facilitant leur excrétion. La lignine est la fibre alimentaire la plus impliquée dans ce mécanisme (Jansen *et al.*, 1999).

#### **4. Effets des différentes classes de fibres**

L'existence de plusieurs classes de fibres implique une diversité d'effets digestifs dans l'organisme. Les effets digestifs des fibres peuvent être liés soit à une variation de la quantité de fibres ingérées sans variation de leur nature, soit à la nature des fibres (Gaëtan *et al.*, 2000). Les hémicelluloses sont mieux digérées que la cellulose mais nettement moins que les substances pectiques (De Vries *et al.*, 1999).

##### **4.1. Effets digestifs des fibres ADF**

La consommation de 59 g / jour de fibres ADF augmente de 4 à 32 % les sécrétions biliaires et de 45 % la sécrétion de stérols d'après les études menées par Ullrich *et al.* (1981) sur des adolescents dans des conditions physiologiques normales. Les travaux de Bellier et Gidenne (1996) indiquent que la digestibilité des aliments augmente de 1,35 % lorsque la teneur en fibres ADF diminue de 1 %. La teneur d'un fourrage en fibres ADF est généralement inversement proportionnelle à sa valeur alimentaire. En effet, lorsque la teneur en fibres ADF dans un fourrage augmente de 1 %, la digestibilité de l'azote total baisse également de 1 % (Gaëtan *et al.*, 2000).

#### **4.2. Effets digestifs des fibres NDF**

L'apport de fibres NDF a un effet neutre, et joue le rôle de diluant sur la digestion de l'aliment chez le porc (Perez, 1990). Chez le rat, l'apport en fibres NDF influence la digestibilité lorsque leur teneur dépasse 4 g / kg d'aliments (Bellier et Gidenne, 1996). Par ailleurs, les fibres NDF contribuent à baisser les risques d'athérosclérose et de cancer du côlon (Ullrich *et al.*, 1981).

## **CHAPITRE VI : GENERALITES SUR LA VALEUR NUTRITIONNELLE DES PROTEINES ALIMENTAIRES ET SUR LES METHODES DE SA MESURE**

La valeur nutritionnelle des protéines d'un aliment peut être définie comme étant l'aptitude de cet aliment à satisfaire aux besoins quantitatifs et qualitatifs de l'organisme en matières azotées. En période d'entretien, les apports en protéines servent essentiellement à couvrir les dépenses azotées entraînées par le renouvellement des tissus et la synthèse de certains composés impliqués dans le bon fonctionnement de l'organisme (enzymes, hormones). Il existe une relation étroite entre la valeur nutritionnelle d'une protéine et ses propriétés physico – chimiques et fonctionnelles. Il s'agit de la teneur en protéines, la qualité des protéines, la disponibilité des acides aminés qui elle, dépend de la digestibilité des protéines.

### **I. Teneurs en protéines**

Le besoin en protéines est de 14 à 25 % de la matière sèche du régime suivant l'espèce et l'état physiologique. Les protéines ne peuvent pas être remplacées par d'autres nutriments comme les glucides et les lipides (Müller et Krawinkel, 2005). Ainsi, les denrées contenant moins de 3 % de protéines (manioc, pomme de terre) ne satisfont pas les besoins protéiques de l'homme même si elles sont ingérées en quantités qui dépassent les besoins caloriques.

### **II. Qualité de la protéine et disponibilité des acides aminés**

La qualité, la valeur ou l'équilibre d'une protéine alimentaire dépend de sa composition en acides aminés. Une protéine équilibrée ou de haute qualité contient tous les acides aminés essentiels en proportions correspondant aux besoins de l'organisme humain. Les protéines d'origine animale sont généralement de meilleure qualité que celles d'origine

végétale (Antoun et Baracos, 2008). En effet, les matières protéiques animales ne renferment presque pas de substances antinutritionnelles, par rapport aux matières protéiques végétales.

Les acides aminés présents dans les protéines des régimes ne sont pas toujours totalement disponibles car la digestion de la protéine ou l'absorption des acides aminés peut être incomplète. Les acides aminés des protéines animales sont généralement digérés et absorbés à un taux de 90 %, tandis que ceux de certaines protéines végétales peuvent n'être libérés et absorbés qu'à 60 à 70 % seulement. La moins bonne digestibilité de certaines protéines peut être attribuée à plusieurs facteurs tels que : la conformation de la protéine, les interactions protéines – substances antinutritionnelles, les interactions protéines – lipides, les effets des traitements thermiques et des traitements alcalins (Johannes et *al.*, 2003).

### **III. Facteurs pouvant influencer la digestibilité des protéines**

Les facteurs qui influencent la digestibilité des protéines sont classés en deux catégories : les facteurs intrinsèques et les facteurs extrinsèques.

#### **1. Facteurs intrinsèques**

Les facteurs intrinsèques sont ceux propres à l'aliment. Ce sont en effet des facteurs qui font partie des constituants de l'aliment. Parmi eux, on peut citer les substances antinutritionnelles présentes dans l'aliment et la conformation de la protéine.

##### **1.1. Les substances antinutritionnelles**

Les substances antinutritionnelles limitant la digestibilité des protéines sont dites antiprotéinogénétiques. Elles agissent sur les protéines en formant des interactions avec elles. Les traitements thermiques et alcalins favorisent ces interactions. La conséquence, c'est la baisse de la biodisponibilité des acides aminés qui sont bloqués dans différentes réactions.

Parmi les substances antiprotéinogénétiques, on peut citer : les inhibiteurs de protéases, les phytates, les composés phénoliques, les oxalates et les tanins.

### ***1.1.1. Interactions protéines – inhibiteurs de protéases***

Les inhibiteurs de protéases sont des protéines antinutritionnelles inhibant l'activité des enzymes protéolytiques comme la trypsine, la chymotrypsine. Les interactions protéines - inhibiteurs de protéases sont une combinaison stoechiométrique de protéines et d'inhibiteurs de protéases - trypsine ou chymotrypsine s'accompagnant d'une diminution de groupes aminés libres. La présence de ces complexes dans le tractus gastro – intestinal entraîne une augmentation de la sécrétion pancréatique d'enzymes protéolytiques. Cette hypersécrétion se caractérise dans le pancréas par une conversion rapide de la méthionine en cystéine, entraînant ainsi une augmentation du besoin de l'organisme en méthionine (Elsheik et *al.*, 2000).

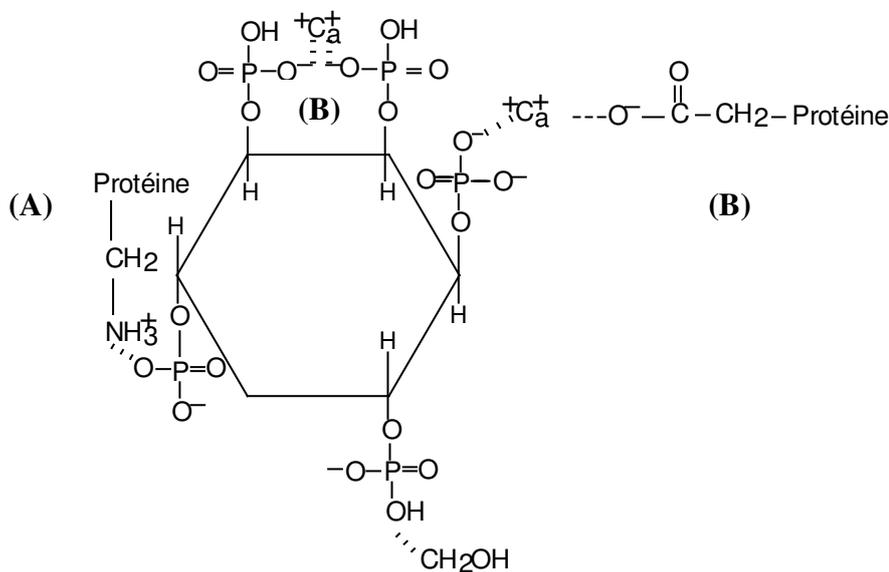
Les inhibiteurs tryptiques sont les facteurs antinutritionnels les plus étudiés, en particulier chez le soja où ils sont présents en quantités particulièrement importantes. Ils provoquent une hypertrophie du pancréas et une hypersécrétion des enzymes pancréatiques chez la souris, le rat, le cobaye et le poulet. Cette hypersécrétion d'enzymes représente donc une perte de protéines endogènes et par conséquent une baisse de la digestibilité apparente (Clark, Wiseman, 2005).

### ***1.1.2 Interactions protéines – phytates***

L'acide phytique est très répandu dans le règne végétal. Présent dans un aliment, il peut former des complexes avec les protéines et les cations divalents. L'interaction entre phytates et protéines conduit à la diminution de la solubilité des protéines qui deviennent non digestibles par les protéases. La formation du complexe protéine – phytate a plus tendance à

prendre place en milieu acide (figure 2) (Graf, 1986). A un pH inférieur au pHi, les groupements lysyl, histidyl et arginyl des protéines sont chargés positivement et peuvent former des complexes avec des phytates chargés négativement. A pH intermédiaire, seuls les groupements lysyl et arginyl des protéines sont chargés positivement et dans ce cas il y a de faibles possibilités d'interactions électrostatiques. Lorsque le pH est supérieur au pHi, les protéines et les phytates sont chargés négativement, les phytates se fixent sur les protéines à travers les ions divalents tels que le calcium, le magnésium, le cuivre, etc. L'acide phytique peut également se complexer aux groupements ε – aminés de la lysine à cause de leur protonation en dessous de pH 10 (Hídvégi et Lásztity, 2002).

Les complexes protéines – phytates peuvent se former pendant les processus de transformation de l'aliment et pendant la digestion conduisant à la diminution de la valeur nutritionnelle des protéines alimentaires.



**Figure 2** : interactions protéines-phytates à pH acide (A) et à pH basique (B) (Graf, 1986)

### ***1.1.3. Interactions protéines – composés phénoliques***

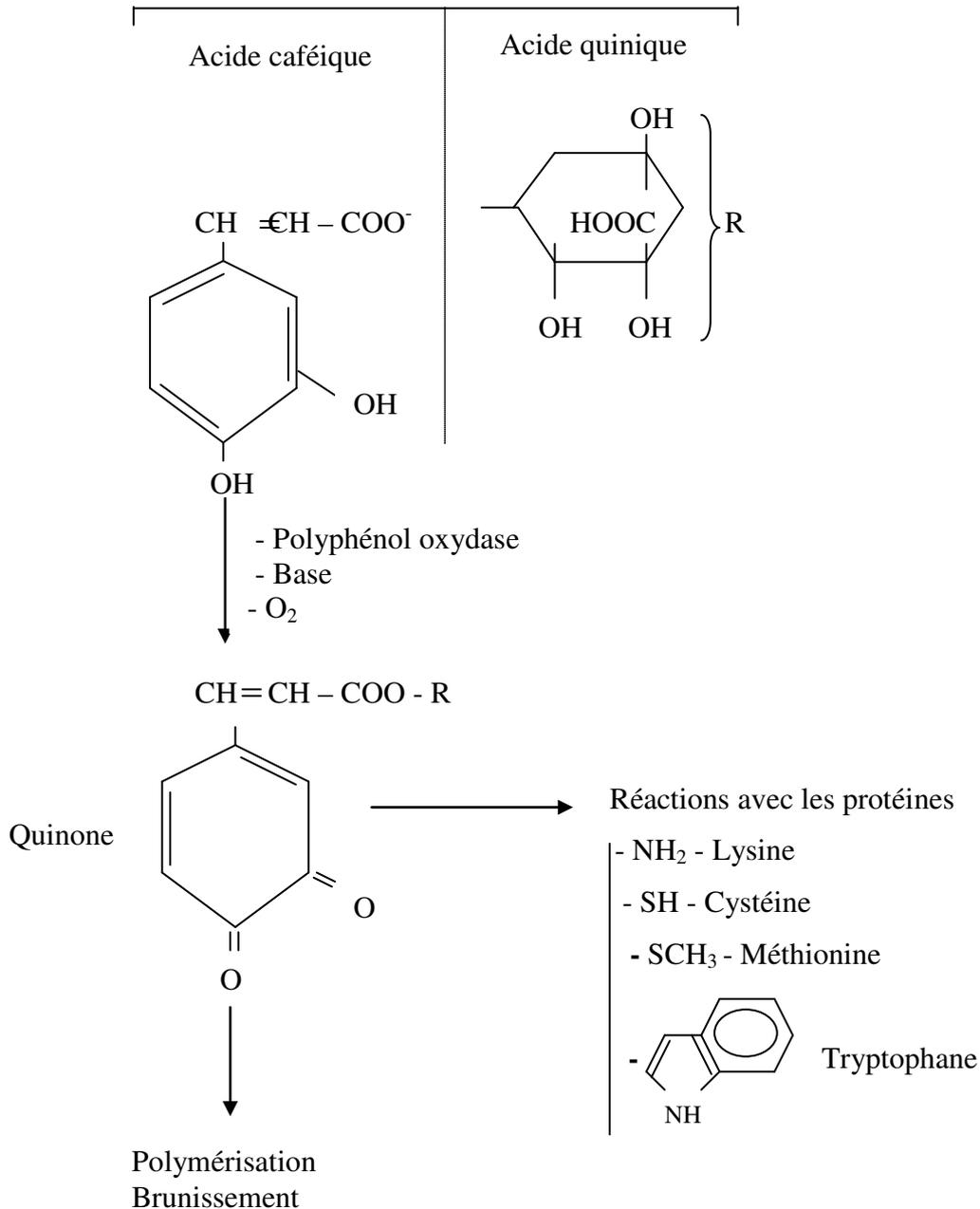
Les composés phénoliques comme l'acide chlorogénique sont largement présents dans les graines oléagineuses. Grâce à leurs nombreux groupements hydroxyles, ils ont une grande aptitude à se lier aux protéines avant et pendant la digestion, diminuant ainsi leur biodisponibilité. Ces interactions sont favorisées par des traitements thermiques et alcalins excessifs (Zaidi et *al.*, 2009).

L'oxydation des composés phénoliques dans les aliments peut avoir lieu pendant les opérations de solubilisation des protéines suite à un traitement alcalin excessif (pH supérieur à 10). Ce phénomène entraîne un brunissement de l'aliment, ce qui pose des problèmes technologiques dans les industries alimentaires. Lorsque l'oxydation des composés phénoliques a lieu sous l'action des enzymes présents dans les aliments, on lui donne le nom de brunissement enzymatique. Par contre, lorsqu'elle se déroule à pH et à température élevés, elle correspond au brunissement non enzymatique. Dans les deux cas, on aboutit à la formation des quinones qui vont se condenser aux groupements aminés des acides aminés tels que la lysine, la cystéine, la méthionine et le tryptophane (Hurrell et *al.*, 1982) (figure 3). Cette condensation entraîne l'indisponibilité biologique de certains acides aminés essentiels et la formation des composés bruns (Zaidi et *al.*, 2009).

### ***1.1.4. Interactions protéines – tanins***

Les tanins sont des composés polyphénoliques qui se subdivisent en deux groupes : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Ce sont ces derniers que l'on trouve dans les graines de céréales et de légumineuses, principalement localisés dans les téguments des graines. Leurs effets biologiques sont dus à leur capacité à se complexer avec les protéines alimentaires et / ou les enzymes. Ils sont aussi responsables de baisses de digestibilité des protéines chez le porc (Perez et Bourdon, 1992) et d'une augmentation des pertes d'azote

endogène par une abondante sécrétion du mucus (Sell *et al.*, 1985) et d'enzymes digestives (Jansman *et al.*, 1993). Leurs interactions avec les acides aminés se déroulent aussi comme indiqué à la figure 3. Les tanins influencent significativement la digestibilité *in vivo* des protéines lorsque l'aliment est à 10 % de protéines. Cet effet n'est pas observé lorsque la teneur en protéines de l'aliment est de 20 % (Li *et al.*, 2003).



**Figure 3 :** réactions des composés phénoliques (cas de l'acide caféique) avec les protéines (Hurrel *et al.*, 1982)

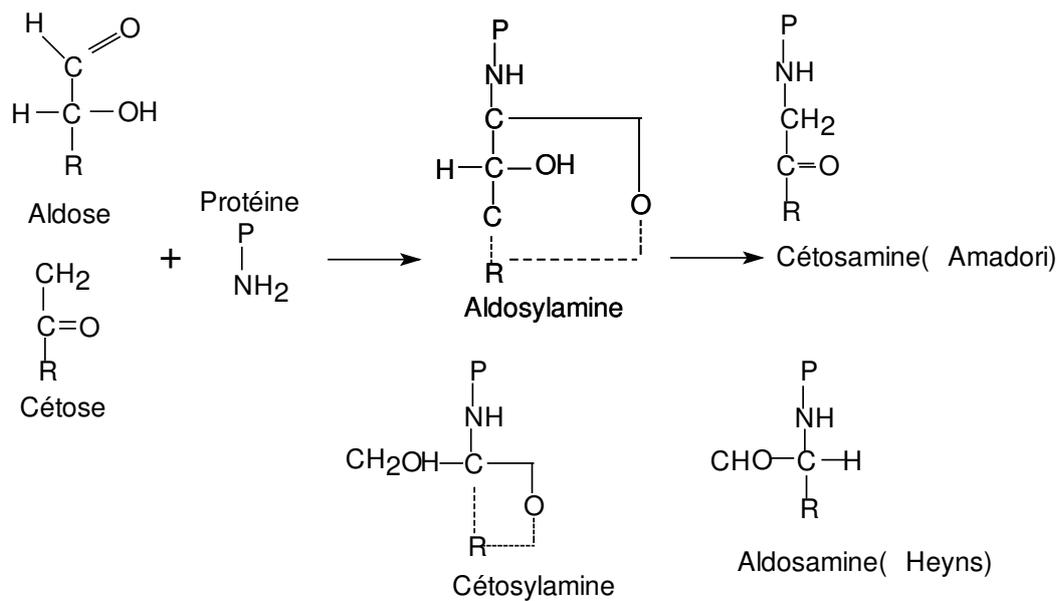
### ***1.1.5. Interactions protéines – oxalates***

L'acide oxalique de formule HOOC-COOH est un diacide organique dont la structure ne présente que deux atomes de carbone. Il est présent à l'état libre et surtout sous forme de sels, aussi bien dans le règne végétal que dans le règne animal. Les produits alimentaires d'origine animale en sont pauvres tandis que ceux d'origine végétale en sont riches. Cependant, la répartition de l'acide oxalique dans le règne végétal varie d'une famille à une autre (Sefa-Dedeh et Agyir-Sackey, 2004).

La plus grande partie de l'acide oxalique contenu dans les plantes s'y trouve sous forme d'oxalates solubles de sodium et de potassium. 10 à 20 % seulement apparaissent comme oxalate insoluble surtout dans les membranes cellulaires. Les légumes et les fruits renferment l'acide oxalique sous formes de sels de sodium, de potassium et de calcium insoluble dans l'eau (Sefa-Dedeh et *al.*, 2004). Les aspects de nocivité de l'acide oxalique se situent à deux niveaux : il limite l'utilisation biologique du calcium, des protéines et peut entraîner la formation des calculs rénaux.

Les interactions protéines – oxalates se forment par l'intermédiaire d'ions divalents à l'instar des ions calcium. La présence de deux fonctions acide carboxylique confère à l'acide oxalique la possibilité de se lier aux ions calcium. En effet, lorsque les conditions le permettent, l'acide oxalique se charge négativement, attirant électrostatiquement les ions calcium ( $\text{Ca}^{++}$ ) qui portent des charges positives. On aboutit ainsi à la formation du complexe oxalate – calcium. L'acide oxalique en solution peut réagir directement avec les protéines et empêcher ainsi leur hydrolyse par les enzymes peptidiques (Sefa-Dedeh et *al.*, 2004). La réaction de l'acide oxalique en solution avec les protéines est présentée à la figure 4.





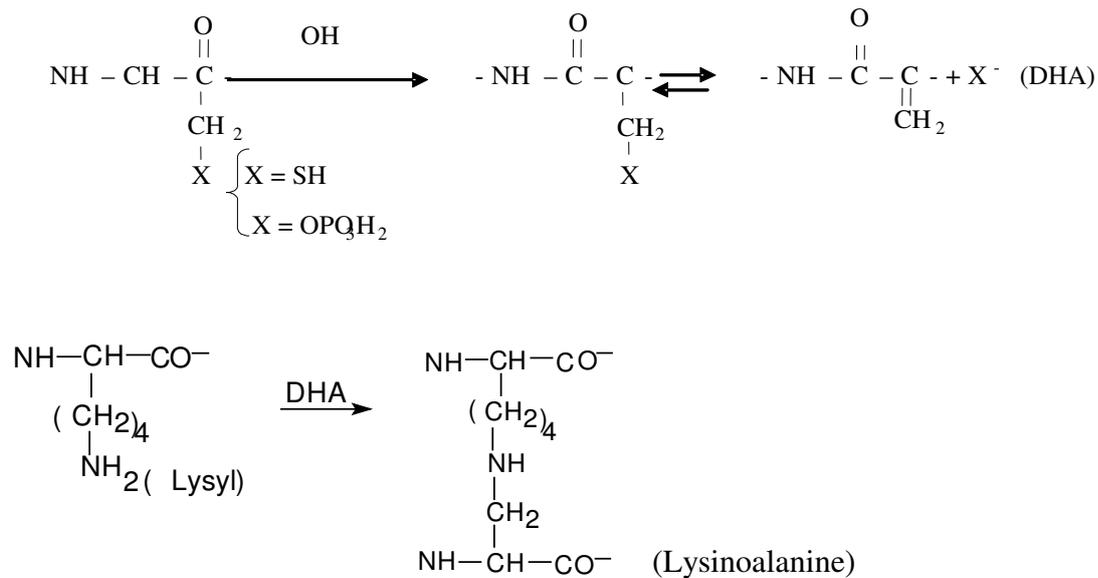
**Figure 5** : réactions de formation des produits d'Amadori et de Heyns (réaction de Maillard)

## 2.2. Les traitements alcalins

Les traitements alcalins appliqués aux aliments pour augmenter leur solubilité peuvent avoir des conséquences néfastes sur leur valeur nutritionnelle. Les traitements alcalins entre pH 10 et pH 11 causent moins de dégâts sur les protéines. Au dessus de pH 11, on note l'oxydation de la méthionine, de la cystéine et du tryptophane, les interactions entre acides aminés, la destruction de la lysine, la sérine, l'arginine, l'histidine (Friedman, 1996).

Au cours des traitements alcalins et thermiques, il y a formation de la déhydroalanine (DHA) suite à la dégradation de la lysine. La DHA va favoriser la mise en place des ponts inter et intra moléculaires et il va en résulter la lysinoalanine (figure 6).

La lysine, par son groupement NH<sub>2</sub> peut aussi réagir avec les dérivés d'oxydation des polyphénols (Moughan et *al.*, 2008).



**Figure 6** : équations de formation de la déhydroalanine (DHA) et de la lysinoalanine

### 2.3. Les traitements mécaniques : le broyage

Le broyage est un traitement technologique qui, appliqué à un aliment entraîne l'obtention des particules de granulométrie différente. Il peut s'effectuer par écrasement – friction (meules), compression – cisaillement (broyeur à cylindres). Son but technologique est de permettre un mélange plus homogène et plus stable (Melcion, 2000). De nombreux travaux sur le broyage des graines mettent en exergue le rôle de la granulométrie comme facteur de variation de la valeur alimentaire ou comme facteur étiologique de troubles digestifs chez le porc (Guillou et Landeau, 2000). Lebas (2000) montre que le broyage, en réduisant la taille des particules peut favoriser l'accessibilité des substrats aux enzymes digestives.

## IV. Méthodes de mesure de la valeur nutritionnelle des protéines

La valeur nutritionnelle diffère d'une protéine à une autre. Sa mesure permet de :

- prévoir la qualité de protéines et de mélanges de protéines alimentaires nécessaires pour satisfaire les besoins en acides aminés pour la croissance ou l'entretien ;

- classer les protéines en fonction de leur valeur nutritive potentielle ;
- déceler les modifications nutritionnelles que les protéines alimentaires peuvent subir durant les traitements technologiques et l'entreposage.

Les méthodes biologiques et chimiques sont utilisées pour mettre en évidence cette valeur nutritive.

## **1. Méthodes biologiques**

La digestibilité *in vitro* et la digestibilité *in vivo* sont deux moyens d'estimation de la valeur nutritionnelle des protéines.

### **1.1. La digestibilité *in vitro***

La digestibilité *in vitro* des protéines se fait à 37°C en présence des protéases. Elle peut se faire dans des tubes à essai, dans des sacs à dialyse ou dans un réacteur thermostaté à pH stationnaire (pH – stat). Lorsqu'elle est effectuée dans des sacs à dialyse, elle permet de mesurer l'azote libéré après hydrolyse par des protéases (Dierickx *et al.*, 1985).

Le réacteur thermostaté utilise un système multi – enzymes à pH constant tout au long de l'hydrolyse par ajout d'une solution de NaOH 0,1 ou 1 N. La mesure de la digestibilité dans ces conditions donne le degré d'hydrolyse (DH) des liaisons peptidiques d'une protéine. Le volume de NaOH ajouté pour maintenir le pH constant est corrélé au nombre de liaisons peptidiques rompues (Rozan *et al.*, 1997 ; Alonso *et al.*, 2000).

La digestibilité *in vitro* constitue certes un atout appréciable dans la mesure de la valeur nutritionnelle des protéines, mais elle reste limitée car elle ne peut se substituer à l'ensemble des facteurs mécaniques, chimiques et enzymatiques agissant en synthèse tout au long du tube digestif. Ainsi, l'expérimentation animale demeure indispensable en physiologie, notamment pour l'étude des fonctions de digestion et de nutrition (Adrian *et al.*, 1998).

## **1.2. La digestibilité *in vivo***

Les méthodes de digestibilité *in vivo* sont basées sur la mesure de la croissance et de la rétention d'azote par les animaux expérimentaux (rats) en fonction de l'apport protéique.

### ***1.2.1. Choix et justificatif de l'animal***

Des tentatives faites en vue de remplacer l'animal par un microorganisme se sont avérées vaines. Elles connaissent une double limitation. Il faut disposer des souches dont les besoins physiologiques soient de même nature que ceux de l'homme. De plus, l'échantillon à étudier ne peut être introduit directement dans le milieu de culture microbiologique. L'animal supérieur reste ainsi un réactif indispensable. Il faut alors le choisir à bon escient et le placer dans des conditions telles que sa réponse soit fiable, significative et ne puisse pas faire l'objet d'interprétations erronées.

Depuis de nombreuses années, les nutritionnistes ont adopté une souche de rat particulière, isolée par la Wistar Institute de Washington comme modèle expérimental. Les expériences en matière de nutrition font appel à la souche de rat Wistar pour plusieurs raisons (Adrian *et al.*, 1998) :

- sa croissance reflète la qualité nutritionnelle de son alimentation ;
- sa moindre sensibilité aux facteurs environnementaux et infectieux, contrairement à la souris ;
- il accepte des régimes semi- synthétiques contrairement au cobaye et au lapin
- il est aussi possible de lui faire accepter des goûts divers car il a un attrait pour certains arômes comme le citral et la vanilline.

L'avantage le plus évident du rat est son caractère d'omnivore et surtout la sensibilité de sa réponse aux conditions nutritionnelles. Par simple suivi de sa consommation journalière en quelques jours, il est possible de présager de la qualité nutritionnelle du constituant étudié,

ce qui ne dispense évidemment pas de poursuivre l'expérimentation jusqu'à son terme. De plus, il existe un degré de similitude physiologique entre le rat et l'homme (Adrian et *al.*, 1998 ; Giami, 2005).

### ***1.2.2. Notions préliminaires sur l'expérimentation animale***

Il existe deux grandes catégories d'expérimentations : celle basée sur la croissance et le développement pondéral des animaux (méthode des poids) et celle qui repose sur des critères physiologiques plus fins en mesurant la rétention azotée (méthode des bilans) (Adrian et *al.*, 1998).

Dans les deux méthodes, on constitue des lots d'animaux pris après sevrage, vers le 21<sup>ème</sup> jour, strictement identiques en tout point (souche, âge, sexe et poids) comprenant au moins 5 individus déclarés sans germes pathogènes. Ils sont placés dans des cages individuelles dont le fond est constitué d'un grillage permettant l'élimination de l'urine et des fèces au fur et à mesure de l'expérimentation. Ces cages sont placées dans l'animalerie.

L'animalerie est un local dans lequel l'aération, la température ( $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) et l'humidité (50 – 60 %) sont constantes ; l'éclairage est généralement de 12 h / 24 h (Rozan et *al.*, 1997 ; Adrian et *al.*, 1998). Les animaux sont nourris quotidiennement avec pesée de la quantité d'aliment ingéré obtenue par différence entre le poids de la mangeoire posée la veille et celui de la mangeoire restante le lendemain. La nourriture est allouée librement (*ad libitum*) ou alors sa quantité est limitée et ajustée par rapport aux consommations du lot ayant le moins ingéré. Les rats sont pesés de façon régulière à la même heure de la journée.

### ***1.2.3. Paramètres de mesure de la croissance : méthode des poids***

L'expérience se déroule pendant au moins 10 jours. La règle fondamentale est que toutes les rations soient isoazotées (même teneur en azote) et que la seule variable entre le

régime témoin (caséine) et les rations expérimentales soit la nature des protéines. Le niveau protéique de toutes les rations est généralement maintenu aux environs de 10 %. Tous les régimes doivent être complets et équilibrés, renfermant un léger excès de nutriments sauf en celui qui fait l'objet de la mesure. Dans ces conditions, la croissance est lente, la protéine est utilisée efficacement (peu de protéines sont dégradées en énergie) et les résultats expérimentaux expriment les différences de valeur nutritive des protéines étudiées et reflètent au maximum la valeur de chacune d'elles.

Les ingérés et la croissance sont ramenés à des moyennes journalières. A partir de là, on établit trois paramètres: l'indice de consommation (ICons), le Coefficient d'Efficacité Protéique (CEP) ou Protein Efficiency Ratio (PER) et le Coefficient d'Efficacité Protéique Net (CEPN) ou Net Protein Ratio (NPR) (Rozan *et al.*, 1997 ; Adrian *et al.*, 1998 ; Giami, 2005).

#### ***1.2.4. Paramètres de mesure de l'azote retenu : méthode des bilans***

La méthode des bilans s'intéresse à la mesure de l'azote ingéré et à celui perdu dans les fèces et les urines. Les bilans de digestibilité sont conduits sur des animaux placés individuellement dans des cages spécialement adaptées permettant de recueillir les rejets fécal et urinaire qui sont analysés par voie physico – chimique en fin d'expérimentation. L'ingéré azoté est égal à zéro dans le groupe de rats soumis au régime sans protéines. Pour ce groupe, le rejet azoté correspond strictement à la fraction azotée endogène. Par ce moyen, il devient possible de calculer la Valeur Biologique (VB) ou Biological Value (BV) et l'Utilisation Protéique Net (UPN) ou Net Protein Utilisation (NPU) (Adrian *et al.*, 1998 ; Giami, 2005).

## 2. Méthodes chimiques

Dans les méthodes chimiques, la valeur nutritive d'une protéine est déterminée sur la base de sa composition en acides aminés essentiels et de son acide aminé limitant. La composition en acides aminés d'un aliment protéique est déterminée après hydrolyse de ses protéines en milieu acide et analyse par chromatographie liquide en phase inverse (Ngudi et *al.*, 2003).

Le calcul de l'indice chimique (IC) d'un acide aminé donne une prévision correcte de la quantité de protéines nécessaires pour couvrir les besoins en acides aminés essentiels en période de croissance (Ngudi et *al.*, 2003). La formule générale suivante permet le calcul de l'indice chimique d'un acide aminé :

$$IC = \frac{\text{mg d'acide aminé dans 1g de protéine analysée}}{\text{mg d'acide aminé dans 1g de protéine de référence}} \times 100$$

L'acide aminé ayant le plus faible indice chimique est l'acide aminé limitant de la protéine et est noté IC<sub>1</sub>.

## 3. Méthode du PDCAAS

Le PDCAAS est une expression anglo – saxonne qui veut dire Protein Digestibility Corrected Amino Acid Scoring. En français, c'est le Score Chimique Corrigé de la Digestibilité. Cette méthode est la plus utilisée aujourd'hui pour estimer la qualité protéique des aliments destinés à l'alimentation humaine. Raison pour laquelle son calcul est basé sur les besoins en acides aminés des humains (FAO / WHO, 2007). Elle a été également adoptée par la Food Drug Administration (FDA, 1993) pour calculer le pourcentage de l'apport journalier recommandé couvert par une protéine.

Lorsqu'une protéine contient tous les acides aminés essentiels, elle est dite complète et a par conséquent un grand indice chimique. Cependant, certaines protéines végétales ne sont pas efficacement digérées à cause de la présence des facteurs antinutritionnels. De ce fait,

l'évaluation de la valeur nutritionnelle d'une protéine ne doit pas seulement se limiter à sa composition en acides aminés essentiels, mais aussi à sa digestibilité (méthode biologique).

Ainsi, pour mieux estimer la valeur nutritionnelle d'une protéine alimentaire, il faudrait combiner la méthode chimique à la méthode biologique qui, respectivement permet le calcul de la valeur de l'acide aminé limitant et donne une estimation du comportement des protéines dans le tube digestif. Ce type de combinaison est appelé : Score Chimique Corrigé de la Digestibilité (PDCAAS) ou « Indice Disco ».

Pour son application, chaque valeur de mesure de la croissance des rats (CEP, CEPN) et de l'azote retenu par les rats (CUD, VB, UPN) est multipliée par la valeur de l'acide aminé limitant de la protéine contenue dans l'aliment analysé (FAO / WHO, 2007)

## PARTIE II : ETUDE DE LA CUISSON DES GRAINES

### I. Introduction

La cuisson est un traitement thermique couramment utilisé pour réduire la quantité de facteurs antinutritionnels présents dans la graine des oléagineux tels que le soja, ainsi que dans les légumineuses. La cuisson des graines de soja à une température de 100°C entraîne une diminution de l'activité anti-trypsique de 95 % et une augmentation progressive, avec le temps de cuisson, de la digestibilité des nutriments, en particulier celui de l'azote (Kaankuka et *al.*, 1996). La cuisson des aliments, d'une manière, réduit leur teneur en quelques nutriments (cendres, protéines) et antinutriments (oxalates, tanins, phytates, inhibiteurs de trypsine) en améliorant la digestibilité des protéines (Edem et *al.*, 1994 ; Gonzalo et *al.*, 2002).

Traditionnellement, l'obtention des amandes de *R. heudelotii* passe par une cuisson préalable des graines pendant un temps arbitraire dépendant de la ménagère et qui peut aller jusqu'à toute une nuit. Elle est pratiquée généralement pendant un temps long dans le but de créer une fissure sur la coque scléreuse coriace qui reste collée sur l'amande. A l'issue de cette cuisson, il devient facile de séparer l'amande de la coque par simple ouverture de la coque fragilisée (Mosso et *al.*, 1998).

Pour être consommées, les graines de *T. conophorum* doivent aussi subir une cuisson pendant un temps variable de 2 à 6 h. Contrairement à *R. heudelotii*, la coque des graines de *T. conophorum* n'est pas adhérente à l'amande. Elle est facilement cassable à la main.

Compte tenu de ces différenciations structurales au niveau des coques, et de la variabilité dans le temps de cuisson traditionnelle des graines des deux plantes, il est judicieux de rechercher un temps de cuisson qui préserve au mieux les propriétés nutritionnelles et

réduise au maximum les substances antinutritionnelles. C'est l'objet de cette partie qui est basée sur deux hypothèses :

*Hypothèse 1* : Les teneurs en substances antinutritionnelles des tourteaux diminuent avec le temps de cuisson des graines.

*Hypothèse 2* : Le temps de cuisson améliore la digestibilité protéique des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

## **II. Matériel végétal**

Les graines crues de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* constituent le matériel végétal. Elles sont issues respectivement des drupes et des capsules achetées auprès des paysans des localités respectives de Mbalmayo dans la région du Centre et de Mélong dans la région du Littoral au Cameroun.

## **III. Méthodologie expérimentale**

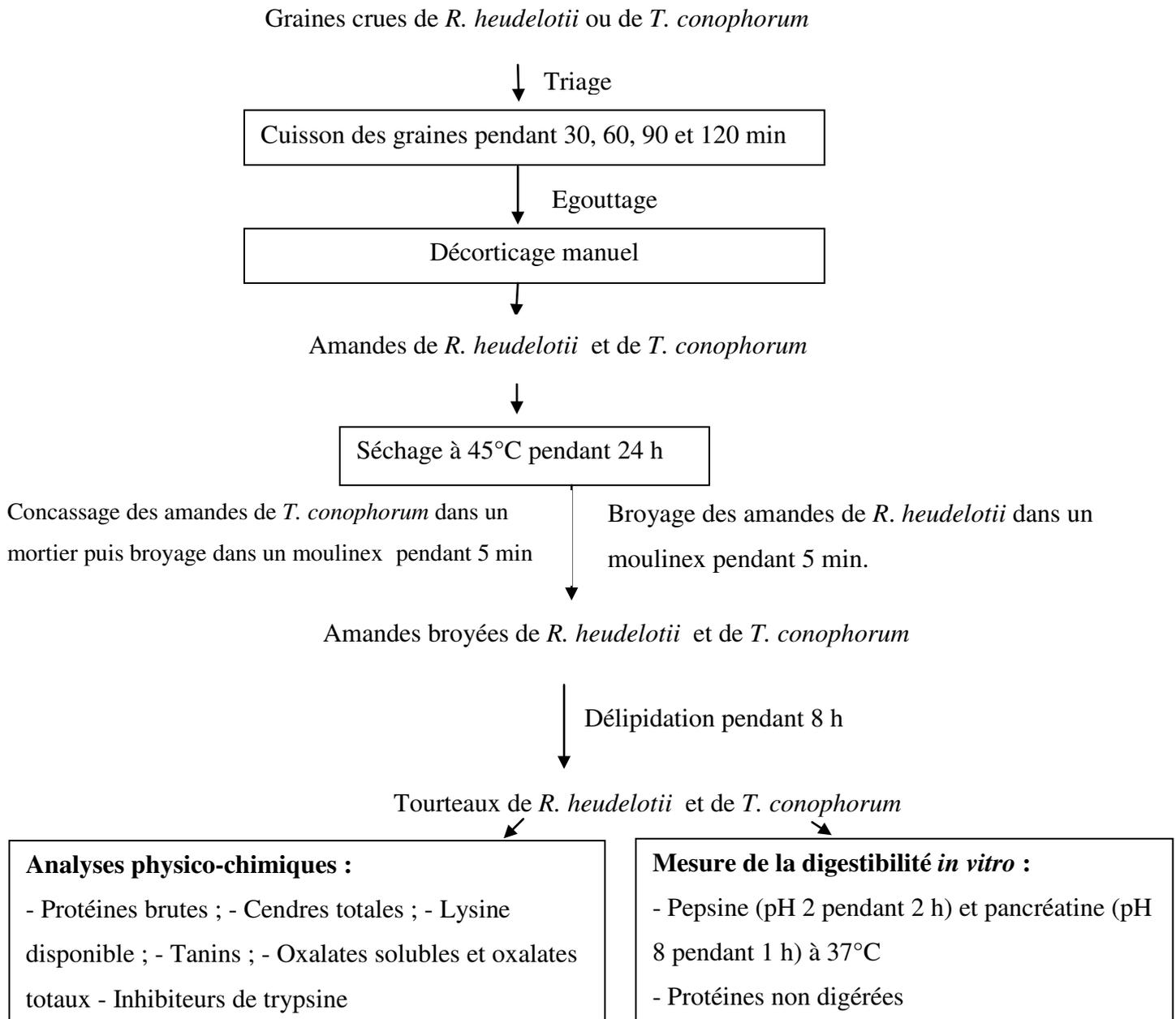
Le schéma expérimental pour la standardisation de la cuisson des graines de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* est présenté à la figure 7.

### **1. Cuisson des graines et broyage des amandes**

La cuisson des graines de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* est faite dans de l'eau distillée bouillante pendant 30, 60, 90 et 120 min respectivement dans les proportions de 2 / 5 (p / v) et de 1 / 5 (p / v) selon la méthode appliquée par Kaankuka et *al.*, (1996) sur les graines de soja.

Après cuisson, les graines sont égouttées. Les amandes de *R. heudelotii* s'obtiennent par ouverture de la coque à l'aide d'un objet pointu. Celles de *T. conophorum*, par simple concassage manuel. Ces amandes sont séchées à l'étuve à 45°C pendant 24 h dans le but de réduire leur teneur en eau. Les amandes sèches de *T. conophorum* sont d'abord pilées dans un

mortier en porcelaine pour réduire leur taille avant d'être broyées comme celles de *R. heudelotii* dans un broyeur à couteaux Moulinex (France) pendant 5 min. La charge du Moulinex est fixée à 50 % (p / v) soit 45 g d'amandes dans un volume de 90 ml.



**Figure 7** : schéma expérimental pour l'étude de la cuisson des graines de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* en fonction du temps

## **2. Détermination de la matière sèche**

La détermination de la matière sèche consiste à sécher à 105°C dans une étuve isotherme jusqu'à poids constant environ 5 g d'échantillon broyé (UICPA, 1978).

## **3. Délipidation des amandes broyées**

L'extraction à chaud de la matière grasse est faite à l'hexane selon la méthode de référence décrite par AFNOR (1981). Le principe est basé sur la solubilité différentielle des lipides dans les solvants organiques.

Les résultats exprimés par rapport à la matière sèche sont la moyenne de trois répétitions.

Les tourteaux issus de cette extraction sont désolvantisés d'abord à l'air libre pendant 1 h puis à l'étuve à 45°C pendant 2 h avant d'être de nouveau broyés dans le même Moulinex pendant 1 min dans le but de réduire la granulométrie. La charge du bol à écraser étant fixée à 2 / 3 (p / v). Les tourteaux broyés sont utilisés pour les analyses physico-chimiques et la mesure de la digestibilité *in vitro*.

## **4. Teneurs en cendres totales**

Les cendres totales représentent la partie minérale d'un produit et permettent d'avoir une idée sur son apport en sels minéraux. Elles sont quantifiées par la méthode décrite dans AFNOR (1981). Les échantillons sont incinérés complètement jusqu'à obtention des cendres blanches dans un four à moufle réglé à 550°C.

## 5. Teneurs en lysine disponible et en quelques substances antinutritionnelles

Les substances antinutritionnelles dosées pendant la cuisson des graines en fonction du temps sont les tanins, les oxalates totaux, les oxalates solubles et les inhibiteurs de trypsine.

### 5.1. Teneurs en lysine disponible

La méthode de Obi (1982) utilisée pour ce dosage consiste à mettre les tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* en présence de carbonate de sodium, de trinitrobenzène sulfonique (TNBS), d'acide chlorhydrique concentré et à lire l'absorbance à 346 nm. Pour cela, 10 mg de tourteau sont introduits dans un tube à tête rodée et additionnés à 1 ml de NaHCO<sub>3</sub> 4 % (p / v), pH 8,5. L'ensemble est placé dans un bain – marie agitateur à 40°C pendant 10 min. 1ml de TNBS à 1 % (p / v) est ajouté au mélange qui est une fois de plus incubé à 40°C pendant 2 h. 3 ml de HCl concentré (12 N) sont ensuite incorporés au contenu des tubes qui sont bouchés et laissés à l'étuve à 120°C pendant 1 h. Après refroidissement à température ambiante, 5 ml d'eau distillée sont introduits dans chaque tube puis le mélange est filtré avec le papier filtre Whatman N°1 pour éliminer les particules insolubles. Le filtrat de chaque tube est lavé deux fois avec 3 x 10 ml d'éther diéthylique qui est à chaque fois évaporé dans de l'eau chaude pendant au moins 5 min. La DO est lue à 346 nm contre le blanc.

Le blanc est préparé de la même manière que les échantillons à la différence que l'acide chlorhydrique concentré est ajouté avant le TNBS. La concentration en lysine disponible est calculée en utilisant le coefficient d'absorption spécifique de TNBS – lysine ( $\epsilon = 1,46 \times 10^4 \text{ l.mole}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). La quantité de lysine disponible des échantillons (QLys) en % MS est donnée par la relation :

$$QLys = \frac{DO * PMLys * m}{\epsilon * MS} * 100. \text{ Avec } PMLys = 146,2; m = \text{masse d'échantillon analysé ; MS}$$

= matière sèche de l'échantillon.

## 5.2. Teneurs en tanins

Le dosage des tanins se fait après extraction dans du méthanol 70 % par la méthode modifiée à la vanilline de Bainbridge et *al.* (1996).

### 5.2.1. Extraction des tanins

0,5 g d'échantillon broyé et délipidé est placé dans un bécher auquel on ajoute 30 ml de méthanol 70 % (v / v). Après 30 min d'agitation, l'ensemble est filtré sur le papier Whatman N°1. Deux extractions sont reprises de la même manière sur le résidu et le volume de l'extrait est complété à 100 ml avec de l'eau distillée.

### 5.2.2. Dosage des tanins

Le principe du dosage est basé sur le fait que l'acide tannique (plus particulièrement le flavane – 3 – ol) en présence du réactif constitué de la vanilline (0,1 mg / ml) en milieu acide (acide sulfurique 70 % (v / v)) donne une coloration rouge dont le maximum d'absorption se situe à 500 nm.

La solution étalon est constituée de l'acide tannique (0,1 mg / ml) préparée dans du méthanol pur à 98 %. Une gamme d'étalon est préparée avec une série de 6 tubes dont le 1<sup>er</sup> représente le blanc. Dans les 5 autres tubes sont introduits respectivement 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 ; 0,05 ml de solution étalon. Le tube de l'essai contient 1 ml d'extrait. A chacun d'eux sont ajoutés 5 ml de réactif à la vanilline. Après 20 min d'incubation à l'obscurité, la DO est lue à 500 nm contre le blanc.

Pour chaque essai, la quantité de tanins est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage dont l'équation de régression est :  $DO = 0,37 q - 0,04$  avec  $r^2 = 0,97$  ; q est la quantité de tanins dans chaque tube. La teneur en % / MS est obtenue à partir de la formule

$$Q = \frac{q * 100 * F}{m * MS} * 100 \text{ avec } m: \text{ masse de l'échantillon (g); } F: \text{ facteur de dilution}$$

### **5.3. Teneurs en oxalates solubles et en oxalates totaux**

Les oxalates solubles et les oxalates totaux sont extraits respectivement à l'eau distillée et dans un mélange eau distillée - acide chlorhydrique (6 N) (1 / 19 : v / v) pendant 1 h dans un bain – marie bouillant. Les oxalates extraits sont dosés après oxydation par le permanganate de potassium (0,09 N) en milieu acide sulfurique 1 N à chaud (AOAC, 1990).

Les détails opératoires pour l'extraction et le dosage sont décrits en annexe 1.

### **5.4. Teneurs en inhibiteurs de trypsine**

Les inhibiteurs de trypsine sont déterminés par mesure de l'hydrolyse d'un substrat peptidique de synthèse : le BAPNA ( $\alpha$  - benzoyl – DL – arginine P-nitroanilide) (Udensi et *al.*, 2007). Cette méthode est basée sur la baisse de la vitesse d'hydrolyse du BAPNA par la trypsine bovine causée par la présence d'inhibiteurs dans les échantillons. L'activité de la trypsine non inhibée est alors mesurée en présence du BAPNA qui libère le P - nitroanilide présentant un maximum d'absorption à 410 nm.

Pour l'extraction, dans un bécher de 100 ml contenant 0,5 g d'échantillon, on introduit 50 ml de NaOH (10 mM) et on ajuste le pH à 9,6 avec NaOH ou HCl (0,1 M). Le mélange est agité à température ambiante pendant 3 h et conservé à 4°C pendant une nuit. Cette préparation est centrifugée à 3500 trs / min pendant 20 min le lendemain et le surnageant obtenu est utilisé pour le dosage des inhibiteurs de trypsine.

#### ***5.4.1. Préparation des solutions et étalonnage***

- Tampon Tris (pH 8,2) : Dissoudre 50 mM de Tris dans 900 ml d'eau distillée, compléter le mélange à 1000 ml et ajuster à pH 8,2.

- BAPNA : Dissoudre 40 mg de BAPNA dans 1 ml de diméthyl sulphoxyde et compléter à 100 ml avec le tampon Tris préalablement maintenu à 37°C.

- Solution de trypsine : Dissoudre 20 mg de trypsine bovine dans 1 l de HCl 1 mM.

Le tableau 2 indique la méthode de préparation des tubes pour le dosage.

#### 5.4.2. Expression des résultats

Les résultats obtenus permettent de calculer l'activité de la trypsine restante et sont exprimés en mg de trypsine inhibée / g d'échantillon. Ainsi donc, la quantité de trypsine pure inhibée (QTI) par unité de g d'échantillon est calculée :  $QTI = [(2,632 * D * Ar) / m]$ . Avec D = facteur de dilution de l'extrait ; Ar (changement d'absorbance dû à l'inhibition par la trypsine) =  $(DO_b - DO_a) - (DO_d - DO_c)$  ; m = masse de l'échantillon.

**Tableau 2:** préparation des tubes pour le dosage des inhibiteurs de trypsine

	<b>Tubes</b>						
	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>b'</b>	<b>c</b>	<b>c'</b>	<b>d</b>	<b>d'</b>
Eau distillée (ml)	2	2	2	1	1	1	1
Trypsine (20 mg / l) (ml)	/	2	2	/	/	2	2
Extrait (ml)	/	/	/	1	1	1	1
<b>Incubation à 37°C pendant 10 min</b>							
BAPNA (40 mg / 100 ml) (ml)	5	5	5	5	5	5	5
<b>Incubation à 37°C pendant 10 min</b>							
Acide acétique (30 %) (ml)	1	1	1	1	1	1	1
Trypsine (ml)	2	/	/	2	2	/	/
<b>Centrifugation ou filtration</b>							
DO du surnageant à 410 nm	DO <sub>a</sub>	DO <sub>b</sub>	DO <sub>b'</sub>	DO <sub>c</sub>	DO <sub>c'</sub>	DO <sub>d</sub>	DO <sub>d'</sub>

#### 6. Cinétique de digestibilité *in vitro* des protéines brutes des tourteaux

La digestibilité *in vitro* des protéines brutes des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* en fonction du temps de cuisson est estimée par la méthode de Marrion et al. (2005) avec quelques modifications. Dans la procédure, 1 g de tourteau de *R. heudelotii* ou de *T. conophorum* est mélangé à 35 ml de pepsine (1,5 g / l) préparée à pH 2 dans un tampon

phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M). Après incubation de la préparation à  $37^\circ\text{C}$  dans un bain-marie agitateur pendant 2 h, le mélange est centrifugé à 4000 trs / min pendant 15 min. Le résidu est lavé avec 10 ml de tampon phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7) et centrifugé à nouveau à 4000 trs / min pendant 15 min. Le résidu est remis dans 35 ml de pancréatine (1,5 g / l) préparé dans  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 M) à pH 8 et incubé dans un bain-marie agitateur à  $37^\circ\text{C}$  pendant 1 h. A la fin de l'incubation, le mélange est centrifugé à 6000 trs / min pendant 15 min. Le résidu est lavé avec 10 ml de tampon phosphate (pH 7), centrifugé à 6000 trs / min pendant 15 min. Le résidu issu de cette dernière centrifugation est minéralisé pour la détermination de la teneur en protéines non digérées.

L'azote non digéré est minéralisé puis dosé par la méthode de Kjeldhal (AOAC, 1990) sur un appareil automatique de type Vadopest 4S Gerhardt (Germany). Les résultats sont exprimés en pourcentage de protéines digérées par la relation suivante :

$$\text{Protéines digérées (\%)} = \frac{\text{Protéines totales} - \text{protéines non digérées}}{\text{Protéines totales}} * 100$$

#### **IV. Analyses Statistiques**

Le dispositif expérimental est un plan factoriel 2 x 4, soit deux échantillons et quatre temps de cuisson. Les différents résultats obtenus sont la moyenne de trois répétitions et sont exprimés sous formes de moyennes  $\pm$  écart types. L'analyse de variance est utilisée pour comparer les moyennes. Le test de comparaison multiple de Duncan permet de classer les moyennes lorsqu'il y a une différence significative. Les logiciels Excel et Statgraphics sont les outils statistiques employés.

## V. Résultats et discussion

Les résultats des dosages des constituants chimiques des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* obtenus à partir des graines cuites pendant 30, 60 90 et 120 min sont donnés dans le tableau 3.

### 1. Matière sèche

La matière sèche (MS) d'un échantillon correspond à sa masse après évaporation complète de l'eau libre. Les résultats obtenus sur les deux échantillons montrent que le temps de cuisson influence ( $P < 0,05$ ) la matière sèche des tourteaux de *R. heudelotii* et n'a aucune influence ( $P > 0,05$ ) sur ceux de *T. conophorum*. Il existe une corrélation négative ( $r = - 0,87$ ) et significative ( $P < 0,05$ ) entre la matière sèche et le temps de cuisson des graines de *R. heudelotii*. Pour *T. conophorum*, elle est positive ( $r = 0,75$ ) mais non significative ( $P > 0,05$ ). Ces résultats montrent que pendant la cuisson des graines de *R. heudelotii*, le mouvement d'eau à travers la paroi de la coque est important probablement à cause de la fragilisation de sa paroi cellulaire. Si pour *T. conophorum* la matière sèche ne varie pas significativement avec le temps de cuisson, cela veut dire que les échanges à travers la coque vers l'amande et inversement sont faibles. La cause probable est le non recollement de la coque sur l'amande contrairement au *R. heudelotii*.

La variation de la matière sèche implique celle de la teneur en eau. En effet, pour les deux espèces, les teneurs en eau sont en moyenne de 5,35 et 5,69 % pour *R. heudelotii* et *T. conophorum* respectivement, valeurs inférieures à celle des graines de tournesol (6,34 %) (Evon et al., 2009). Ces résultats montrent que les tourteaux obtenus des graines cuites des deux Euphorbiaceae sont favorables pour une conservation de longue durée. D'autre part, sur le plan microbiologique, ces teneurs faibles en eau limitent le développement des microorganismes, à l'exception des moisissures (Chapeland-Leclerc et al., 2005).

**Tableau 3 :** teneurs (% MS) en quelques constituants chimiques des tourteaux obtenus des graines cuites de *R. heudelotii* et de *T.*

*conophorum* en fonction du temps de cuisson

	Temps (min)	Matière sèche	Cendres totales	Protéines (N x 6,25)	Lysine disponible	Oxalates solubles	Oxalates totaux	Inhibiteurs de trypsine*	Tanins
<i>R. heudelotii</i>	0	95,24±0,50 <sup>a</sup>	14,66±0,55 <sup>a</sup>	54,89±0,15 <sup>a</sup>	1,39±0,15 <sup>a</sup>	1,08±0,17 <sup>a</sup>	3,45±0,37 <sup>a</sup>	2,53±0,23 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>a</sup>
	30	95,43±0,93 <sup>a</sup>	13,90±0,66 <sup>b</sup>	52,29±0,47 <sup>a</sup>	1,41±0,33 <sup>a</sup>	0,80±0,17 <sup>b</sup>	3,05±0,21 <sup>a</sup>	2,43±0,09 <sup>a</sup>	0,23±0,01 <sup>a</sup>
	60	94,32±1,01 <sup>a</sup>	12,13±0,27 <sup>c</sup>	54,27±0,82 <sup>a</sup>	1,12±0,14 <sup>b</sup>	0,69±0,11 <sup>c</sup>	3,04±0,12 <sup>a</sup>	1,21±0,06 <sup>b</sup>	0,19±0,07 <sup>b</sup>
	90	94,13±0,95 <sup>b</sup>	11,72±0,72 <sup>c</sup>	54,86±0,61 <sup>a</sup>	1,11±0,00 <sup>b</sup>	0,80±0,13 <sup>b</sup>	2,88±0,05 <sup>b</sup>	0,69±0,04 <sup>c</sup>	0,20±0,05 <sup>a</sup>
	120	94,13±0,62 <sup>b</sup>	9,92±0,20 <sup>d</sup>	54,69±0,89 <sup>a</sup>	1,04±0,14 <sup>bc</sup>	0,79±0,08 <sup>b</sup>	2,69±0,24 <sup>b</sup>	0,29±0,04 <sup>d</sup>	0,19±0,01 <sup>b</sup>
<i>T. conophorum</i>	0	94,90±1,65 <sup>a</sup>	8,83±0,13 <sup>a</sup>	56,98±0,71 <sup>a</sup>	1,78±0,27 <sup>a</sup>	1,91±0,08 <sup>a</sup>	2,79±0,24 <sup>a</sup>	1,25±0,37 <sup>a</sup>	0,22±0,06 <sup>a</sup>
	30	94,78±1,43 <sup>a</sup>	8,58±0,20 <sup>a</sup>	55,21±0,10 <sup>a</sup>	1,60±0,14 <sup>a</sup>	1,82±0,21 <sup>a</sup>	2,62±0,12 <sup>b</sup>	0,62±0,04 <sup>b</sup>	0,22±0,01 <sup>a</sup>
	60	93,87±0,20 <sup>a</sup>	8,79±0,40 <sup>a</sup>	55,46±0,04 <sup>a</sup>	1,42±0,16 <sup>b</sup>	0,96±0,16 <sup>b</sup>	2,56±0,25 <sup>b</sup>	0,46±0,09 <sup>b</sup>	0,18±0,03 <sup>b</sup>
	90	94,03±0,85 <sup>a</sup>	8,54±0,11 <sup>a</sup>	56,29±0,61 <sup>a</sup>	1,26±0,29 <sup>b</sup>	0,51±0,13 <sup>c</sup>	2,20±0,14 <sup>c</sup>	0,36±0,04 <sup>c</sup>	0,15±0,01 <sup>c</sup>
	120	93,94±0,44 <sup>a</sup>	6,12±0,12 <sup>b</sup>	55,58±0,14 <sup>a</sup>	1,23±0,31 <sup>b</sup>	0,34±0,08 <sup>d</sup>	1,84±0,22 <sup>d</sup>	0,32±0,09 <sup>c</sup>	0,17±0,01 <sup>b</sup>

\* Résultats exprimés en mg / g de protéines inhibées

Pour chaque échantillon, les valeurs dans la même colonne affectées de la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes ( $P > 0,05$ ). n =3 répétitions.

## 2. Teneurs en cendres totales

Les cendres totales représentent l'ensemble des minéraux contenus dans un échantillon. Les résultats du tableau 3 laissent apparaître que par rapport aux amandes crues, la cuisson pendant 120 min entraîne une perte en cendres totales de 4,74 % pour le tourteau de *R. heudelotii* et de 2,71 % pour celui de *T. conophorum*. La corrélation entre le temps de cuisson et les teneurs en cendres est négative pour les deux Euphorbiacées. Elle est significative uniquement pour *R. heudelotii* ( $r = - 0,98$  ;  $P < 0,05$ ). Les teneurs en cendres totales des tourteaux obtenus des graines cuites pendant 120 min. sont de 9,92 et 6,12 % respectivement pour les graines de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*. Ces valeurs sont supérieures à celle de *Arachis hypogaea* (arachide) dont la teneur en cendres est de 5 % (Batal et al., 2005).

Les pertes observées pourraient s'expliquer par le phénomène de diffusion favorisé par l'épaisseur des coques de *R. heudelotii* (0,31 mm) et de *T. conophorum* (0,95 mm). De plus, la coque adhère sur l'amande de *R. heudelotii*, ce qui n'est pas le cas pour *T. conophorum*. Cette différenciation ajoutée probablement à la nature des coques ainsi que la texture des amandes interviennent pour expliquer les différences de comportement dans les échanges pendant la cuisson. La cuisson pendant 120 min induit également des pertes en cendres (4 %) des graines de *Carnivalia ensiformis*, légumineuse tropicale couramment consommée au Nigeria (Akingbade et al., 2009).

## 3. Teneurs en protéines brutes totales

Les protéines brutes totales représentent l'ensemble de l'azote converti en protéines par le facteur conventionnel de conversion 6,25 (AOAC, 1975). Les teneurs en protéines brutes des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* ne varient pas significativement ( $P > 0,05$ ) avec le temps de cuisson, les résultats restant supérieurs à 50 % pour les échantillons crus et cuits (tableau 3). On note une corrélation inverse imparfaite pour *R. heudelotii* ( $r = -$

0,31) et *T. conophorum* ( $r = - 0,37$ ) entre les teneurs en protéines brutes totales et les temps de cuisson. Les mouvements des constituants à travers la paroi favoriseraient les fluctuations non significatives des taux de protéines chez les deux espèces. La cuisson des graines n'entraîne pas de dégradation des protéines car les teneurs après cuisson sont comparables aux valeurs initiales.

#### **4. Teneurs en lysine disponible**

La lysine disponible est la lysine non bloquée dans des réactions de Maillard et biologiquement active, c'est à dire pouvant être hydrolysée par les protéases.

Les teneurs en lysine disponible des tourteaux des deux échantillons analysés dépassent 1 % et baissent significativement ( $P < 0,05$ ) pendant la cuisson (tableau 3). Les valeurs décroissent de 1,39 à 1,04 % MS (*R. heudelotii*) et de 1,78 à 1,23 % MS (*T. conophorum*). A l'issue de 120 min de cuisson, les pertes en lysine disponible sont de 25 et 31 % respectivement dans les tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*. Les corrélations sont significatives ( $P < 0,05$ ) et négatives ( $r = - 0,97$  et  $- 0,90$  respectivement) entre le temps de cuisson et les teneurs en lysine disponible. Cette baisse pendant la cuisson proviendrait du blocage de certains groupements  $\epsilon$ -amine de la lysine dans des réactions de Maillard favorisées par l'augmentation du temps de cuisson tel qu'indiqué par Gonzalo et al. (2002) sur le soja. D'autres interactions favorisées par les mouvements de l'eau et la chaleur pourraient également intervenir dans le blocage de la lysine (Moughan et Rutherford, 2008).

#### **5. Teneurs en oxalates solubles et en oxalates totaux**

##### **5.1. Oxalates solubles**

Le tourteau des graines crues de *R. heudelotii* renferme moins d'oxalates solubles (1,08 % MS) que celui de *T. conophorum* (1,91 % MS) (tableau 3). La teneur en oxalates

solubles du tourteau de *R. heudelotii* baisse de 1,08 (tourteau des graines crues) à 0,79 % MS (tourteau des graines cuites pendant 120 min). La corrélation inverse ( $r = -0,63$ ) qui existe entre le taux d'oxalates solubles et le temps de cuisson n'est cependant pas significative ( $P > 0,05$ ).

Pour *T. conophorum*, les valeurs baissent de 1,91 à 0,34 % MS pour les tourteaux des graines crues et cuites pendant 120 min respectivement. La perte en oxalates solubles est remarquable après 60 min (81,74 %) et est inversement liée au temps de cuisson des graines ( $r = -0,96$  ;  $P < 0,05$ ).

## 5.2. Oxalates totaux

La teneur en oxalates totaux du tourteau de *R. heudelotii* varie de 2,69 (graines cuites pendant 120 min) à 3,45 % MS (graines crues) ( $P < 0,05$ ). La corrélation est négative ( $r = -0,95$ ) et significative ( $P < 0,05$ ) entre les temps de cuisson et les teneurs en oxalates totaux de cet échantillon. Pour *T. conophorum*, la perte de 79 % d'oxalates totaux après 90 min de cuisson serait liée à la solubilisation de près de 23 % d'oxalates solubles. La corrélation est inverse et significative ( $r = -0,96$  ;  $P < 0,05$ ) entre le temps de cuisson des graines et la teneur en oxalates totaux de *T. conophorum*. Malgré cette baisse après 120 min de cuisson, les échantillons analysés contiennent plus d'oxalates totaux que l'arachide, le soja et le pois dont les teneurs sont de 140 ; 50 et 5 mg / 100g respectivement (Chai et Liebman, 2005).

D'une manière générale, les teneurs en oxalates solubles des tourteaux des graines crues de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* représentent respectivement 31 et 68 % des oxalates totaux. D'après les indications de Boontaganon et al. (2009) sur les formes d'oxalates solubles, l'acide oxalique des tourteaux de ces deux Euphorbiacés seraient respectivement à 31 et 68 % sous forme d'oxalates de sodium et de potassium. Ces résultats

montrent que 32 et 69 % d'oxalates apparaissent comme insolubles dans les tourteaux respectifs de *T. conophorum* et de *R. heudelotii*.

## **6. Activité d'inhibition de la trypsine**

Les inhibiteurs de trypsine sont des peptides capables d'inhiber l'activité de la trypsine. Leur présence dans un aliment a un impact sur sa digestibilité. La cuisson est l'un des traitements thermiques qui contribue à leur inactivation (Písaříková et Zralý, 2009).

L'activité d'inhibition de la trypsine (AIT) est exprimée ici en mg de trypsine inhibée par gramme d'échantillon. Le tourteau des graines crues de *R. heudelotii* a une AIT plus élevée. Les valeurs sont de 0,29 et 2,53 mg / g respectivement pour les graines cuites pendant 120 min et crues. Pour *T. conophorum*, on note une baisse de 1,25 mg / g (tourteaux des graines crues) à 0,32 mg / g (tourteaux des graines cuites pendant 120 min). Ceci correspond respectivement à 88,54 et 74,4 % de pertes en AIT. La corrélation est en effet négative et significative ( $P < 0,05$ ) entre le temps de cuisson et l'AIT des tourteaux de *R. heudelotii* ( $r = - 0,97$ ) et de *T. conophorum* ( $r = - 0,87$ ). Les inhibiteurs de trypsine de ces deux espèces végétales sont donc thermolabiles. Leur inactivation complète sur les échantillons de pois et de colza cuits a été reportée par Bishnoi et Khetarpaul (1994) ; Trugo et al. (2000). En effet, la chaleur humide inactive les inhibiteurs de trypsine par dénaturation de leur molécule protéique qui perd ainsi ses propriétés fonctionnelles (Písaříková et Zralý, 2009).

## **7. Teneurs en tanins**

Les tanins sont des composés relativement thermostables capables de complexer les protéines ou les enzymes protéiques (Li et al., 2003). Leurs teneurs exprimées en g % MS sont présentées dans le tableau 3. Les tourteaux des graines crues de *R. heudelotii* en renferment 0,24 g % MS contre 0,19 g % MS dans celles cuites pendant 120 min. Pour *T.*

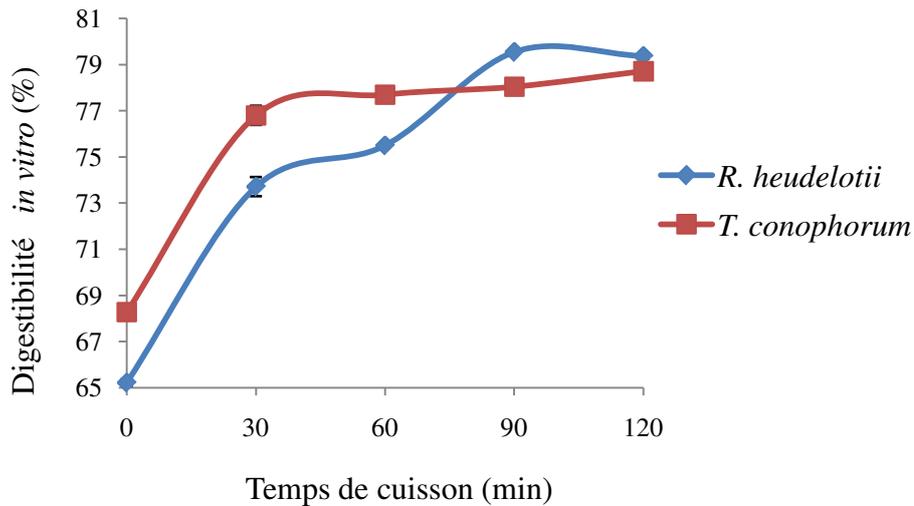
*conophorum*, on passe de 0,22 g % MS (échantillons crus) à 0,15 g % MS (échantillons cuits pendant 90 min). Pour les deux espèces, les pertes par solubilisation dans l'eau sont respectivement de 21,04 et 22,25 %. Les corrélations entre les teneurs en tanins et les temps de cuisson sont négatives mais non significatives ( $P > 0,05$ ) pour *R. heudelotii* ( $r = - 0,82$ ) et *T. conophorum* ( $r = - 0,85$ ). Cette perte en tanins peut s'expliquer par la solubilisation des tanins hydrosolubles dans l'eau de cuisson. Le phénomène observé serait facilité par la température qui fragilise la paroi de la coque en favorisant le passage des composés hydrosolubles tels que les tanins dans l'eau de cuisson.

On peut en déduire que la cuisson des graines de *T. conophorum* et de *R. heudelotii* pendant 90 et 120 min respectivement permet de réduire significativement leurs teneurs en tanins. Les résultats corroborent ceux obtenus sur le haricot (*Phaseolus vulgaris*) (Elsheik et al., 2000) et le pois (*Pisum sativum*) (Habiba, 2001). Ces auteurs ont noté respectivement 60 et 69 % de pertes en tanins pendant la cuisson.

### **8. Digestibilité *in vitro* des protéines brutes**

La quantité des protéines n'est ni une indication de la digestibilité ni celle de la valeur biologique de ses éléments nutritifs. La digestibilité *in vitro* des protéines (DIVP) est l'un des paramètres de mesure de la qualité nutritionnelle d'un aliment protéique. Elle est utilisée comme un indicateur de la biodisponibilité des acides aminés d'une protéine (Duodu et al., 2003).

La mesure de la DIVP des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* à 37°C en présence de la pepsine (pH 2) pendant 2 h et de la pancréatine (pH 8) pendant 1 h a permis en fonction du temps de cuisson d'obtenir les courbes de la figure 8. Les données brutes de la DIVP sont rassemblées dans le tableau 1A en annexe 2.



**Figure 8:** digestibilité *in vitro* des protéines des amandes délipidées de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

Il ressort de cette figure que la DIVP des tourteaux des graines crues des deux Euphorbiacées est supérieure à 60 %, ce qui correspond à plus de 34 % MS de protéines brutes digestibles en présence de la pepsine et de la pancréatine à 37°C. Cette valeur augmente significativement ( $P < 0,05$ ) avec le temps de cuisson.

Pour *R. heudelotii*, elle passe de 65,21 (tourteau des graines crues) à 79,54 % (tourteau des graines cuites pendant 90 min). L'augmentation de la DIVP est considérable après 30 min et atteint un plateau entre 90 et 120 min. Cette augmentation peut s'expliquer par une hydrolyse poussée des protéines de *R. heudelotii* suite à leur dénaturation par la chaleur (Aisha et al., 2004).

Pour *T. conophorum*, la variation est de 68,27 (échantillons crus) à 77,80 % (échantillons cuits pendant 30 min). L'augmentation est importante après 30 min de cuisson, temps après lequel on note une variation non significative. Les protéines de cette plante sembleraient plus résistantes à la cuisson que celles de *R. heudelotii*. Du fait de la variabilité des pourcentages de digestibilité en fonction des temps de cuisson, les corrélations sont de

part et d'autre non significatives ( $P > 0,05$ ) entre le temps de cuisson et la DIVP des tourteaux de *R. heudelotii* ( $r = 0,67$ ) et de *T. conophorum* ( $r = 0,68$ ).

L'augmentation de la DIVP des tourteaux des deux plantes s'explique par l'élimination d'une partie des substances antinutritionnelles telles que les oxalates, les tanins, les inhibiteurs de trypsine, dont les teneurs baissent considérablement après 60 min de cuisson. Ces antinutriments ont la propriété de former des complexes avec les protéines et les enzymes protéiques induisant ainsi une moindre digestibilité des protéines (Elsheik et al., 2000). Ces résultats corroborent ceux obtenus par Clemente et al. (2000) sur le pois chiche. Une autre raison pouvant expliquer l'augmentation de la DIVP est la simplification moléculaire des protéines au cours du traitement thermique. En effet, la température dénature les protéines entraînant la rupture des liaisons hydrogènes d'où l'obtention des structures primaires et la stabilisation de la conformation en hélice de la structure secondaire. La molécule protéique se trouve ainsi ouverte et les protéines se trouvent exposées aux sites actifs des enzymes digestives, d'où l'augmentation de la digestibilité des protéines (Duodu et al., 2003).

## **VI. Conclusion partielle**

Les substances antinutritionnelles (oxalates, tanins, inhibiteurs de trypsine), les cendres totales et la lysine disponible de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* diminuent avec le temps de cuisson des graines. La digestibilité *in vitro* des protéines des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* (supérieure à 70 % pour les échantillons cuits) est également améliorée. Le temps de cuisson auquel cette digestibilité est meilleure (plus de 77 % de protéines brutes totales) est de 90 min pour *R. heudelotii* et 30 min pour *T. conophorum*. On en déduit que la cuisson traditionnelle des graines des deux espèces devrait se faire à 100°C pendant 90 et 30 min respectivement pour préserver au mieux les qualités nutritionnelles des

protéines des amandes. Les tourteaux obtenus des graines cuites pendant 90 et 30 min seront utilisés pour la suite de l'étude.

# **PARTIE III : INFLUENCE DE LA GRANULOMETRIE SUR LA COMPOSITION PHYSICO - CHIMIQUE DES TOURTEAUX DE *R.***

## ***heudelotii* ET DE *T. conophorum***

### **I. Introduction**

La granulométrie est une caractéristique physique qui permet d'étudier la distribution de la taille des particules d'un produit. Elle est en relation directe avec toutes les opérations unitaires de broyage et de séparation (Melcion, 2000). De nombreux travaux sur le broyage des graines démontrent le rôle de la granulométrie comme facteur de variation de la valeur d'un aliment (Guillou et Landeau, 2000).

La partie précédente a permis de standardiser le temps de cuisson des graines de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* qui est souvent long et arbitraire sur le plan domestique. En effet, en plus de la cuisson, la granulométrie est un facteur pouvant influencer la composition physico-chimique et nutritionnelle des aliments. La définition d'une granulométrie permettra non seulement de standardiser certains procédés technologiques comme la préparation des concentrats et des isolats protéiques, mais aussi des études nutritionnelles. A l'issue de l'analyse des résultats obtenus, il pourra être possible de choisir la fraction granulométrique la plus représentative en éléments nutritifs (protéines, cendres, sucres) et contenant moins de substances antinutritionnelles (composés phénoliques, oxalates, phytates).

L'hypothèse selon laquelle la composition physico-chimique des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* varie avec la fraction granulométrique est à vérifier dans cette partie.

## **II. Matériel végétal**

Le matériel végétal est constitué des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* obtenus des graines cuites à 100°C pendant 90 et 30 min respectivement. Les tourteaux sont obtenus par délipidation des amandes des deux plantes cuites aux conditions optimales déterminées dans la partie précédente.

## **III. Méthodologie expérimentale**

Les analyses physico-chimiques de cette partie sont effectuées sur les tourteaux broyés pendant une minute à l'aide d'un broyeur (Moulinex, France) dont la charge du bol est fixée à 2 / 3 (p / v). Les broyats sont tamisés avec un empilement de tamis de mailles 160, 400 et 500 µm. Le schéma synoptique de l'étude est présenté à la figure 9.

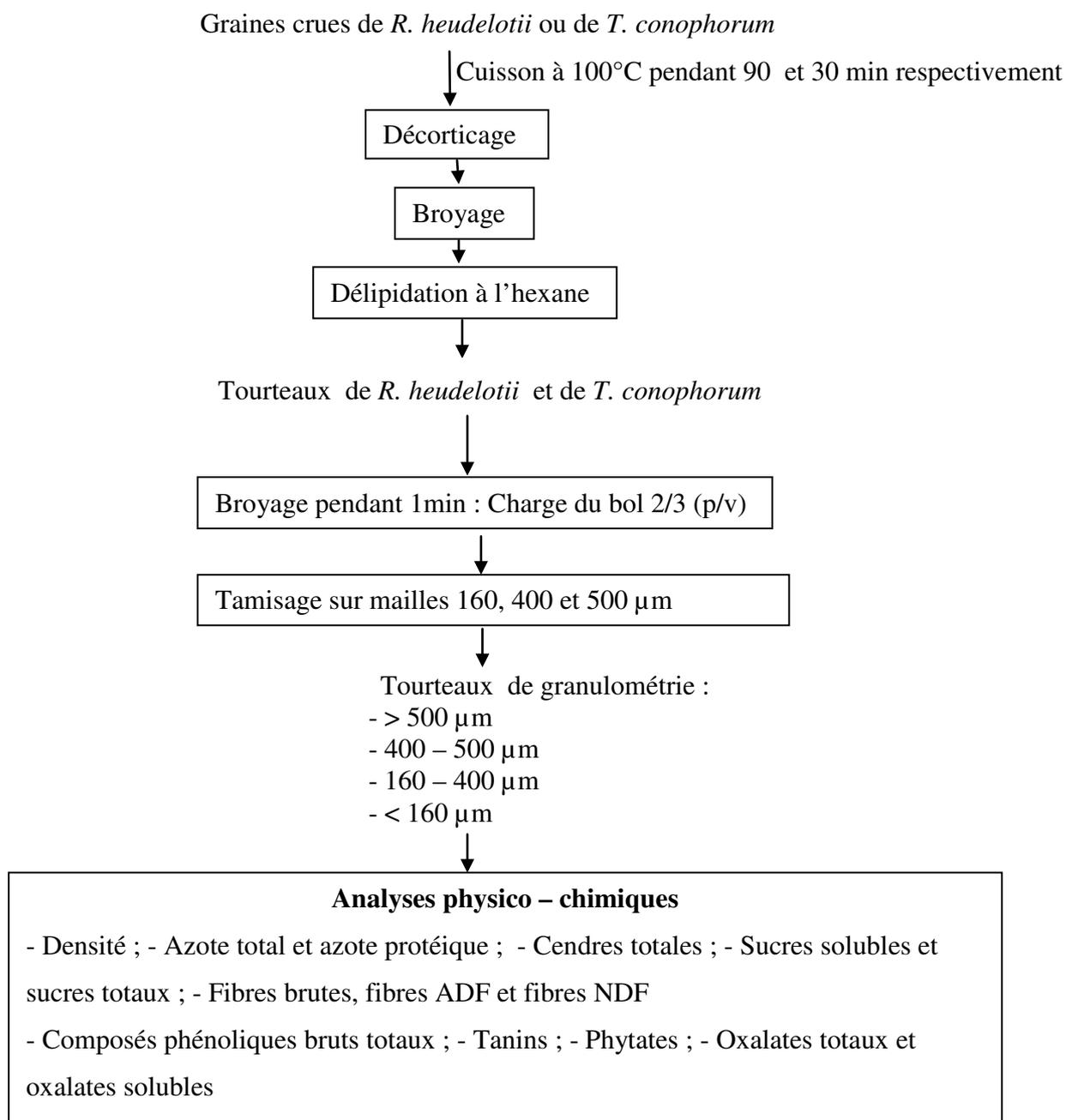
### **1. Etude de la répartition granulométrique des tourteaux**

La répartition granulométrique des tourteaux est déterminée après tamisage. Les tamis de mailles 160, 400 et 500 µm de marque AFNOR sont utilisés pour étudier la répartition granulométrique des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* selon la méthode décrite par Melcion (2000).

Le principe de la méthode consiste à déposer une masse de farine au sommet d'un empilement de tamis de dimension des mailles décroissante à laquelle on applique un mouvement vibratoire mécanique pendant un temps donné.

Pour cela, 50 g ( $M_1$ ) d'échantillon sont déposés au sommet de l'empilement de tamis qui est soumis à une vibration de 50 Hz pendant 15 min sur un vibreur de type Merck. Les particules de dimensions inférieures aux mailles du tamis traversent ( $M_2$ ) alors que celles de dimensions supérieures sont retenues ( $M_3$ ). Ces fractions et celles ayant traversé les mailles de chaque tamis ( $M_2$ ) sont pesées en vue de la détermination de la répartition granulométrique.

Pour chaque échantillon et en fonction du tamis, elle est exprimée comme suit :  $[(M_2 \text{ ou } M_3) / M_1] * 100$ .



**Figure 9** : schéma synoptique pour l'étude de l'influence de la granulométrie sur la composition physico – chimique des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

## **2. Densité des tourteaux**

La densité est la masse de farine que peut occuper un volume précis. La méthode modifiée de Adebowale et *al.* (2005) est utilisée pour cette mesure. Une masse de farine est introduite dans une capsule tarée de volume connu (v) jusqu'au ras. Pendant la mesure, la capsule est tassée plusieurs fois pour éliminer les vides entre particules. Une fois la capsule pleine, l'ensemble est pesé (m). Le résultat est exprimé en gramme d'échantillon par unité de volume (ml).

## **3. Détermination de l'azote total et de l'azote protéique**

La teneur en azote total est déterminée après sa minéralisation et son dosage par la méthode de Kjeldhal (AOAC, 1990) comme indiqué plus haut.

L'azote protéique est quantifié après précipitation des protéines des échantillons par l'acide trichloroacétique (TCA) à 24 % (p / v) pendant 1h. Après filtration, le surnageant est minéralisé pour le dosage de l'azote non protéique. L'azote protéique est la différence entre l'azote total et l'azote non protéique. La teneur en protéines totales est calculée en multipliant l'azote total par le facteur de conversion 6,25 (AOAC, 1990).

## **4. Teneurs en cendres totales**

Les cendres totales des différentes fractions granulométriques sont quantifiées selon le protocole décrit plus haut (AFNOR, 1981).

## **5. Teneurs en sucres solubles et en sucres totaux**

Les sucres totaux sont extraits à chaud dans une solution d'acide sulfurique 1,5 N pendant 45 min tandis que les sucres solubles sont solubilisés dans de l'eau distillée bouillante pendant 15 min. Les extraits de sucres sont dosés par la méthode à l'acide 3,5 –

dinitrosalicylique (DNS) (Tood Deal et *al.*, 2002). En présence d'un sucre, le DNS donne un complexe rouge-brun (l'acide 3-amino 5-nitrosalicylique) qui présente un maximum d'absorption à 540 nm.

La solution étalon est le glucose à 1 mg / ml. 0,25 à 1,25 ml de cette solution est introduite dans 5 tubes pour l'étalonnage. 1 ml de chaque extrait est analysé. Chacun de ces tubes est additionné à 0,5 ml d'eau et 0,25 ml de DNS puis porté à 100°C pendant 5 min. Les volumes sont complétés à 2 ml et la DO est lue à 540 nm contre un blanc.

La courbe d'étalonnage a pour équation de régression :  $DO = 12,72 q - 0,11$  avec  $r^2 = 0,94$ ; q est la quantité de sucres dans chaque tube.

Les teneurs en sucres totaux et en sucres solubles (% MS) de chaque échantillon sont calculées par la relation  $Q = \frac{q * 100 * F}{m * MS} * 100$ . Avec m: masse de l'échantillon (g) ; MS : matière sèche ; F : facteur de dilution.

## 6. Teneurs en fibres brutes

Les fibres brutes regroupent la cellulose, quelques hémicelluloses et la lignine. Les teneurs en fibres brutes des échantillons sont déterminées par la méthode de Weende (Wolff, 1968). Pour cela, 1g d'échantillon (M) est porté à ébullition dans 50 ml d'acide sulfurique (0,25 N) et ensuite dans 50 ml de soude (0,31 N) pendant 1h (30 min \* 2). Le résidu obtenu est séché à 105°C pendant 8 h ( $M_1$ ) puis incinéré à 550°C pendant 3 h ( $M_2$ ). La teneur en fibres brutes (FB) est exprimée en pourcentage de matière sèche (MS) par la formule :

$$FB (\%) = \frac{M_1 - M_2}{M \times MS} \times 100$$

## **7. Teneurs en fibres NDF**

Les fibres NDF sont les fibres solubles dans les détergents neutres. Elles sont composées d'hémicellulose, de cellulose et de lignine. La méthode d'analyse est celle décrite par Southgate (1978). Elle consiste à porter une masse d'échantillon (M) à ébullition en présence du Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) (30 g / l) pendant 60 min. Le résidu obtenu est séché (M<sub>1</sub>) puis incinéré (M<sub>2</sub>). La teneur en fibres ADF se calcule avec la même formule utilisée pour celle des fibres brutes.

## **8. Teneurs en fibres ADF**

Les fibres ADF sont des fibres solubles dans les détergents acides. Elles sont constituées de cellulose et de lignine. La méthode utilisée consiste à hydrolyser à chaud 1 g d'échantillon (M) dans 50 ml de Cétyle Triméthyle Ammonium Bromure (CTAB) à 20 g / l préparé dans l'acide sulfurique (0,5 N). Après 60 min d'ébullition, le mélange est filtré et le résidu est lavé avec 20 ml d'eau distillée bouillante puis séché à 105°C pendant 8 h (M<sub>1</sub>). Les résultats, exprimés en pourcentage de matière sèche (MS) sont calculés par la formule :

$$\text{ADF (\%)} = \frac{M_1}{M \times \text{MS}} \times 100$$

## **9. Teneurs en composés phénoliques bruts totaux et en tanins**

Le dosage de ces deux constituants se fait après une double extraction du matériel végétal dans du méthanol 70 % (v / v) pendant 30 min \* 2 (Bainbridge *et al.*, 1996 ; Cicco *et al.*, 2009). Le volume total extrait est ajusté à 50 ml avec le même solvant dans chaque cas.

### **9.1. Dosage des composés phénoliques bruts totaux**

Le Folin Ciocalteu est utilisé comme réactif du dosage (Cicco *et al.*, 2009). L'acide gallique à 0,2 g / l est utilisé comme étalon. 0,01 à 0,05 ml de cette solution est introduite

dans les tubes. On additionne ensuite 0,2 ml de réactif et 0,4 ml de carbonate de sodium (20 % : p / v). Le volume d'échantillon analysé est de 1 ml. L'ensemble est incubé au bain – marie à 40°C pendant 40 min puis la DO est lue à 745 nm contre le blanc.

La quantité de composés phénoliques bruts totaux est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage dont l'équation de régression est :  $DO = 0,03 q + 0,01$  avec  $r^2 = 0,97$ ;  $q$  est la quantité de composés phénoliques. La teneur en composés phénoliques (% MS) est calculée par la relation  $Q = \frac{q * 100 * F}{m * MS} * 100$  ;  $m$  : masse de l'échantillon (g) ;  $MS$  : matière sèche ;  $F$  : facteur de dilution.

## **9.2. Dosage des tanins**

Les tanins sont dosés dans le même extrait que celui des composés phénoliques selon la méthode modifiée de Bainbridge et *al.* (1996) comme décrit dans la partie précédente.

## **10. Teneurs en phytates**

La méthode de Mohammed et *al.*, 1986) est utilisée pour l'extraction et le dosage des phytates.

### **10.1. Extraction des phytates**

L'acide phytique est extrait des échantillons (0,5 g) à température ambiante (environ 25°C) avec 25 ml d'acide trichloroacétique (TCA) à 3 % (p / v) pendant 45 min. L'ensemble est centrifugé à 3500 trs / min pendant 15 min et 5 ml du surnageant sont mélangés à 3 ml de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  à 1 % (p / v) préparé dans HCl 1 N. Le mélange est chauffé dans un bain - marie bouillant pendant 45 min pour complexer le fer au phytate. Après refroidissement, suit une nouvelle centrifugation à 3500 trs / min pendant 10 min. Le phytate ferrique contenu dans le surnageant est libéré après deux incubations : une première à température ambiante pendant 2

h dans de l'acide chlorhydrique (0,5 N : p / v), une seconde dans un bain – marie bouillant pendant 15 min dans de la soude (1,5 N : p / v). Le surnageant résultant de la dernière centrifugation est utilisé pour le dosage des phytates.

## 10.2. Dosage des phytates

L'acide phytique en solution réagit avec une solution chromogénique et l'absorbance est lue à 830 nm. La solution chromogénique est préparée de la manière suivante :

*Solution A : Mélanger 16 g de molybdate d'ammonium à 120 ml d'eau distillée*

*Solution B : Mélanger 80 ml de la solution A à 40 ml d'HCl (35 %) et à 10 ml de mercure. Après agitation pendant 30 min, filtrer sur papier Whatman N°1.*

*Solution C : Mélanger le reste de la solution A à 200 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 N) et à la solution B.*

*Solution chromogénique : Mélanger 45 ml de méthanol pur à 25 ml d'eau distillée et à 25 ml de solution C.*

*La solution chromogénique est stable à 5°C pendant au moins 3 mois.*

Le phytate de sodium à 11,74 mg / 100 ml est utilisé comme solution standard. Les volumes allant de 0,01 à 0,05 ml sont utilisés pour la préparation de la gamme étalon. 0,3 ml de chaque extrait végétal d'acide phytique est analysé. Tous les volumes sont complétés à 5 ml avec de l'eau distillée puis additionnés de 0,2 ml de la solution chromogénique. Après chauffage à 95°C pendant 30 min dans un bain – marie, les tubes sont refroidis à température ambiante et la DO est lue à 830 nm contre le blanc.

La quantité de phytates (Q) est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage dont l'équation de régression est :  $DO = 0,01 q$  avec  $r^2 = 0,96$ ; q est la quantité de phytates dans

chaque essai. La relation  $Q = \frac{q * 100 * F}{m * MS} * 100$  est utilisée pour exprimer les résultats en %

MS. m: masse de l'échantillon (g); q: quantité de phytates présents dans chaque essai ; MS : matière sèche ; F : facteur de dilution.

### **11. Teneurs en oxalates solubles et en oxalates totaux**

Les teneurs en oxalates solubles et en oxalates totaux des différentes fractions granulométriques sont déterminées selon la procédure décrite précédemment (AOAC, 1990).

## **IV. Analyses statistiques**

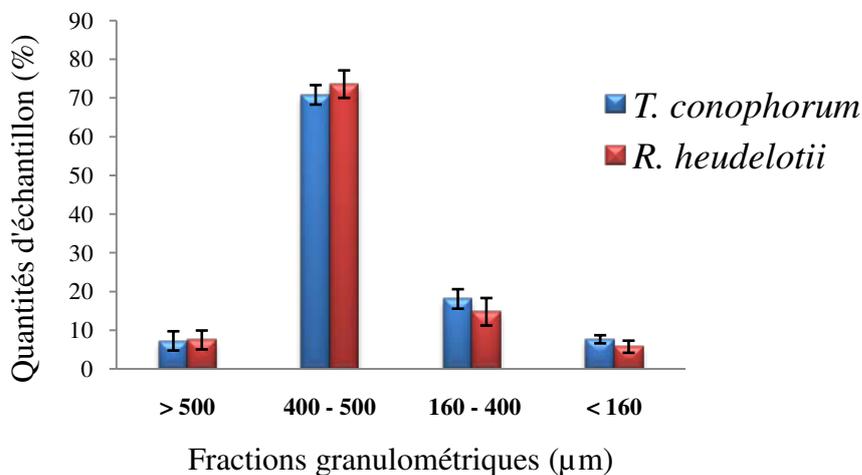
Le dispositif expérimental est un plan factoriel 2 x 3, soit deux plantes et trois tamis de mailles différentes. Toutes les analyses sont effectuées en triple. Les résultats sont traités par les mêmes outils statistiques comme dans la partie précédente.

## **V. Résultats et discussion**

### **1. Répartition granulométrique des tourteaux broyés**

La répartition granulométrique des tourteaux a nécessité l'usage des tamis de mailles 160, 400 et 500  $\mu\text{m}$ . Pour cela, les tourteaux de chaque plante sont répartis dans quatre fractions granulométriques qui sont : > 500  $\mu\text{m}$ , 400 - 500  $\mu\text{m}$ , 160 - 400  $\mu\text{m}$  et < 160  $\mu\text{m}$ . Les proportions correspondant à ces différentes fractions granulométriques sont représentées par les histogrammes de la figure 10. Il en ressort que la fraction de granulométrie comprise entre 400 et 500  $\mu\text{m}$  est la plus représentative et les valeurs sont de 73 % pour *R. heudelotii* et de 70 % pour *T. conophorum*. Cette différence, bien que non significative entre les deux plantes pour cette fraction, s'explique par la texture fine du tourteau de *R. heudelotii* par rapport à celle de *T. conophorum*. En effet, la texture et la forme des particules d'un produit, la température ambiante, la vitesse et la durée du mouvement appliqué lors du tamisage sont des facteurs susceptibles d'influencer sa répartition granulométrique (Melcion, 2000). De

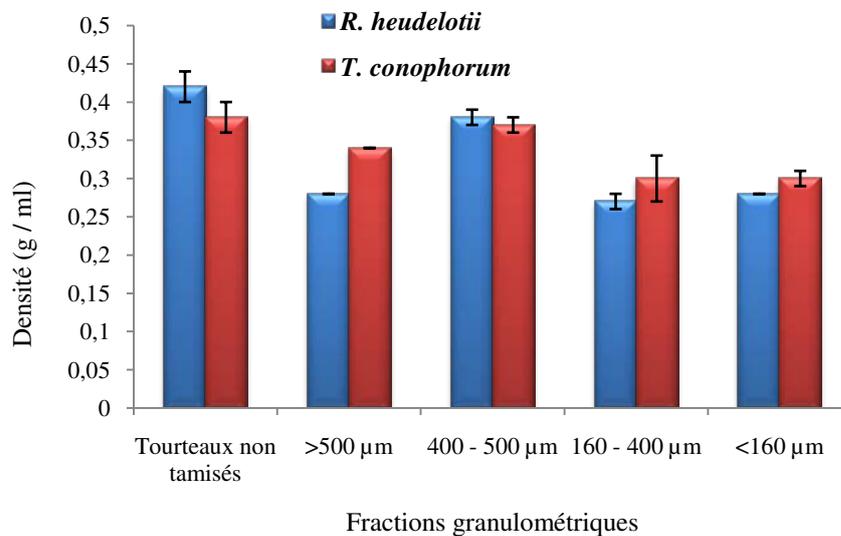
plus les teneurs en lipides résiduels pourraient avoir une influence sur la texture et par là sur la répartition granulométrique.



**Figure 10:** proportions des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* en fonction des fractions granulométriques

## 2. Densité des tourteaux

Les résultats des mesures des densités des tourteaux broyés tamisés ou non de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sont représentées par les histogrammes de la figure 11. Il en ressort que le tourteau non tamisé de *R. heudelotii* a une densité comparable (0,42 g / ml) à celle de *T. conophorum* (0,38 g / ml). Quelle que soit la plante, les plus grandes densités sont obtenues avec les tourteaux non tamisés et les fractions de granulométrie 400 - 500  $\mu\text{m}$  (0,38 g / ml). Le tourteau non tamisé de *R. heudelotii* a une plus grande densité et celle – ci est proche de la farine de *P. vulgaris* qui présente une valeur de 0,51 g / ml (Siddiq et *al.*, 2009). Cette densité élevée est l'une des raisons qui justifie l'utilisation de cet Euphorbiaceae comme épaississant (Adebowale et *al.*, 2005).



**Figure 11** : densité des tourteaux tamisés ou non de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

### 3. Teneurs en protéines brutes totales

Dans le tableau 4 sont données les teneurs en protéines brutes totales (g / % MS) des tourteaux broyés tamisés ou non de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*. Il en ressort que les tourteaux non tamisés de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* ont respectivement des teneurs en protéines brutes de 50,30 et 52,81 %. La valeur pour *R. heudelotii* est inférieure à celle trouvée par Tchiégang et *al.* (2006) qui ont signalé un chiffre de 55,37 %. La teneur en protéines brutes du tourteau de *T. conophorum* est supérieure à celle indiquée par Edem et *al.* (2009) pour les échantillons du Nigeria (35,22 %). Les différences observées s'expliquent par des origines agroclimatiques non identiques des échantillons.

L'analyse des résultats sur les tourteaux broyés tamisés montre que pour *R. heudelotii*, les valeurs varient de 2,01 (fraction < 160 µm) à 40,53 % dans la fraction 400 - 500 µm. Avec *T. conophorum*, on passe de 2,76 (fraction < 160 µm) à 43,91 % dans celle de granulométrie 400 - 500 µm. Les valeurs maximales pour les deux échantillons restent inférieures à celles obtenues avec les tourteaux non tamisés. Pour une même plante, les

teneurs en protéines brutes présentent une différence significative ( $P < 0,05$ ) d'une fraction granulométrique à une autre. Ces résultats indiquent que les tourteaux des deux Euphorbiacées dont la granulométrie est comprise entre 400 et 500  $\mu\text{m}$  sont de potentielles fractions à retenir sous réserve de la détermination de leur teneur en azote protéique.

#### **4. Teneurs en protéines totales vraies**

Les protéines totales vraies représentent l'azote protéique total multiplié par le facteur de conversion conventionnel 6,25. Les valeurs pour les deux Euphorbiacées varient d'une granulométrie à une autre ( $P < 0,05$ ) (tableau 4). Les tourteaux non tamisés de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* ont des valeurs respectives de 44,55 et de 47,98 %, ce qui correspond à 88,56 et 90,38 % de protéines brutes totales respectivement. Les protéines totales vraies des fractions granulométriques du tourteau de *R. heudelotii* varient de 1,39 (fraction  $> 500 \mu\text{m}$ ) à 37,56 % (fraction 400 - 500  $\mu\text{m}$ ). Pour *T. conophorum*, les variations vont de 2,23 (fraction  $> 500 \mu\text{m}$ ) à 40,94 % (fraction 400 - 500  $\mu\text{m}$ ). Ces valeurs maximales correspondent à 92 % (*R. heudelotii*) et 93 % (*T. conophorum*) de protéines brutes totales. L'azote non protéique qui représente environ 7 % dans les tourteaux des deux Euphorbiacées proviendrait de l'ammoniac, de l'urée et des acides aminés libres.

Quelle que soit la plante, les tourteaux non tamisés et les fractions 400 - 500  $\mu\text{m}$  des deux oléagineux étudiés ont des teneurs en protéines vraies (37,56 et 40,94 % pour *R. heudelotii* et *T. conophorum* respectivement) comparables à celle du soja (40 %) (Vollman et al., 2000) et de l'arachide (30 %) (Ng et al., 2006) qui sont des sources conventionnelles de protéines végétales.

**Tableau 4:** constituants physico – chimiques (g % MS) des tourteaux tamisés ou non de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

Constituants		Protéines	Protéines	Cendres	Sucres	Sucres	Fibres	Fibres ADF	Fibres NDF
Tourteaux		brutes totales	vraies totales	totales	solubles	totaux	brutes		
Non tamisés	<i>R. heudelotii</i>	50,30±1,46 <sup>a</sup>	44,55±0,01 <sup>a</sup>	16,35±0,07 <sup>a</sup>	5,37±1,6 <sup>a</sup>	9,98±0,07 <sup>a</sup>	10,98 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,53±1,07 <sup>a</sup>	5,34 ± 0,9 <sup>a</sup>
	<b>&gt;500µm</b>	2,94±0,14 <sup>d</sup>	1,39±0,06 <sup>c</sup>	2,69±0,07 <sup>c</sup>	0,79±0,01 <sup>d</sup>	1,87±0,07 <sup>c</sup>	5,55 ± 1,99 <sup>b</sup>	3,12±0,09 <sup>b</sup>	2,94 ± 0,17 <sup>b</sup>
Tamisés	<b>400 – 500µm</b>	40,53±1,88 <sup>b</sup>	37,56±0,01 <sup>b</sup>	8,56±0,11 <sup>b</sup>	2,25±0,01 <sup>c</sup>	5,93±0,11 <sup>b</sup>	3,43± 0,38 <sup>c</sup>	2,01±0,23 <sup>c</sup>	1,45 ± 0,29 <sup>c</sup>
	<b>160 - 400µm</b>	5,81±0,16 <sup>c</sup>	3,01±0,08 <sup>c</sup>	4,09±0,03 <sup>c</sup>	1,82±0,31 <sup>b</sup>	1,79±0,03 <sup>c</sup>	1,17 ± 0,49 <sup>d</sup>	0,68±0,19 <sup>d</sup>	0,94 ± 0,95 <sup>d</sup>
	<b>&lt;160 µm</b>	2,01±0,06 <sup>d</sup>	2,42±0,07 <sup>d</sup>	1,06±0,06 <sup>d</sup>	0,68±0,49 <sup>d</sup>	0,93±0,06 <sup>d</sup>	0,68 ± 1,54 <sup>e</sup>	0,13±0,25 <sup>e</sup>	0,41 ± 0,05 <sup>d</sup>
Non tamisés	<i>T. conophorum</i>	52,81±0,58 <sup>a</sup>	47,98±0,02 <sup>a</sup>	6,05±0,78 <sup>a</sup>	5,51±0,04 <sup>a</sup>	14,91±0,02 <sup>a</sup>	9,76 ± 0,30 <sup>a</sup>	5,33±1,09 <sup>a</sup>	4,58 ± 0,66 <sup>a</sup>
	<b>&gt;500m</b>	3,98±0,38 <sup>c</sup>	2,23±0,18 <sup>d</sup>	0,95±0,06 <sup>d</sup>	0,71±0,03 <sup>d</sup>	2,17±0,41 <sup>d</sup>	4,86 ± 0,28 <sup>b</sup>	3,78±0,30 <sup>b</sup>	2,11 ± 0,14 <sup>b</sup>
Tamisés	<b>400 – 500µm</b>	43,91±4,56 <sup>b</sup>	40,94±0,02 <sup>b</sup>	3,88±0,55 <sup>b</sup>	2,93±0,01 <sup>b</sup>	7,24±0,08 <sup>b</sup>	2,45 ± 0,66 <sup>c</sup>	1,35±0,45 <sup>c</sup>	1,17 ± 0,80 <sup>c</sup>
	<b>160 – 400µm</b>	4,12±0,15 <sup>c</sup>	3,02±0,03 <sup>c</sup>	1,94±1,24 <sup>c</sup>	1,08±0,06 <sup>c</sup>	3,54±0,08 <sup>c</sup>	1,01 ± 0,71 <sup>d</sup>	0,39±0,34 <sup>d</sup>	0,75 ± 0,05 <sup>d</sup>
	<b>&lt;160µm</b>	2,76±0,82 <sup>d</sup>	1,85±0,06 <sup>c</sup>	0,65±0,07 <sup>c</sup>	0,96±0,00 <sup>d</sup>	1,34±0,34 <sup>e</sup>	0,82 ± 0,26 <sup>c</sup>	0,26±0,02 <sup>d</sup>	0,85 ± 0,02 <sup>d</sup>

Les valeurs maximales pour chaque échantillon sont en trame de fond.

Pour chaque échantillon, les valeurs dans la même colonne ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes ( $P > 0,05$ ).

## 5. Teneurs en cendres totales

Les résultats regroupés dans le tableau 4 montrent que le tourteau non tamisé de *R. heudelotii* a deux fois plus de cendres (16,35 % MS) que celui de *T. conophorum* (6,05 %). La teneur en cendres totales du tourteau non tamisé de *R. heudelotii* est comparable à celle indiquée par Tchiégang et al. (2006) qui signalent une valeur de 16 %. Celle du tourteau de *T. conophorum* est comparable à celle trouvée par Enujiugha (2003) (6,09 %) mais supérieure à celle obtenue par Edem et al. (2009) qui indiquent une moyenne de 5,07 % pour les tourteaux de *T. conophorum* du Nigeria. La granulométrie influence ( $P < 0,05$ ) la teneur en cendres totales des tourteaux des deux Euphorbiacées. Les valeurs varient de 2,69 (fraction > 500  $\mu\text{m}$ ) à 8,56 (fraction 400 - 500  $\mu\text{m}$ ) pour *R. heudelotii* et de 0,95 (fraction > 500  $\mu\text{m}$ ) à 3,88 % (fraction 400 - 500  $\mu\text{m}$ ) pour *T. conophorum*. Il ressort de cette analyse que les fractions de granulométrie 400 - 500  $\mu\text{m}$  présentent également des teneurs élevées en cendres.

## 6. Teneurs en sucres solubles et en sucres totaux

Les résultats du dosage des sucres totaux et des sucres solubles des tourteaux broyés tamisés ou non de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sont consignés dans le tableau 4.

En ce qui concerne les sucres solubles, les tourteaux non tamisés de *R. heudelotii* et *T. conophorum* ont des valeurs comparables : 5,37 et 5,51 % respectivement (tableau 4). Les fractions de *R. heudelotii* présentent des variations de 0,78 (fraction < 160  $\mu\text{m}$ ) à 2,25 % (fraction 400 - 500  $\mu\text{m}$ ). Celles de *T. conophorum* vont de 0,71 (fraction > 500  $\mu\text{m}$ ) à 2,93 % (fraction 400 - 500  $\mu\text{m}$ ). Les tourteaux non tamisés et les tourteaux de granulométrie 400 - 500  $\mu\text{m}$  ont des teneurs en sucres solubles inférieures à celles du soja (20,70 %) et de l'arachide (24,6 %) (Nielsen et al., 1996). Cette faible teneur en sucres solubles des échantillons analysés est un facteur favorable pour la conservation des tourteaux et des

amandes dans la mesure où il y aura peu de sucres libres pour se condenser aux acides aminés libres (Moughan *et al.*, 2008).

Pour les sucres totaux, les tourteaux non tamisés renferment 9,98 (*R. heudelotii*) et 14,91 % (*T. conophorum*). Les résultats des fractions granulométriques de *R. heudelotii* varient de 0,93 (fraction < 160 µm) à 5,93 % (fraction 400 - 500 µm). Ceux de *T. conophorum*, de 1,34 (fraction < 160 µm) à 7,24 % (fraction 400 - 500 µm). Les teneurs en sucres totaux des tourteaux non tamisés et les tourteaux de granulométrie 400 - 500 µm sont inférieures à celles du soja (32,43 %) (Felberg *et al.*, 2009).

## **7. Teneurs en fibres brutes, ADF et NDF**

### **7.1. Fibres brutes**

Les fibres brutes alimentaires regroupent l'ensemble des polysaccharides végétaux non assimilables c'est à dire non hydrolysables par les enzymes endogènes du tube digestif de l'homme (De Vries *et al.*, 1999).

Le tableau 4 fait ressortir les taux de fibres brutes des tourteaux broyés tamisés ou non des deux échantillons. Il en ressort que les teneurs en fibres brutes des tourteaux non tamisés de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sont respectivement de 10,98 et 9,76 %. La valeur trouvée pour *R. heudelotii* est inférieure à celle indiquée par Tchiégang *et al.* (2006) (13,98 %). Pour *T. conophorum*, le résultat est inférieur à celui trouvé par Enujiugha (2003) (12,68 %) mais supérieur à celui indiqué par Edem *et al.* (2009) (6,68%) pour les échantillons du Nigeria. Les teneurs en fibres brutes des tourteaux non tamisés sont comparables à celle du coton (7 – 11 %), supérieures à celle de l'arachide (8,3 %) (Batal *et al.* 2005). Les résultats varient d'une granulométrie à une autre ( $P < 0,05$ ). Pour *R. heudelotii*, la variation est de 0,68 (fraction < 160 µm) à 5,55 % (fraction > 500 µm) et de 0,82 (fraction < 160 µm) à 4,86 %

(fraction > 500 µm) pour *T. conophorum*. Les tourteaux de granulométrie > 500 µm ont des teneurs en fibres brutes élevées quelle que soit l'espèce considérée.

Les teneurs importantes en fibres brutes des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sont un avantage pour l'organisme, dans la mesure où les fibres réduisent la constipation. Elles sont aussi bénéfiques aux diabétiques et aux individus souffrant de l'artériosclérose. L'excès peut conduire à une constipation par blocage mécanique si l'apport hydrique est insuffisant (Liu et al., 2000).

## **7.2. Fibres ADF**

Les tourteaux non tamisés de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* renferment respectivement 5,53 et 5,33 % de fibres ADF (tableau 4). Après broyage, les taux varient en fonction de la fraction granulométrique ( $P < 0,05$ ). Pour les deux plantes, le maximum de fibres ADF est obtenu avec les tourteaux de granulométrie > 500 µm (3,12 et 3,78 % pour *R. heudelotii* et *T. conophorum* respectivement). Malgré le fait que les fibres ADF soient la fraction la plus indigestible, elles ont cependant un effet sur le métabolisme des stérols, particulièrement sur leur absorption (Ullrich et al., 1981). Les teneurs en fibres ADF des deux Euphorbiaceae sont inférieures à celles du pois chiche (*Cicer arietinum*) et du haricot (*Phaseolus vulgaris*) avec des valeurs respectives de 6,59 et 21,57 % (Pérez-Hidalgo et al., 1997)

## **7.3. Fibres NDF**

Du tableau 4, il ressort que les teneurs en fibres NDF des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sont de 5,34 et 4,58 % respectivement. Ces valeurs sont comparables à celles des fibres ADF. Ce résultat laisse apparaître que les fibres NDF de ces tourteaux seraient essentiellement constituées de lignine et de cellulose dans la mesure où les fibres

ADF (cellulose et lignine) représentent une partie des fibres NDF (hémicellulose, cellulose et lignine) (Gaëtan et al., 2000). Les valeurs vont de 0,41 (fraction < 160 µm) à 2,94 % (fraction > 500 µm) pour le tourteau de *R. heudelotii* et de 0,75 (fraction 160 - 400 µm) à 2,11 % (fraction > 500 µm) pour celui de *T. conophorum*. Ces valeurs sont inférieures à celles du pois chiche (17,40 %) et du haricot (9,13 %) d'après les indications de Pérez-Hidalgo et al. (1997).

## **8. Teneurs en quelques substances antinutritionnelles dans les fractions des tourteaux**

Les composés phénoliques bruts totaux, les tanins, les phytates, les oxalates solubles et totaux sont les substances antinutritionnelles dosées dans les différentes fractions granulométriques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*. Les résultats de ces analyses sont rassemblés dans le tableau 5.

### **8.1. Teneurs en composés phénoliques bruts totaux et en tanins**

#### ***8.1.1. Teneurs en composés phénoliques bruts totaux***

Dans les tourteaux non tamisés de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*, les teneurs en composés phénoliques bruts totaux sont de 940 et de 1590 mg % respectivement. La granulométrie influence significativement ( $P < 0,05$ ) les différents résultats obtenus. En effet pour *R. heudelotii*, on passe de 80,05 (fraction < 160 µm) à 490,05 mg % (fraction 160 - 400 µm), tandis que pour *T. conophorum*, les taux vont de 83,08 (fraction < 160 µm) à 730 mg % (fraction 160 - 400 µm). Pour les deux Euphorbiacées, les tourteaux de granulométrie 160 - 400 µm ont des teneurs en composés phénoliques les plus élevées. Pour chaque plante, ces valeurs sont de loin inférieures à celles obtenues avec les tourteaux non tamisés. Ce résultat

signifie que le broyage et le tamisage induit une répartition inégale des composés phénoliques bruts totaux des échantillons analysés.

### **8.1.2. Teneurs en tanins**

Les teneurs en tanins des tourteaux non tamisés sont compris entre 19,63 et 17,97 mg % pour *R. heudelotii* et *T. conophorum* respectivement (tableau 5). Le broyage et le tamisage influencent les teneurs en tanins des échantillons analysés ( $P < 0,05$ ). Pour *R. heudelotii*, la valeur minimale est de 2,13 (fraction  $> 500 \mu\text{m}$ ) et la valeur maximale de 9,51 mg % (fraction 400 - 500  $\mu\text{m}$ ). Pour *T. conophorum*, les résultats varient de 1,91 (fraction  $< 160\mu\text{m}$ ) à 9,02 mg % (fraction 400 - 500  $\mu\text{m}$ ). La variation des résultats avec la granulométrie explique l'inégale répartition des constituants d'un composé alimentaire broyé et tamisé. Quelle que soit la plante, les tourteaux de granulométrie 400 - 500  $\mu\text{m}$  contiennent le maximum de tanins. Par ailleurs, cette fraction renferme également le maximum de protéines brutes. Ce résultat se justifierait par la formation des complexes protéines – tanins pendant la cuisson (Trugo et al., 2000) ou au cours des opérations de broyage.

Bien que les teneurs en tanins des deux Euphorbiacées soient faibles, leur présence peut influencer la biodisponibilité des protéines par complexation des enzymes digestives ou des protéines elles – mêmes (Li et al., 2003).

**Tableau 5** : substances antinutritionnelles (mg % MS) des tourteaux tamisés ou non de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

Constituants		Composés phénoliques	Tanins	Phytates	Oxalates solubles	Oxalates totaux
Tourteaux		bruts totaux				
<b>Non tamisés</b>	<i>R. heudelotii</i>	940,00 ± 5,02 <sup>a</sup>	19,63±0,54 <sup>a</sup>	17,57± 0,54 <sup>a</sup>	790,01±0,08 <sup>a</sup>	2690,87±0,05 <sup>a</sup>
	<b>&gt;500µm</b>	170,01 ± 3,10 <sup>d</sup>	2,13±0,41 <sup>e</sup>	3,03±0,23 <sup>d</sup>	54,51±2,11 <sup>e</sup>	620,01±2,02 <sup>d</sup>
	<b>400 - 500µm</b>	210,02 ± 5,40 <sup>c</sup>	9,51±1,41 <sup>b</sup>	6,54±0,18 <sup>b</sup>	460,11±3,01 <sup>b</sup>	1060,01±7,72 <sup>b</sup>
<b>Tamisés</b>	<b>160 - 400µm</b>	490,05 ± 6,57 <sup>b</sup>	5,17±1,89 <sup>c</sup>	5,03±0,32 <sup>c</sup>	185,09±1,02 <sup>c</sup>	790,00±6,61 <sup>c</sup>
	<b>&lt; 160µm</b>	80,05±4,63 <sup>e</sup>	3,58±1,10 <sup>d</sup>	3,07±0,36 <sup>d</sup>	90,08±1,72 <sup>d</sup>	150,03±5,51 <sup>d</sup>
<b>Non tamisés</b>	<i>T. conophorum</i>	1590,04±8,26 <sup>a</sup>	17,97±0,15 <sup>a</sup>	18,46±0,36 <sup>a</sup>	510,09±0,03 <sup>a</sup>	2200,02±0,14 <sup>a</sup>
	<b>&gt; 500 µm</b>	250,07± 6,55 <sup>d</sup>	2,52±0,30 <sup>e</sup>	4,37±0,07 <sup>b</sup>	75,02±2,07 <sup>e</sup>	104,24±4,04 <sup>e</sup>
	<b>400 - 500µm</b>	480,12±4,13 <sup>c</sup>	9,02±0,15 <sup>b</sup>	8,76±0,12 <sup>c</sup>	140,03±3,15 <sup>b</sup>	780,03±3,80 <sup>c</sup>
<b>Tamisés</b>	<b>160 - 400µm</b>	730,01±7,43 <sup>b</sup>	5,10±0,90 <sup>c</sup>	4,14±0,46 <sup>d</sup>	210,03±2,08 <sup>c</sup>	1140,04±8,80 <sup>b</sup>
	<b>&lt; 160µm</b>	83,08±3,09 <sup>e</sup>	1,91±1,41 <sup>d</sup>	1,02±0,27 <sup>e</sup>	97,11±1,45 <sup>d</sup>	287,07±2,79 <sup>d</sup>

Les valeurs maximales pour chaque échantillon sont en trame de fond.

Pour chaque échantillon, les valeurs dans la même colonne ayant la même lettre en exposant sont significativement égales ( $P > 0,05$ ).

## 8.2. Teneurs en phytates

Les teneurs en phytates des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* exprimées en mg pour 100 g de matière sèche (tableau 5) sont respectivement de 17,57 et 18,46 mg % MS. Le broyage suivi du tamisage a un effet sur les teneurs en phytates des deux Euphorbiacées. Les valeurs pour le tourteau tamisé de *R. heudelotii* vont de 3,03 (fraction > 500 µm) à 6,54 mg % (fraction 400 - 500 µm). *T. conophorum* présente des variations de 1,02 (fraction > 160 µm) à 8,76 mg % (fraction 400 - 500 µm). Quelle que soit la granulométrie, les résultats sont inférieurs à ceux du soja, du pois et du lupin dont les valeurs sont de 1,43 ; 1,02 et 1,38 % respectivement (Hídvégi et Lásztity, 2002).

## 8.3. Teneurs en oxalates solubles et en oxalates totaux

Le broyage - tamisage influence les teneurs en oxalates solubles et en oxalates totaux des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* ( $P < 0,05$ ) (tableau 5). Les valeurs observées restent inférieures à celles des tourteaux non tamisés. Le maximum en oxalates solubles (460,11 mg % MS) et en oxalates totaux (1060,01 mg % MS) du tourteau de *R. heudelotii* est noté pour la fraction 400 - 500 µm. Ce résultat dénote que dans cet échantillon, l'acide oxalique serait majoritairement lié aux minéraux et aux protéines. En effet, cette fraction granulométrique contient plus de protéines (45,53 % MS) et de cendres totales (12,56 % MS). La fraction 160 - 400 µm du tourteau de *T. conophorum* a une teneur maximale en oxalates solubles (210,03 mg % MS) et en oxalates totaux (1140,04 mg % MS). L'acide oxalique contenu dans cet échantillon serait moins lié aux protéines et aux minéraux car ces fractions ont de très faibles teneurs en protéines et en minéraux (de l'ordre de 4 g % MS). Ceci laisse penser que le broyage et le tamisage des tourteaux favoriseraient la dissociation du complexe oxalate – minéraux – protéine du tourteau de *T. conophorum*, mais n'a pas d'effet

sur celui de *R. heudelotii*. Cette distinction peut également se justifier par la différence de texture des particules des tourteaux des deux Euphorbiacées.

## **VI. Conclusion partielle**

L'analyse des résultats permet d'affirmer l'hypothèse selon laquelle la composition physico-chimique des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* varie avec la fraction granulométrique. Le broyage et le tamisage entraînent l'inégale répartition des constituants des tourteaux des deux Euphorbiacées. La fraction 400 - 500  $\mu\text{m}$  est la plus représentative et riche en protéines brutes, en cendres totales, en sucres. Les tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* de cette fraction granulométrique seront ainsi utilisés pour l'étude de la solubilité des protéines brutes en vue de la préparation des concentrats et des isolats protéiques.

# **PARTIE IV : PREPARATION DES CONCENTRATS ET DES ISOLATS PROTEIQUES ET LEURS CARACTERISATIONS CHIMIQUES ET FONCTIONNELLES**

## **I. Introduction**

La séparation, la purification et l'extraction des protéines passe par leur solubilisation dans un solvant approprié (Lorient et Mesnier, 1990). Solubiliser les protéines brutes d'une farine ou d'un tourteau dans un solvant consiste en une dispersion dans ce solvant. Le pH, la force ionique et la granulométrie d'un produit alimentaire sont quelques facteurs de variation de la solubilité de ses protéines brutes. Les aliments de particules fines sont en effet plus solubles que ceux de particules grossières (Lorient et Mesnier, 1990). Les résultats de la partie précédente ont indiqué pour les tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* que la fraction broyée et tamisée la plus représentative et riche en protéines est celle de granulométrie 400 - 500  $\mu\text{m}$ . L'obtention des courbes de solubilité des protéines brutes des tourteaux de cette fraction granulométrique guidera dans la définition des conditions de préparation des concentrats et des isolats protéiques.

Dans cette partie, il est question à partir des tourteaux de fraction 400 - 500  $\mu\text{m}$  des deux plantes de :

- définir les conditions de préparation des concentrats et des isolats protéiques à partir des courbes de solubilité des protéines brutes;
- préparer les concentrats et les isolats protéiques;
- déterminer les caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles des tourteaux tamisés (granulométrie 400 - 500 $\mu\text{m}$ ), des concentrats et des isolats protéiques.

De ces objectifs se dégagent deux hypothèses :

*Hypothèse 1* : Les courbes de solubilité des protéines brutes des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* peuvent servir pour la préparation des concentrats et des isolats protéiques.

*Hypothèse 2* : Les caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles des concentrats et des isolats protéiques sont différentes de celles des tourteaux.

## **II. Les protéines brutes des tourteaux : solubilité, préparation des concentrats et des isolats protéiques**

### **1. Solubilité des tourteaux broyés et tamisés**

Pour augmenter la force ionique du milieu de solubilisation des protéines des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*, les solutions de NaOH (0; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 ; 0,05 N) et de NaCl (0; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 M) sont utilisées. Pour chaque concentration en NaOH ou en NaCl, le pH est ajusté entre 2 et 11 (2, 4, 6, 8, 10, 11) avec une solution de NaOH ou de HCl 0,1 N.

Pour la solubilisation des protéines, 0,5 g d'échantillon délipidé de granulométrie 400 - 500  $\mu\text{m}$  est mélangé à 50 ml d'une solution de NaOH ou de NaCl de concentration connue et le pH du mélange est ajusté avec NaOH 0,2 N ou HCl 0,2 N. Après 30 min d'agitation à température ambiante, l'ensemble est centrifugé à 3500 trs / min pendant 25 min, le surnageant contenant l'azote soluble est minéralisé et dosé par la méthode de Kjeldhal (AOAC, 1990).

Le dispositif expérimental est factoriel  $6 \times 2 \times 4$ , soit six pH (2, 4, 6, 8, 10, 11), deux types de solutions et quatre concentrations de NaOH (0; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 ; 0,05 N) ou de NaCl (0; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 M).

Les résultats exprimés en pourcentages de solubilité sont la moyenne de trois répétitions. Solubilité protéique (%) =  $\frac{\text{Protéines solubles}}{\text{Protéines totales}} * 100$

## **2. Choix d'un pH isoélectrique des protéines des tourteaux**

La recherche d'un point isoélectrique (pHi) est effectuée sur les tourteaux des deux Euphorbiacées dans le but de trouver un pH auquel on a un minimum strict de protéines solubles.

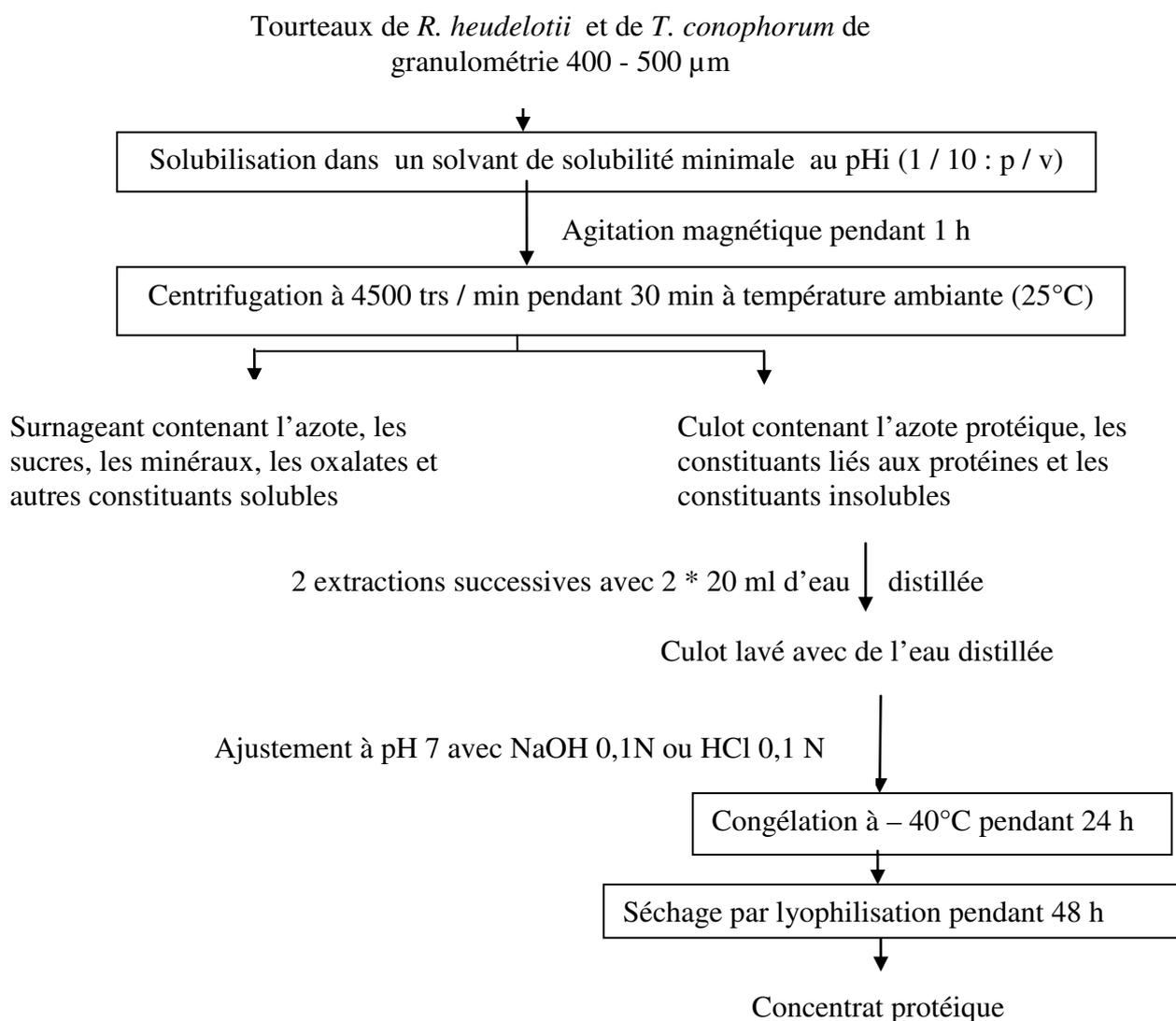
La méthode de Lqari et *al.* (2002) utilisée consiste à extraire les protéines de l'échantillon et à faire varier le pH de l'extrait dans sa zone minimale de solubilité. Pour cela, dans un bécher, on mélange 1,5 g de farine à 30 ml d'une solution de NaOH 0,2 % à pH 12. Deux extractions sous agitation de 30 min chacune sont effectuées sur le mélange. Après chaque extraction, le mélange est centrifugé à 4500 trs / min pendant 15 min. 40 ml du surnageant sont récupérés et utilisés pour l'analyse. L'extrait est ajusté à l'un des pH suivants : 4 ; 4,5 ; 5 ; 5,5 ; 6 ; 6,5 ; 7 ; 7,5 et 8 avec HCl 0,5 N avant d'être centrifugé à 4500 trs / min pendant 15 min. Le surnageant est minéralisé et l'azote soluble est dosé selon Kjeldahl (AOAC, 1990).

## **3. Préparation des concentrats protéiques**

La préparation des concentrats protéiques est une opération qui consiste à extraire les protéines dans des conditions où elles sont le moins solubles. Le solvant de préparation est celui dans lequel les protéines des échantillons étudiés présentent un minimum de solubilité.

Pratiquement, l'échantillon est mélangé au 1 / 10 (p / v) à une solution où sa solubilité est minimale et le pH est ajusté au pHi avec le NaOH 0,1 N ou HCl 0,1 N. L'ensemble est soumis à une agitation magnétique pendant 1 h à température ambiante puis centrifugé à 4500 trs / min pendant 30 min. Le culot contenant l'azote et les autres constituants non solubles est

lavé deux fois avec 2 \* 20 ml d'eau distillée et centrifugé à 4500 trs / min pendant 30 min. A l'issu de ces deux nouvelles centrifugations le pH du culot protéique lavé est ajusté à 7 avec une solution de NaOH 0,1 N ou de HCl 0,1 N avant d'être congelé à – 40°C pendant 24 h (méthode modifiée de Lqari et *al.*, 2002). Le culot représentant le concentrat protéique est lyophilisé dans un lyophilisateur de pailleuse de marque Bioblock scientifique (France) pendant 48 h. La figure 12 résume les étapes de l'opération de préparation des concentrats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*.



**Figure 12** : procédé de préparation des concentrats protéiques à partir des fractions 400 – 500  $\mu\text{m}$  des tourteaux broyés et tamisés de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

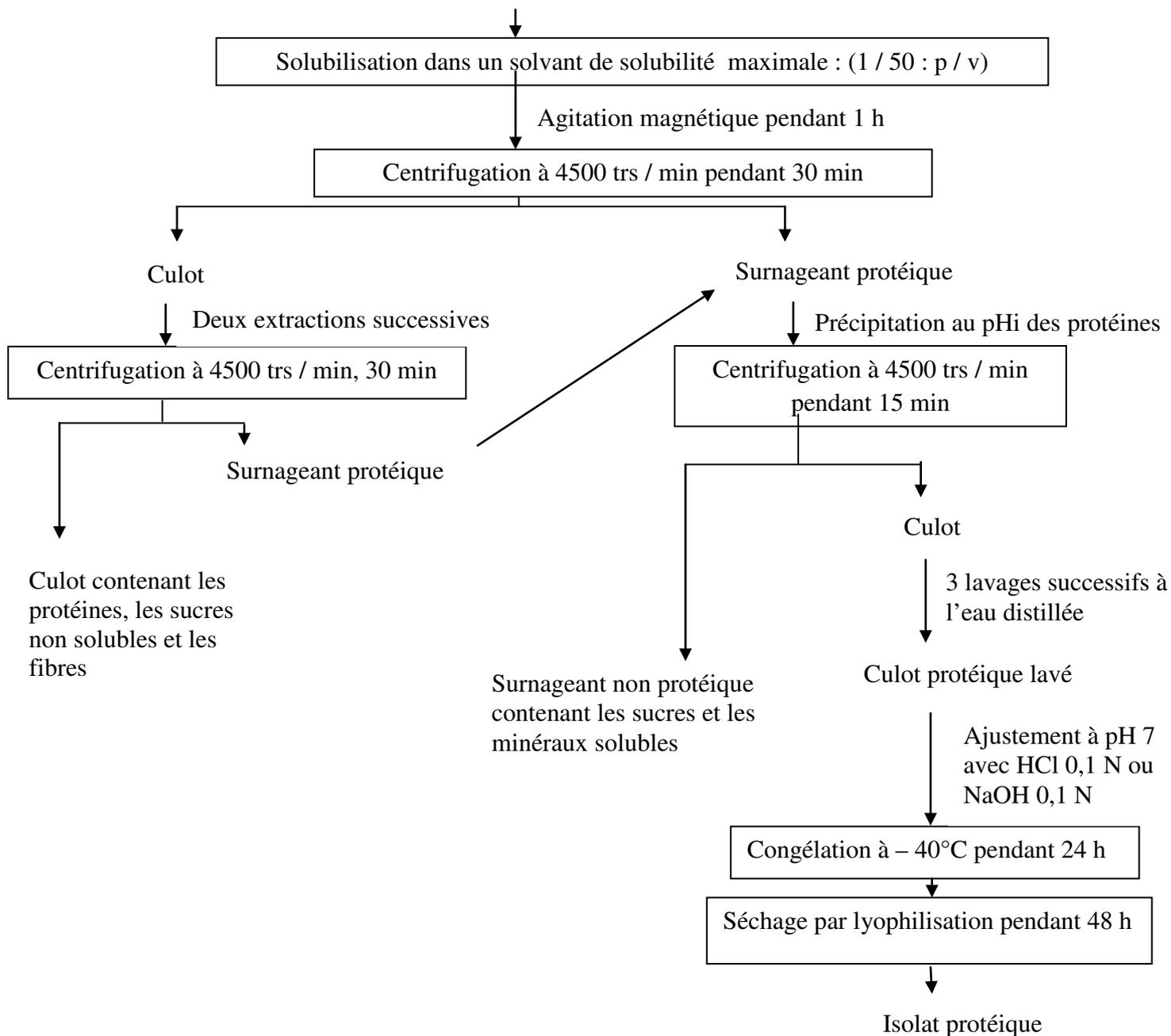
#### 4. Préparation des solats protéiques

La préparation d'isolats protéiques consiste à isoler des tourteaux de granulométrie 400 - 500  $\mu\text{m}$  les protéines des autres constituants de la farine. Elle nécessite une succession de deux opérations. Les protéines sont dans un premier temps solubilisées dans des conditions dans lesquelles elles présentent un maximum de solubilité. Dans un second temps, elles sont

précipitées à leur pHi afin de les séparer des autres constituants de la farine (méthode modifiée de Lqari et *al.*, 2002).

Pour la préparation des isolats protéiques, le tourteau de chaque plante est mis dans des conditions de solubilité maximale dans des proportions 1 / 50 (p / v). Le mélange est soumis à une agitation magnétique pendant 1 h à température ambiante (25°C) et centrifugé à 4500 trs / min pendant 30 min. Le surnageant contient les protéines et autres constituants solubles de l'échantillon. Le culot est soumis à deux nouvelles extractions (2 \* 1 h) dans les mêmes conditions pour extraire au mieux les protéines des échantillons. Chacune de ces extractions est suivie d'une centrifugation à 4500 trs / min pendant 30 min. Pour chaque échantillon, les surnageants des trois centrifugations sont rassemblés dans un bécher et les protéines sont précipitées au pHi précis. Une nouvelle centrifugation à 4500 trs / min pendant 30 min permet de récupérer le culot contenant les protéines. Le culot protéique est lavé trois fois avec de l'eau distillée. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation à 4500 trs / min pendant 15 min. L'ensemble est ajusté à pH 7 avec NaOH 0,1 N ou HCl 0,1 N puis congelé à - 40°C pendant 24 h avant d'être lyophilisé pendant 48 h (figure 13).

Tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* de granulométrie 400 - 500  $\mu\text{m}$



**Figure 13** : procédé de préparation d'isolats protéiques à partir des fractions 400 – 500

$\mu\text{m}$  des tourteaux broyés et tamisés de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

## **II. Caractérisation chimique et fonctionnelle des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques**

La caractérisation chimique des concentrats, des isolats protéiques préparés à partir des tourteaux des deux Euphorbiacées consiste à déterminer quelques uns de leurs constituants chimiques, à analyser les lipides résiduels extraits des tourteaux, à mesurer quelques paramètres de couleur et à estimer le poids moléculaire des protéines par électrophorèse sur SDS-PAGE. Sur le plan fonctionnel, il est question de mesurer la solubilité en fonction du pH à différentes forces ioniques, les capacités moussante, émulsifiante, de rétention d'huile et d'eau.

### **1. Composition en quelques constituants chimiques des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques**

Les constituants chimiques tels que l'azote total, les cendres totales, les sucres totaux, les fibres brutes, ADF et NDF sont déterminés par les méthodes déjà décrites.

#### **1.1. Teneurs en minéraux**

Le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le phosphore et le fer sont les seuls minéraux dosés.

Les taux de Na, K, Mg et Ca sont mesurés par spectrométrie d'absorption atomique (Perkin – Elmer, Model 1100, France). Les teneurs en P et Fe sont déterminées par spectrophotométrie UV visible. Pour le dosage de Na, K, Mg, P et Fe, les cendres sont dissoutes au 1 / 100 (p / v) dans une solution concentrée de HCl (36 % : p / v). La solution de cendres à 1 % (p / v) est diluée à 10 % (v / v) dans une solution de chlorure de lanthane (LaCl<sub>3</sub>) comme correcteur d'interactions pour quantifier Ca et Mg.

### ***1.1.1. Dosage du sodium, potassium, calcium et magnésium***

Le dosage des minéraux nécessite au préalable l'établissement d'une gamme étalon. Les standards sont préparés à des concentrations allant de 0,4 à 1,2 mg / l pour le Mg ; de 0,8 à 2,4 mg / l pour le Na et de 4 à 12 mg / l pour le Ca et le K. Les mesures sont effectuées à différentes longueurs d'ondes : 285,2 ; 422,7 ; 589 et 766,5 nm respectivement pour le Mg, le Ca, le Na et le K (Audigié et *al.*, 1983).

Les concentrations en minéraux de l'échantillon sont calculées à partir des courbes d'étalonnage d'équations suivantes : Na :  $y = 0,80 x - 0,05$  avec  $r^2 = 0,99$  ; Ca :  $y = 0,04 x - 0,04$  avec  $r^2 = 0,90$  ; Mg :  $y = 0,80x + 0,05$  avec  $r^2 = 0,92$ ; K :  $y = 0,83x + 0,02$  avec  $r^2 = 0,99$ . Pour chaque équation, y est la densité optique et x, la quantité du minéral analysée.

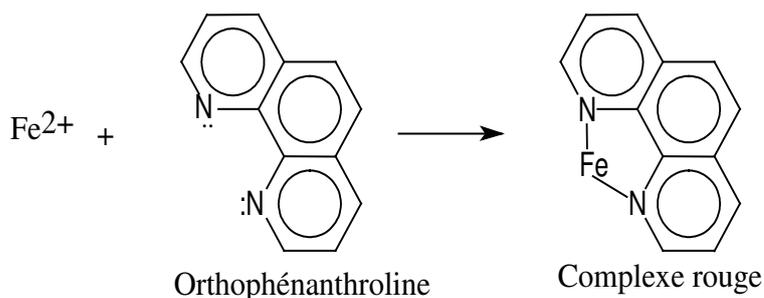
### ***1.1.2. Dosage du phosphore***

L'étalon utilisé pour cette analyse est une solution de dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) à 0,04 g / l soit 10 mg de phosphore / l de solution. Dans 5 tubes sont introduits respectivement 0,4 ; 0,8 ; 1,2 ; 1,6 ; 2,0 ml de la solution étalon. Le tube nommé essai contient 1 ml de cendre minéralisée. Dans chacun de ces tubes sont ajoutés successivement 0,2 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  10 N, 0,4 ml de molybdate d'ammonium à 2,5 % (p / v) et 0,2 ml d'acide ascorbique à 1 % (p / v). Le volume est complété à 5 ml avec de l'eau distillée. La densité optique est lue à 660 nm contre le blanc (Batal et *al.*, 2005).

La quantité de phosphore (Q) de chaque essai est calculée à partir d'une courbe d'étalonnage dont l'équation de régression est :  $\text{DO} = 0,02 q$  avec  $r^2 = 0,99$  ; q est la quantité de phosphore. La relation  $Q = \frac{q * 100 * F}{m * \text{MS}} * 100$  permet de calculer la teneur en phosphore (% mg MS) de chaque échantillon. Avec m: masse de l'échantillon (g); q: quantité de phosphore dans chaque tube ; F : facteur de dilution ; MS : matière sèche.

### 1.1.3. Dosage du fer

Le fer est déterminé par spectrophotométrie d'absorption ultraviolette suivant la méthode décrite dans AFNOR (1986). En milieu acide, le fer est réduit à l'état ferreux. Il y a ensuite formation en milieu tamponné et en présence de l'orthophénanthroline d'un complexe rouge présentant un maximum d'absorption à 510 nm (figure 14).



**Figure 14** : équation de réaction du fer ferreux avec l'orthophénanthroline

L'étalon est la solution de fer (0,01g / l) préparée à partir d'une solution mère à 70,02 mg / l de sel de Mohr ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O). Les tubes préparés pour l'étalonnage contiennent 0,1 à 0,5 ml de cette solution. Le tube essai renferme 1 ml de solution de cendre minéralisée. Tous les tubes sont complétés à 10 ml avec de l'eau distillée puis additionnés successivement à 0,5 ml d'acétate de sodium 40 % (p / v), 0,3 ml d'acide ascorbique 1 % (p / v) et 1 ml d'orthophénanthroline 1 % (p / v). La DO est lue à 500 nm contre le blanc.

La quantité de fer de chaque prise d'essai (q) est déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage dont l'équation de régression est  $DO = 26,09 q - 0,48$  avec  $r^2 = 0,99$  ; q est la quantité de fer de chaque volume analysé.

La quantité de fer (Q) dans 100g de matière sèche est donnée par la formule :

$$Q = \frac{q * 100 * F}{m * MS} * 100. \text{ Avec } m: \text{ masse de l'échantillon (g); } q: \text{ quantité de fer dans chaque}$$

tube ; F : facteur de dilution ; MS : matière sèche.

## 2. Mesure des paramètres trichromatiques

Les paramètres trichromatiques  $L^*a^*b^*$  sont mesurés sur les tourteaux, les concentrats et les isolats protéiques à l'aide d'un chromamètre (Chromameter CR210, Minolta, France S.A.D.). Cette méthode qui consiste à quantifier les paramètres de la couleur de manière objective utilise l'espace  $L^*a^*b^*$  défini par la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE). Dans le système  $L^*a^*b^*$ ,  $L^*$  représente la luminance ou brillance,  $a^*$  la balance vert – rouge et  $b^*$  la balance bleu – jaune. Une valeur positive de  $a^*$  et de  $b^*$  correspond à un mélange de rouge et de jaune dont l'intensité relative dépend de leurs valeurs.

Les mesures des paramètres de couleur  $L^*a^*b^*$  des poudres sont effectuées sur des échantillons de poudre remplis et tassés dans des boîtes de Pétri transparentes à l'aide du Chromamètre. Après une calibration de l'appareil avec une plaque blanche fournie avec l'appareil, la cellule de l'appareil est directement appliquée sur la boîte de Pétri contenant la poudre. La mesure est réalisée et on relève les valeurs  $L^*a^*b^*$  sur le moniteur. Les valeurs relevées pour la plaque de calibration sont les suivantes :  $L_s = 93,95$  ;  $a_s = -0,51$  ;  $b_s = -0,28$ . La différence de couleur pour chaque échantillon ( $\Delta E$ ) est calculée selon l'équation :  $\Delta E = [(L_s - L)^2 + (a_s - a)^2 + (b_s - b)^2]^{1/2}$  (Kaur et Singh, 2005). La teinte des échantillons notée Hue est aussi déterminée à partir de la relation :  $\text{Hue} = \text{tg}^{-1} (a/b)$  (Tchiégang, 1996).

## 3. Electrophorèse des protéines sur SDS - PAGE

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide préparé à 10 % selon les indications de Laemmli (1970) a servi pour estimer le poids moléculaire des protéines de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*.

La séparation des protéines se fait après leur dépôt sur le gel de polyacrylamide. Les extraits protéiques sont déposés entre deux plaques de verre sur lesquelles sont coulés successivement le gel de séparation et le gel de concentration.

### **3.1. Préparation du gel de séparation**

Le gel de séparation sépare les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Il est préparé à 10 % à partir d'un mélange de 2 ml d'eau distillée, 2,5 ml de tampon Tris HCl, pH 8,8, 100µl de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 10 %, 3,35 ml d'acrylamide / bisacrylamide 30 %, 15µl de TEMED (Tétraméthyl Diaminométhane) et 100 µl d'APS (Ammonium Persulfate) 10 %. Le mélange est homogénéisé et est immédiatement coulé entre deux plaques de verre fixées sur un support. La polymérisation du gel est complète après 30 min (Laemmli 1970).

### **3.2. Préparation du gel de concentration**

Le gel de concentration permet aux protéines de migrer et d'arriver au même moment sur le gel de séparation. Il est préparé dans un bécher de 50 ml à partir de 2,85 ml d'eau distillée, 1,25 ml de tampon Tris HCl pH 6,8, 50 µl de SDS 10 %, 850 µl d'acrylamide / bisacrylamide 30 %, 15 µl de TEMED et 50 µl d'APS 10 %. Après homogénéisation, le mélange est coulé sur le gel de séparation déjà polymérisé et un peigne est inséré entre ces plaques à la limite du gel de concentration. Après polymérisation de celui - ci, le peigne est retiré formant ainsi des puits.

### **3.3. Préparation des extraits protéiques**

Les extraits protéiques sont préparés à 1% (p / v) tel qu'indiqué par Urbano et *al.* (2005). Pour cela, 100 mg d'échantillon sont mélangés à 2,5 ml de SDS (1 %) et 2,5 ml de β - mercaptoéthanol (1 %) dans un tampon phosphate à pH 7,8. Le mélange est centrifugé à 2500 trs / min pendant 15 min et le surnageant est récupéré pour la préparation des solutions de dépôt. Pour cela, 950 µl de bleu de bromophénol sont mélangés à 50 µl de β - mercaptoéthanol dans des tubes côniques de 20 ml. 20 µl de ce mélange sont mélangés à 10

$\mu\text{l}$  d'extrait protéique dans d'autres tubes côniques de 10 ml. Ce mélange est placé au bain – marie à 100°C pendant 5 min.

### **3.4. Migration proprement dite**

Les plaques de verre supportant le gel polymérisé sont placées dans une cuve d'électrophorèse. Du tampon d'électrophorèse conducteur ou tampon de migration est mis dans la cuve. Le tampon de migration est préparé à partir de 30 g de Trisma, 144 g de glycine et 10 g de SDS dans une fiole de 1000 ml avec de l'eau distillée. 10  $\mu\text{l}$  de la solution de dépôt sont déposés dans les puits de migration. 10  $\mu\text{l}$  d'un marqueur de protéines (BenchMark™ Protein ladder) de masses molaires variant de 10 à 220 KDa est déposé dans un puit du gel au même moment que le mélange protéique pour estimer le poids moléculaire des protéines analysées. La migration s'effectue sous l'action d'un champ électrique à intensité constante (25 mA) et tension maximale fixée à 150 V.

A la fin de la migration, le gel est démoulé et placé d'abord dans une solution de fixation (250 ml isopropanol + 100 ml acide acétique + 650 ml eau) pour fixer les protéines, puis dans une solution de coloration préparée à partir de l'acide acétique (100 ml), de l'eau (900 ml) et de 60 mg du bleu Coomassie (G – 250). On obtient ainsi différentes bandes. Le gel est placé dans une solution d'acide acétique à 10 % pour sa décoloration.

La droite :  $\log(\text{masse molaire}) = f(\text{mobilité relative})$  permet de déterminer la masse molaire d'une protéine inconnue.

### **4. Extraction et analyse des lipides résiduels**

L'extraction à l'hexane n'épuise pas toujours totalement les lipides contenus dans la matière (surtout les phospholipides). L'évaluation des taux de lipides résiduels nécessite l'utilisation du système de solvant chloroforme / méthanol et l'analyse par CCM

(Chromatographie sur Couche Mince). La CPG (Chromatographie en Phase Gazeuse) permet d'avoir la composition en acides gras de ces lipides résiduels.

#### **4.1. Extraction des lipides résiduels**

La méthode utilisée est celle de Folch et *al.* (1957) modifiée par Christie (1982). L'extraction se fait sur les tourteaux des deux plantes avec le mélange chloroforme / méthanol (2 / 1 : v / v). Le mélange solvant + échantillon de masse (m) connue est agité pendant 3 min puis filtré sur Buchner muni d'un papier filtre Whatman N°1. Les résidus sont de nouveau dispersés dans le même mélange de solvants, homogénéisés pendant 3 min puis refiltrés. Les filtrats sont additionnés de 0,2 ml de NaCl 0,7 % puis rassemblés dans des ampoules à décanter. Après 2 h, la séparation de la phase surnageante de la phase organique (contenant la quasi – totalité des lipides) est faite. Cette dernière est récupérée dans un ballon taré ( $M_1$ ), puis le solvant est éliminé à 50°C à l'évaporateur rotatif sous vide et le résidu lipidique est pesé ( $M_2$ ). La teneur en lipides résiduels est calculée par la relation :  $\frac{(M_2 - M_1)}{m} * 100$ .

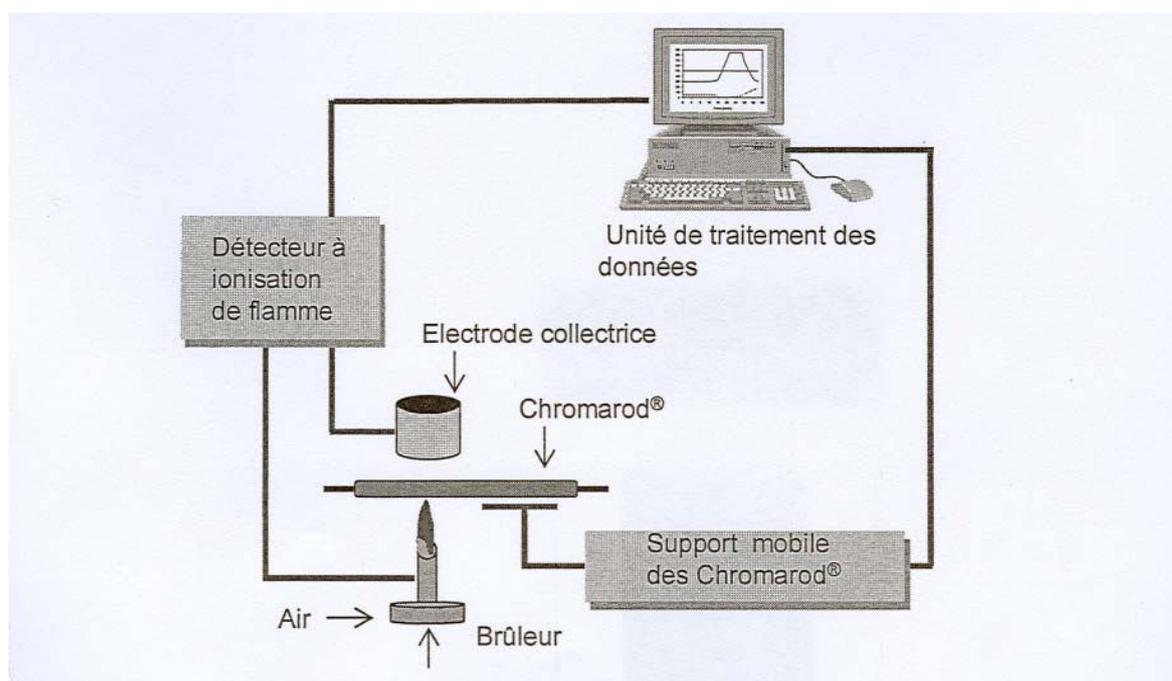
#### **4.2. Analyse des lipides résiduels**

##### ***4.2.1. Chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme***

Parmi les méthodes de séparation et de quantification des classes de lipides, la chromatographie sur couche mince couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Iatroscan®) est très utilisée de nos jours en raison de son efficacité et sa bonne résolution (Linder et *al.*, 2005).

#### 4.2.1.1 Principe de la chromatographie à flamme - Iatroscan

C'est une méthode chromatographique qui combine la chromatographie sur couche mince (CCM) à la détection par ionisation de flamme. La couche d'absorbant (la silice) est fixée sur des baguettes de quartz appelées chromarods®. Les composés organiques sont déposés sur une couche mince et détectés par un système à ionisation de flamme hydrogène / air. Les molécules organiques sont ionisées dans une flamme hydrogène / air. Les ions formés sont collectés entre deux électrodes provoquant un courant d'ionisation qui est ensuite amplifié au niveau du détecteur à ionisation de flamme (FID Ammeter) avant d'être analysés par le logiciel (Chromstar™) ( Laboratory Inc, Tokyo – Japan) (figure 15).



**Figure 15:** schéma du principe de chromatographie à flamme Iatroscan MK – 5

#### 4.2.1.2. Quantification des phospholipides

Avant toute analyse, les chromarods doivent être nettoyés au niveau de l'analyseur en utilisant la fonction « Blank Scan » pour éliminer les impuretés. Les échantillons à analyser sont dissous à raison de 5 mg / ml de chloroforme, et 2 µl du mélange sont déposés sur des

baguettes chromarods ou rods à l'aide d'une micropipette de 1µl (Hirshmann™ Laborgeräte, Germany). Dans un premier temps, les chromarods sont placés dans un mélange hexane / diéthyl éther / acide formique (80 / 20 / 0,2 : v / v / v) pendant 25 min (De Shreijver et Vermeulen, 1991 ; Sebedio & Juaneda, 1991 ; Linder et *al.*, 2005) pour séparer les lipides neutres (triglycérides) et les stérols. La deuxième migration effectuée dans un éluant constitué de chloroforme / méthanol / ammoniacque (65 / 35 / 5 v / v / v) pendant 45 min sépare individuellement les phospholipides. Après chaque migration, les chromarods sont séchés dans une étuve (Rod Dryer TK – B, Tokyo, Japon) à 100°C pendant 1min. Un brûlage total (« Normal Scan ») des chromarods permet de détecter les lipides polaires. La chromatographie est réalisée à 20°C sous un flux d'air (200 ml / min) et d'hydrogène (160 ml / min). Le temps de brûlage est de 30 s pour un rod.

#### ***4.2.2. Détermination de la composition en acides gras par chromatographie en phase gazeuse***

##### ***4.2.2.1. Préparation des esters méthyliques***

Les esters méthyliques d'acides gras sont préparés à chaud dans du trifluorure de bore (BF<sub>3</sub>) – méthanol à 14 % (9,1 ml BF<sub>3</sub> + 3,9 ml méthanol) (AOAC, 1990). 25 mg d'échantillon sont pesés dans un tube à vis de 10 ml auquel est ajouté 1 ml de toluène. Après 45 min de chauffage dans un bain sec à 100°C, le mélange est refroidi et additionné de 1 ml d'eau millipore et de 1 ml de cyclohexane. L'ensemble est fermé, agité au vortex puis laissé au repos pour un délai de 5 min. Après décantation, le surnageant contenant les esters formés est récupéré dans un flacon bouché et analysé par chromatographie en phase gazeuse.

#### ***4.2.2 Analyse par chromatographie en phase gazeuse***

La séparation des esters méthyliques est réalisée à l'aide d'un chromatographe Péri 2000 (Périchrom, Saulx – les – Chatreux, France) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne utilisée est une colonne capillaire (25 m de longueur, 0,25 mm de diamètre dont l'épaisseur du film est de 0,5  $\mu\text{m}$ ) garnie de polyéthylène glycol greffé sur l'acide téréphtalique (Périchrom). Les températures du détecteur et de l'injecteur sont fixées à 260°C. Pendant l'analyse, la colonne est successivement chauffée à 70°C pendant 2 min, à 180°C (39,9°C / min) pendant 8 min puis à 220°C (3°C / min) pendant 45 min. Elle se refroidit de 39,9°C / min.

Les pics sont identifiés à l'aide des standards d'acides gras de source végétale fournis par la société Supelco (Belle fonte, USA).

Le logiciel Winlab III version 4.0 permet l'intégration des pics et le calcul des pourcentages de chaque acide gras.

#### ***4.2.3. Identification des classes de phospholipides par HPLC-SM***

Les types de phospholipides des lipides résiduels sont séparés et identifiés par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse (SM) dans le laboratoire d'analyse LCMS du LIBio de l'ENSAIA – INPL – Nancy (France). La séparation est faite à l'aide d'une colonne C18 de 150 mm de longueur, 2,1 mm de diamètre interne minie d'une pré – colonne (Alltima, Alltech, France).

Le gradient de séparation est constitué d'un tampon A (méthanol / ammoniac / triéthylamine / acide formique) et d'un tampon B constitué de chloroforme pur (tableau 6). La vitesse d'élution est de 0,2 ml / min.

Les molécules séparées sont ionisées en spectrométrie de masse en mode electrospray de polarité négative à 230°C sous azote dans des conditions suivantes : voltage source, 5 V, voltage capillaire -3 V, tube lens – 132 V.

**Tableau 6** : gradient d'élution des classes de phospholipides par HPLC-SM

Temps (min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	5	95
11	30	70
14	80	20
18	80	20
20	5	95
25	5	95

L'acquisition et l'exploitation des résultats est faite à l'aide d'un logiciel Model 600 Data Analysis System (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### **5. Indice de solubilité et solubilité des protéines brutes, des concentrats et des isolats protéiques**

L'indice de solubilité des échantillons mesure la solubilité de tous leurs constituants dans des conditions définies. C'est le rapport de la masse de substances solubilisées sur la masse de départ (AACC, 1990).

La solubilité des protéines est mesurée dans du NaCl 0,2 M à pH 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 et 11. La procédure de solubilisation de l'azote et du dosage est identique à celle décrite pour la solubilisation des protéines des tourteaux (méthode modifiée de Lqari et *al.*, 2002). Le résultat est la moyenne de trois répétitions. Il est exprimé comme suit :

$$\text{Solubilité protéique (\%)} = \frac{\text{Protéines solubles}}{\text{Protéines totales}} * 100$$

## 6. Capacités de rétention d'eau et d'huile

Les mesures des capacités de rétention d'eau et d'huile sont effectuées selon la méthode de Phillips et *al.* (1988). 1g de farine est mélangé ( $M_0$ ) à 10 ml d'eau ou d'huile et l'ensemble est mécaniquement agité pendant 30 min à l'aide d'un agitateur. Le mélange est ensuite centrifugé à 4500 trs / min pendant 30 min dans une centrifugeuse de type Bioblock (France). Le culot après centrifugation est pesé ( $M_1$ ) mais pour la mesure de la capacité de rétention d'eau, il est d'abord séché à 105°C à l'étuve pendant 8 h ( $M_2$ ). Les capacités de rétention d'eau (CRE) et d'huile (CRH) sont calculées par les formules suivantes :

$$\text{CRE}(\%) = \frac{(M_2 - M_1)}{M_1} \times 100 ; \quad \text{CRH}(\%) = \frac{(M_1 - M_0)}{M_0} \times 100$$

## 7. Capacité gélifiante

La méthode de Deshpande et *al.*, (1982) utilisée consiste à préparer les suspensions de farine de 2 à 20 % (p / v) dans des tubes à essai et à incuber dans un bain-marie bouillant pendant 1 h. Dans 10 tubes, on incorpore 5 ml de suspension de farine préparées de 2 à 20 % (p / v) dans de l'eau distillée. Ces préparations sont chauffées pendant 1 h au bain – marie bouillant suivi d'un refroidissement rapide sous un courant d'eau. La plus petite concentration gélifiante correspond à celle du tube dont le mélange ne coule pas lorsqu'il est renversé.

## 8. Capacité émulsifiante et stabilité des émulsions

L'activité émulsifiante et la stabilité des émulsions des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sont mesurées par la méthode décrite par Naczka et *al.* (1985).

3,5 g d'échantillon sont mélangés à 50 ml d'eau dans un tube de 250 ml puis l'ensemble est homogénéisé au vortex pendant 30 sec. 25 ml d'huile de maïs sont additionnés au mélange qui est agité au vortex pendant 30 sec. Un autre volume d'huile (25 ml) est ajouté

et l'ensemble est de nouveau homogénéisé pendant 90 sec puis centrifugé à 1500 trs / min pendant 5 min. L'activité émulsifiante (AE) est le rapport du volume de la couche émulsionnée sur le volume total du contenu du tube avant centrifugation.

$$AE (\%) = \frac{\text{Volume d'émulsion formée}}{\text{Volume total du mélange}} * 100.$$

L'émulsion formée est chauffée à 85°C pendant 15 min dans un bain – marie pour mesurer sa stabilité. Après chauffage, elle est ramenée à température ambiante (25°C) puis centrifugée à 1500 trs / min pendant 5 min et le volume d'émulsion formé est noté. La stabilité d'émulsion (SE) est exprimée comme le pourcentage de l'activité émulsifiante restante après chauffage.

$$SE (\%) = \frac{\text{Volume d'émulsion formée après chauffage}}{\text{Volume d'émulsion avant chauffage}} * 100.$$

### **9. Capacité moussante et stabilité des mousses**

La méthode utilisée est celle décrite par Srinivas et Rao Narasinga (1986). 3g d'échantillon sont additionnés à 100 ml d'eau distillée. Le mélange est fouetté à l'aide d'une moulinette Supermix 150 (France) pendant 5 min et introduit dans une éprouvette graduée de 250 ml, le volume de mousse est lu après 30 s. La capacité moussante (CM) est le rapport du volume de mousse formé ( $V_1$ ) sur le volume total du mélange ( $V_0$ ) soit,  $CM = \frac{V_1}{V_0} * 100$

La stabilité de mousse (SM) est mesurée après 10, 30, 60 min. Elle est exprimée en pourcentage et représente la variation du volume de mousse dans l'éprouvette graduée, soit

$$SM = \frac{V_2}{V_0} * 100 . \text{ Avec } V_0: \text{ volume total du mélange au départ ; } V_2: \text{ volume de mousse}$$

restant.

### III. Analyses statistiques

Les résultats, moyennes de trois répétitions sont soumis à l'analyse de variance et au test de comparaison multiple de Duncan lorsqu'il y a une différence significative. Le logiciel Statgraphics Plus 3. est utilisé à cet effet.

### IV. Résultats et discussion

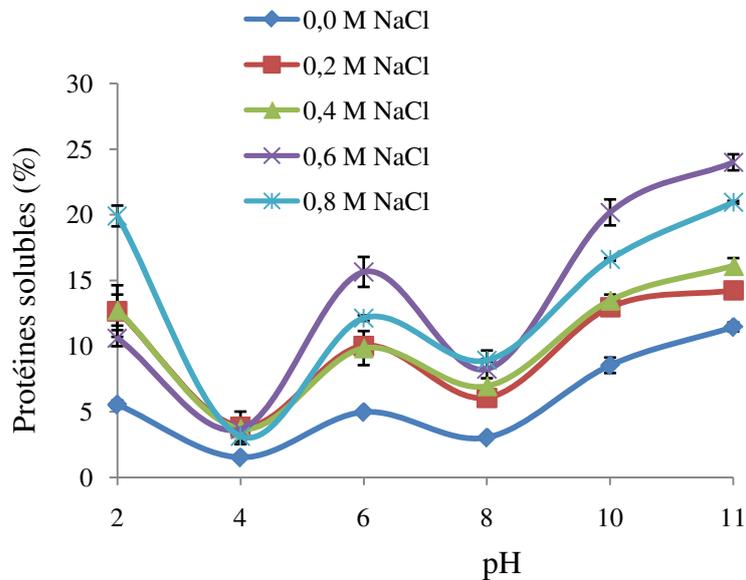
#### 1. Solubilité des protéines brutes des tourteaux

L'étude de la solubilité des protéines permet de prévoir leur comportement au cours des processus de transformation d'un aliment protéique (Moure et *al.*, 2006).

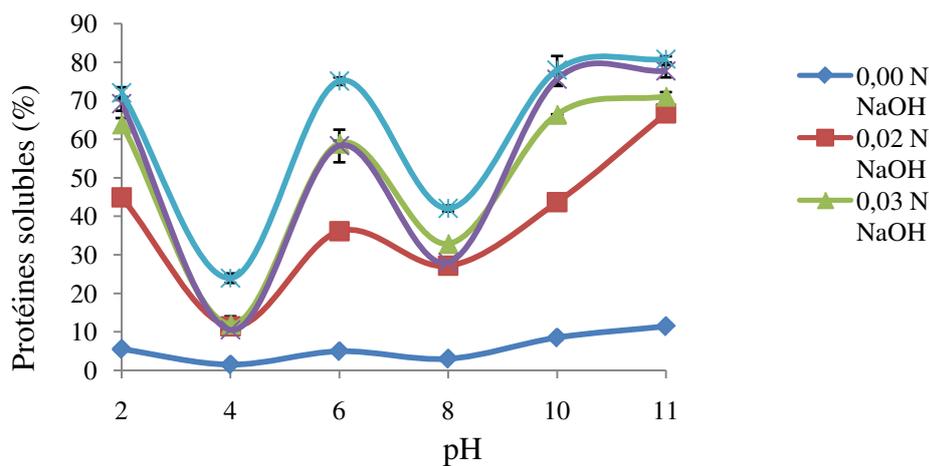
Les taux de protéines solubles en fonction du pH à différentes concentrations en NaCl ou en NaOH sont présentés sur les courbes des figures 16 (*R. heudelotii*) et des figures 17 (*T. conophorum*). Ces courbes ont une même allure et présentent deux minima, l'un à pH acide (pH 4) et l'autre à pH basique (pH 8). De part et d'autre de ces minima, la solubilité est élevée à pH 6. *Citrullus vulgaris*, *Cucumeropsis edulis* et *Brassica napus* sont des plantes oléagineuses dont les courbes de solubilité des protéines brutes présentent également deux minima de solubilité aux environs des pH 4 et 8 (Ige et *al.*, 1984 ; Ghodsvali et *al.*, 2005).

Les courbes de la figure 16 montrent que la solubilité des protéines de *R. heudelotii* augmente avec la force ionique et est maximale dans une solution de NaOH. En dehors des points isoélectriques, la solubilité des protéines varie de 5,54 (0 M NaCl, pH 2) (figure 16 A) à 72,03 % (0,05 N NaOH, pH 11) (figure 16 B). La corrélation est positive et significative ( $P < 0,05$ ) entre les protéines solubles et la concentration en NaCl d'une part ( $r = 0,90$ ) et la concentration en NaOH d'autre part ( $r = 0,92$ ). En plus du pH, les anions et les cations ajoutés dans le milieu de solubilisation peuvent faire varier la solubilité. Avec la soude, l'accroissement de la solubilité provoquée par l'augmentation du pH est continue d'où cette corrélation élevée ( $r = 0,92$ ) entre la solubilité des protéines de *R. heudelotii* et la

concentration en NaOH. La charge minérale (10,94 %) du tourteau pourrait justifier ce résultat. En effet, NaOH apporte des ions hydroniums et hydroxyles qui limiteraient les interactions protéines – minéraux en favorisant la solubilisation des protéines (Marfo et Oke, 1988).

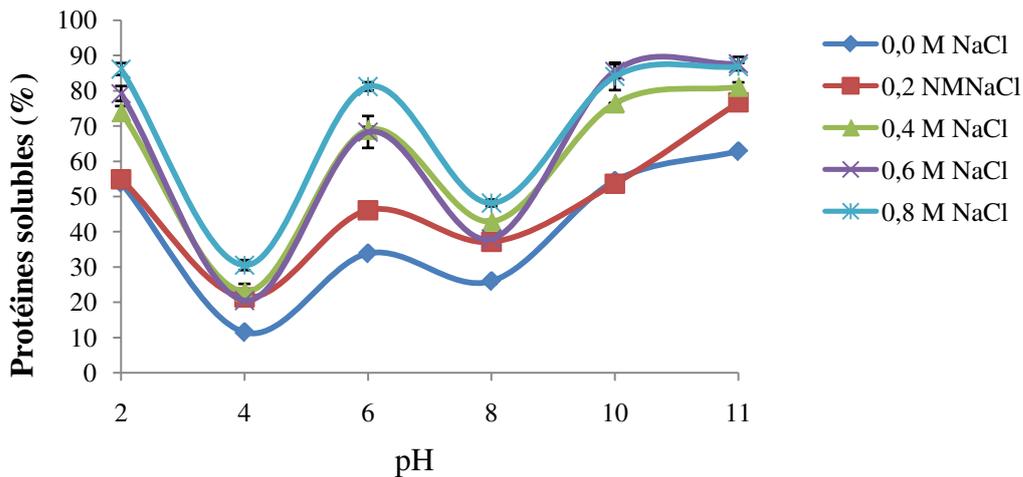


**Figure 16 A :** courbes de solubilité des protéines brutes de *R. heudelotii* en fonction du pH à différentes concentrations en NaCl

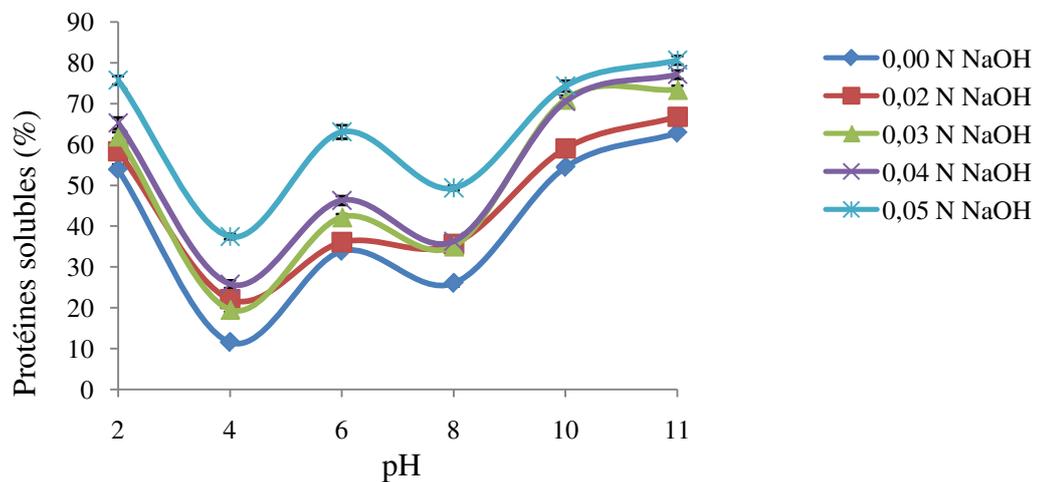


**Figure 16 B :** courbes de solubilité des protéines brutes de *R. heudelotii* en fonction du pH à différentes concentrations en NaOH

Contrairement à celles de *R. heudelotii* qui présentent le maximum de solubilité dans les solutions de NaOH utilisées, les protéines du tourteau de *T. conophorum* sont plus solubles dans NaCl (figures 17). En dehors des points isoélectriques, les valeurs vont de 53,86 (0 M NaCl, pH 2) (figure 17 A) à 87,66 % (0,6 N NaCl, pH 11) (figure 17 B).



**Figure 17 A:** solubilité des protéines brutes de *T. conophorum* en fonction du pH à différentes concentrations en NaCl



**Figure 17 B:** solubilité des protéines brutes de *T. conophorum* en fonction du pH à différentes concentrations en NaOH

La solubilité des protéines croît proportionnellement ( $P < 0,05$ ) avec l'augmentation de la concentration en NaCl ( $r = 0,97$ ) et de la concentration en NaOH ( $r = 0,91$ ). Les deux corrélations sont parfaites et significatives mais la solubilité est maximale dans une solution de NaCl 0,6 M (87,66 %). Cette différence de solubilité justifie l'influence du type d'anions et de cations dans la solubilité des protéines.

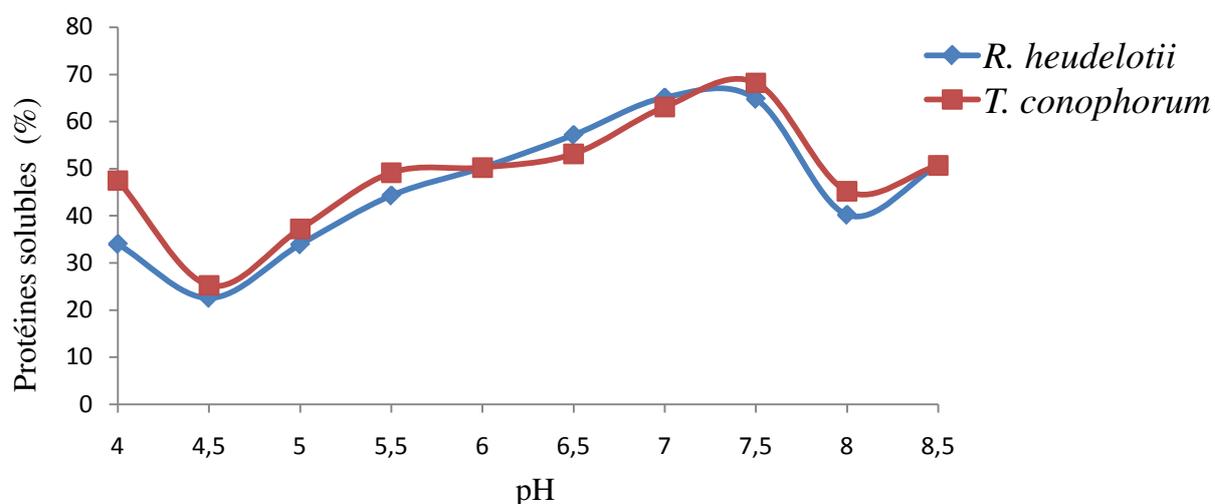
L'augmentation de la solubilité des protéines des deux plantes avec la force ionique s'explique par le fait qu'en présence des sels neutres comme NaCl à des concentrations inférieures à 1M, les groupes chargés des protéines n'interagissent pas entre eux. L'effet global étant une augmentation des interactions protéines – eau et par conséquent une augmentation de la solubilité. Ce phénomène est connu sous le nom de *salting – in* (Adeye et Aye, 2005). La force ionique agit sur les propriétés fonctionnelles en réduisant la charge électrique de la double couche monomoléculaire au voisinage de la structure de la protéine. Il en résulte une diminution de l'attraction électrostatique entre charges opposées des molécules de protéines adjacentes qui entrent facilement en interaction avec le solvant d'où une augmentation de la solubilité (Adeye et Aye, 2005).

De l'analyse des résultats, il ressort que l'eau est le solvant dans lequel la solubilité protéique des deux Euphorbiacées est faible quelle que soit le pH. Le maximum de protéines brutes des tourteaux de *R. heudelotii* (80,73 %) et de *T. conophorum* (87,66 %) est solubilisé à pH 11 dans des solutions respectives de NaOH 0,05 N et de NaCl 0,6 M.

Les conditions de solubilisation minimale et maximale des protéines brutes de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* seront utilisées dans la suite pour la préparation des concentrats et des isolats protéiques. Les minima de solubilité des protéines observés à pH 4 et à pH 8 indiquent leurs pH isoélectriques (pHi). Ceux - ci doivent être mieux définis pour être utilisés dans les technologies de séparation et de purification des protéines à partir des tourteaux.

## 2. Choix d'un point isoélectrique minimum des protéines des tourteaux

La détermination précise du pHi permet de mieux fixer les conditions de précipitation isoélectrique au cours des préparations protéiques dans la mesure où les protéines de ces deux Euphorbiacées montrent deux pHi 4 et à 8. Pour cela, la solubilité des protéines des tourteaux a été mesurée dans une solution de NaOH 0,2 % à pH variant de 4 à 8,5 (figure 18).



**Figure 18** : solubilité des protéines des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* en fonction du pH dans une solution de NaOH 0,2 %.

De cette figure, il ressort que le pourcentage de solubilité des protéines baisse entre pH 4 et pH 4,5 et entre pH 7,5 et pH 8. Pour *R. heudelotii* et *T. conophorum*, on note 22 à 25 % de solubilité protéique à pH 4,5 contre 40 à 45 % à pH 8. Il en découle que le pH 4,5 est celui auquel les protéines des deux Euphorbiacées présentent précisément un minimum de solubilité. Ce point isoélectrique est similaire à celui utilisé pour la préparation de l'isolat protéique de *Brassica napus* (colza) (Gonçalves et al., 1997), du lupin (El – Adawy et al., 2001) et du pois chiche (Kaur et Singh, 2007).

### **3. Préparation des concentrats et des isolats protéiques**

Les résultats sur la solubilité et le pH isoélectrique des protéines fixent les conditions de préparation des concentrats et des isolats protéiques à partir des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*.

Pour la préparation des concentrats protéiques, le solvant utilisé est l'eau et le pH isoélectrique convenable est 4,5. Ce pH est également utilisé pour la précipitation isoélectrique des protéines solubles lors de la préparation des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*. Au cours de cette opération, les protéines des tourteaux de granulométrie 400 - 500 µm sont solubilisées à pH 11 respectivement dans les solutions de NaOH 0,05 N et de NaCl 0,6 M selon les protocoles définis d'après les figures 12 et 13.

### **4. Caractérisation physico-chimique des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques préparés**

Les teneurs en protéines brutes, en cendres totales, en minéraux, en sucres et en fibres brutes des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques sont indiquées dans le tableau 7.

#### **4.1. Teneurs en protéines brutes totales**

Le concentrat protéique de *R. heudelotii* a une teneur en protéines supérieure (75,38 %) à celle de *T. conophorum* (65,36 %). Cette différence s'explique par le fait que les protéines de *R. heudelotii* présentent une faible solubilité dans l'eau par rapport à celles de *T. conophorum* quel que soit le pH (figures 16 et 17). De plus, cette préparation protéique consiste à concentrer les protéines par précipitation isoélectrique dans un solvant de moindre solubilité (eau à pH 4,5). Le concentrat de *R. heudelotii* contient plus de protéines que celui du soja dont la teneur signalée par Hidvégi et Lásztity (2002) est de 69,2 %, valeur comparable à celle de *T. conophorum*.

Pour les isolats protéiques, l'observation est inverse. En effet, l'isolat de *R. heudelotii* (81,42 %) contient moins de protéines que celui de *T. conophorum* (91,65 %). Ce résultat s'explique par le pourcentage de solubilité élevé des protéines de *T. conophorum* à pH 11 par rapport à celui de *R. heudelotii* tel que l'indiquent les courbes de solubilité des protéines obtenues en fonction du pH et de la force ionique (figures 15 et 16).

Les teneurs en protéines des isolats des deux plantes oléagineuses sont comparables à celle de l'isolat du pois chiche (89,9 – 94,3 %) (Kaur et Singh, 2007) du soja (90,8 %) (Hidvégi et Lásztity, 2002) et du lupin (87,7 – 91,25 %) (El – Adawy et al., 2001).

#### **4.2. Teneurs en cendres totales**

Le concentrat et l'isolat protéique de *R. heudelotii* ont des valeurs de l'ordre de 2 (tableau 7). Par rapport au tourteau, on note une perte en cendres d'environ 81 %. Ce résultat corrobore avec celui obtenu par Kaur et Singh (2007) qui a noté une perte de l'ordre de 61 % en cendres au cours de la préparation des isolats protéiques du pois chiche. Le tourteau de *T. conophorum* contient autant de cendres (8,83 %) que son isolat protéique (9,17 %) ( $P < 0,05$ ), valeurs inférieures à celle obtenue avec le concentrat protéique correspondant (2,77 %). En effet, Sosulski et Mc Curdy (1987) indiquent que les solutions d'acides et de bases utilisées pour ajuster le pH pendant l'extraction des protéines peuvent contribuer à la formation des sels pouvant entraîner une augmentation de la teneur en cendres. Par ailleurs, à pH élevé, les cations peuvent entrer en interaction avec les phytates et les protéines, ce qui justifierait le taux élevé de cendres dans l'isolat protéique de *T. conophorum*. Les isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* ont des teneurs en cendres supérieures à celles du lupin (1,06 – 1,26 %) et du pois chiche (0,82 – 1,04 %) (El – Adawy et al., 2001 ; Kaur et Singh, 2007).

**Tableau 7 :** composition physico – chimique des tourteaux de granulométrie 400 - 500 µm, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* (% / MS)

Constituants	<i>R. heudelotii</i>			<i>T. conophorum</i>		
	Tourteau	Concentrat	Isolat	Tourteau	Concentrat	Isolat
<b>Matière sèche</b>	90,69±1,07 <sup>b</sup>	96,00±0,79 <sup>a</sup>	98,82±0,76 <sup>a</sup>	91,49±0,59 <sup>b</sup>	96,68±0,96 <sup>a</sup>	97,29±0,90 <sup>a</sup>
<b>Protéines brutes totales</b>	49,25±0,95 <sup>c</sup>	75,38±2,04 <sup>b</sup>	81,42±3,70 <sup>a</sup>	50,14±1,46 <sup>c</sup>	65,36±2,91 <sup>b</sup>	91,65±1,62 <sup>a</sup>
<b>Cendres</b>	10,94±1,74 <sup>a</sup>	2,16±0,28 <sup>b</sup>	2,19±0,84 <sup>b</sup>	8,83±1,36 <sup>a</sup>	2,77±0,45 <sup>c</sup>	9,17±1,36 <sup>a</sup>
<b>Ca</b>	0,64±0,02 <sup>b</sup>	0,26±0,02 <sup>c</sup>	3,65±0,13 <sup>a</sup>	0,37±0,01 <sup>b</sup>	0,02±0,00 <sup>c</sup>	2,66±0,00 <sup>a</sup>
<b>Mg*</b>	51,30±4,22 <sup>c</sup>	12,28±0,2 <sup>b</sup>	84,21±5,76 <sup>a</sup>	70,65±5,26 <sup>b</sup>	3,75±0,03 <sup>c</sup>	78,33±1,32 <sup>a</sup>
<b>Na*</b>	6,29±1,10 <sup>b</sup>	0,17±0,00 <sup>c</sup>	51,78±0,56 <sup>a</sup>	4,80±0,30 <sup>c</sup>	6,77±0,05 <sup>b</sup>	47,40±0,72 <sup>a</sup>
<b>K *</b>	0,48±0,06 <sup>c</sup>	1,33±0,037 <sup>b</sup>	3,51±0,05 <sup>a</sup>	0,22±0,11 <sup>b</sup>	0,01±0,01 <sup>c</sup>	8,72±0,26 <sup>a</sup>
<b>Fe*</b>	28,55±1,84 <sup>a</sup>	26,56±0,27 <sup>a</sup>	20,88±0,10 <sup>b</sup>	24,45±0,42 <sup>a</sup>	20,27±0,24 <sup>b</sup>	20,61±0,18 <sup>b</sup>
<b>P</b>	2,03±0,15 <sup>a</sup>	0,46±0,06 <sup>b</sup>	0,28±0,12 <sup>c</sup>	1,67±0,25 <sup>a</sup>	1,78±0,22 <sup>a</sup>	0,01±0,00 <sup>b</sup>
<b>Sucres solubles</b>	2,97±0,15 <sup>a</sup>	1,78±0,05 <sup>b</sup>	1,97±0,28 <sup>b</sup>	5,60±0,75 <sup>a</sup>	1,28±0,00 <sup>c</sup>	2,42±0,04 <sup>b</sup>
<b>Sucres totaux</b>	5,55±0,40 <sup>a</sup>	5,19±0,18 <sup>a</sup>	3,80±0,11 <sup>b</sup>	10,26±0,17 <sup>a</sup>	4,19±0,39 <sup>b</sup>	3,72±0,41 <sup>c</sup>
<b>Fibres brutes</b>	7,16 ± 0,25 <sup>b</sup>	12,39±1,94 <sup>a</sup>	1,14±0,14 <sup>c</sup>	8,74±1,03 <sup>b</sup>	15,41±1,45 <sup>a</sup>	0,98±0,07 <sup>c</sup>
<b>Fibres ADF</b>	5,53±1,07 <sup>a</sup>	5,26±1,02 <sup>a</sup>	1,35±0,14 <sup>b</sup>	5,33±1,09 <sup>a</sup>	6,06±1,88 <sup>a</sup>	0,82±0,00 <sup>b</sup>
<b>Fibres NDF</b>	5,34±0,90 <sup>a</sup>	4,23±0,43 <sup>b</sup>	1,45±0,29 <sup>c</sup>	5,58±0,66 <sup>b</sup>	7,29±0,43 <sup>a</sup>	0,93±0,14 <sup>c</sup>
<b>Phytates*</b>	19,54±0,18 <sup>c</sup>	35,20±1,40 <sup>a</sup>	25,81±1,64 <sup>b</sup>	10,76±0,12 <sup>c</sup>	24,26±1,73 <sup>a</sup>	21,82±1,11 <sup>a</sup>
<b>Composés phénoliques</b>	0,57±0,05 <sup>b</sup>	0,79±0,01 <sup>a</sup>	0,39±0,00 <sup>c</sup>	0,73±0,43 <sup>a</sup>	0,22±0,63 <sup>c</sup>	0,41±0,01 <sup>b</sup>

\* Résultats exprimés en mg pour 100 g de matière sèche. Les valeurs maximales pour chaque espèce sont en trame de fond. Pour une même plante, les valeurs sur la même ligne ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

### 4.3. Teneurs en minéraux

Le calcium, le magnésium, le sodium, le potassium, le phosphore et le fer sont des minéraux dosés dans les tourteaux, les concentrats et les isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* (tableau 7).

Les isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* ont des teneurs élevées en Ca (3,65 et 2,66 mg %), Mg (84,21 et 78,33 mg %), Na (51,78 et 41,47 mg %), K (5,51 et 8,72 mg %). Ces minéraux sont les moins représentés dans les concentrats protéiques correspondants. La teneur en Fe est maximale dans le tourteau de *R. heudelotii* (28,55 mg %), minimale dans le concentrat protéique de *T. conophorum* (20,27 mg %). Le phosphore varie de 0,01 (isolat de *T. conophorum*) à 2,03 % (tourteau de *R. heudelotii*).

La préparation des isolats protéiques concentre 5 fois le Ca, 1 fois le Mg, 8 fois le Na et 7 fois le K dans les échantillons de *R. heudelotii*. Pour *T. conophorum*, la même opération technologique concentre 7 fois le Ca, 1 fois le Mg, 9 fois le Na et 32 fois le K. La concentration de ces minéraux dans les isolats protéiques serait en rapport avec leur solubilité. Ils entreraient en interaction avec les protéines au cours des opérations de solubilisation et précipiteraient avec elles au point isoélectrique. Le Fe et le P sont deux minéraux dont les teneurs baissent au cours des opérations technologiques appliquées. Les pertes en fer sont en effet d'au moins 7 (*R. heudelotii*) et 17 % (*T. conophorum*). La cause serait la formation du complexe phytate - fer - phosphore soluble à pH 4,5. Les échantillons analysés ont des teneurs en calcium, en phosphore, en sodium et en potassium inférieures à celles de l'arachide dont les valeurs sont de 80, 57, 10 et 1220 mg % respectivement (Batal et al., 2005).

Le Ca et le P sont deux minéraux qui participent au développement du squelette et dans divers autres processus physiologiques (Dede et al., 2003). De tous les minéraux dosés, le P est le plus abondant avec des valeurs de 2,03 et 1,67 % respectivement dans les tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*. Sa teneur dans les concentrats (0,46 et 1,78 g % MS

respectivement) est supérieure à celle dans les isolats protéiques correspondants (0,28 et 0,01 % MS respectivement) et serait liée à la présence des phospholipides et des phytates.

#### **4.4. Teneurs en sucres solubles et en sucres totaux**

Le tourteau de *T. conophorum* renferme deux fois plus de sucres totaux (10,26 %) et de sucres solubles (5,60 %) que celui de *R. heudelotii* (5,55 et 2,97 % respectivement) (tableau 7).

Les teneurs en sucres solubles baissent de 1,78 à 2,97 % pour le concentrat et le tourteau de *R. heudelotii* respectivement, d'où une perte de 60 %. Pour *T. conophorum*, les valeurs passent de 1,28 (concentrat protéique) à 5,60 % (tourteau), ce qui correspond à une perte de 77 %.

Pour ce qui est des sucres totaux, on ne note pas de pertes au cours de la préparation des concentrats protéiques de *R. heudelotii*. Ce qui n'est pas le cas avec l'isolat protéique correspondant où la perte est de 31 % par rapport au tourteau. Pour *T. conophorum*, lorsqu'on passe du tourteau au concentrat et à l'isolat, la réduction est de 60 et 63 % respectivement. Durant les procédés de préparation des concentrats et des isolats protéiques, il y a solubilisation et élimination des sucres.

#### **4.5. Teneurs en fibres brutes, ADF et NDF**

Les fibres brutes des échantillons de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* se concentrent au cours de la préparation des concentrats protéiques. En effet, les valeurs sont maximales dans les concentrats (12,39 et 15,41 % respectivement) et minimales dans les isolats protéiques (1,14 et 0,98 % respectivement). Les faibles teneurs en fibres brutes sont aussi obtenus avec les isolats protéiques de lupin (0,74 – 1,06 %) (El – Adway et al., 2001). En

effet, pour chaque plante, quand on passe des concentrats à l'isolat protéique la baisse est d'environ 90 %.

Quelle que soit la plante, les taux de fibres ADF des tourteaux ne sont pas significativement différents ( $P > 0,05$ ) de ceux des concentrats protéiques correspondants. Cependant la préparation des isolats protéiques réduit ces valeurs de 75 % (*R. heudelotii*) et 84 % (*T. conophorum*).

En ce qui concerne les fibres NDF, la baisse est de 20 % lorsqu'on passe du tourteau au concentrat protéique de *R. heudelotii*. Dans le cas de *T. conophorum*, c'est l'inverse avec une augmentation de 30 % de fibres NDF dans le concentrat protéique comparativement au tourteau. Pour les deux Euphorbiacées, les valeurs minimales correspondent à celles obtenues avec les isolats protéiques.

Les fibres brutes, ADF et NDF des concentrats sont élevées par rapport à celles des isolats protéiques quelle que soit la plante. Cette observation se justifie par les propriétés physiques des fibres. Ce sont en effet des constituants insolubles des végétaux (Gaëtan et al., 2000). Par ailleurs, la préparation des concentrats protéiques commence par une insolubilisation des protéines à leur point isoélectrique. Cette opération favoriserait la concentration des fibres dans le culot insolubilisé.

#### **4.6. Teneurs en phytates et en composés phénoliques**

##### ***4.6.1. Teneurs en phytates***

Pour les échantillons de *R. heudelotii*, les teneurs en phytates varient de 19,54 (tourteau) à 35,20 mg % (concentrat protéique) (tableau 7). Les préparations protéiques à partir du tourteau concentrent environ 2 fois l'acide phytique dans l'isolat et 3 fois dans le concentrat.

Dans le cas de *T. conophorum*, les valeurs passent de 10,76 (tourteau) à 24,26 mg % (concentrat protéique). L'isolat et le concentrat protéique renferment 2 fois plus de phytates par rapport au tourteau. L'acide phytique a une valeur maximale dans le concentrat protéique de chaque plante parce que cette opération technologique se déroule à pH acide. En effet, à ce pH, les phytates chargés négativement peuvent facilement former des interactions avec les protéines chargées positivement (Hidvégi et Lásztity, 2002). Ces résultats justifient leurs valeurs en phosphore, étant donné que le phytate est une réserve de phosphore des graines, des racines et des tubercules (Hidvégi et Lásztity, 2002). Les échantillons des deux Euphorbiaceae renferment moins de phytates que le concentrat (1,01 %) et l'isolat protéique de soja (1,01 %) (Hidvégi et Lásztity, 2002).

#### **4.6.2. Teneurs en composés phénoliques**

De tous les échantillons analysés, le concentrat protéique de *R. heudelotii* renferme le maximum de composés phénoliques (0,79 %) (tableau 7). Le minimum (0,22 %) est obtenu avec l'isolat protéique de *T. conophorum*. Par rapport au tourteau, les composés phénoliques diminuent de 69 et 56 % dans les isolats protéiques respectifs de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*. Leur teneur maximale dans le concentrat protéique de *R. heudelotii* pourrait avoir des effets sur leur couleur dans la mesure où les interactions entre les composés phénoliques et les protéines entraînent le phénomène de brunissement (Hurrel et al., 1982).

### **5. Analyse des couleurs**

La couleur d'un aliment est l'un des facteurs pouvant limiter ou favoriser son utilisation industrielle. La mesure de couleur des échantillons de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* dans l'espace CIE a donné les résultats rassemblés dans le tableau 8.

**Tableau 8** : paramètres de couleur L\*a\*b\* des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

Echantillons	L*	a*	b*	$\Delta E$	Hue (tg <sup>-1</sup> a/b)
<b>TORH</b>	87,21±2,34 <sup>a</sup>	0,45±0,09 <sup>c</sup>	21,79±0,59 <sup>a</sup>	23,19±4,49 <sup>a</sup>	46,09±5,35 <sup>a</sup>
<b>CORH</b>	84,02±2,14 <sup>a</sup>	0,70±0,10 <sup>b</sup>	20,32±1,05 <sup>a</sup>	19,04±4,36 <sup>a</sup>	11,09±0,76 <sup>c</sup>
<b>ISRH</b>	78,44±6,06 <sup>b</sup>	0,84±0,05 <sup>a</sup>	9,33±0,74 <sup>b</sup>	22,39±4,79 <sup>a</sup>	29,30±4,70 <sup>b</sup>
<b>TOTC</b>	83,83±3,96 <sup>b</sup>	1,17±0,04 <sup>a</sup>	22,16±1,03 <sup>a</sup>	25,06±5,00 <sup>a</sup>	19,00±0,80 <sup>a</sup>
<b>COTC</b>	84,02±2,15 <sup>b</sup>	1,19±0,10 <sup>a</sup>	22,71±0,52 <sup>a</sup>	13,42±3,66 <sup>b</sup>	19,1±1,94 <sup>a</sup>
<b>ISTC</b>	89,51±2,27 <sup>a</sup>	0,69±0,05 <sup>b</sup>	12,17±0,21 <sup>b</sup>	25,97±5,01 <sup>a</sup>	17,72±1,66 <sup>b</sup>

*Pour chaque échantillon, les valeurs dans la même colonne ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes (P < 0,05).*

\*L : Luminance ; a : balance vert – rouge ; b : balance bleu – jaune

**TORH** : Tourteau de *R. heudelotii* ; **CORH** : Concentrat protéique de *R. heudelotii* ; **ISRH** : isolat protéique de *R. heudelotii* ; **TOTC** : Tourteau de *T. conophorum* ; **COTC** : Concentrat protéique de *T. conophorum* ; **ISTC** : Isolat protéique de *T. conophorum*

Parmi les échantillons analysés, l'isolat protéique de *R. heudelotii* (ISRH) présente une luminescence minimale (L = 78,44). Les valeurs de a (balance vert – rouge) et de b (balance bleu – jaune) pour chaque préparation protéique ne sont pas proportionnelles à celles de L. Le calcul de différence de couleur ( $\Delta E$ ) montre qu'il n'existe pas de différence significative ( $P < 0,05$ ) entre les tourteaux, les concentrats et les isolats protéiques de *R. heudelotii* (tableau 8). La baisse de luminance observée avec ISRH impliquerait les opérations technologiques subies, les interactions composés phénoliques – protéines et les interactions phytate – protéine – calcium (Hurrel et al., 1982 ; Tchiégang, 1996). La corrélation entre la luminance et les composés phénoliques d'une part, la luminance et les phytates d'autre part n'est pas significative ( $P > 0,05$ ). Ce résultat laisse penser que la solution alcaline (NaOH, 0,2 %)

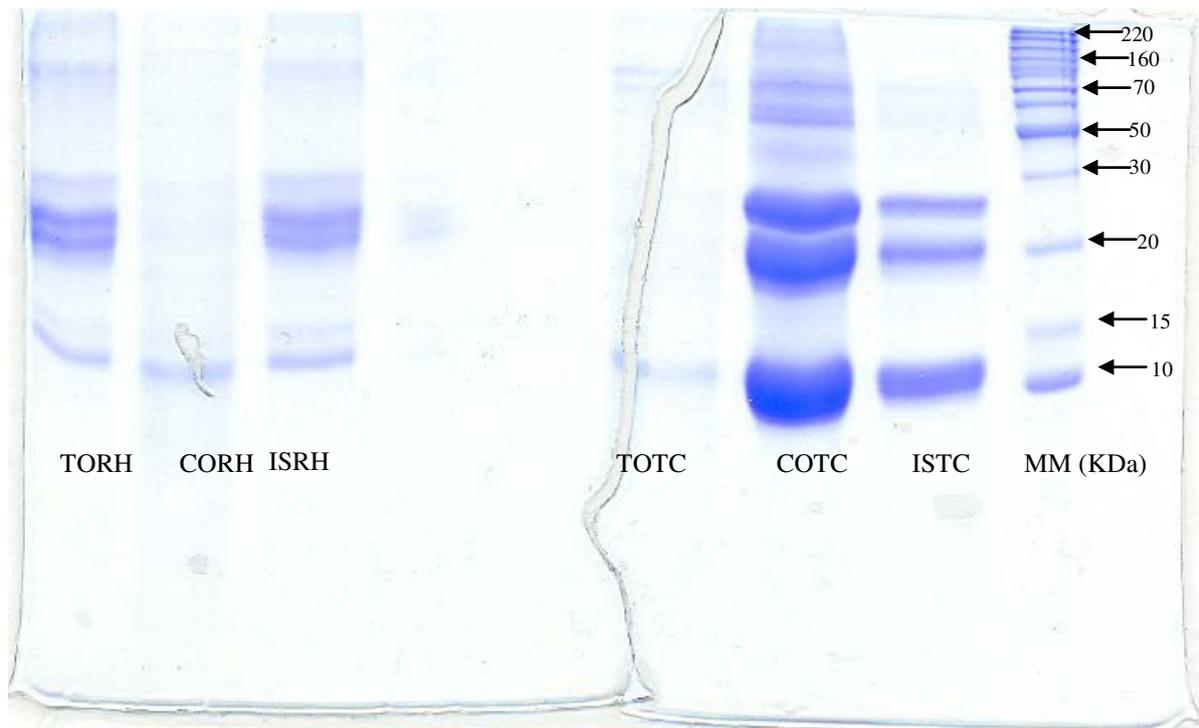
utilisée pour la préparation de ISRH induirait des réactions responsables de cette baisse de luminance.

Le calcul de la teinte Hue montre une valeur de 49,06 pour TORH, suivie de 29,30 pour son isolat protéique (ISRH) et de 11,90 pour son concentrat protéique (CORH) (tableau 8). Il en ressort que ISRH est plus teinté que CORH, ceci confirme que la baisse de luminance de cet échantillon est liée aux réactions induites par la solution de NaOH à pH 11 utilisée pour solubiliser les protéines.

L'isolat protéique de *T. conophorum* (ISTC) est plus luminant que l'isolat protéique de *R. heudelotii* (ISRH) avec une valeur maximale de L (89,51) ( $P < 0,05$ ). Cependant, le calcul de  $\Delta E$  montre qu'il n'y a aucune différence significative ( $P > 0,05$ ) entre la coloration de cet échantillon et celui du tourteau correspondant (tableau 8). La corrélation est négative ( $r = -0,67$ ) et significative ( $P < 0,05$ ) entre la luminance et le taux de composés phénoliques des échantillons de *T. conophorum*. Ces observations montrent que le changement de couleur est lié aux interactions entre protéines et les produits d'oxydation des composés phénoliques. La valeur de Hue est minimale avec ISTC, résultat corroborant avec le maximum de luminance observé (tableau 8). Le fait que la corrélation soit faible entre composés phénoliques et luminance laisse penser aussi que les interactions phytate – protéine – calcium pourraient contribuer à la coloration.

## **6. Electrophorèse des protéines sur SDS – PAGE**

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du dodécylsulfate de sodium préparé à 10 % à pH 8,8 et avec pour témoins des Marqueurs de Masses (MM) allant de 10 à 220 KDa a permis d'identifier les poids moléculaires des tourteaux des deux plantes. Les résultats sont donnés par le profil électrophorétique de la figure 19 où les bandes correspondent aux poids moléculaires.



**Figure 19** : profils électrophorétiques des protéines des tourteaux, des concentrats et des isolats de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sur gel de SDS-PAGE

Le profil électrophorétique de TOTC montre 4 bandes entre 10 – 160 KDa alors que celui de COTC présente 5 bandes et celui de ISTC, 3 bandes entre 10 – 70 KDa. Ces résultats suggèrent la dissociation des protéines de haut poids moléculaire du tourteau en protéines de faible poids moléculaire au cours de la préparation des concentrats protéiques et l'absence de certaines protéines dans les isolats protéiques. L'absence de certaines bandes, comparativement aux tourteaux peut s'expliquer par la non précipitation isoélectrique de certaines protéines, les différentes réactions de complexations se déroulant à pH 11 au cours de la solubilisation des protéines ainsi que leur dénaturation pendant la préparation des échantillons pour l'électrophorèse.

On remarque également que les protéines des tourteaux des deux Euphorbiacées présentent chacune des bandes électrophorétiques entre 10 – 160 KDa, ce qui montre la

présence des mêmes familles protéiques dans les deux plantes. Les poids moléculaires de CORH sont comparables à celui des albumines (11 – 30 KDa) (Chavan et *al.*, 2001). Ceux de ISRH, COTC et ISTC se trouvent dans le même intervalle que celui des prolamines (25 – 75 KDa) (Gessendorfer et *al.*, 2009). Les albumines seraient majoritairement représentées dans les protéines de CORH, tandis que celles de ISRH, COTC et ISTC seraient constituées d'albumines et de prolamines.

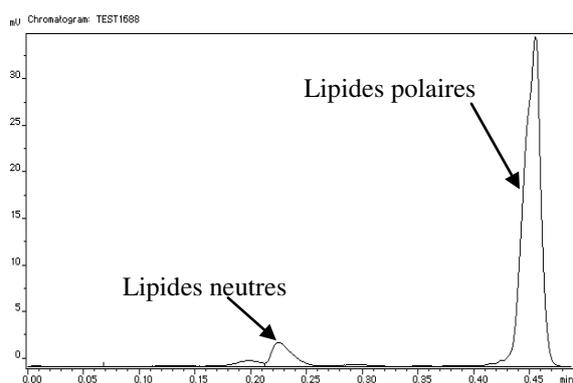
Les résultats de l'électrophorèse justifient une fois de plus le fait que le taux de protéines du concentrat de *R. heudelotii* soit supérieur à celui de *T. conophorum* étant donné que les albumines présentent une solubilité maximale dans de l'eau, solvant utilisé pour cette préparation protéique.

#### **7. Teneurs en lipides résiduels des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques**

L'extraction à l'hexane n'a pas éliminé la totalité des lipides des amandes de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*. Une deuxième extraction faite sur les tourteaux, les concentrats et les isolats protéiques avec un mélange de solvants polaires chloroforme / méthanol (2 / 1 : v / v) a permis d'extraire les lipides polaires de ces différents échantillons. Les quantités de matières grasses extraites ainsi que leurs proportions en phospholipides obtenues par chromatographie sur couche mince (CCM) couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Iatroscan®) sont données dans le tableau 9.

## 7.1. Profil chromatographique des lipides résiduels des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques

La figure 20 montre le profil en CCM des extraits au chloroforme / méthanol (2 / 1 : v / v) du tourteau de *R. heudelotii*. Ce mélange est favorable pour solubiliser les phospholipides (Folch et *al.*, 1956). Le chromatogramme obtenu est identique à celui de *T. conophorum*, à ceux des concentrats et des isolats protéiques des deux plantes. Le développement des chromatogrammes dans l'éluant apolaire constitué du mélange hexane / éther diéthylique / acide formique (80 / 20 / 0,2 : v / v / v) a permis la séparation de deux pics, l'un correspondant aux lipides polaires et l'autre aux lipides neutres. Les lipides neutres sont identifiés comme des triglycérides. Les proportions de lipides polaires des tourteaux, des préparations protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sont plus importantes (83 – 97 %) que celles des lipides neutres (3 – 17 %) (tableau 9).



**Figure 20:** profil CCM Iatroscan des lipides extraits au chloroforme / méthanol (2 / 1 : v / v) du tourteau de *R. heudelotii*.

**Tableau 9 :** teneurs en lipides résiduels et en phospholipides des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

	<b>Lipides résiduels</b> (g / 100 g MS)	<b>Lipides polaires</b> (%)	<b>Lipides neutres</b> (%)	<b>Phospholipides</b> (g / 100 g MS)
<b>TORH</b>	8,72±1,19	86,86	13,13	7,57±0,11
<b>CORH</b>	9,23±1,24	93,47	6,53	8,62±0,17
<b>ISRH</b>	5,57±0,80	83,50	16,50	4,65±0,48
<b>TOTC</b>	9,13±0,57	91,87	8,13	8,38±0,27
<b>COTC</b>	12,19±0,21	97,70	2,30	11,90±0,30
<b>ISTC</b>	7,74±0,90	74,70	25,30	5,79±0,53

**TORH** : Tourteau de *R. heudelotii* ; **CORH** : Concentrat protéique de *R. heudelotii* ; **ISRH** : isolat protéique de *R. heudelotii* ; **TOTC** : Tourteau de *T. conophorum* ; **COTC** : Concentrat protéique de *T. conophorum* ; **ISTC** : Isolat protéique de *T. conophorum*

*Les chiffres en trame de fond représentent pour chaque échantillon la valeur maximale.*

D'après les données du tableau 9 et du profil chromatographique de la figure 20, les lipides résiduels des échantillons analysés sont essentiellement constitués de lipides polaires dont les teneurs sont maximales dans les concentrats protéiques des deux plantes. Par rapport aux amandes, les valeurs sont de 5,13 et 4,73 g / 100 g MS pour *R. heudelotii* et *T. conophorum* respectivement. Elles sont supérieures à celle des graines de tournesol dont la teneur est de 0,59 % MS (Evon et al., 2009). Ces phospholipides pourraient se combiner aux protéines et influencer leur flaveur et leur qualité nutritionnelle (Moure et al., 2006). Ils peuvent également contribuer à stabiliser certaines propriétés fonctionnelles des tourteaux comme les émulsions (Belhaj et al., 2010). Bien que ces teneurs soient faibles, ils pourraient apporter certains acides gras essentiels à des taux non négligeables.

## 7.2. Composition en acides gras des phospholipides des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques

La composition en acides gras (AG) des phospholipides exprimée par rapport à 100 g des acides gras totaux est donnée dans le tableau 10. Elle est comparée à celle des triglycérides de *R. heudelotii*, *T. conophorum*, *Elaeis guineensis*, *Z. mays*, *Coula edulis*, *C. schweinfurthii* et *A. hypogea*, oléagineux faisant parti d'une constante alimentaire au Cameroun. De ce tableau, il ressort que l'acide palmitique (C<sub>16:0</sub>) est l'acide gras saturé (AGS) majeur des phospholipides de *R. heudelotii* (10,94 – 18,45 % des acides gras totaux (AGT)), valeur comparable à celle des triglycérides de *Z. mays* (16,1 % des AGT) (Kim et al., 2010). La teneur en C<sub>16:0</sub> de COTC est comparable à celle des triglycérides de *A. hypogea* (9,48 % des AGT) (Musa et Özcan, 2009). Dans les échantillons de *T. conophorum* par contre l'AGS le plus abondant est l'acide stéarique (C<sub>18:0</sub>) avec des teneurs de 8,17- 10,96 % des AGT.

L'acide oléique (C<sub>18:1(ω-9)</sub>) qui est un acide gras monoinsaturé (AGMI) est fortement représenté dans les phospholipides des tourteaux et des préparations protéiques des deux Euphorbiaceae (34 à 66 % des AGT). Ces pourcentages sont comparables à ceux des tryglycérides de quelques « fruits de bouche » au Cameroun tels que *E. guineensis*, *D. edulis* et *C. schweinfurthii* avec 39,8; 31 et 33,4 % des AGT respectivement (Sundram et al., 2003 ; Kapseu, 2009). Les triglycérides de *C. edulis*, de *H. annuus* et de *A. hypogea* (95,5 ; 85,77 et 52,3 % respectivement) (Tchiégang et al., 1996; Amalia Kartika et al., 2006; Musa et Özcan, 2009).

Les pourcentages en acide linoléique (C<sub>18:2(ω-6)</sub>) des phospholipides des échantillons analysés (8 – 19 % des AGT) sont comparables à ceux des triglycérides de l'huile de *E. guineensis* (10,20) (Sundram et al., 2003).

*Belschmedia jacques felixii* est également une des épices épaississantes utilisées au Cameroun. L'analyse de la composition en acides gras de ses triglycérides faite par Tchiégang et Parmentier (2008) révèle une teneur de 19,8 % des AGT en acide oléique, valeur inférieure à celle de *R. heudelotii*.

L'analyse des résultats montre que les phospholipides des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sont majoritairement constitués d'AGMI tel que l'acide oléique et d'AGPI tel que l'acide linoléique. Ces indications montrent que ces phospholipides ont une valeur nutritive non négligeable et peuvent ainsi contribuer à réduire la cholestérolémie (Foster et al., 2009) au même titre que les triglycérides de *E. guineensis*, *D. edulis* et *C. schweinfurthii* (Tarek et al., 2001).

**Tableau 10** : composition en acides gras (%) des phospholipides des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* comparée à celle des triglycérides de *R. heudelotii*, *T. conophorum*, *E. guineensis*, *Z. mays*, *C. edulis*, *C. schweinfurthii*, *A. hypogea*

Acides gras	C <sub>14:0</sub>	C <sub>15:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1(ω-9)</sub>	C <sub>18:2(ω-6)</sub>	C <sub>18:3(α-élaéostéarique)</sub>	C <sub>18:3(ω-3)</sub>	C <sub>20</sub>	C <sub>20:4(ω-6)</sub>
<b>TORH</b> <sup>(1)</sup>	0,02	/	6,6	6,5	6,0	27,9	52,6	/	/	/
<b>TOTC</b> <sup>(1)</sup>	0,4	/	1,7	/	10,8	14,83	/	72,2	/	/
<b>TORH</b>	0,31±0,01	/	18,45±0,23	/	65,20±0,31	12,86±0,03	12,23±0,78	0,76±0,03	0,55±0,01	/
<b>CORH</b>	/	/	19,30±0,15	1,27±0,15	66,27±1,57	/	/	/	/	3,92±0,08
<b>ISRH</b>	/	/	10,94±0,65	/	10,47±1,19	18,88±1,08	/	/	/	37,06±2,86
<b>TOTC</b>	0,42±0,03	4,90±0,07	6,75±0,16	8,17±0,07	33,9±0,18	10,75±0,07	/	22,36±0,16	2,9±0,21	/
<b>COTC</b>	/	/	9,71±1,30	10,07±1,01	40,30±3,62	8,23±0,78	/	29,97±0,58	/	/
<b>ISTC</b>	/	5,23±2,60	5,85±0,81	10,96±2,27	34,49±2,24	17,34±1,83	/	24,72±0,98	/	/
<i>E. guineensis</i> <sup>(2)</sup>	1,1±0,01	/	43,5±0,95	4,3±0,18	39,8±0,94	10,20±0,56	/	0,3±0,07	0,20±0,16	/
<i>Z.mays</i> <sup>(3)</sup>	/	/	16,1	2,6	28,3	50,6	/	1,2	0,6	/
<i>C.edulis</i> <sup>(4)</sup>	0,1	/	1,8	0,2	95,5	0,4	/	/	/	/
<i>D.edulis</i> <sup>(5)</sup>	/	/	39	3,7	31	24,9	/	1,3	/	/
<i>C.schweinfurthii</i> <sup>(5)</sup>	0,1	/	35,3	1,5	33,4	26,6	/	2,2	/	/
<i>A.hypogea</i> <sup>(6)</sup>	/	/	9,48	2,92	52,3	32,2	/	0,80	1,84	/

<sup>(1)</sup>: Tchankou Leudeu (2006) ; <sup>(2)</sup>: Sundram et al. (2003) ; <sup>(3)</sup>: Kim et al. (2010) ; <sup>(4)</sup>: Tchiégang et al. (1998) ; <sup>(5)</sup>: Kapseu (2009) ; <sup>(6)</sup>: Musa Özcan (2009)

Les chiffres en trame de fond représentent pour chaque échantillon la valeur maximale.

### 7.3. Classes des phospholipides des tourteaux, des concentrats et des isolats

#### protéiques

Les lipides résiduels des échantillons ont été analysés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse dans le but d'identifier les types de phospholipides des échantillons (tableau 11). Les résultats obtenus montrent que les phospholipides des échantillons sont constitués du phosphatidyl inositol, de la phosphatidyl choline, de la phosphatidyl éthanolamine et du phosphatidyl glycérol.

**Tableau 11** : classes des phospholipides identifiés dans les échantillons analysés

Phospholipides	TORH	CORH	ISRH	TOTC	COTC	ISTC
<b>Phosphatidyl inositol</b>	++	+	++	+	+	++
<b>Phosphatidyl choline</b>	++++	+	++++	-	+	++++
<b>Phosphatidyl éthanolamine</b>	+++	+	+++	-	+	+++
<b>Phosphatidyl glycérol</b>	-	+	+	+	+	+

+ : Présence

- : Absence

**TORH** : Tourteau de *R. heudelotii* ; **CORH** : Concentrat protéique de *R. heudelotii* ;  
**ISRH** : isolat protéique de *R. heudelotii* ; **TOTC** : Tourteau de *T. conophorum* ; **COTC** :  
Concentrat protéique de *T. conophorum* ; **ISTC** : Isolat protéique de *T. conophorum*

Bien que cette analyse soit qualitative, il faut noter l'importance du phosphatidylcholine (lécithine) dans le tourteau et l'isolat protéique de *R. heudelotii* et dans l'isolat de *T. conophorum*. Ce qui peut présager l'utilisation de ces farines pour stabiliser les systèmes alimentaires à base d'émulsion.

## **8. Propriétés fonctionnelles des tourteaux, des concentrats et des isolats**

### **protéiques**

Les propriétés fonctionnelles sont surtout dues aux protéines et permettent de prévoir leur comportement au cours des processus de transformations et de conservation d'un aliment (Moure et *al.*, 2006). L'indice de solubilité, la solubilité des protéines dans le NaCl (0,2 M) en fonction du pH, les capacités de rétention d'eau, d'huile, gélifiante, moussante et émulsifiante ont été mesurés.

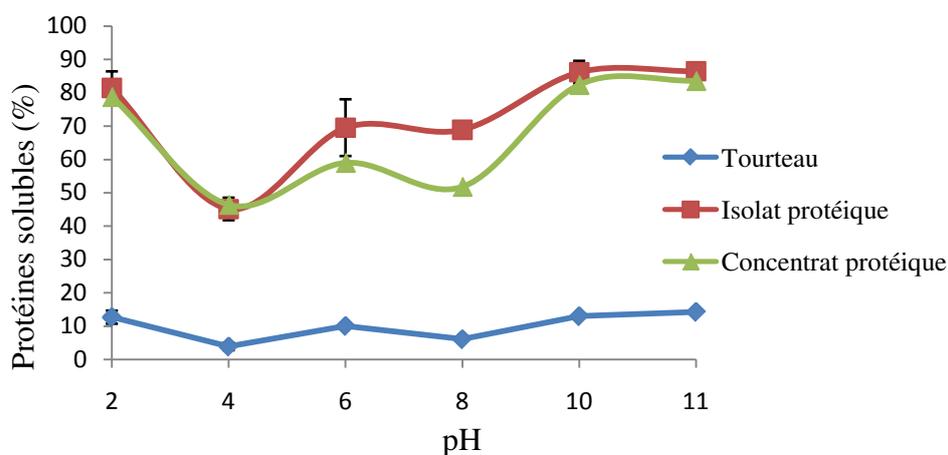
### **8.1. Indice de solubilité**

La solubilité est une propriété physico-chimique des protéines dont dépendent les propriétés fonctionnelles des aliments principalement les émulsions, les mousses et les gels (Sikorski, 2001).

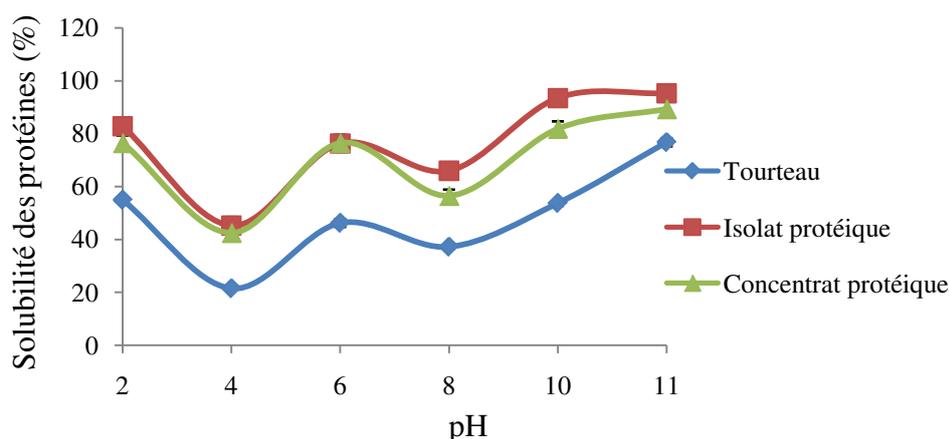
Les isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* ont des indices de solubilité (IS) proches de 100 % (98,66 et 96,80 % respectivement). Les concentrats protéiques présentent des valeurs de l'ordre de 81 %. Les IS des isolats et des concentrats protéiques sont de loin supérieurs aux IS des tourteaux qui sont de 16,80 et 21,02 % pour *R. heudelotii* et *T. conophorum* respectivement. Ces résultats indiquent que les préparations protéiques des deux Euphorbiacées améliorent leur indice de solubilité, ce qui implique une amélioration de cette propriété fonctionnelle. Par ailleurs, le tamisage des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques avec un empilement de tamis de mailles allant de 106 à 315  $\mu\text{m}$  révèle pour les deux plantes que les isolats et les concentrats protéiques sont majoritairement constitués des fractions < 106  $\mu\text{m}$  (23,4 et 33,2 % respectivement), tandis que la fraction < 212  $\mu\text{m}$  est la plus représentée dans les tourteaux (21 et 25,03 % respectivement) (figure 1 annexe 3). Ce résultat corrobore celui de Guillou et Landeau (2000) qui montrent que la granulométrie influence l'IS des farines.

## 8.2. Solubilité des protéines brutes

Les figures 21 montrent les courbes de solubilité des protéines brutes des concentrats et des isolats protéiques préparés à partir des tourteaux de granulométrie 400 - 500  $\mu\text{m}$  de *R. heudelotii* (figure 21 A) et de *T. conophorum* (figure 21 B). Ces courbes ont la même allure. On note l'existence de deux pH isoélectriques (pH 4 et pH 8) et un maximum (plus de 76 %) de solubilité des protéines à pH acide (pH 2) et à pH alcalin (pH 11).



**Figure 21 A** : solubilité en fonction du pH et du NaCl 0,2 M des protéines brutes du tourteau, du concentrat et de l'isolat protéique de *R. heudelotii*



**Figure 21 B** : solubilité en fonction du pH et du NaCl 0,2 M des protéines brutes du tourteau, du concentrat et de l'isolat protéiques de *T. conophorum*

Pour les deux plantes, la même allure de courbe est maintenue avec les tourteaux, les concentrats et les isolats protéiques, preuve que dans ces préparations protéiques, les mêmes familles de protéines majoritaires sont présentes. Cette observation confirme les résultats de l'électrophorèse qui révèlent des bandes majoritaires entre 10 et 160 KDa quel que soit l'échantillon.

La solubilité des protéines des deux Euphorbiacées est améliorée au fur et à mesure qu'on passe des tourteaux aux concentrats, puis aux isolats protéiques. Ce constat est lié non seulement à la granulométrie comme mentionné ci – dessus, mais aussi à l'élimination de la plupart des composés autres que les protéines au cours des préparations protéiques et pouvant limiter cette solubilité.

La solubilité est une propriété fonctionnelle utilisée en brasserie. Etant donné que la solubilité des protéines des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* est élevée à pH acide et alcalin, celles – ci pourraient également être facilement incorporées dans certaines boissons acides et préparations alimentaires basiques.

### **8.3. Capacités de rétention d'eau et d'huile**

Les résultats sont exprimés en gramme d'eau ou d'huile par 100 g d'échantillon (tableau 12).

#### ***8.3.1. Capacité de rétention d'eau***

La capacité de rétention d'eau (CRE) est maximale avec les isolats protéiques de *R. heudelotii* (467,20 g / 100 g d'échantillon) et de *T. conophorum* (367,20 g / 100 g d'échantillon). Les concentrats protéiques ont des valeurs respectives de 237,30 et 367 g / 100 g d'échantillon. Les préparations protéiques des deux plantes améliorent leur CRE. En effet, les isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* absorbent respectivement 4,5 fois et 3,5 fois plus d'eau de leur poids. Ces valeurs sont de loin supérieures à celles des tourteaux

(229 et 268 g / 100 g d'échantillon respectivement). La capacité de rétention d'eau élevée est surtout due aux groupements hydrophiles des protéines (Moure et *al.*, 2006), ceci justifierait les résultats obtenus avec les isolats protéiques des deux Euphorbiacées qui ont plus de 81 % MS de protéines. Les CRE des échantillons analysés sont supérieurs à ceux du tourteau de *T. conophorum* du Nigeria 165,59 % (Enujiugha, 2003) et du soja 130 % (Ige et *al.* 1984).

La CRE joue un rôle majeur dans la qualité de la texture de divers aliments notamment les viandes hachées et les pâtes boulangères. L'imbibition d'eau sans dissolution de la protéine conduit à une augmentation des propriétés telles que la consistance, l'épaississement, la viscosité et l'adhésion (Moure et *al.*, 2006). Les isolats et les concentrats protéiques de ces deux oléagineux permettraient d'augmenter la teneur en eau des produits dans lesquels ils seront incorporés, et de limiter les pertes d'eau à la cuisson.

**Tableau 12** : capacités de rétention d'eau, d'huile de gélification, capacités émulsifiante et moussante des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

	<i>R. heudelotii</i>			<i>T. conophorum</i>		
	TORH	CORH	ISRH	TOTC	COTC	ISTC
Capacité de rétention d'eau (g / 100 g d'échantillon)	229,00±3,09 <sup>c</sup>	237,3±1,27 <sup>b</sup>	467,20±7,35 <sup>a</sup>	268,00±5,93 <sup>b</sup>	367,00±1,97 <sup>a</sup>	367,20±9,05 <sup>a</sup>
Capacité de rétention d'huile (g / 100 g d'échantillon)	222,91±4,94 <sup>c</sup>	227,40±7,11 <sup>b</sup>	256,60±3,11 <sup>a</sup>	277,40±7,07 <sup>c</sup>	385,10±4,66 <sup>b</sup>	410,80±6,50 <sup>a</sup>
Plus petite concentration gélifiante (%)	18 <sup>c</sup>	14 <sup>a</sup>	16 <sup>b</sup>	10 <sup>c</sup>	6 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>
Capacité émulsifiante (%)	48,58±2,00 <sup>c</sup>	63,25±1,06 <sup>a</sup>	55,70±1,6 <sup>b</sup>	70,29±0,41 <sup>c</sup>	87,68±5,2 <sup>a</sup>	72,41±2,23 <sup>b</sup>
Stabilité de l'émulsion (%)	36,60±0,55 <sup>b</sup>	60,46±2,17 <sup>a</sup>	30,23±1,61 <sup>c</sup>	26,15±3,04 <sup>c</sup>	73,48±2,38 <sup>a</sup>	70,41±0,58 <sup>b</sup>
Capacité moussante (%)	25,96±1,35 <sup>c</sup>	31,66±2,35 <sup>b</sup>	68,33±2,35 <sup>a</sup>	50,00±2,02 <sup>c</sup>	67,50±3,53 <sup>b</sup>	71,66±2,37 <sup>a</sup>
Stabilité des mousses (%)						
- Après 10 min	0	23,33±4,71 <sup>b</sup>	36,66±4,71 <sup>a</sup>	32,85±2,02 <sup>c</sup>	41,5±2,12 <sup>b</sup>	58,33±2,3 <sup>a</sup>
-Après 30 min	0	20,00±4,71 <sup>a</sup>	18,33±2,35 <sup>b</sup>	30,00±2,01 <sup>b</sup>	31,00±1,41 <sup>b</sup>	46,66±4,71 <sup>c</sup>
- Après 60 min	0	13,33±1,00 <sup>a</sup>	2,00±1,00 <sup>b</sup>	15,71±2,02 <sup>b</sup>	10,50±0,70 <sup>c</sup>	39,16±1,17 <sup>a</sup>

Pour chaque échantillon, les valeurs sur la même ligne ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes ( $P < 0,05$ )

Les chiffres en trame de fond représentent pour chaque échantillon sa valeur maximale

### 8.3.2. Capacité de rétention d'huile

La capacité de rétention d'huile (CRH) est une propriété fonctionnelle qui trouve son intérêt en charcuterie. Les CRH de *R. heudelotii* varient de 222,90 (tourteau) à 256,40 g / 100 g d'échantillon (isolat protéique) (tableau 12). Pour *T. conophorum*, les variations sont de 277,40 (tourteau) - 410,80 g / 100 g d'échantillon (isolat protéique). Les préparations protéiques améliorent la CRH des deux Euphorbiacées. Les isolats protéiques de pois chiche (170 %) et de soja (254 – 261 %) (Wong et kits, 2003) ont des CRH inférieures à celles de *R. heudelotii* (256,60 %) et de *T. conophorum* (410,80 %). On remarque néanmoins que les tourteaux présentent également des valeurs assez élevées (229 et 367 % respectivement). Les propriétés d'absorption d'huile sont principalement dues à une disponibilité des groupements lipophiles (Sumner et al., 1981). En plus des groupements hydrophiles, les protéines des deux oléagineux présentent également de nombreux groupements lipophiles. L'élimination des autres constituants au cours de l'extraction des protéines laisse libre les fonctions lipophiles des protéines, d'où les valeurs maximales obtenues avec les isolats protéiques des deux plantes. L'habilité de ces protéines à retenir de l'huile est une propriété intéressante car elle permet une bonne rétention de la flaveur au cours des procédés de transformations alimentaires améliorant ainsi l'appétence (Moure et al., 2006).

### 8.4. Capacité gélifiante

La capacité de gélification d'une farine est définie comme l'aptitude d'une farine à former un gel lorsqu'elle est chauffée. Il ressort des résultats du tableau 12 que les plus petites concentrations gélifiantes sont obtenues avec les concentrats protéiques de *R. heudelotii* (14 %) et de *T. conophorum* (6 %). Celles des isolats sont de 16 et 8 % respectivement, tandis que celles des tourteaux, de 18 et 10 % respectivement. Néanmoins, l'isolat protéique de *T. conophorum* a une aptitude à plus former les gels que celui du pois chiche dont la capacité

gélifiante est de 14 % (Boye et *al.*, 2010). On se rend compte que la préparation des concentrats protéiques améliore la plus petite concentration gélifiante. On se serait attendu à avoir ces résultats avec les isolats protéiques car le gel est formé suite à des interactions protéines - protéines sous l'effet de la chaleur. Xu et *al.* (2010) ont observé que la gélification exige toujours des concentrations élevées de protéines. Les résultats obtenus s'expliquent par le fait que la gélification ne dépend pas seulement de la teneur en protéines mais aussi du type de protéines et des constituants non protéiques comme les fibres (Southgate, 1990). En effet, les concentrats protéiques des deux Euphorbiacées renferment environ 10 fois plus de fibres que leurs isolats protéiques respectifs. De même, les teneurs en fibres brutes de ces concentrats protéiques sont environ deux fois supérieures à celles des tourteaux.

La gélification protéique est importante dans la formation des gels solides viscoélastiques, pour améliorer l'absorption d'eau, l'épaississement, la liaison des particules (adhésion) et pour stabiliser les émulsions et les mousses (Moure et *al.*, 2006). Au vu des résultats, les concentrats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* pourraient être utilisés en charcuterie, boulangerie et laiterie.

### **8.5. Capacité émulsifiante et stabilité des émulsions**

La capacité émulsifiante (CE) est définie comme étant la hauteur de la phase émulsionnée rapportée à la hauteur totale de l'émulsion. Elle est surtout due aux protéines solubles (Moure et *al.*, 2006). La stabilité de l'émulsion (SE) mesurée après chauffage au bain- marie à 80°C pendant 30 min est la hauteur stable rapportée à la hauteur initiale. Les résultats de ces mesures sont donnés dans le tableau 12.

Les concentrats protéiques des deux Euphorbiacées présentent des CE de 63,25 (*R. heudelotii*) et 87,68 % (*T. conophorum*). La SE est respectivement de 60,46 et 73,48 %. On se serait attendu à avoir ces résultats avec les isolats protéiques car la capacité et la stabilité

des émulsions sont l'œuvre des protéines solubles, qui, présentes à l'interface eau et huile, favorisent et stabilisent les émulsions (Moure et *al.*, 2005). Ce résultat se justifie par le fait que, de tous les échantillons analysés, seuls les concentrats protéiques des deux Euphorbiacées ont des teneurs maximales en phospholipides (tableau 9). En effet, les phospholipides contribuent à la formation et à la stabilisation d'émulsions des aliments protéiques (Moure et *al.*, 2006 ; Belhaj et *al.*, 2010).

De même que la capacité de rétention d'eau, les émulsions contribuent à apporter des propriétés désirables aux aliments. Une fois de plus, les concentrats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* seraient utiles en laiterie, confiserie et chocolaterie.

### **8.6. Capacité moussante et stabilité des mousses**

La capacité moussante (CM) est définie comme le volume de mousse rapportée au volume total. La formation et la stabilité de mousse impliquent la diffusion des protéines solubles vers l'interface air / eau. La stabilité de la mousse (SM) est mesurée après 10, 30 et 60 min en rapportant le pourcentage de mousse stable (restant) au pourcentage de mousse initial. D'après les résultats du tableau 12, les échantillons de *R. heudelotii* forment moins de mousse que ceux de *T. conophorum*. Les isolats protéiques présentent les valeurs maximales (68,33 et 71,66 % respectivement). La SM après 60 min est de 1 % (*R. heudelotii*) et 39,16 % (*T. conophorum*). Ceci s'explique par le fait que la manifestation d'un bon pouvoir moussant et d'une bonne stabilité de la mousse varient proportionnellement en fonction de la solubilité de la protéine (Moure et *al.*, 2006). En effet, les protéines de l'isolat protéique de *T. conophorum* (figure 21 A) sont plus solubles que celles de *R. heudelotii* (figure 21 B) dans les mêmes conditions.

Les propriétés moussantes des protéines, la capacité à former des mousses stables et consistantes sont importantes particulièrement dans la préparation des gâteaux, des garnitures,

des desserts comme les produits soufflés (Moure et *al.*, 2006). Les isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* trouveraient leur importance en boulangerie, pâtisserie et laiterie.

## V. Conclusion partielle

Les courbes de solubilité des protéines brutes précisent les conditions de préparation des concentrats (eau à pH 4,5) et des isolats protéiques (NaOH 0,05 N et NaCl 0,6 M à pH 11 respectivement) à partir des tourteaux. Le pH 4,5 correspond à leur point isoélectrique précis. Le maximum de protéines brutes des tourteaux de *R. heudelotii* (80,73 %) et de *T. conophorum* (87,66 %) est solubilisé à pH 11 dans des solutions respectives de NaOH 0,05 N et de NaCl 0,6 M.

Les caractéristiques physico-chimiques des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sont différentes de celles de leurs tourteaux. Les teneurs en protéines des tourteaux, des concentrats et des isolats sont en moyenne de 50, 70 et 82 % MS respectivement. Pour chaque Euphorbiacée, les tourteaux et les concentrats protéiques correspondants sont riches en fibres brutes.

Les poids moléculaires des protéines déterminés par électrophorèse sur SDS-PAGE sont majoritairement compris entre 10 et 160 KDa. L'analyse des paramètres trichromatiques des échantillons montrent que le concentrat protéique de *T. conophorum* est le plus luminant.

Les propriétés fonctionnelles des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sont aussi différentes de celles de leurs tourteaux respectifs. Quand on passe des tourteaux aux concentrats puis aux isolats, la solubilité des protéines, les capacités de rétention d'eau, d'huile et moussantes augmentent. Les capacités gélifiantes et émulsifiantes quant à elles sont plus importantes dans les concentrats protéiques correspondants.

# **PARTIE V : COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS ET DIGESTIBILITÉS DES PROTÉINES DE TOURTEAUX, DE CONCENTRATS ET D'ISOLATS PROTÉIQUES**

## **I. Introduction**

La composition en acides aminés, la digestibilité *in vitro* et la digestibilité *in vivo* sont des paramètres de mesure de la valeur nutritionnelle d'un aliment. La digestibilité *in vitro* se déroule hors de l'organisme vivant et reste limitée car les résultats obtenus ne peuvent se substituer à l'ensemble des facteurs mécaniques, chimiques et enzymatiques.

L'expérimentation animale à travers la digestibilité *in vivo* demeure indispensable en physiologie nutritionnelle (Adrian *et al.*, 1998). Elle donne des résultats qui peuvent se substituer à l'ensemble des facteurs mécaniques, chimiques et enzymatiques. La digestibilité *in vivo* des protéines évalue la qualité nutritionnelle d'une protéine à partir de l'analyse des résultats de la mesure de l'azote retenu et de la croissance des rats.

Pour poursuivre l'évaluation de la qualité nutritionnelle des deux Euphorbiacées, une étude de la digestibilité a été menée sur les concentrats et les isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* préparés.

Cette partie du travail consiste à déterminer la composition en acides aminés, la digestibilité *in vitro* et *in vivo* des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques. Les trois hypothèses qui en découlent sont les suivantes :

*Hypothèse 1* : Les tourteaux, les concentrats et les isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* ont un équilibre chimique satisfaisant en acides aminés.

*Hypothèse 2*: La digestibilité *in vitro* des préparations protéiques (concentrats et isolats) est supérieure à celle des tourteaux.

*Hypothèse 3* : Les paramètres de digestibilité *in vivo* des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques préparés sont comparables à ceux de la caséine

## **II. Matériel végétal**

Les tourteaux de granulométrie 400 - 500  $\mu\text{m}$ , les concentrats et les isolats protéiques préparés comme décrit précédemment ont servi de matériel végétal.

## **III. Méthodologie expérimentale**

### **1. Composition en acides aminés**

La composition en acides aminés en dehors du tryptophane a été déterminée dans le laboratoire du Service Commun de Séquençage des Protéines (SCSP) de la faculté de Sciences de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1 (France). Cette détermination s'est faite par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (Colonne PTC RP – 18, 220 mm de longueur, 2,1 mm de diamètre interne et une pré – colonne, Applied Biosystems, Applera Corp, Fosters City, CA, USA).

Les échantillons à analyser sont hydrolysés sous vide à 150°C pendant 60 min dans une station Pico – Tag en présence de HCl 6 N à 1 % de phénol. Puis, ils sont repris dans de l'eau ultra pure et dérivatisés automatiquement grâce à un auto dérivatiseur – analyseur 420a (Applied Biosystems, Applera Corp, Foster City, CA, USA).

Les dérivés d'acides aminés sous forme de phényl – isothiocyanate (PICT) sont séparés en gradient par un tampon A (acétate de sodium 45mM à pH 5,9) et un tampon B (30 % acétate de sodium 105mM, pH 4,6 ; 70 % acétonitrile). La séparation se fait également sous un gradient d'élution à une vitesse de 300  $\mu\text{l}$  / min (tableau 13). La détection est fixée à 254 nm.

L'acquisition et l'exploitation des résultats est faite à l'aide d'un logiciel Model 600 Data Analysis System (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

**Tableau 13** : gradient d'élution des acides aminés par chromatographie liquide haute performance en phase inverse.

<b>Etapas</b>	<b>Temps (min)</b>	<b>Solvant A (%)</b>	<b>Solvant B (%)</b>
1	0,1	100	/
2	0,2	100	/
3	10	62	38
4	20	40	60
5	25	/	100
6	30	/	100
7	31	/	100
8	0	95	5

## **2. Détermination du tryptophane**

Le tryptophane est déterminé par dosage spectrophotométrique après une hydrolyse basique des échantillons à la baryte (Drèze, 1956 ; Friedman et Finley, 1971).

### **2.1. Hydrolyse des échantillons**

Dans un tube en verre muni d'un bouchon à vis, sont introduits successivement 1 g d'échantillon, 4 g de Ba(OH)<sub>2</sub> · 8H<sub>2</sub>O et 10 ml d'eau distillée. Les tubes sont fermés, incubés à l'étuve à 110°C pendant 16 h. Après refroidissement à température ambiante, les hydrolysats sont transvasés dans un bécher de 40 ml puis les tubes sont rincés avec 10 ml de solution tampon phosphate à pH 7,5. Ces béchers sont placés dans un bac à glace et l'hydrolysate est neutralisé avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,6 N ajouté goutte à goutte sous agitation jusqu'au pH 7 – 7,5. Les volumes sont complétés à 50 ml avec la solution tampon phosphate à pH 7,5.

La solution tampon phosphate pH 7,5 est préparée selon De Vries et *al.* (1980). 4,40 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4,40 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sont pesés dans une fiole de 1000 ml et le volume est complété avec de l'eau distillée.

## 2.2. Dosage colorimétrique

Le dosage se fait par spectrophotométrie UV à 590 nm. Tous les tubes sont au préalable emballés de papier aluminium avant l'introduction des différentes solutions. Pour l'étalonnage, les volumes de 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 ml de L – tryptophane (0,1 mg / l) sont introduits dans 5 tubes. Le tube blanc ne contient pas de solution étalon. Dans les tubes essais sont introduits successivement 8 ml de diméthyl aminobenzaldéhyde (DAB) (3 g / l dans H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 19 N) et 1 ml de solution à analyser. Après incubation à l'obscurité pendant 1 h, les volumes sont complétés à 10 ml avec la solution tampon phosphate pH 7,5. Aux tubes sont additionnés 0,1 ml de NaNO<sub>2</sub> 0,048 % puis laissés au repos toujours à l'obscurité pendant 45 min et la DO est lue à 590 nm contre le blanc.

L'équation de régression :  $DO = 199,14 q + 0,01$  avec  $r^2 = 0,99$  permet de calculer la quantité de tryptophane de chaque essai (q). La teneur (% MS) est obtenue à partir de la formule  $Q = \frac{q * 100 * F}{m * MS} * 100$ . Avec m: masse de l'échantillon (g) ; F : facteur de dilution ; m : masse; MS : matière sèche.

Les analyses sont effectuées en triple.

### **3. Calcul de l'indice chimique**

Connaissant la composition en acides aminés, il est possible d'identifier les acides aminés limitants en calculant l'indice chimique. Pour cela, on détermine le pourcentage de chaque acide aminé essentiel de la protéine à tester par rapport à l'acide aminé essentiel correspondant de la protéine de référence (FAO / WHO, 2007). L'indice chimique de la protéine est noté  $IC_1$  et est assimilé à celui de l'acide aminé ayant la valeur la plus faible (Ngudi et *al.*, 2003).

### **4. Digestibilités enzymatiques *in vitro* des protéines**

La digestibilité *in vitro* des échantillons (tourteaux, concentrats et isolats) a été testée par deux techniques multi – enzymatiques : la méthode du pH – stat qui donne le degré d'hydrolyse et la méthode utilisant le sac à dialyse qui mesure la cinétique de libération de l'azote avec le temps.

#### **4.1. Mesure du degré d'hydrolyse par la méthode du pH – stat**

La méthode du pH – stat (Pedersen et Eggum, 1983) permet d'apprécier la digestion des protéines grâce au pourcentage de liaisons peptidiques hydrolysées par un système multi – enzymatiques employant trois enzymes (Mc Donough et *al.*, 1990). Parmi les protéases connues, la pepsine, la trypsine, la chymotrypsine et la peptidase sont les plus indiquées lorsqu'on veut effectuer des tests de digestibilité *in vitro* et lorsque ces résultats vont être corrélés à ceux obtenus *in vivo*.

Les trois enzymes nécessaires pour cette étude sont : la trypsine pancréatique de porc (Sigma T – 0134, activité : 15900 unités / mg de protéines), la chymotrypsine pancréatique de bovin (Sigma C – 4129, activité : 52,6 unités / mg de poudre) et la peptidase intestinale de porc (Sigma P – 7500, activité : 102 unités / g de solide). L'hydrolyse est réalisée dans un

réacteur thermostaté de 100 ml (Biolafitte, France) où l'échantillon est mis en suspension dans de l'eau distillée (1 mg d'azote brut / ml) à 37°C et le pH est ajusté à 8 après ajout d'une solution enzymatique (Trypsine : 23100 unités / mg ; Chymotrypsine : 186 unités / mg ; Peptidase : 0,052 unités / mg). Le pH est maintenu constant pendant 10 min par addition de soude (NaOH 0,1N) (Alder – Nissen, 1986 ; Linder et *al.*, 1995). Le volume de soude ajouté (B) permet de calculer le degré d'hydrolyse (DH) des protéines. La protéine de référence est la caséine. Trois essais sont effectués par mesure.

### *Expression des résultats*

Alder – Nissen (1982) a montré qu'il existe une proportionnalité entre la libération des protons et le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées. Le degré d'hydrolyse (DH) est défini comme étant le rapport entre le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées (h) et le nombre de liaisons peptidiques totales ( $h_{\text{tot}}$ ). DH (%) est défini selon la formule :

$$\text{DH (\%)} = \frac{B \times N_B}{MP \times \alpha \times h_{\text{tot}}} \times 100$$

Avec : B : volume de soude ajouté

$N_B$  : normalité de la soude

$\alpha$  : degré de dissociation des groupes  $\alpha$  aminés

MP : masse de protéines (azote x 6,25) présente dans le milieu réactionnel

$h_{\text{tot}}$  : nombre de liaisons peptidiques dans la protéine (fixé à 8,2 méq / g)

Le degré de dissociation ( $\alpha$ ) est défini comme suit :  $\alpha = \frac{10^{\text{pH} - \text{pK}}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}}}$  où le pK représente le

pK moyen des fonctions  $\alpha$  - aminés durant l'hydrolyse :  $\text{pK} = 7,98 + \frac{298 - T}{298 \times T} \times 2400$  où T est

la température du réacteur exprimée en Kelvin

La valeur du pK est de 0,76 parce que la température est maintenue constante (37°C) au cours de l'analyse (Alder – Nissen, 1982).

Les résultats sont la moyenne de trois répétitions.

#### **4.2. Mesure de la digestibilité après dialyse**

Cette méthode permet de déterminer le pourcentage d'azote libéré par les échantillons après une prédigestion par la pepsine porcine (Sigma, P 7012, activité : 2331 unités / mg de poudre) suivie d'une digestion enzymatique de 6 h par la pancréatine porcine (Sigma, P 7545) (Rozan *et al.*, 1997).

Pour cette mesure, les échantillons sont préparés à 15 mg de protéines / ml. Cette préparation est mélangée à 10 ml de HCl (0,01 N) et à 2 ml de pepsine (3500 unités / mg de protéines) préparée dans un tampon phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01M, pH 2). Après 30 min d'incubation dans un bain – marie agitateur à 37°C, le pH du mélange est ajusté à 7,5 pour arrêter la digestion. 2 ml de pancréatine porcine (Sigma, P 7545) préparée à 1 mg / ml dans un tampon phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,01M, pH 8) sont additionnés au digestat qui est transféré dans un sac à dialyse possédant une limite d'exclusion moléculaire entre 800 et 1200 D. Cette deuxième digestion est réalisée dans un bain – marie agitateur à 37 °C pendant 6 h. Les fractions digérées (5 ml) sont collectées toutes les heures avec une micropipette. Une cinétique de libération de l'azote est mesurée après minéralisation et dosage selon Kjeldhal.

Les résultats sont la moyenne de trois répétitions.

#### **5. Digestibilité *in vivo* des protéines**

La digestibilité *in vivo* est menée pendant 15 jours sur des rats mâles albinos de race Wistar âgés de 21±3 jours. Durant l'expérimentation, les ingérés sont pesés quotidiennement et les animaux, tous les deux jours.

### 5.1. Préparation des aliments pour la digestibilité *in vivo*

La règle fondamentale est que toutes les rations soient isoazotées (c'est à dire qu'elles ont la même teneur en azote) et que la seule variable entre le régime témoin (contenant la caséine) et les rations expérimentales est la nature des protéines. Tous les régimes doivent être complets et équilibrés, renfermant un léger excès de nutriments sauf en celui qui fait l'objet de la mesure. La teneur en protéines des aliments est maintenue à 10 % (Giami, 2005). La composition des aliments pour la nutrition des rats est indiquée dans le tableau 14.

**Tableau 14** : composition des rations pour l'alimentation des rats (Giami, 2005).

Ingrédients	Aliment témoin	Aliment test
Protéines (%)	10	10
Huile de maïs (g)	80	80
Cellulose (g)	30	30
DL – Méthionine (g)	3	3
Saccharose (g)	374,3	374,3
Mélange de sels minéraux <sup>a</sup> (g)	40	40
Mélange vitaminique <sup>b</sup> (g)	10	10
Amidon de maïs	Quantité pour atteindre 1000g	

<sup>a</sup>**Mélange minéral** (composition / 100 g): Phosphate bicalcique (36,5 g) ; Carbonate de calcium (22,77 g) ; Phosphate monopotassique (18,7 g) ; Chlorure de potassium (7,75 g) ; Chlorure de sodium (7,75 g) ; Magnésie anhydre (4 g) ; Sulfate de fer (1,13 g) ; Sulfate de zinc (0,9 g) ; Sulfate de manganèse (0,4 g) ; Sulfate de cuivre (0,1 g) ; Sulfate de cobalt ( 2 mg) ; Iodure de potassium (1 mg).

<sup>b</sup>**Mélange vitaminique** (composition / 100 g): Vit. B<sub>1</sub> (1,5 mg) ; Vit. B<sub>2</sub> (2,5 mg) ; Vit. B<sub>3</sub> (15 mg) ; Vit. B<sub>5</sub> (5 mg) ; Vit. B<sub>6</sub> (1,5 mg) ; Vit. B<sub>9</sub> (0,5 mg) ; Vit. B<sub>8</sub> (150 µg) ; Vit. B<sub>12</sub> (10 µg) ; Vit. A (1 mg) ; Vit. D (37 µg) ; Vit. E (40 mg) ; Vit. K (3 mg).

Expérimentalement, on dispose de 8 formulations d'aliments différents les uns des autres par la source protéique apportée :

- L'aliment 1 sert de témoin et a pour source protéique la caséine (GTE);
- L'aliment 2, le tourteau tamisé de *R. heudelotii* (GTORH);
- L'aliment 3, le tourteau tamisé de *T. conophorum* (GTOTC) ;
- L'aliment 4, le concentrat protéique de *R. heudelotii* (GCORH);
- L'aliment 5 le concentrat protéique de *T. conophorum* (GCOTC);
- L'aliment 6, l'isolat protéique de *R. heudelotii* (GISRH) ;
- L'aliment 7, l'isolat protéique de *T. conophorum* (ISTC);
- L'aliment 8 ne contient pas de protéines (GSA).

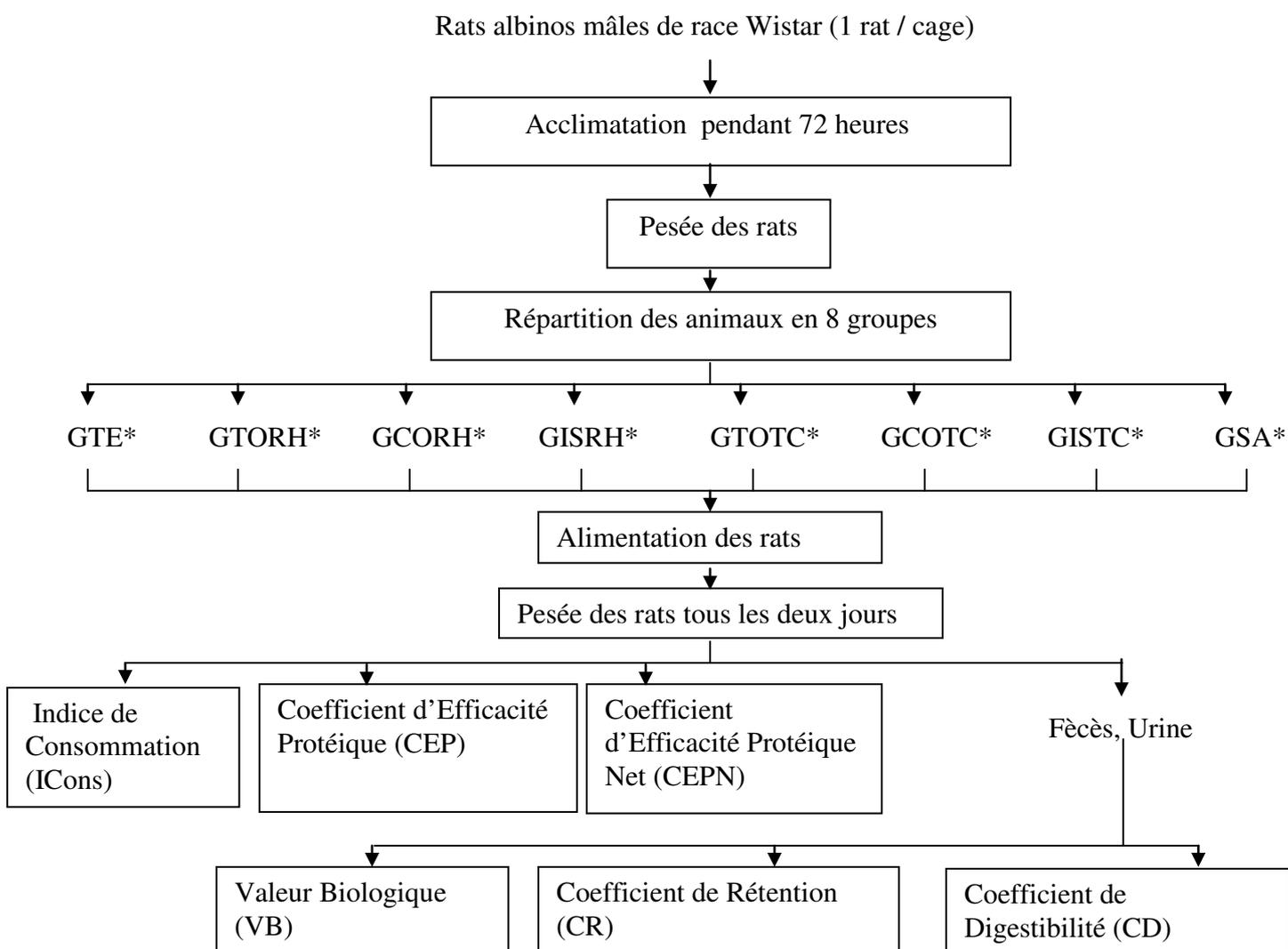
## **5.2. Procédure expérimentale**

Les rats mâles albinos de race Wistar âgés de 21±2 jours sont pesés et répartis de manière randomisée en 8 groupes. L'organigramme de l'exécution de l'étude est présenté à la figure 22.

Les rats acclimatés pendant 72 h sont pesés et gardés chacun dans des cages métaboliques maintenues alternativement 12 h à la lumière du jour et 12 h à l'obscurité à température ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) et humidité (50 – 60 %) constantes (Gianni, 2005). Pendant la période d'acclimatation, les animaux reçoivent de l'eau et l'aliment témoin à volonté. Après pesée, les rats sont répartis de manière randomisée en 8 groupes de 5 rats chacun.

Les rats sont nourris pendant 15 jours. Tous les deux jours et à la même heure, ils sont pesés. La perte de masse présentée par le groupe de rats soumis au régime sans protéines est utilisée pour le calcul du CEPN. La variation de masse corporelle et la quantité d'aliments consommées pendant la période que dure l'expérimentation sont utilisées pour l'estimation du

CEP. A partir du 10<sup>ème</sup> jour, les fèces et les urines sont collectés et leur teneur en azote est déterminée en vue de l'évaluation de la digestibilité protéique (CR, VB, CUD).



**Figure 22** : organigramme pour l'étude de la digestibilité *in vivo*

- \* **GTE** : groupe de rats nourris à l'aliment témoin (caséine) ;
- \* **GTORH** : groupe de rats nourris au tourteau de *R. heudelotii* ;
- \* **GCORH**: groupe de rats nourris au concentrat protéique de *R. heudelotii*;
- \* **GISRH** : groupe de rats nourris à l'isolat protéique de *R. heudelotii* ;
- \* **GTOTC** : groupe de rats nourris au tourteau de *T. conophorum* ;
- \* **GCOTC** : groupe de rats nourris au concentrat protéique de *T. conophorum* ;
- \* **GISTC** : groupe de rats nourris à l'isolat protéique de *T. conophorum* ;
- \* **GSA** : groupe de rats soumis au régime sans protéines.

### 5.3. Paramètres de mesure de la croissance des rats

Les ingérés et les poids des rats mesurés permettent d'établir trois valeurs : l'indice de consommation (ICons), le Coefficient d'Efficacité Protéique (CEP) et le Coefficient d'Efficacité Protéique Net (CEPN) (Adrian et *al.*, 1998). Pour chaque échantillon, chaque paramètre de croissance est la moyenne des mesures effectuées sur 5 rats.

$$\text{ICons} = \frac{\text{IS(g)}}{\text{GM(g)}} * 100; \quad \text{IS : Ingéré sec ;} \quad \text{GM : Gain de masse corporelle}$$

$$\text{CEP} = \frac{\text{GM(g)}}{\text{PI(g)}} * 100; \quad \text{PI : Protéines ingérées}$$

$$\text{CEPN} = \frac{\text{GM(g)} + \text{PM(g)}}{\text{PI(g)}} * 100; \quad \text{PM : perte de masse corporelle du groupe de rats nourris}$$

au régime sans protéines

### 5.4. Paramètres de mesure de l'azote retenu

L'ingéré azoté étant égal à zéro dans le groupe de rats soumis au régime sans protéines, le rejet correspond strictement à la fraction azotée endogène. Par ce moyen, il devient possible de calculer le Coefficient de Digestibilité (CD) ou Coefficient d'Utilisation Digestive, la Valeur Biologique (VB) et l'Utilisation Protéique Nette (UPN). Pour chaque groupe, les résultats des paramètres de l'azote retenu sont la moyenne pour 5 rats. Les formules suivantes sont utilisées pour ces calculs :

$$\text{CD} = \frac{\text{NA(g)}}{\text{NI(g)}} * 100; \quad \text{NA : Azote absorbé ;} \quad \text{NI : Azote ingéré}$$

$$\text{CD} = \frac{\text{NI} - (\text{F} - \text{Fm})}{\text{NI(g)}} * 100; \quad \text{F = Azote fécal alimentaire;} \quad \text{Fm = Azote fécal métabolique}$$

$$\text{VB} = \frac{\text{NR(g)}}{\text{NA(g)}} * 100; \quad \text{NR : Azote retenu ou fixé;} \quad \text{NA : Azote absorbé}$$

$$VB = \frac{NI - (F - Fm) - (U - Um)}{NI - (F - Fm)} * 100 ; \quad U = \text{azote urinaire alimentaire} \quad Um = \text{azote}$$

urinaire métabolique

$$UPN = \frac{NR(g)}{NI(g)} * 100 ; \quad UPN = \frac{NI - (F - Fm) - (U - Um)}{NI} * 100$$

#### **IV. Correction des résultats de la digestibilité protéique par la méthode du PDCAAS**

En français, PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score) veut dire score chimique corrigé de la digestibilité. Pour son application, chaque valeur de mesure de la croissance des rats (CEP, CEPN) et de l'azote retenu par les rats (CD, VB, UPN) est multipliée par le plus faible indice chimique de la protéine contenue dans l'aliment analysé (Rozan *et al.*, 1997). Ainsi, les valeurs corrigées à calculer sont :

- CEPCAAS : Coefficient d'Efficacité Protéique corrigé par l'indice chimique des acides aminés
- CEPNCAAS : Coefficient d'Efficacité Protéique Net corrigé par l'indice chimique des acides aminés
- CDCAAS : Coefficient de Digestibilité corrigé par l'indice chimique des acides aminés
- VBCAAS : Valeur Biologique corrigée par l'indice chimique des acides aminés
- UPNCAAS : Utilisation Protéique Nette corrigée par l'indice chimique des acides aminés

#### **V. Analyses statistiques**

Le dispositif expérimental est un bloc complètement randomisé. Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart type. Les données sont soumises à l'analyse de la variance afin d'apprécier l'effet des traitements alimentaires sur les paramètres mesurés. La différence entre les moyennes des traitements est déterminée par le test de comparaison multiple de

DUNCAN. Le logiciel Statgraphics Plus 3 est utilisé pour ces analyses. Les effets au seuil de probabilité  $P < 0,05$  sont considérés comme significatifs.

## VI. Résultats et discussion

### 1. Compositions en acides aminés et indices chimiques

Les compositions en acides aminés en mg / g de protéines des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* par rapport à la matière sèche sont données dans le tableau 15. Cette composition en acides aminés est comparée à celle de la protéine de référence selon le modèle FAO / WHO (2007) pour une ration journalière de 0,66 g de protéines / kg de poids corporel chez un individu en bonne santé et ayant une activité physique modérée. Les acides aminés dont les valeurs sont soulignées correspondent aux acides aminés limitants. Les valeurs des indices chimiques (IC) sont rassemblées dans le tableau 16. Celles qui sont soulignées correspondent pour chaque échantillon au plus petit indice chimique (IC<sub>1</sub>).

Les acides aminés essentiels du tourteau de *R. heudelotii* (TORH) ont des valeurs supérieures à celle de la protéine de référence (FAO / WHO, 2007) (tableau 15). Le concentrat protéique de *R. heudelotii* (CORH) est pauvre en tryptophane (2,06 mg / g de protéines) et en lysine (28,76 mg / g de protéines) par rapport à la protéine de référence où les teneurs en ces acides aminés sont de 6 et 45 mg / g de protéines respectivement (tableau 15). Le tryptophane est ainsi le facteur limitant primaire du CORH avec un IC de 34,33 % et la lysine en est le second avec un IC de 64,00 % (tableau 16). L'isolat protéique de *R. heudelotii* (ISRH) présente également deux acides aminés limitants : le tryptophane avec un IC de 36,83 % et la lysine (IC de 52,61 %) (tableau 16). La préparation des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* induit des pertes en acides aminés d'où leur déficience en certains acides aminés essentiels.

**Tableau 15** : compositions en acides aminés (mg / g de protéines) des tourteaux, des concentrats, des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* comparées à celle de la protéine de référence (WHO / OMS, 2007)

Acides aminés	TORH	CORH	ISRH	TOTC	COTC	ISTC	FAO/WHO/ (2007)
<b>Acides aminés essentiels</b>							
<b>Ile</b>	59,07	45,13	30,33	64,61	40,06	38,93	30
<b>Leu</b>	128,90	81,54	65,24	122,25	79,06	71,60	59
<b>Lys</b>	48,92	<u>28,76*</u>	<u>23,67*</u>	71,20	<u>38,33*</u>	45,00	45
<b>Met + Cys</b>	53,99	44,52	42,15	62,02	29,31	47,77	22
<b>Phe + Tyr</b>	102,11	63,49	49,20	79,57	56,11	50,84	38
<b>Thr</b>	68,00	44,36	38,07	71,59	51,07	45,93	23
<b>Val</b>	133,98	81,54	65,68	96,52	68,18	58,21	36
<b>Trp</b>	26,99	<u>2,06*</u>	<u>2,21*</u>	11,91	<u>2,94*</u>	14,00	6
<b>His</b>	32,88	28,61	16,80	37,69	20,29	<u>13,38*</u>	15
<b>Acides aminés non essentiels</b>							
<b>Asp</b>	270,40	245,10	156,02	324,09	220,08	193,56	/
<b>Glu</b>	369,26	282,12	205,89	237,54	184,13	183,86	/
<b>Ser</b>	95,61	86,13	59,57	111,09	76,41	63,74	/
<b>Gly</b>	203,00	176,56	118,27	352,21	213,71	174,52	/
<b>Arg</b>	182,09	139,84	95,47	127,24	92,99	79,09	/
<b>Ala</b>	157,32	117,19	84,56	138,61	97,10	89,29	/
<b>Pro</b>	97,44	64,56	49,20	92,54	59,96	58,46	/
$\frac{\sum \text{AAE}}{\sum \text{AAT}}$	33,43	28,46	31,36	32,23	30,40	32,78	

\* *Acides aminés limitants*

$\Sigma$ AAE : somme des acides aminés essentiels ;  $\Sigma$ AAT : somme des acides aminés totaux.

**Tableau 16 :** indices chimiques (%) de la caséine, des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

Acides aminés	TORH	CORH	ISRH	TOTC	COTC	ISTC	Caséine*
<b>Ile</b>	200,00	150,45	101,10	215,40	133,55	129,78	213,33
<b>Leu</b>	218,48	138,21	110,60	207,21	134,01	121,36	133,89
<b>Lys</b>	108,72	64,00	52,61	158,74	85,20	99,62	197,77
<b>Met + Cys</b>	245,45	202,38	191,61	281,94	194,77	217,17	131,81
<b>Phe + Tyr</b>	268,70	167,09	192,50	209,41	147,67	133,80	121,05
<b>Thr</b>	295,68	193,00	165,56	311,20	222,06	199,80	213,04
<b>Val</b>	372,20	226,52	185,46	268,14	189,41	161,71	175
<b>Trp</b>	250,00	<u>34,33**</u>	<u>36,83**</u>	198,50	<u>49,00**</u>	233,36	266,66
<b>His</b>	219,24	190,74	112,02	251,30	134,31	<u>89,25*</u>	193,33

\*D'après la composition en acides aminés donnée par Blondeau (1988) comparée à celle de la protéine de référence FAO / WHO (2007)

\*\* Plus faible indice chimique ( $IC_1$ ) de chaque protéine

**TORH** : Tourteau de *R. heudelotii* ; **CORH** : Concentrat protéique de *R. heudelotii* ; **ISRH** : isolat protéique de *R. heudelotii* ; **TOTC** : Tourteau de *T. conophorum* ; **COTC** : Concentrat protéique de *T. conophorum* ; **ISTC** : Isolat protéique de *T. conophorum*.

Tout comme *R. heudelotii*, les teneurs en acides aminés essentiels des protéines du tourteau de *T. conophorum* (TOTC) sont aussi supérieures à celles de la protéine de référence (FAO / WHO, 2007). Son concentrat protéique est déficient en tryptophane et en lysine. Leur indice chimique respectif est de 49,00 et 85,20 %. L'isolat protéique de *T. conophorum* est limité en histidine ( $IC = 89,25\%$ ) (tableau 16).

Les protéines des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques des deux Euphorbiacées sont riches en isoleucine, en valine et en acides aminés soufrés (méthionine + cystéine). Elles pourraient ainsi être utilisées pour la complémentation des aliments qui en sont pauvres. De même, ces échantillons renferment des teneurs élevées en acide aspartique (193,56 – 324,09 mg / g protéines) et en acide glutamique (183,86 – 369,26 mg / g protéines), deux acides aminés considérés aussi comme essentiels dans le métabolisme des protéines (Reeds, 2000). Les valeurs obtenues sont supérieures à celles des protéines de l'arachide avec 114 et 177 mg / g protéines respectivement (Campos – Mondragón et al., 2009). L'arginine agit dans le système cardiovasculaire comme régulateur de la pression sanguine (Lira et Arredonde, 2004). Les teneurs en arginine des tourteaux et des préparations protéiques des deux Euphorbiacées sont élevées et varient de 79,9 (ISTC) à 182,09 mg / g protéines (TORH).

La préparation des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* entraîne des pertes en chacun de leurs acides aminés essentiels dont deux principalement : la lysine et le tryptophane. Cette perte serait liée à leur destruction au cours des opérations de solubilisation, précipitation isoélectrique, congélation, lyophilisation appliquées aux échantillons. En effet, les traitements alcalins au – dessus de pH 10 entraînent l'oxydation du tryptophane, la destruction de la lysine. On note également des pertes dues aux réactions avec les composés phénoliques et les phytates à pH alcalin ou acide (Zaidi et al., 2009).

Pour connaître l'équilibre chimique en acides aminés des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*, les rapports somme acides aminés essentiels sur somme acides aminés totaux sont calculés pour chaque échantillon (tableau 15). Selon Blankership et Alford (1983), les acides aminés d'une protéine présentent un équilibre chimique entre eux lorsque ce rapport est supérieur ou égal à 33 %. Des échantillons analysés, TORH est la seule source de protéines à avoir un rapport supérieur à 33 %. En dehors du

CORH dont la valeur est de 28,56 %, les autres échantillons présentent des résultats compris entre 30 – 32,78 % (tableau 15), donc proches de l'équilibre préconisé. Les protéines du tourteau de *R. heudelotii* présentent ainsi un équilibre chimique satisfaisant en ses acides aminés. Ce résultat corrobore celui obtenu par Tchiégang et *al.* (2006) sur d'autres provenances du Cameroun.

## **2. Digestibilités enzymatiques**

Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer la digestibilité enzymatique des protéines des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* : la méthode du pH – stat qui évalue le degré d'hydrolyse et la méthode de digestibilité *in vitro* dans des sacs à dialyse, mesure l'azote libéré.

### **2.1. Mesure de la digestibilité par degré d'hydrolyse**

La mesure du degré d'hydrolyse (DH) par la méthode du pH – stat tient compte du nombre de liaisons peptidiques hydrolysées par trois enzymes (trypsine, chymotrypsine et peptidase). Les résultats de digestibilité par cette méthode sont rapides et reflètent le pourcentage de liaisons peptidiques rompues. Pour les échantillons des deux plantes, le nombre de liaisons peptidiques totales dans la protéine ( $h_{tot}$ ) est fixé à 8,2 meq / g de protéines (Alder – Nissen, 1986). La caséine est utilisée comme témoin.

Les résultats rassemblés dans le tableau 17 laissent apparaître que le DH après 10 min de digestion est maximal avec la caséine (11,07 %) et minimal avec le tourteau de *R. heudelotii* (4,72 %). Le volume de NaOH étant proportionnel au DH, il en ressort que le volume de base (NaOH 0,1 N) utilisé est significativement plus grand pour la caséine et significativement plus petit pour TORH. Le résultat avec la caséine est lié à sa composition

équilibrée en acides aminés essentiels ainsi qu'à l'absence des substances non protéiques contrairement aux échantillons tests.

**Tableau 17 :** degré d'hydrolyse (%), volumes de NaOH (0,1 N) des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* comparés à celui de la caséine

	DH (%)	Volume de NaOH (ml)
<b>Caséine</b>	11,07±0,02	2,84±0,00
<b>TORH</b>	4,72±0,02 <sup>c</sup>	2,52±0,01
<b>CORH</b>	6,81±0,04 <sup>b</sup>	2,59±0,00
<b>ISRH</b>	9,03±0,03 <sup>a</sup>	2,43±0,01
<b>TOTC</b>	5,29±0,02 <sup>c</sup>	2,82±0,01
<b>COTC</b>	7,79±0,01 <sup>b</sup>	2,72±0,01
<b>ISTC</b>	8,21±0,03 <sup>a</sup>	2,41±0,00

*Pour chaque échantillon, les chiffres ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes (P < 0,05).*

**TORH :** Tourteau de *R. heudelotii* ; **CORH :** Concentrat protéique de *R. heudelotii* ; **ISRH :** isolat protéique de *R. heudelotii* ; **TOTC :** Tourteau de *T. conophorum* ; **COTC :** Concentrat protéique de *T. conophorum* ; **ISTC :** Isolat protéique de *T. conophorum*.

Des échantillons analysés, le DH de ISRH a une valeur maximale (9,03 %) se rapprochant de celle de la caséine (11,07 %). Les préparations protéiques (concentrats et isolats) de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* entraînent une augmentation de leur capacité d'hydrolyse par la trypsine, la chymotrypsine et la peptidase. En effet, les résultats pour les tourteaux de *R. heudelotii* (4,72 %) et de *T. conophorum* (5,29 %) sont inférieurs à ceux des concentrats (6,81 et 7,79 % respectivement) qui, à leur tour sont inférieurs aux valeurs des

isolats protéiques respectifs (9,03 et 8,21 %). Les protéines des tourteaux des deux plantes ont ainsi les plus faibles degrés d'hydrolyse malgré l'absence d'acides aminés limitants. Le processus de purification de ces protéines améliore donc leur degré d'hydrolyse.

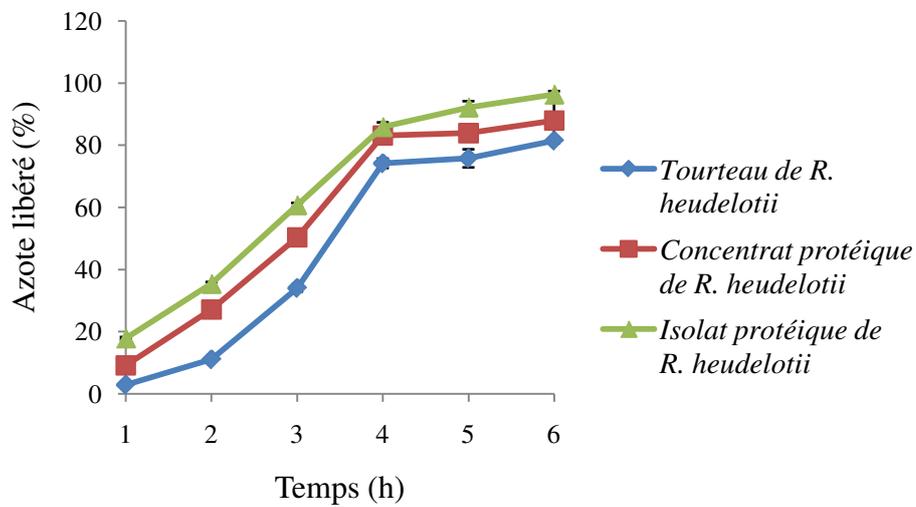
D'une manière générale, le DH augmente avec la teneur en protéines c'est-à-dire lorsqu'on passe des tourteaux aux concentrats puis aux isolats quelle que soit la plante. L'élimination de certains constituants tels que les glucides, les inhibiteurs de trypsine et les lipides résiduels des tourteaux (phospholipides) rend les enzymes accessibles aux différents sites d'action (Rubanza et *al.*, 2005).

## **2.2. Digestibilité *in vitro* des protéines dans des sacs à dialyse**

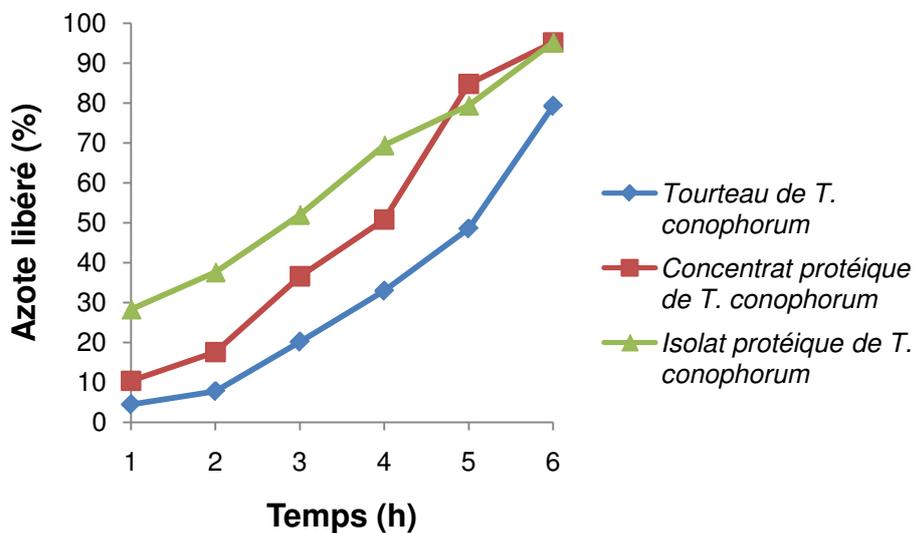
La digestibilité *in vitro* des protéines des deux Euphorbiacées faite en présence de deux protéases consiste en une prédigestion enzymatique par la pepsine pendant 30 min, puis une digestion de 6 h par la pancréatine constituée de la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase, la carboxypeptidase A et B. La cinétique de la libération de l'azote réalisée pendant 6 h a permis d'évaluer la digestibilité à intervalles d'une heure. Les résultats exprimés en azote libéré en fonction du temps sont présentés sur la figure 23 A (*R. heudelotii*) et la figure 23 B (*T. conophorum*).

Pendant les 3 premières heures d'hydrolyse, ISRH présente des valeurs supérieures à CORH et TORH car l'azote libéré augmente au fur et à mesure qu'on passe des tourteaux aux concentrats, puis aux isolats protéiques. Ces résultats prouvent que la préparation de l'isolat protéique de *R. heudelotii* élimine les fibres, les lipides résiduels et les tanins. Les complexes formés par les tanins et les protéines réduisent en effet l'accessibilité des protéines aux enzymes digestives tel qu'indiqué par Rubanza et *al.* (2005). De la 4<sup>ème</sup> à la 6<sup>ème</sup> h, l'azote libéré par TORH n'est pas significativement différent ( $P > 0,05$ ) de celui libéré par ISRH.

L'accessibilité des protéines aux enzymes est donc la même dans le tourteau et l'isolat protéique durant cette période d'hydrolyse.



**Figure 23 A:** azote libéré après digestion des protéines du tourteau, du concentrat et de l'isolat protéique de *R. heudelotii* pendant 6 h.



**Figure 23 B :** azote libéré après digestion des protéines du tourteau, du concentrat et de l'isolat protéique de *T. conophorum* pendant 6 h.

Pour *T. conophorum*, le pourcentage d'azote libéré augmente avec la technologie de purification des protéines jusqu'à la 4<sup>ème</sup> h d'hydrolyse. En effet, durant cette période, TOTC libère moins d'azote que COTC qui à son tour en libère moins que ISTC ( $P < 0,05$ ). Mais à la 5<sup>ème</sup> h d'hydrolyse, la différence devient non significative ( $P > 0,05$ ) entre COTC et ISTC.

Pour mieux apprécier le phénomène de digestibilité en fonction du temps, les équations de droite linéaire  $y = ax + b$  ont été établies et les résultats sont présentés dans le tableau 18. « y » représente le temps d'hydrolyse, « x » correspond à la quantité d'azote libéré et « a » représente la vitesse d'hydrolyse enzymatique. Pour tous les échantillons, la valeur de « a » augmente avec le pourcentage d'azote libéré. Elle est plus élevée pour les concentrats et les isolats protéiques des deux Euphorbiacées.

Le carré du coefficient de détermination met en évidence la linéarité de la relation entre le temps d'hydrolyse et la quantité d'azote libéré quel que soit l'échantillon. Il présente une valeur maximale avec ISTC, ce qui montre la linéarité du passage passif de l'azote de cet échantillon à travers la membrane à dialyse.

**Tableau 18** : équations des différentes cinétiques de digestibilité *in vitro* et coefficients de détermination ( $r^2$ )

Echantillons	Equations : $y = ax + b$	$r^2$
<b>TORH</b>	$y = 13,15 x - 10,66$	0,90
<b>CORH</b>	$y = 17,70 x - 1,28$	0,96
<b>ISRH</b>	$y = 17,72 x + 0,41$	0,95
<b>TOTC</b>	$y = 8,60 x - 3,94$	0,97
<b>COTC</b>	$y = 16,68 x - 7,89$	0,96
<b>ISTC</b>	$y = 14,97 x + 6,75$	0,98

**TORH** : Tourteau de *R. heudelotii* ; **CORH** : Concentrat protéique de *R. heudelotii* ; **ISRH** : isolat protéique de *R. heudelotii* ; **TOTC** : Tourteau de *T. conophorum* ; **COTC** : Concentrat protéique de *T. conophorum* ; **ISTC** : Isolat protéique de *T. conophorum*.

### 2.3. Digestibilité réelle *in vitro* corrigée par l'indice chimique

La digestibilité réelle *in vitro* des protéines des tourteaux, des concentrats, des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* consiste pour chaque échantillon à multiplier les résultats de la digestibilité de l'azote (DA) après 6 h d'hydrolyse et les données du degré d'hydrolyse (DH) par celui de l'acide aminé ayant le plus faible indice chimique (IC<sub>1</sub>). C'est la méthode du PDCAAS (Protein Digestibility Corrected Amino Acid). En français, Cette expression signifie Score Chimique Corrigé par l'Indice Chimique des Acides Aminés. Ainsi, le DACAAS (Digestibilité *in vitro* de l'Azote Corrigée par l'Indice Chimique des Acides Aminés) et le DHCAAS (Degré d'Hydrolyse Corrigé par l'Indice Chimique des Acides Aminés) sont les deux paramètres calculés. Ils permettent de juger de la biodisponibilité des protéines dans la mesure où ils prennent en compte l'acide aminé ayant le plus faible indice chimique. La biosynthèse des protéines nécessite en effet la présence de tous les acides aminés essentiels au même moment (FAO / WHO, 1989). Les résultats sont donnés dans le tableau 19.

**Tableau 19** : digestibilité *in vitro* corrigée (DACAAS et DHCAAS) des tourteaux, des concentrats, des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

	DA (%)	DH (%)	IC <sub>1</sub>	DACAAS	DHCAAS
<b>TORH</b>	91,43±1,06 <sup>c</sup>	4,72±0,02 <sup>c</sup>	1,08	98,74	5,09
<b>CORH</b>	97,93±5,29 <sup>a</sup>	6,81±0,04 <sup>b</sup>	0,34	33,29	2,31
<b>ISRH</b>	96,30±1,76 <sup>b</sup>	9,03±0,03 <sup>a</sup>	0,36	34,66	3,25
<b>TOTC</b>	49,22±0,96 <sup>b</sup>	5,29±0,02 <sup>c</sup>	1,08	53,15	5,71
<b>COTC</b>	95,13±0,91 <sup>a</sup>	7,79±0,01 <sup>b</sup>	0,49	46,61	3,81
<b>ISTC</b>	95,14±1,06 <sup>a</sup>	8,21±0,03 <sup>a</sup>	0,89	84,67	7,30

*Pour chaque échantillon, les valeurs ayant la même lettre en exposant sur la même colonne ne sont pas significativement différentes (P < 0,05).*

Par rapport aux valeurs de DA et de DH, on note une baisse remarquable du DHCAAS et du DACAAS des concentrats et des isolats protéiques. Les valeurs sont en hausse avec les tourteaux correspondants. La digestibilité réelle des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sont ainsi les plus élevées dans la mesure où leurs indices chimiques est supérieur à 1.

Les méthodes de digestion *in vitro* mesurent la capacité d'une protéine à être hydrolysée. Elles ont l'avantage d'être rapides, reproductibles et simples mais ne prennent pas en compte les quantités d'aliments ingérés et les diverses interactions au niveau de la muqueuse intestinale (Adrian et *al.*, 1998). Il est donc nécessaire de mesurer la digestibilité *in vivo* dans le but de déterminer la disponibilité des acides aminés de ces protéines.

### **3. Digestibilité *in vivo***

#### **3.1. Aliment ingéré, azote ingéré, azote excrété**

L'aliment et l'azote ingérés ainsi que l'azote excrété sont mesurés sur des jeunes rats mâles albinos de race Wistar soumis à une expérimentation de 15 jours. Les résultats rassemblés dans le tableau 20 représentent la moyenne d'une alimentation de 15 jours par groupe de 5 rats chacun.

L'étude de la prise alimentaire montre des différences entre la caséine et les aliments tests (TORH, CORH, ISRH, TOTC, COTC, ISTC). La quantité moyenne d'aliments ingérés par le groupe recevant l'aliment de base est très faible (10,24 g / rat / 15 jours). Les groupes de référence, TORH, TOTC et COTC ingèrent en moyenne 20 g d'aliment / rat / 15 jours. Des aliments tests, celui à base de CORH est le moins ingéré (13,96 g / rat / 15 jours), suivi de ISRH (15,40 g / rat / 15 jours) et de ISTC (16,36 g / rat / 15 jours). La faible prise alimentaire du régime CORH serait liée à sa teneur élevée en fibres brutes (12,39 % MS) dans la mesure où les régimes riches en fibres nécessitent souvent une grande mastication, ce qui peut vite

entraîner la sensation de satiété (Southgate, 1990). Dans le cas des aliments à base de ISRH et de ISTC, les résultats seraient liés à leur faible teneur en arginine, lysine et histidine, qui sont des acides aminés basiques. En effet, Maga (1981) signale que les acides aminés basiques et l'acide glutamique contribuent à améliorer la saveur et l'appétence des aliments qui en sont riches.

L'azote ingéré est du même ordre que l'aliment consommé. En effet, l'azote ingéré augmente avec la quantité d'aliment consommée pour chaque régime. Le maximum d'azote fécal est excrété dans le groupe TORH (0,14 g / rat / 15 jours) suivi de COTC (0,12 g / rat / 15 jours) à cause de leur teneur élevée en fibres brutes (12 et 15 % respectivement), en dehors de celles ajoutées pour la préparation des régimes. L'augmentation de la teneur en fibres du régime accroît l'excrétion fécale d'azote suite à une augmentation d'azote d'origine microbienne (Zhu et al., 1990). Par ailleurs, de par leur capacité de rétention d'eau élevée, les fibres exercent un effet « barrière » qui freinerait la digestion et la réabsorption des sécrétions digestives et expliquerait les pertes endogènes plus élevées observées en leur présence (Leterme et al., 1997). Tout ceci justifie le minimum d'azote fécal excrété par les rats nourris à la caséine car dépourvue de fibres.

Les rats ingérant l'aliment COTC excrètent plus d'azote urinaire (0,29 g / rat / 15 jours). Le taux de fibres du régime n'a pas eu d'effet significatif sur l'excrétion urinaire d'azote car les rats soumis aux régimes CORH, ISRH, TOTC et de base ont une excrétion d'azote urinaire comparable (tableau 20).

**Tableau 20** : aliment et azote ingérés, excrétion totale et gain de poids (g / rat / 15 jours) des groupes de rats nourris aux régimes caséine, TORH, CORH, ISRH, TOTC, COTC et ISTC

	Aliment ingéré	Azote ingéré	Azote fécal	Azote urinaire	Excrétion totale	Gain de poids
<b>Caséine</b>	23,06±3,61 <sup>a</sup>	0,36±0,05 <sup>a</sup>	0,02±0,00 <sup>d</sup>	0,07±0,01 <sup>b</sup>	0,08±0,01 <sup>c</sup>	7,06±1,51 <sup>a</sup>
<b>TORH</b>	22,72±3,75 <sup>a</sup>	0,36±0,06 <sup>a</sup>	0,14±0,03 <sup>a</sup>	0,10±0,03 <sup>d</sup>	0,24±0,03 <sup>b</sup>	4,69±1,96 <sup>b</sup>
<b>CORH</b>	13,96±0,53 <sup>c</sup>	0,22±0,00 <sup>c</sup>	0,07±0,00 <sup>b</sup>	0,07±0,02 <sup>b</sup>	0,14±0,08 <sup>c</sup>	3,33±1,85 <sup>b</sup>
<b>ISRH</b>	15,40±4,39 <sup>c</sup>	0,24±0,07 <sup>b</sup>	0,06±0,01 <sup>b</sup>	0,06±0,02 <sup>b</sup>	0,12±0,09 <sup>d</sup>	3,28±1,71 <sup>b</sup>
<b>TOTC</b>	20,01±1,62 <sup>b</sup>	0,32±0,02 <sup>b</sup>	0,09±0,03 <sup>b</sup>	0,07±0,02 <sup>b</sup>	0,15±0,02 <sup>c</sup>	6,06±1,49 <sup>a</sup>
<b>COTC</b>	22,09±2,56 <sup>a</sup>	0,35±0,04 <sup>a</sup>	0,12±0,04 <sup>a</sup>	0,17±0,03 <sup>a</sup>	0,29±0,2 <sup>a</sup>	5,22±0,48 <sup>b</sup>
<b>ISTC</b>	16,36±1,50 <sup>c</sup>	0,26±0,02 <sup>c</sup>	0,05±0,02 <sup>b</sup>	0,04±0,01 <sup>c</sup>	0,09±0,06 <sup>c</sup>	3,90±0,93 <sup>c</sup>
<b>Base</b>	10,24±0,86 <sup>d</sup>	0,00	0,02±0,00 <sup>c</sup>	0,08±0,01 <sup>b</sup>	0,12±0,01 <sup>d</sup>	-2,98±0,36 <sup>d</sup>

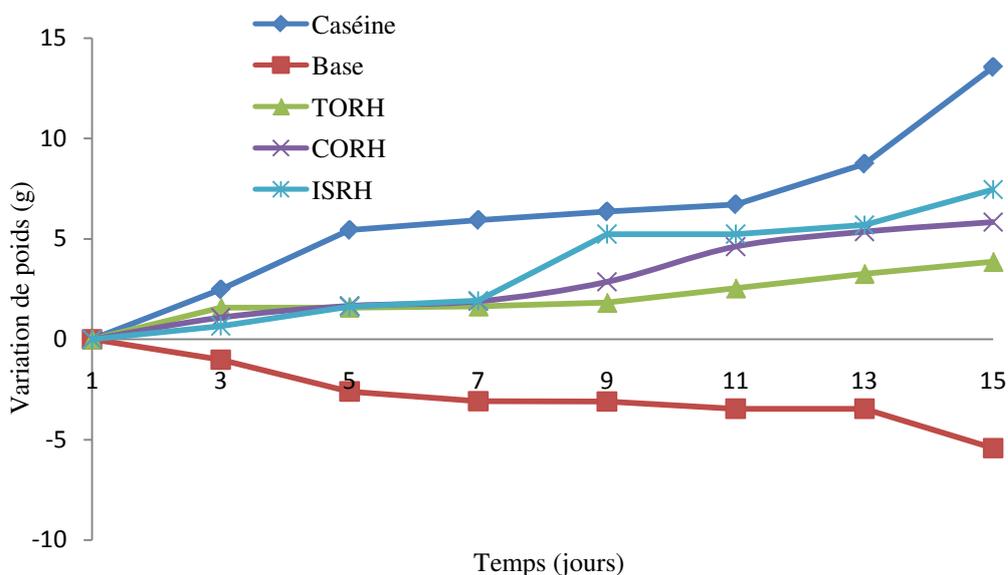
*Les valeurs sur la même colonne et ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes (P < 0,05).*

*Les chiffres en trame de fond représentent pour chaque échantillon la valeur maximale*

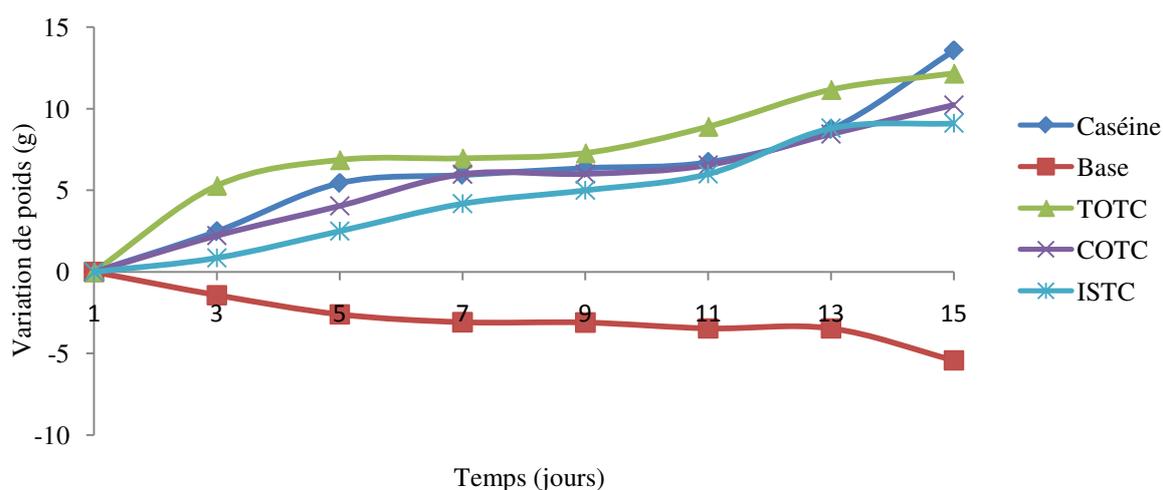
**TORH** : Tourteau de *R. heudelotii* ; **CORH** : Concentrat protéique de *R. heudelotii* ; **ISRH** : isolat protéique de *R. heudelotii* ; **TOTC** : Tourteau de *T. conophorum* ; **COTC** : Concentrat protéique de *T. conophorum* ; **ISTC** : Isolat protéique de *T. conophorum*

### 3.2. Evolution du poids

Le gain de poids en fonction du temps des rats nourris aux aliments TORH, CORH et ISRH est donnée par les courbes de la figure 24 A tandis que celui des régimes TOTC, COTC et ISTC est représenté à la figure 24 B.



**Figure 24 A** : évolution de poids des rats nourris aux échantillons de *R. heudelotii* pendant 15 jours d'expérimentation



**Figure 24 B** : évolution de poids des rats nourris aux échantillons de *T. conophorum* pendant 15 jours d'expérimentation

Il en ressort qu'il y a gain de poids des rats nourris à la caséine et aux aliments tests contre une perte de poids des rats nourris à l'aliment sans source de protéines en fonction du temps. Au bout de 15 jours, la variation de poids est importante avec les régimes de référence et de TOTC (6,06 g / rat / 15 jours), suivies de COTC (5,22 g / rat / 15 jours), de TORH (4,69 g / rat / 15 jours), de ISTC (3,90 g / rat / 15 jours), de CORH (3,33 g / rat / 15 jours), et de ISRH (3,28 g / rat / 15 jours). La prise de poids des rats nourris au TORH pendant 15 jours est inférieure à ceux ingérant l'aliment TOTC, malgré le fait que les protéines des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* ne présentent aucun acide aminé limitant. Cette différence de prise de poids s'expliquerait par la forte excrétion d'azote fécal présentée par les rats soumis au régime TORH. La déficience en lysine et en tryptophane des concentrats et des isolats protéiques préparés explique la faible croissance des rats des groupes CORH, ISRH, COTC et ISTC. En effet, la lysine et la thréonine jouent un rôle essentiel dans le métabolisme des acides aminés (Jonnala et al., 2005). Par ailleurs le tryptophane stimule la libération de l'hormone de croissance (Henry, 1996).

Les rats nourris à l'aliment de base perdent en moyenne 2,98 g / rat / 15 jours car ne reçoivent aucune source de protéines. De tous les aliments tests, celui à base de ISRH entraîne une moindre prise de poids (tableau 20).

Le tableau 2A en annexe donne les valeurs de l'évolution progressive de poids des 8 groupes de rats pendant l'expérimentation.

### **3.3. Indice de consommation**

L'indice de consommation (ICons) est le rapport de la quantité d'aliment ingérée sur le gain de masse de l'animal. Il traduit l'efficacité alimentaire globale et chiffre le rendement de la ration. Le résultat le plus faible traduit une meilleure production.

Il est de l'ordre de 4 avec les régimes TORH, CORH, ISRH, COTC, et ISTC. Dans les groupes référence et TOTC, l'ICons est en moyenne de 3 (tableau 21). Ces résultats indiquent que dans ces groupes, le gain de poids des rats est important par rapport à la quantité d'azote ingérée, ce qui traduit une efficacité protéique. Cependant, l'ICons à lui seul ne peut pas prédire de l'efficacité d'une protéine dans la mesure où la quantité consommée ne correspond pas toujours à celle assimilée. Pour cette raison, on fait appel à d'autres calculs utilisant la quantité de protéines ingérée.

**Tableau 21** : paramètres de digestibilité bruts et corrigés (par l'indice chimique des acides aminés) des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

	<b>Caséine</b>	<b>TORH</b>	<b>CORH</b>	<b>ISRH</b>	<b>TOTC</b>	<b>COTC</b>	<b>ISTC</b>
<b>ICons</b>	3,27±0,61 <sup>b</sup>	4,84±0,86 <sup>a</sup>	4,66±1,14 <sup>c</sup>	4,69±0,42 <sup>a</sup>	3,30±0,69 <sup>b</sup>	4,23±1,05 <sup>a</sup>	4,19±0,71 <sup>a</sup>
<b>CEP</b>	3,75±0,44 <sup>a</sup>	2,02±0,32 <sup>c</sup>	2,26±0,58 <sup>bc</sup>	2,01±0,90 <sup>c</sup>	2,97±0,53 <sup>b</sup>	2,33±0,58 <sup>bc</sup>	2,36±0,39 <sup>bc</sup>
<b>CEPN</b>	5,89±0,50 <sup>a</sup>	0,79±0,08 <sup>e</sup>	3,43±0,47 <sup>d</sup>	4,17±0,77 <sup>bc</sup>	4,47±0,45 <sup>b</sup>	3,70±0,49 <sup>cd</sup>	4,20±0,33 <sup>bc</sup>
<b>Valeurs corrigées de digestibilité par l'indice chimique des acides aminés</b>							
<b>CEPCAAS</b>	4,54	2,18	1,34	0,72	3,21	0,92	2,10
<b>CEPNCAAS</b>	7,13	0,86	1,16	1,50	4,83	1,81	3,74

*Les valeurs sur une même ligne et ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes (P > 0,05)*

**TORH** : Tourteau de *R. heudelotii* ; **CORH** : Concentrat protéique de *R. heudelotii* ; **ISRH** : isolat protéique de *R. heudelotii* ; **TOTC** : Tourteau de *T. conophorum* ; **COTC** : Concentrat protéique de *T. conophorum* ; **ISTC** : Isolat protéique de *T. conophorum*

### 3.4. Coefficient d'efficacité protéique

Le Coefficient d'Efficacité Protéique (CEP) est un paramètre de mesure de la croissance des animaux. C'est le rapport du gain de poids des animaux sur la quantité de protéines ingérées. Le tableau 21 donne les valeurs de CEP des différents aliments tests et de la caséine utilisée comme protéine de référence. Le calcul du pourcentage du CEP de chaque aliment test par rapport à celui de la caséine donne les valeurs suivantes: 54 % (TORH), 60 % (CORH), 53 % (ISRH), 79 % (TOTC), 63 % (COTC) et 62 % (ISTC) ( $P < 0,05$ ). Ces données relatives confirment les résultats du tableau 20 qui laissent apparaître que les rats nourris au régime de référence et au TOTC ont significativement ( $P < 0,05$ ) le même gain de poids durant les 15 jours d'expérimentation.

Le CEP Corrigé par l'Indice Chimique des Acides Aminés (CEPCAAS) (tableau 21) de CORH (0,77), ISRH (0,72), COTC (1,14) et ISTC (2,10) sont inférieures aux valeurs non corrigées à cause de leur déficience en lysine et en tryptophane. Les CEPCAAS de TORH (2,18) et de TOTC (3,21) sont en hausse comme celui de la caséine car leurs protéines ne présentent aucune déficience en acides aminés essentiels. Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus avec le soja (1,60), le blé (0,95) (Friedman, 1996) et le tourteau de colza (0,9) (Rozan et al., 1997).

D'après Friedman (1996), les protéines dont le CEP est inférieur à 1,5 sont de qualité protéique faible, celles ayant un CEP compris entre 1,5 et 2 sont de qualité intermédiaire, et quand il est supérieur à 2, les protéines sont de bonne qualité. En se basant sur ces critères et en tenant compte des valeurs corrigées, les protéines des régimes CORH, ISRH et COTC sont de faible qualité nutritionnelle, tandis que celles de TORH, TOTC et ISTC sont de bonne qualité nutritionnelle comme la caséine. Cependant, une faible valeur de CEP n'indique pas toujours une faible capacité de la protéine à assurer la croissance. Le calcul du CEPN est plus approprié et plus précis (Friedman, 1996).

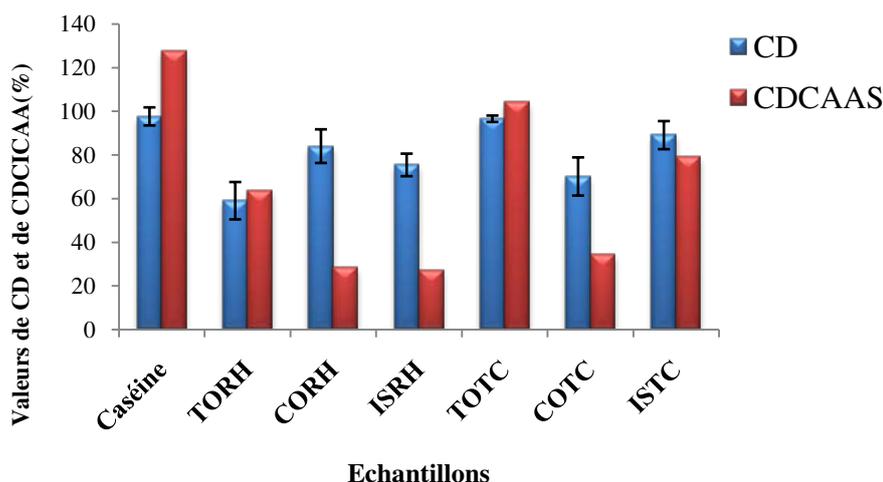
### 3.5. Coefficient d'efficacité protéique net

L'efficacité d'une protéine pour la croissance peut être estimée par le calcul du Coefficient d'Efficacité Protéique Net (CEPN) qui prend en compte la perte de poids du groupe nourri à l'aliment de base (Cheftel *et al.*, 1985). C'est le rapport du gain de poids des animaux ajouté de la perte de poids du groupe sans protéines divisé par la quantité de protéines ingérées par l'animal. Les résultats du tableau 21 montrent qu'en dehors du régime TORH, les valeurs obtenues avec les autres aliments tests représentent plus de 50 % du CEPN du groupe référence ( $P < 0,05$ ). Ces résultats sont comparables à ceux du colza (4,59) et supérieurs à ceux du soja (2,74) (Friedman, 1996).

Le CEPN corrigé par l'Indice Chimique des Acides Aminés (CEPNCAAS) augmente pour TOTC et la caséine, mais baisse pour TORH (tableau 21). Ces résultats confirment ceux obtenus sur les gains de poids des rats.

### 3.6. Coefficient de digestibilité

Le Coefficient de Digestibilité (CD) est le rapport de l'azote absorbé sur l'azote ingéré quand l'azote fécal métabolique est inclus dans les calculs. Il caractérise l'aptitude d'une protéine à être dégradée par les enzymes protéolytiques et à être absorbée à travers la muqueuse intestinale (Adrian *et al.*, 1998). Les coefficients de digestibilité bruts (CD) et corrigés (CDCAAS) des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* comparés à ceux de la caséine sont présentés à la figure 25.



**Figure 25** : CD et CDCAAS des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* comparés à ceux de la caséine

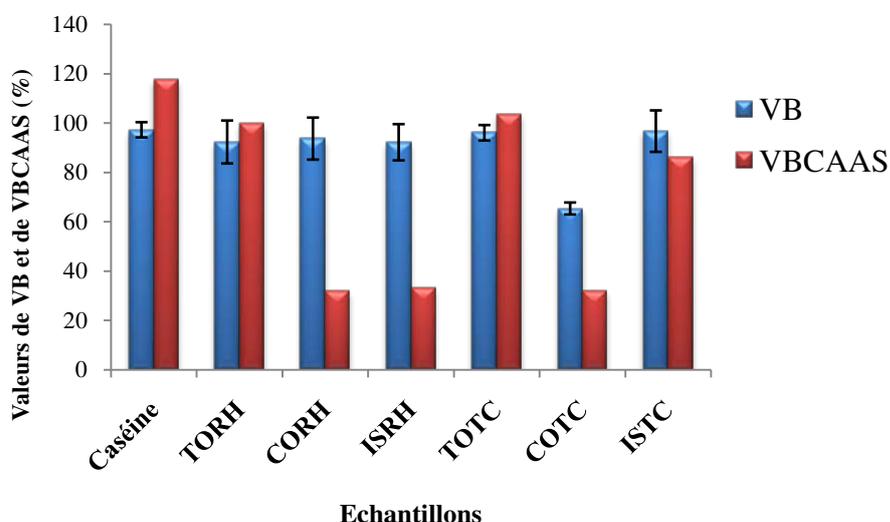
Les rats soumis au régime TORH présentent le plus faible pourcentage d'azote absorbé (59,00 %) suivi de COTC (70,07 %) et de ISRH (75,37 %) par rapport à ceux ingérant l'aliment de référence (97,60 %). Des échantillons analysés, seul TOTC présente un CD (96,51 %) comparable à celui de la caséine (97,60 %). L'absorption intestinale d'azote est faible chez les rats ingérant les aliments à base de TORH d'une part et de COTC d'autre part à cause de leur teneur élevée en fibres brutes qui est de 7,16 et 15,41 % MS respectivement. En effet, Boisen et Eggum (1991) montrent que les fibres alimentaires influencent la digestibilité *in vivo* en réduisant l'activité des enzymes dans le tube digestif. Par ailleurs, les fibres ont une capacité d'hydratation élevée, elles réduisent l'absorption intestinale en augmentant les pertes endogènes (Leterme et *al.*, 1997).

Le faible CD obtenu avec le régime ISRH s'explique par la présence de la lysinoalanine qui pourrait se former au cours des traitements alcalins appliqués au tourteau pour la préparation de cet isolat protéique. En effet, à pH 11, il peut y avoir racémisation des acides aminés et formation des composés toxiques (Friedman et *al.*, 1981). Le calcul du Coefficient de Digestibilité Corrigé par l'Indice chimique des Acides Aminés (CDCAAS) montre par

ailleurs qu'il est très faible (27,13 %) uniquement dans ce cas à cause de la destruction du tryptophane (92 %) et de la lysine (52 %) au cours de cette préparation protéique.

### 3.7. Valeur biologique

La Valeur Biologique (VB) représente le rapport de l'azote retenu sur l'azote absorbé. D'après la figure 26, les VB des groupes recevant TOTC (95,96 %) et ISTC (96,63 %) ne sont pas différentes ( $P < 0,05$ ) de celle du groupe de référence (97,17 %). En dehors du régime COTC (65,25 %) dont la VB est la plus faible, tous les autres aliments tests présentent des valeurs supérieures à celles indiquées par Friedman (1996) sur le soja (73 %). Ces résultats indiquent qu'une fraction considérable (au moins 92 %) de l'azote protéique absorbé des échantillons analysés est retenue par les rats, exception faite de celui à base de COTC, qui pourtant présente une prise alimentaire (22,09 g / rat / 15 jours) proche de celle du groupe de référence (23,06 g / rat / 15 jours). Cette faible VB est liée au fait que l'azote urinaire des rats ingérant COTC (0,17 g / rat / 15 jours) est de loin supérieur à celui des rats nourris à la caséine (0,07 g / rat / 15 jours). Le faible pourcentage d'azote retenu dans ce groupe est dû à sa déficience en lysine et en tryptophane dans la mesure où le manque d'un seul acide aminé limite l'utilisation de la protéine au niveau sanguin (Giami, 2005).



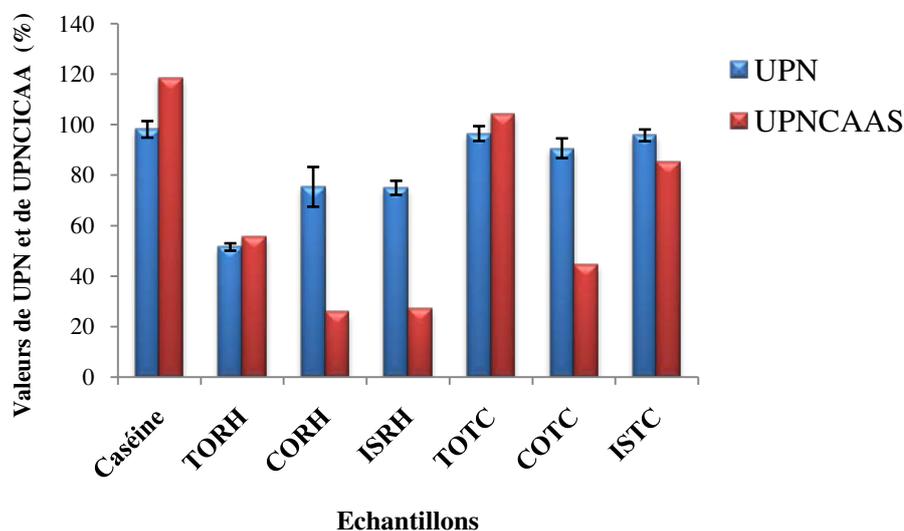
**Figure 26 :** VB et VBCAAS des tourteaux, des concentrats et des isolats

protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* comparés à ceux de la caséine.

La Valeur Biologique Corrigée par l'indice chimique des acides aminés (VBCAAS) est faible avec les aliments CORH, ISRH et COTC (de l'ordre de 30), proche de 100 % (99,61 %) avec l'aliment TORH et supérieur à 100 % avec l'aliment TOTC (103,64 %) et la caséine (117,58 %).

### 3.8. Utilisation protéique nette

L'Utilisation Protéique Nette (UPN) est le rapport azote retenu sur azote ingéré. C'est donc une estimation globale prenant en compte la valeur biologique et le coefficient de digestibilité. Les histogrammes de la figure 27 montrent que l'UPN des échantillons varie de 51,42 % (groupe TORH) à 96,37 % (groupe TOTC), l'aliment de référence présentant une valeur de 98,04 %. Des régimes analysés, seul l'UPN de TORH est inférieur à celui trouvé par Friedman (1996) pour le soja (66 %).



**Figure 27** : UPN et UPNCAAS des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* comparés à ceux de la caséine.

Le calcul du pourcentage d'azote utilisé (azote consommé – azote excrété) par rapport à celui consommé donne les valeurs suivantes : 63,96 % (caséine) ; 32,45 % (TORH) ; 57,05 % (CORH) ; 18,37 % (ISRH) ; 74,80 % (TOTC) ; 57,22 % (COTC) ; 59,92 % (ISTC). Ces résultats révèlent que, seulement 18 % de l'azote consommé de ISRH sont utilisés. L'utilisation des acides aminés dépend de leur absorption en quantité et en qualité. L'excès ou le manque d'un seul acide aminé peut modifier la compétition pour son site d'absorption intestinale (Rozan et *al.*, 1997). En effet, la lysine et le tryptophane sont les acides aminés limitants de ISRH. Une protéine non équilibrée en acides aminés est principalement utilisée comme source d'énergie que pour la croissance des rats (Giami, 2005). Tout ceci explique la faible utilisation des protéines par les rats soumis au régime ISRH et confirme les causes de leur faible gain de poids.

L'Utilisation Protéique Nette Corrigé par l'Indice Chimique des Acides Aminés (UPNCAAS) des aliments tests est faible (inférieure à 45 %) pour CORH, ISRH et COTC, moyenne (50 %) pour TORH, élevée (85 %) pour ISTC et maximale pour TOTC (104,8 %) et la caséine (118,62 %). L'utilisation des protéines dépend principalement de l'équilibre en acides aminés et de la simultanéité de leur apport au niveau sanguin. La déficience en lysine et en tryptophane explique les résultats obtenus avec CORH, ISRH et COTC.

### **3.9. Correlations *in vivo* / *in vitro***

Les calculs des corrélations sont effectués dans le but de déterminer si les paramètres de digestibilité *in vitro* des échantillons analysés peuvent être utilisés pour prédire les résultats de la digestibilité *in vivo*. Le seuil de probabilité des corrélations est fixé à 5 %. Les résultats des corrélations entre le degré d'hydrolyse (DH) et les paramètres de rétention azoté corrigés (CDCAAS, VBCAAS, UPNCAAS) d'une part, l'azote libéré (AL) et ces mêmes paramètres d'autre part sont donnés dans le tableau 22. De toutes ces corrélations, aucune n'est

significative ( $P > 0,05$ ). Cette absence de corrélation se justifie par le fait que la digestibilité *in vitro* des protéines augmente au fur et à mesure quand on passe des tourteaux aux concentrats puis aux isolats protéiques, ce qui n'est pas le cas avec la digestibilité *in vivo* des mêmes échantillons. En effet, les résultats *in vivo* ne se limitent pas seulement à l'azote digéré par les protéases mais prennent en compte la rétention azotée après digestion et l'apport en tous les acides aminés essentiels au niveau sanguin. On comprend ainsi pourquoi les concentrats et les isolats protéiques préparés, bien que riches en protéines dont la digestibilité *in vitro* est supérieure à 90 % après 6 h sont faiblement utilisés et par conséquent induisent une faible croissance des rats. Ainsi donc, pour les deux Euphorbiacées, le degré d'hydrolyse des protéines et l'azote libéré des aliments tests ne peuvent pas être utilisés comme indicateur de la digestibilité *in vivo* de leurs protéines. La prédiction de la qualité des protéines par la digestibilité *in vitro* ne peut être qu'imparfaite.

**Tableau 22:** corrélations entre le Degré d'Hydrolyse (DH), l'Azote Libéré (AL) et le Coefficient de Digestibilité (CD), la Valeur Biologique (VB), l'Utilisation Protéique Nette (UPN)

DH			AL	
	Equations	r	Equations	r
<b>CDCAAS</b>	$CD = 37,34DH - 16,27$	0,45	$CDCAAS = -0,40AL + 114,35$	0,55
<b>VBCAAS</b>	$VB = 26,27DH + 158,51$	0,36	$VBCAAS = -0,40AL + 114,35$	0,55
<b>UPNCAAS</b>	$UPN = 38,87DH - 19,82$	0,36	$UPNCAAS = 0,35AL + 111,78$	0,38

## VII. Conclusion partielle

L'analyse de la composition en acides aminés montre que seules les protéines du tourteau de *R. heudelotii* présentent un équilibre chimique satisfaisant en acides aminés avec un rapport acides aminés essentiels sur acides aminés totaux égal à 33 %. Avec le tourteau et l'isolat protéique de *T. conophorum*, ce rapport se rapproche de cette valeur, soit 32 %.

La digestibilité *in vitro* des protéines des tourteaux est inférieure ( $P < 0,05$ ) à celle des concentrats et des isolats protéiques correspondants. Les valeurs restent supérieures à 90 % pour ce qui est de l'azote libéré après 6 h et comprises entre 4 – 9 % pour ce qui est du degré d'hydrolyse.

Les études *in vivo* réalisées sur les tourteaux, les concentrats et les isolats protéiques des deux Euphorbiacées révèlent que seuls les paramètres de digestibilité *in vivo* du régime à base du tourteau de *T. conophorum* sont comparables à ceux de la caséine. La mesure des paramètres de croissance indique que cet aliment favorise une bonne croissance des rats autant que la caséine, avec des valeurs de CEP (2,97 et 3,75) et de CEPN (4,47 et 5,89) comparables. La rétention azotée des rats ingérant le tourteau de *T. conophorum* est comparable à celle du groupe ingérant la caséine.

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le temps de cuisson des graines de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* correspondant à une meilleure digestibilité *in vitro* des protéines est de 90 et 30 min respectivement à 100°C. Au cours de ce traitement technologique, on note une baisse des teneurs en substances antinutritionnelles (oxalates, tanins, inhibiteurs de trypsine), en cendres totales, en lysine disponible.

La fraction de tourteau de granulométrie 400 – 500 µm est technologiquement la plus intéressante, quelle que soit la plante. Elle est riche en azote protéique, en cendres totales, en sucres totaux et pauvre en composés phénoliques bruts totaux. Les fibres sont concentrées dans la fraction > 500 µm.

L'étude de la solubilité des protéines brutes de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* en fonction du pH et de la force ionique indique deux pHi (pH 4 et pH 8). Les concentrats sont préparés dans de l'eau à pH 4,5 et les isolats protéiques à pH 11 dans du NaOH 0,05 N pour *R. heudelotii* et dans du NaCl 0,6 M pour *T. conophorum* à partir des tourteaux. Le pH 4,5 est le point isoélectrique précis des protéines des deux plantes.

La caractérisation physico-chimique des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques des deux Euphorbiacées permet de relever que les teneurs en protéines augmentent lorsqu'on passe des tourteaux (50 %) aux concentrats (plus de 65 %) et aux isolats (plus de 81 %). Les concentrats protéiques sont riches en fibres brutes. Les isolats protéiques correspondants présentent des valeurs maximales en calcium, magnésium, sodium, potassium. L'électrophorèse des protéines sur SDS – PAGE donne des bandes majoritaires entre 10 et 160 KDa. La mesure des couleurs des échantillons dans le système L\*a\*b\* montrent que le concentrat protéique de *T. conophorum* est le plus luminant tandis que le tourteau de *R. heudelotii* est le plus teinté. L'analyse des propriétés fonctionnelles indique que la préparation des concentrats protéiques améliore les propriétés émulsifiantes et la capacité gélifiante,

tandis que celle des isolats protéiques améliore l'indice de solubilité, les capacités de rétention d'eau, d'huile et moussante.

L'analyse de la composition en acides aminés essentiels indique que les acides aminés des protéines des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* ont des teneurs supérieures à celle de la protéine de référence (FAO / WHO, 2007). Cependant, seuls les acides aminés des protéines du tourteau de *R. heudelotii* présentent un équilibre chimique satisfaisant.

Les résultats de la digestibilité *in vitro* des protéines révèlent que le pourcentage d'azote libéré après 6 h est maximal dans les concentrats et les isolats protéiques des deux Euphorbiacées. Pour les études *in vivo*, le gain de poids est plus important chez des rats nourris à l'aliment de référence et au tourteau de *T. conophorum*. La correction des valeurs de l'azote retenu par l'indice chimique des acides aminés permet de classer les protéines des échantillons analysés en fonction de leur qualité nutritionnelle. Etant donné que les valeurs corrigées de digestibilité du tourteau de *T. conophorum* sont supérieures à 100 %, ses protéines sont de très bonne qualité nutritionnelle. Celles du tourteau de *R. heudelotii* et de l'isolat de *T. conophorum* sont de qualité nutritionnelle intermédiaire avec des valeurs corrigées comprises entre 50 et 70 %, tandis que celles du concentrat et de l'isolat de *R. heudelotii*, du concentrat de *T. conophorum* sont de qualité nutritionnelle moindre avec des valeurs corrigées de digestibilité inférieures à 20 %. L'analyse des corrélations entre le degré d'hydrolyse d'une part, l'azote libéré d'autre part avec les paramètres de rétention azoté, montre que la mesure de ces paramètres ne peut pas être utilisée pour prédire les résultats de la digestibilité *in vivo*.

Pour compléter ce travail, il serait judicieux :

- de préparer également des concentrats et des isolats à pHi alcalin et faire une comparaison avec ceux à pH acides ;
- d'identifier et de séparer les deux familles protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*,

- d'étudier les propriétés fonctionnelles et nutritionnelles des tourteaux obtenus par hydrolyse enzymatique des amandes broyées;
- d'étudier l'influence de ces protéines sur
  - le métabolisme des acides aminés dans différents compartiments corporels,
  - l'homéostasie du glucose et la sensibilité à l'insuline,
  - le fonctionnement cardiovasculaire,
  - les fonctions immunitaires,
- d'étudier l'influence du taux d'incorporation de ces protéines sur l'excrétion azotée,
- de faire des essais d'enrichissement des bouillies et autres denrées infantiles avec les tourteaux
- de faire des essais d'incorporation des isolats protéiques des deux Euphorbiacées en pâtisserie, les boissons et autres systèmes alimentaires.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AACC American Association of Cereal Chemists (1990).** AACC approved methods, 8<sup>ème</sup> éd. St Paul, Minnesota, USA.
- Aboubakar Dandjouma, A.K., Tchiégang, C., Kapseu, C., Linder, M. Parmentier, M. (2008).** Enzyme-assisted hexane extraction of *Ricinodendron heudelotii* (Bail.) Pierre ex Pax seeds oil. *International Journal of Food Science and Technology*, **43**, 1169–1175.
- Adebowale, Y. A., Adeyemi I. A., Oshodi A. A. (2005).** Functional and physicochemical properties of flours of six *Mucuna* species. *African Journal of Biotechnology*, **4** (12), 1461-1468.
- Adeyeye E., Aye P. A. (2005).** Chemical Composition and the Effect of Salts on the Food Properties of *Triticum durum* Wholemeal Flour. *Pakistan Journal of Nutrition*, **4** (3), 187-196.
- Adrian J., Potus J., Annie P. (1998).** *Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires : Méthodes biologiques sur l'animal.* Technique et Documentation-Lavoisier, Paris (France), 254p.
- AFNOR (Association Française de Normalisation) (1981).** Corps gras, graines oléagineuses et produits dérivés. *Recueil des normes françaises.* AFNOR, Paris (France) 2<sup>ème</sup> éd., 438 p.
- AFNOR (Association Française de Normalisation) (1986).** Eaux - Méthodes d'essais. Recueil de norme française. Paris.
- Aisha S. M. F., Elfadil E. B., Abdullahi H., El T. (2004).** Effect of malt pre-treatment and / or cooking on phytate and essentials amino acids contents and *in vitro* protein digestibility of corn flour. *Food Chemistry*, **88**, 261–265.
- Akingbade A. A., Sodeinde F.G., Olaniy C.O., Oyetayo O.S, Fadare O.R., Rabiou A.O.**

- (2009). Proximate and Mineral Composition of Boiled *Carnivalia ensiformis* seeds. *Pakistan Journal of Nutrition*, **8** (8), 1266-1268.
- Alder – Nissen J. (1982)**. Limited enzymic degradation of proteins: A new approach in the industrial application of hydrolysis. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **32**, 138–156.
- Alder – Nissen J. (1986)**. Enzymatic hydrolysis of food proteins. Elsevier Applied Science Publisher. London and New York.
- Al-Dobaib S. N. (2009)**. Effect of diets on growth, digestibility, carcass and meat quality characteristics of four rabbit breeds. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **17** (1), 83-93.
- Alonso R., Grant G., Dewey P., Marzo F. (2000)**. Nutritional Assesment *in vitro* and *in vivo* of raw and Extruded Peas (*Pisum sativum* L.). *J. Agric. Food Chem*, **48**: 2286–2290.
- Amalia Kartika I., Pontalier P. Y., Rigal L. (2006)**. Extraction of sunflower oil by twin screw extruder: Screw configuration and operating condition effects. *Bioresource Technology*, **97** (18), 2302-2310.
- Antoun S., Baracos V. E. (2008)**. Acides aminés, protéines et pathologies néoplasiques : peu de données pour une question essentielle. *Nutrition Clinique et métabolisme*, **22** (4), 168-17.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1975)**. Methods of analysis of the association of Official Analytical Chemists, 10<sup>th</sup> ed. AOAC, Washington, DC.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1990)**. *Official Methods of Analysis*, Association of Official Analytical Chemists. K. Helrich (ed.), Fifteenth edition. Virginia (USA), 963 - 964.
- Audigié C., Dupont G., Zonsain F. (1983)**. Principes des méthodes d'analyse biochimique ; tome 2 ; Doin Editeurs, Paris – France, pp 27-33.

- Bainbridge Z., Tomlins K., Westby A. (1996).** *Methods for assessing quality characteristic of non – grains starch (Part 3. Laboratory methods)*. Natural Resources Institute, Chatham, UK.
- Batal A., Dale N., Cafe M. (2005).** Nutrient composition of peanut meal. *Journal of applied poultry research*, **14** (2), 254-257.
- Belhaj N., Arab – Tehrany E., Linder M. (2010)** Oxidative kinetics of salmon oil in bulk and in nanoemulsion stabilized by marine lecithin. *Process Biochemistry*, **45**, 187–195.
- Bellier R., Gidenne T. (1996).** Consequences of reduced fibres intake on digestion, rate of passage and caecal microbial activity in the young rabbit. *British Journal of Nutrition*, **75**, 353 – 363.
- Bishnoi S., Khetarpaul N. (1994).** Saponin content and trypsin inhibitor of pea cultivars: effect of domestic processing and cooking methods. *Journal of Food Science & Technology*, **31**: 73 – 76.
- Blankership D. C., Alford B. B. (1983).** Cottonseeds, the new staff of life. A monograph of cottonseeds protein research conducted by Scientists at the Texas Woman’s University Press Denton Texas, **76**: 204.
- Blondeau P. (1988).** Chimie organique, manuel de laboratoire. Ed. Addison – Wesley, Montréal (Québec), 336p.
- Boisen S., Eggum B. O. (1991).** Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple - stomach animals. *Nutr. Res. Rev.*, **4**, 141–162.
- Boontaganon P., Jéhanno E., Savage G. P. (2009).** Total, soluble and insoluble oxalate content of bran and bran products. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, **7** (3-4), 204-206.
- Boye J. I., Aksay S., Roufik S., Ribéreau S., Mondor M., Farnworth E., Rajamohamed S. H. (2010).** Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil

protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. *Food research International*, **43**, 537-546

**Branlard G., Bancel E. (2007).** Protein extraction from cereal seeds. *In Plant Proteomics, Methods in molecular Biology*, Eds. Thiellement H., Zivy M., Damerval C. and Méchin V. Human press, p **15-26**, 343p.

**Campos-Mondragón M.G., Calderón De La Barca A. M., Durán-Prado A., Campos-Reyes L. C., Oliart-Ros R. M., Ortega-García J., Medina-Juárez L.A., Angulo O. (2009).** Nutritional composition of new peanut (*Arachis hypogaea L.*) Cultivars. *Grasas y aceites*, **60 (2)**, 161-167.

**Chai W., Liebman M. (2005).** Oxalate content of legumes, nuts, and grain-based flours. *Journal of Food Composition and Analysis*, **18 (7)**, 723-729.

**Chapeland-Leclerc F., Papon N., Noël T., Villard J. (2005).** Moisissures et Risques Alimentaires (Mycotoxicooses). *Revue Française des laboratoires*, **373** : 61 – 66.

**Chavan U. D., Mc Kenzie D. B., Shahidi F. (2001).** Protein classification of beach pea (*Lathyrus maritimus L.*). *Food Chemistry*, **75**, 145–153.

**Christie W. W. (1982).** Lipids analysis, 2<sup>nd</sup> éd. Pergamon Press, Oxford.

**Cicco N., Lanorte T. M., Paraggio M., Viggiano M. & Lattanzio V. (2009).** A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, **91 (1)**, 107–110.

**Clark E., Wiseman J. (2005).** Effects of variability in trypsin inhibitor content of soya bean meals on true and apparent ileal digestibility of amino acids and pancreas size in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology*, **121 (1-2)**, 125-138.

**Clemente A., Vioque J., Sánchez-Vioque R., Pedroche J., Bautista J., Millán, F. (2000).** Factors affecting the *in vitro* protein digestibility of chickpea albumins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **80 (1)**, 79-84.

- Culioli J., 1996.** Les procédés de texturation des matières protéiques végétales: aspects technologiques. In: *Protéines végétales*, 2<sup>ème</sup> éd. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris (France). 666p.
- Dede, S., Deger, Y., Deger, S. (2003).** Serum profile of calcium, phosphore, copper and zinc in healthy and lice infested goats. *Indian Veterinary Journal*, **80** (2), 150–151.
- Deen L. J., Funk M., Guevara C. V., Saloojee H., James Y. Doe Y. J., Palmer A., Weber W. M. ( 2003).** Implementation of WHO guidelines on management of severe malnutrition in hospitals in Africa. *Bulletin of the World Health Organization*, **81**: 237-243.
- De Shreijver R., Vermeulen D. (1991).** Separation and quantification of phospholipids in animal tissues by Iatroscan TLC / FID. *Lipids*, **26** (1): 74 – 76.
- De Vries J. W., Kosk C. M., Egbert D. C., Larson P. A. (1980).** Comparison between a spectrophotometric and high pressure liquid chromatography methods for determining tryptophan in food products. *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 896–898.
- De Vries J. W., Prosky L., Li B., Cho S. (1999).** A historical perspective on defining dietary fiber. *American Association of Cereal Chemists*, **44** (5), 367–368.
- Deshpande S. S., Sath S. K., Cornforth D., Salunkhe O. K. (1982).** Effects of dehulling on functional properties of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *Cereal Chem*, **59**, 396-401.
- Dierickx N., Vervaeke I., Decuypere J., Henderickx H. K. (1985).** Protein digestion in pigs measured *in vivo*. *Berentn. fra Statens Hursdyrbrugforsog*, **580**, 329–332.
- Drèze A. (1956).** Le dosage du tryptophane dans les milieux naturels. *Bull. Soc. Biol.*, **38** (1): 43 – 253.
- Dronne Y. (2001).** Les marchés oléagineux de l'Europe dans le contexte international. *Sunflower Conference*, Toulouse. **8** (3), 211-215.

- Duodu K. G., Taylor J. R. N., Belton P. S., Hamaker B. R. (2003).** Factors affecting sorghum protein digestibility. *Journal of Cereal Science*, **38**, 117 – 131.
- Dupriez H., De Leener , P. (1987).** Jardins et vergers d’Afrique. Edition l’Harmattan, Apica, ENDA, CTA, Terre et Vie. Pp 328-329.
- Eastwood M. A., Morris E. R. (1992).** Physical properties of dietary fiber that influence physiological function: a model for polymers along the gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.*, **55**, 436 – 442.
- Edem D. O., Ekwere E. S., Eka O. U. (1994).** Chemical evaluation of the effects of cooking on the nutritive value of Conophor seeds (*Tetracarpidium conophorum*). *Tropical Science*, **34 (4)**, 377-380.
- Edem, C. A.; Dosunmu, M. I; Bassey F. I. (2009).** Determination of proximate composition, ascorbic acid and heavy metal content of African walnut (*Tetracarpidium conophorum*). *Pakistan Journal of Nutrition*, **8 (3)**, 225-226.
- El-Adawy T.A., Rahma, E.H., El-Bedawey A. A., Gafar, A. F. (2001).** Nutritional potential and functional properties of sweet and bitter lupin seed protein isolates. *Food Chemistry*, **74 (4)**, 455-462.
- Elsheik E. A. E., Fadul I. A., El Tinay A. H. (2000).** Effect of cooking on anti – nutritional factors and *in vitro* protein digestibility (IVPD) of faba bean grown with different nutritional regimes. *Food Chemistry*, **68**, 211–212.
- Enujiugha V. N. (2003).** Chemical and functional characteristics of Conophor Nut. *Pakistan Journal of Nutrition*, **2 (6)**: 335-338.
- Evon Ph., Vandebossche V., Pontalier P. Y., Rigal L. (2009).** Aqueous extraction of residual oil from sunflower press cake using a twin-screw extruder: Feasibility study *Industrial Crops and Products*, **26 (2-3)**, 455–465.

**FAO / WHO (Food and Agriculture Organization and the World Health Organization)**

(1989) Protein quality evaluation. Report of the Joint FAO / WHO Expert Consultation. *Food and Nutrition Paper* N°. 51, Rome (Italy).

**FAO (2006)**. Investir dans l'agriculture pour la sécurité alimentaire. Journée mondiale de l'alimentation / Téléfood, Rome, Italie.

**FAO / WHO (Food and Agriculture Organization and the World Health Organization)**

(2007). Protein and amino acid requirements in human nutrition. Report of a Joint WHO / FAO / UNU Expert. Technical Report Series 935. *Cholé – Doc* N° 111.

**FAO (Food and Agriculture Organization) (2008)**. "Soaring Food Prices: Facts, perspectives, impacts and actions required. Background paper prepared for the High-level conference on World Food Security: The Challenges of Climate Change and Bioenergy, Rome, June 3-5.

**FDA (Food and Drug Administration) (1993)**. Food labelling; general provisions; nutrition labelling; label format; nutrient content claim; health claims; ingredients labelling; state and local requirements and exemptions; final rules. *Food and Drug Admin.*, Fed. Reg., **58 (3)**: 2101–2106.

**Felberg I., Antoniassi R., Deliza R., De Freitas S. C., Modesta R. C. D. (2009)**. Soy and Brazil nut beverage: Processing, composition, sensory, and color evaluation. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, **29 (3)**, 609-617.

**Folch J., Lees M., Stanley GHS (1957)**. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal sources. *J. Biol. Chem*, **226**, 497–509.

**Fondoun J. M., Tiki Manga T., Kengue J. (1998)**. Ethnobotany and importance for forest dwellers in Southern Cameroon. *Actes du 2<sup>ème</sup> Séminaire Safou* du 3 au 5 Décembre 1996 à Ngaoundéré (Kapseu C. et Kayem G. J. eds.) Presses universitaires du Cameroun, Yaoundé. pp 247-259.

- Foster R., Williamson C. S., Lunn J. (2009).** Culinary oils and their health effects. British Nutrition Foundation. *Nutrition Bulletin*, **34**, 4–47
- Friedman M., Finley J. W. (1971).** Methods of tryptophan analysis. *J. Agr. Food. Chem.*, **19** (4), 626–631.
- Friedman M., Zahnley J. C., Master P.M. (1981).** Relationship between *in vitro* digestibility of casein and its content of lysinoalanine and D – amino acids. *J. Food Sci.*, **46**: 127–131.
- Friedman M. (1996).** Nutritional value of proteins from different food sources. A review. *J. Agric. Chem*, **44**, 6–29.
- Gaëtan F. T., Hélène V. P., Carole L. (2000).** Notions de qualité des fourrages. Agriculture et Agroalimentaire, Canada, pp 1 – 16.
- Gessendorfer B., Koehler P., Wieser H. (2009).** Preparation and characterization of enzymatically hydrolyzed prolamins from wheat, rye, and barley as references for the immunochemical quantitation of partially hydrolyzed gluten. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **395** (6), 1721–1728.
- Ghodsvali A., Khodaparast H. M. H., Vosoughi M., Diosady L. L. (2005).** Preparation of canola protein materials using membrane technology and evaluation of meals functional properties. *Food Research International*, **38** (2), 223–231.
- Giami Y. S. (2005).** Compositional and nutritional properties of selected newly developed lines of cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp). *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**, 665–673.
- Gonzalo G., Mateos, María Á. L. , Rosa L. (2002).** Traitement de la graine de soja. *American Soybean Association*, **3** : 1- 48.
- Graf E. (1986).** Phytic acid: Chemistry and applications. Pilatus press (USA), 343 p.

- Grongnet J. F., Youyou A. (2009).** Les composés phénoliques, facteur limitant du grignon d'olive chez les ruminants. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **150 (2)**, 67-73.
- Guillou D., Landeau E. (2000).** Granulométrie et nutrition porcine. *INRA Prod. Anim.*, **13 (2)**, 137 – 145.
- Gueguen J., Azanza J. L (1983).** Propriétés biochimiques et physico – chimiques des protéines végétales. In : *Protéines végétales*, 2<sup>ème</sup> éd. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris (France). 666p.
- Gunstone F.D., Hardwood J. L., Padley F.B. (1986).** The Lipid. Handbook. Chapman and Hall, London.
- Gupta M., Sarkar K., Baral R., Laskar S. (2010).** Some chemical investigations of Amoora rohituka seed proteins. *Food Chemistry*, **119 (3)**, 1057–1062.
- Habiba R. A. (2000).** Changes in antinutrients, protein solubility, digestibility and HCl – extractability of ash and phosphorus in vegetable peas as affected by cooking methods. *Food Chemistry*, **77**, 187–192.
- Heim F., Garrigue E., Husson M. (1919).** Un nouvel oléagineux de Madagascar ‘Betratra’. *Jatropha mahafalensis* jum (Euphor.). *Bulletin Agence Générale des Colonies*, **12**, 679-691.
- Henry Y., Seve B., Mounier A., Ganier P. (1996).** Growth performance and brain neurotransmitters in pigs as affected by tryptophan, protein, and sex. *Journal of Animal Science*, **74 (11)**, 2700–2710.
- Hídvégi M., Lásztity R. (2002).** Phytic acid content of cereals and legumes and interaction with proteins. *Periodica polytechnica ser. chem. eng*, **46 (12)**, 59–64.
- Hurrel R. F., Finot P. A., Cuq J. L. (1982).** Protein polyphenol reactions. In: Nutritional and metabolic consequences of the reaction between oxidized caffeic and the lysine residues of casein. *Br. J. Nutr.*, **47**: 191 – 211.

- Ige M. M., Ogunsua A. O., Oke O. L. (1984).** Functional properties of proteins of some Nigerian oilseeds: Conophor seeds and three varieties of Melon seeds. *J. Agric. Food Chem*, **32**, 822-825.
- Jalili T., Wildamn R. E. C., Medeiros D.M. (2000).** Nutraceutical roles of dietary fiber. *Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods*, **2 (4)**, 19–34.
- Jonnala R.S, Dunford N.T, Chenault K. (2005).** Nutritional composition of genetically modified peanut varieties. *J. Food Sci*, **70**, 254-256.
- Jansen M. C., Bueno de – Mesquita H. B., Buzina R., Fidanza F., Menotti A., Blackburn H., Nissinen A. M., Kok F. J., Kromhout D. (1999).** Dietary fiber and plant foods in relation to colorectal cancer mortality: the seven countries study. *Int. J. Cancer*, **81**, 174–179.
- Jansman A. J. M., Verstegen M. W., Huisman J. (1993).** Effects of dietary inclusion of hulls of faba beans (*Vicia faba* L.) with a low and high content of condensed tanins on digestion and some physiological parameters in piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **43**, 239-257.
- Johannes O., Einar N., Tor A. S., Giorgio V. Umberto L. Harald M. (2003).** Effect on protein digestibility of different processing conditions in the production of fish meal and fish feed. *Journal of the science of food and agriculture*, **83 (8)**, 775-782.
- Kaankuka F., G., Balogun T ; F. & Tegbe T. S. B. (1996).** Effects of duration of cooking of full – fat soya beans on proximate analysis, levels of antinutritional factors and digestibility by weanling pigs. *Animal Feed Science Technology*, **62**, 229–237.
- Kapseu C., Tchiégang C. (1995).** Chemical properties of *Ricinodendron heudelotii* (Bail.) seed of oil. *J. Food Lipids*, **2**, 87-98.

- Kapseu C., Jiokap N. Y., Tchiégang C., Parmentier M. (1998).** Variations de la consommation et de la composition des oléagineux au Cameroun. *Bioscience Proceedings (Cameroun)*, **5**, 349-355.
- Kapseu C. (2009).** Production, analyse et applications des huiles végétales en Afrique. *Oléagineux Corps gras Lipides*, **16 (4)**, 215–229.
- Kaur M., Singh N. (2005).** Studies on functional, thermal and pasting properties of flours from different chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Journal of Food Engineering*, **69**, 511–517.
- Kaur M., Singh N. (2007).** Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, **102 (1)**, 366-374.
- Khantaphant S., Benjakul S. (2010).** Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Chemistry*, **120 (3)**, 658-664.
- Kim J., Kim N. D., Lee S. H., Yoo S. H., Lee S. (2010).** Correlation of fatty acid composition of vegetable oils with rheological behaviour and oil uptake. *Food Chemistry*, **118**, 398–402.
- Kinkela T., Bezar J. (1993).** Lipids in some Congolese foods. *Sciences des Aliments*, **13 (3)**, 567-575.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680 – 685.
- Lebas (2000).** Granulométrie des aliments composés et fonctionnement digestif du lapin. *INRA Prod. Anim*, **13 (2)**: 109–116.
- Leterme P., Florence Rossi, Théwis (1997).** Effet des protéines et des fibres alimentaires sur les pertes iléales d'acides aminés endogènes chez le porc. Journées Rech. Porcine en France, **29**, 243-248.

- Linder M., Fanni J., Parmentier M., Sergent M., Phan-Tan-Luu (1995).** Protein recovery from veal bones by enzymatic hydrolysis. *J. Food Sci*, **60**, 1–5.
- Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M. (2005).** A process for the valorisation of marine by-products in mild conditions. *Marine Biotechnology*, **15**, 70-76.
- Li J. Liu J. Tao S. (2003).** Effects of tannic acid on the food intake and protein digestibility of root voles. *Acta Theriologica Sinica*. **23** (1), 52–57.
- Liu S., Manson J., Lee I. M., Cole S. R., Hennekens C. R., Willet W. C., Buring J. E. (2000).** Fruit and vegetables intake and risk of cardiovascular disease. The women's health study. *American J. Clinical Nutr*, **72**, 922–978.
- Lira R, Arredondo P. (2004).** Oxido nítrico: un héroe disfrazado de villano. *Ciencia y Cultura*, **53**, 11-18.
- Lqari H., Vioque J., Pedroche J., Millàn (2002).** *Lupinus angustifolius*: chemical composition, functional properties and protein characterization. *Food Chemistry*, **76**, 349–356.
- Maga, J. A. (1981).** Mushroom flavour. *J. Agric. Food Chem.*, **29** (1), 1–4.
- Mapongmetsem P. M., Duguma B. et Nkongmeneck B. A. (1998).** Domestication of *Ricinodendron heudelotii* (Bail) in the humid lowlands of Cameroun. *Actes du 2<sup>ème</sup> Séminaire Safou* du 3 au 5 décembre 1996 à Ngaoundéré (Kapseu C. et Kayem G. J. édés.) Presses universitaires du Cameroun, Yaoundé, pp 25-34.
- Marfo K. E., Oke L. E. (1989).** Effect of sodium chloride, calcium chloride and sodium hydroxide on *Denolix regia* protein solubility. *Food chemistry*, **31**, 117–127.
- Marrion O., Fleurence J., Schwertz A., Jean-Louis Guéant J. L., Mamelouk L., Ksouri J., Villaume C. (2005).** Evaluation of protein *in vitro* digestibility of *Palmaria palmata* and *Gracilaria Verrucosa*. *Journal of Applied Phycology*, **17**, 99–102.

- Melcion J. P. (2000).** La granulométrie de l'aliment: Principe, mesure et obtention. *Inra Prod. Anim*, **13** (2): 81- 97.
- Mbofung Carl M. F., Gee Jennifer M., Knight Dorothy J. (1994).** Fatty acid profile of some Cameroonian spices. *J. Sci. Food Agric*, **66**, 213-216.
- Mc Donough FE., Sarwar G., Steinke FH., Slump P., Garcia S., Boisen S. (1990).** *In vitro* assay for protein digestibility and fluctuation in appetite. *J. Appl. Physiol.*, 535 – 538.
- Mohammed A. I., Ponnampurna A. J. P., Hafez Y. S. (1986).** New Chromophore method for phytic acid determination. *Am. Ass. of Cereal Chem.*, **63**, 475-478.
- Montfort M. A. (2005).** Notes et études économiques. Filières oléagineuses, N° 23, pp 55–85.
- Mosso K., Kouadio N., Coulibay S., Kouman K. G. (1998).** Utilisations alimentaires des amandes du *Ricinodendron heudelotii* ('AKPI') en Côte d'Ivoire. *Actes du 2<sup>ème</sup> Séminaire Safou* du 3 au 5 Décembre 1996 à Ngaoundéré (éd. Kapseu C. et Kayem G. J.) Presse universitaire du Cameroun, Yaoundé pp 325-331.
- Moundipa Fewou P., Tchana N. A., Tchiégang C., Chuisseu D. D. P., Sitio N. G. F., Tchounguep M. F. (1998).** Effets de la consommation des huiles végétales sur les lipides sanguins du rat. *Biosciences Proceedings* (Cameroun), **5**, 304-310.
- Moughan J. P., Rutherford M. S. (2008).** Available lysine in foods: A brief historical overview. *Journal of AOAC international*, **91** (4), 901–906.
- Moure A., Sineiro J., Domínguez H., Parajó J. C. (2006).** Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, **38** (9), 945–963.
- Müller O., Krawinkel M. (2005).** Malnutrition and health in developing countries. *Canadian medica Association Journal*, **173** (3), 279-286.
- Musa Özcan M. (2009).** Some nutritional characteristics of Kernel and oil of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Oleo Science*, **59** (1), 1-5.

- Naczk M., Diosady L. L., Rubin L. J. (1985).** Functional properties of canola meals produced by a two phases solvent extraction system. *Journal of Food Science*, **50**, 1685– 1692.
- Nalinanon S., Benjakul S., Kishimura H. (2010).** Biochemical properties of pepsinogen and pepsin from the stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). *Food Chemistry*, **121** (1), 49-55.
- Ngudi D., Kuo Y. H., Lambien F. (2003).** Amino acid profiles and protein quality of cooked cassava leaves or ‘saka – saka’. *J. Sci. Agri.* **83**, 529–534.
- Ng E., C., Dunford, T.N., Chenault K. (2006).** Chemical Characteristics and volatile profile of genetically modified peanut cultivars. *Journal of bioscience and bioengineering*, **106** (4), 350–356.
- Nielsen S. C., Belury M. A., Nickel K. P., Mitchell C. A. (1996).** Plant nutrient composition altered with controlled environments for future space life – support system. *J. Janick* pp: 624–532.
- Noumi E. (1984).** Les plantes à épices, à condiments et à aromates du Cameroun. Thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle. Faculté des Sciences, Université de Yaoundé (Cameroun), 166pp.
- Obi I. U. (1982).** Application of the 2,4,6-Trinitrobenzene- 1 -Sulfonic Acid (TNBS) Method for determination of available lysine in maize seed. *Agric. Biol. Chem*, **46** (1), 15-20.
- Okafor J. C. (2002).** African plum (*Daryodes edulis*) and two other non-conventional oil crops in agroforestry production system in Nigeria. *Actes du 3<sup>ème</sup> Séminaire Safou* du 3 au 5 Octobre 2000 à Yaoundé (Kengue J., Kapseu C. et Kayem G. J édés.) Presses universitaires du Cameroun, Yaoundé pp 166-179.
- OMS (2000).** Turning the side of malnutrition: responding to the challenge of the 21<sup>st</sup> century. Geneva.

- Pedersen B., Eggum BO. (1983).** Prediction of protein digestibility by an *in Vitro* enzymatic pH – stat procedure, *Zeit Tierernähr Futt*, **49**, 265 – 277.
- Perez J. M. (1990).** Prévission de l'énergie disponible des aliments pour le porc : intérêt du dosage des parois végétales par voie enzymatique. *INRA Prod. Anim*, **3**, 171 – 179.
- Perez J. M., Bourdon D. (1992).** Energy and protein value of peas for pigs: synthesis of french results. First European conference on grain legumes, Angers, France pp489–490.
- Pérez-Hidalgo M., Guerra-Hernández E., García-Villanova B. (1997).** Determination of insoluble dietary fiber compounds: cellulose, hemicellulose and lignin in legumes. *Ars Pharmaceutica*, **38 (4)**, 357-364.
- Phillips R. D., Chinnan M. S., Branch A. L., Miller J., Mc Watters K. H. (1988).** Effects of pre-treatment on functional and nutritional properties of cowpea meal. *Journal of Food Science*, **53 (3)**, 805-809.
- Písaříková B., Zralý Z. (2009).** Nutritional value of Lupine in the diets for pigs: A Review). *Acta Vet. Brno*, **78**, 399–409.
- Reeds J. (2000).** Dispensable and Indispensable Amino Acids for Humans. *Am. Soc. Nutri. Sc*, **130**, 18355-18405.
- Rozan P., Lamghari R., Linder M., Christian V., Fanni J., Parmentier M., Méjean L. (1997).** *In vivo* and *in vitro* digestibility of Soybean, Lupine, and Rapeseed meal proteins after various technological processes. *J. Agric. Food Chem*, **45**, 1762–1769.
- Roufik, S. Gauthier S. F., Turgeon S. L. (2006).** *In vitro* digestibility of bioactive peptides derived from bovine  $\beta$  – lactoglobulin. *International Dairy Journal*, **16**, 294–302.
- Rubanza C. D. K., Shem M. N. Otsyina R., Bakengesa S. S., Ichinohe T., Fujihara T. (2005).** Polyphenolics and tannins effect on *in vitro* digestibility of selected acacia species leaves. *Animal Feed Science and Technology*, **119**, 129–142.

- Schmidhuber J. (2003).** Alimentation : Perspectives de changement à long terme dans les habitudes alimentaires. Conséquences, options de politiques nutritionnelles. Global perspectives studies units, FAO, 2p.
- Sefa-Dedeh S., Agyir-Sackey K. E. (2004).** Chemical composition and the effect of processing on oxalate content of cocoyam *Xanthosoma sagittifolium* and Colocasia esculenta cormels. *Food Chemistry*, **85**, 479–487.
- Sell D. R., Reed W. M., Chrisman C. L., Rogler J. C. (1985).** Mucin excretion and morphology of the intestinal tract as influenced by sorghum tanins. *Nutr. Report Intern*, **31**, 1369-1374.
- Siddiq M., Ravi R., Harte J. B., Dolan K. D. (2009).** Physical and functional characteristics of selected dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) flours. *Food Science and Technology*, **43** (2), 232–237.
- Sikorski Z. E. (2001).** Functional properties of proteins in food systems. In Z. E. Sikorski (Ed.), *Chemical and functional properties of food proteins* (pp. 113–136). Lancaster, PA: Technomic Publishing Company, Inc.
- Sosulski F. W., Mc Curdy A. R. (1987).** Functionality of flours, protein fractions and isolates from field peas and faba – bean. *Journal of Food Science*, **52**, 1010–1014.
- Southgate D. A. T. (1978).** The definition, analysis and properties of dietary fibre. *J. Plant Food*, **3**, 9-19.
- Southgate D. A. T. (1990).** The role of dietary fiber in the diet. *J. Royal Soc Health*, **5**: 174–178.
- Spector J. M. (2009).** Protein-calorie malnutrition in developed countries. *New Iraqi Journal of Medecine*, **5** (1), 49–53.
- Srinivas H., Rao Narasinga M. S. (1986).** Functional properties of poppy seed meal. *J. Agric. Food Chem*, **34**, 222-224.

**Statgraphics (1998) (Plus for windows, version 3. Statistical graphic Corp).**

**Sumner A. K., Nielsen M. A., Youngs C. G. (1981).** Production and evaluation of pea protein isolate. *J. Food Sci*, **46**, 364-372.

**Sundram K., Sambanthamurthi R., Yew-Ai Tan A.Y. (2003).** Palm fruit chemistry and nutrition. *Asia Pacific J Clin Nutr*, **12 (3)**, 355-362.

**Tarek, A., El – Adawy, Taha M. K. (2001).** Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chemistry*, **74**, 47–54.

**Tchakam M. (1995).** *Etude in vivo de la qualité nutritionnelle des protéines du tourteau de Njansan (Ricinodendron heudelotii (Bail.)).* Mémoire de Maîtrise en Biochimie, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, (Cameroun), 24 p.

**Tchankou Leudeu B. C., Tchiégang C., Barbé F., Nicolas B., Guéant J-L. (2009).** *Ricinodendron heutelotii (Bail.) or Tetracarpidium conophorum Müll.* oils fed to male rats lower blood lipids. *Nutrition Research*, **29 (7)**, 503-509.

**Tchiégang C., (1996).** Influence of phenolic compounds on the colour of flour in some detoxification treatments of cottonseed kernels. *J. Food Sci. Technol*, **33 (4)**, 348–351.

**Tchiégang C., Kapseu C., Ndjouenkeu R., Ngassoum M. B. (1997).** Amandes de *Ricinodendron heudelotii (Bail)*: Matière première potentielle pour les industries. Agro-alimentaires tropicales. *J. Food Eng*, **32**, 1-10.

**Tchiegang C. Kapseu C. Parmentier M. (1998).** Chemical composition of oil from *Coula edulis (Bail.)* nuts. *Journal of Food Lipids*, **5 (2)**, 103-111

**Tchiégang C., Kapseu C., Parmentier M., (2001).** Chemical composition of oil from *Tetracarpidium conophorum ((Müll. Arg.) Hutch. and Dalz.)* nuts. *J. Food Lipids*, **8**, 95–102.

**Tchiégang C., Mezajoug Kenfack L. B. (2003).** Influence of pH, temperature and ionic strength on some functional properties of defatted flour from *Ricinodendron heudelotii*

- (Bail.) and *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg.). *Journal of Food Technology* (Pakistan), **1** (3), 133–138.
- Tchiégang C., Mezajoug Kenfack L. B., Tenin D., Ndjouenkeu R. (2006).** Physicochemical and functional properties of defatted cakes from two Euphorbiaceae from Cameroon: *Ricinodendron heudelotii* (Bail) and *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg.). *Journal of Food Technology*, **4** (2), 96–100.
- Tchiegang C., Parmentier M. (2008).** Chemical composition and nutritional evaluation of two cameroonian soup thickeners: *Belschmiedia jacques felexii* and *Belschmiedia anacardiodes*. *Journal of Food Science and Technology*, **45** (2), 187-189.
- Tiki Manga T., Fondoun J. M., Tchiégang C. (2000).** Chemical composition of *Ricinodendron heudelotii*: An indigenous fruit tree in southern Cameroon. *African Crop Science Journal*, **8**, 195–201.
- Tood Deal, S., Farmer E. F., Cerpovicz (2002).** Carbohydrate analysis: can we control the ripening of bananas? *Journal of chemical education*, **79** (4), 479–480.
- Trowell H. (1976).** Definition of dietary fiber and hypothesis that it is a protective factor incertain diseases. *Am. J. Clin. Nutr.*, **29**, 417 – 427.
- Trugo L. C., Monangelo C. M., Trugo N. M., Backnudsen K. E. (2000).** Effect of heat treatment on nutritional quality of germinated legume seeds. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, **48**, 2082–2086.
- UICPA (Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée) (1978).** Méthode d'analyse des matières grasses. 6<sup>ème</sup> éd. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris (France), 190p.
- Udensi E. A., Ekwu F., C., Isinguzo J. N. (2007).** Antinutrient factors of vegetable cowpea(*Sesquipedalis*) seeds during thermal processing, *Pakistan Journal of Nutrition*, **6** (2), 194-197.

- Ullrich H. I., Hsiao- Ya L., Linda Vona., B.S., Reid L. R., Albrink J. M. (1981).** Alterations of fecal steroid composition induced by changes in dietary fiber consumption. *Am. J. Clin. Nutr.* **34**, 2054-2060.
- Urbano G., López – Jurado M., Frejnagel S., Gómez - Villalva E., Porres M.J., Frías J., Vidal – Valverde C., Aranda P. (2005).** Nutritional assesment of raw and germinated pea (*Pisum sativaum* L.) protein and carbohydrate *in vitro* and *in vivo* techniques. *Nutrition*, **21**, 230–239.
- Vivien J., Faure J. J. (1996).** Fruitiers sauvages d’Afrique. Espèces du Cameroun. Coopération française, CTA 416 p.
- Vollman J., Fritz N. C., Wagentristi H., Ruckenbauer P. (2000).** Environmental and genetic variation of soybean seed protein content under Central European growing conditions. *Journal of the science of food and agriculture*, **80** (9), 1300–1306.
- WHO (World Health Organization) (2008).** World Health Statistics, Child Growth and Nutrition Data Base, accessed online at [www.who.int](http://www.who.int).
- Wolff J. P. (1968).** Manuel d’analyse des corps gras; Azoulay éd., Paris (France), 519 p.
- Wong P. Y. Y., Kitts D. D. (2003).** A comparison of the buttermilk solids functional properties to non fat dried milk, soy protein isolate, dried egg white and egg yolk powders. *Journal of Dairy Science*, **86** (3), 746–754.
- Zaidi F., Hassissene N., Allouache H., Kichou M., Ourdani S. Rezki K., Bellal M. M., Li J. Liu J. Tao S. (2003).** Effects of tannic acid on the food intake and protein digestibility of root voles. *Acta Theriologica Sinica*. **23** (1), 52–57.
- Zhu J.Q., Fowler V.R., Fuller M.F. (1990).** Digestion of unmolassed sugar-beet pulp in young growing pigs and implications for the growth-supporting values of fermented energy. *Anim.Prod.* **50**, 531-539.

## ANNEXES

### ANNEXE 1: Extraction et dosage des oxalates solubles et des oxalates totaux

#### Extraction des oxalates solubles

Dans une fiole de 250ml contenant 200ml d'eau distillée est introduit 2g d'échantillon délipidé. Le mélange est chauffé pendant 1h dans un bain – marie bouillant, refroidi, complété au trait de jauge et filtré (filtrat 1). Deux échantillons de 50ml de filtrat sont prélevés dans deux béchers où on ajoute 20ml de HCl 6N. Le mélange est évaporé sur une plaque chauffante environ la moitié de son volume et filtré (filtrat 2). Le précipité resté sur le papier filtre est lavé plusieurs fois à l'eau distillée bouillante et gardé. Au filtrat 2 (environ 125ml), sont additionnées 3 à 4 gouttes de rouge de méthyle 0,1% (préparé dans l'éthanol 60%) suivi de l'ammoniac concentré jusqu'au virage de la solution au jaune. Ce mélange est chauffé entre 90 et 100°C, refroidi et filtré (filtrat 3) pour éliminer les précipités contenant les ions ferreux. Le filtrat 3 est porté à ébullition et 10ml de chlorure de calcium 5% (p/v) sont ajoutés au mélange sous agitation. Puis l'ensemble est laissé au repos pendant 24 h pour permettre la formation des cristaux d'oxalates. Le lendemain, on observe la présence des cristaux dans les solutions qui sont filtrés ainsi que l'eau de rinçage du bécher (filtrat 4). Le précipité retenu par le papier filtre et constitué de cristaux d'oxalates est lavé plusieurs fois à l'eau distillée. Tous les papiers filtres utilisés lors des filtrations 2, 3 et 4 sont conservés dans un bécher pour le dosage de l'acide oxalique.

### Extraction des oxalates totaux

Dans une fiole de 250ml contenant 200 ml d'eau distillée et 10ml de HCl (6N), sont introduits 2g d'échantillon délipidé. Le mélange est chauffé pendant 1h dans un bain – marie bouillant, refroidi, complété au trait de jauge et filtré (filtrat 1). La suite de l'extraction suit la même procédure que celle des oxalates solubles.

### Dosage des oxalates solubles et des oxalates totaux

Les papiers filtres utilisés dès la 2<sup>ème</sup> filtration sont introduits dans les béchers. L'acide sulfurique (1:4 v / v) y est ajouté progressivement jusqu'à dissolution complète du précipité. Le contenu du bécher est amené à la limite de l'ébullition (70 – 80°C) et titré sous agitation avec le permanganate de potassium (0,09N) jusqu'au virage au rose stable pendant environ 30sec.

En présence de l'acide sulfurique et à chaud, l'acide oxalique est oxydé par le permanganate de potassium suivant la réaction :



L'oxydation de l'acide oxalique est marquée par le virage de l'incolore au rose persistant pendant quelques secondes marquant la fin de la réaction.

L'équation bilan ci – dessus correspond à l'équation de dosage de l'acide oxalique en présence du  $\text{KMnO}_4$ . D'après cette équation, 2 moles de  $\text{KMnO}_4$  réagissent avec 5 moles de  $\text{C}_2\text{O}_4^{--}$ .

Le nombre d'équivalent gramme de permanganate ayant réagi est  $E_{\text{éqg}} = N \times V \times 10^3$ ;  
N le titre de chute du permanganate (0,05N), V le volume de chute du  $\text{KMnO}_4$ .

Le nombre de mole correspondant à  $0,05E_{\text{éqg}}$  de  $\text{KMnO}_4$  est  $M = E_{\text{éqg}} / n$  ;  $n$  est le nombre d'électron échangé (5). Le nombre de moles d'acide oxalique correspondant au nombre de moles de  $\text{KMnO}_4$  ayant réagi est :  $N_{\text{Ox}} = M \times (5 / 2) = M \times 2,5$ . La masse d'oxalate dans 50ml de préparation est  $M_{\text{Ox}} = P_{\text{MOx}} \times N_{\text{Ox}}$  ;  $P_{\text{MOx}}$  est le poids molaire moléculaire de l'acide oxalique (126g / mole). La masse d'oxalate pour 250ml de préparation (2g de prise d'essai) est  $M'_{\text{Ox}} = (250 \times M_{\text{Ox}}) / 50 = 5M_{\text{Ox}}$ . La teneur en oxalate (Q) des échantillons par rapport à 100g de MS est donc calculée par la formule suivante :

$Q = [(M'_{\text{Ox}} * 100) / m] * [\text{MS}/100]$  ;  $m$  est la prise d'essai de départ.

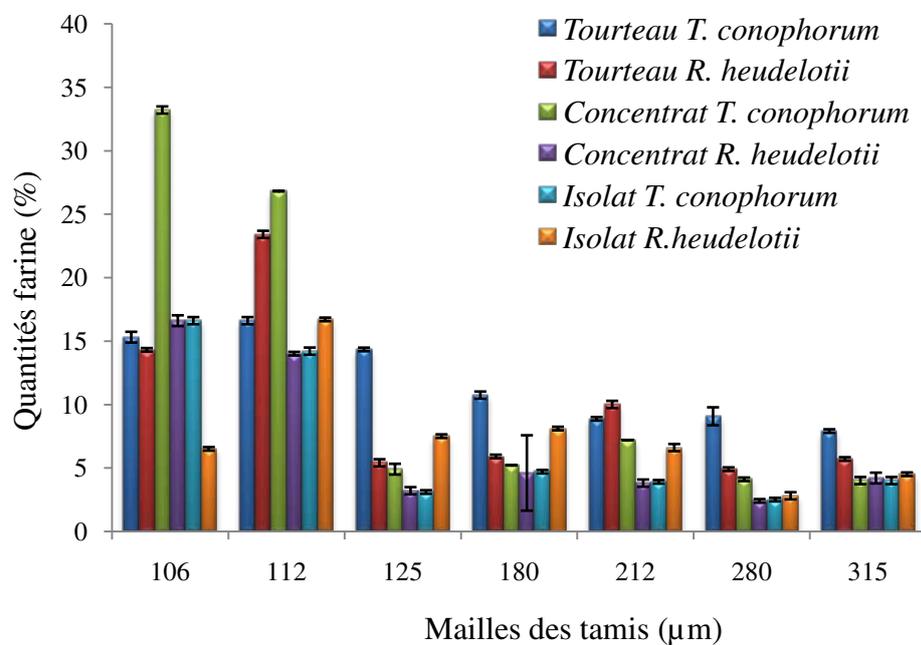
**ANNEXE 2 : Résultats bruts de la digestibilité *in vitro* des protéines brutes en présence de la pepsine et de la pancréatine**

**Tableau 1A :** digestibilité *in vitro* (% MS) des protéines brutes des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*

<b>Temps de cuisson</b>	<b><i>R. heudelotii</i></b>	<b><i>T. conophorum</i></b>
0	65,21±0,96 <sup>b</sup>	68,27±0,14 <sup>b</sup>
30	73,71±0,10 <sup>b</sup>	76,80±0,41 <sup>a</sup>
60	75,50±0,09 <sup>b</sup>	77,70±0,02 <sup>a</sup>
90	79,54±0,14 <sup>a</sup>	78,04±0,03 <sup>a</sup>
120	79,36±0,05 <sup>a</sup>	78,71±0,11 <sup>a</sup>

*les valeurs sur la même colonne ayant la même lettre en exposant ne sont pas significativement différentes (P > 0,05)*

**ANNEXE 3:** Répartitions granulométriques des tourteaux, des concentrats et des isolats protéiques de *R. heudelotii* et de *T. conophorum*



**Figure 1 :** répartitions granulométriques des tourteaux, des concentrats et d'isolats protéiques de *R. heudelotii* et *T. conophorum*

**ANNEXE 4 : Evolution de poids des rats durant l'expérimentation**

**Tableau 2A:** poids en gramme des rats pendant l'expérimentation

<b>Jours</b>	<b>Référence</b>	<b>TORH</b>	<b>CORH</b>	<b>ISRH</b>	<b>TOTC</b>	<b>COTC</b>	<b>ISTC</b>	<b>Base</b>
<b>1<sup>er</sup></b>	63,48±6,80	68,12±5,68	60,6±2,78	73,1±3,90	67,56±6,50	65,66±3,03	51,92±7,04	71,14±6,09
<b>3<sup>eme</sup></b>	65,96±7,81	69,7±5,78	61,68±2,06	73,76±3,78	72,84±5,26	67,88±3,10	52,78±7,08	69,72±6,58
<b>5<sup>eme</sup></b>	71,40±8,00	69,7±7,98	63,34±2,90	74,72±3,82	74,42±7,77	69,7±4,40	54,42±8,09	67,12±6,63
<b>7<sup>eme</sup></b>	77,34±7,63	69,76±7,98	65,23±2,90	75,02±3,82	74,52±8,73	71,64±4,43	56,1±8,09	64,04±5,72
<b>9<sup>eme</sup></b>	83,70±7,41	69,94±8,45	68,09±5,52	78,34±6,40	74,84±9,21	72,2±7,49	56,92±8,77	60,94±5,80
<b>11<sup>eme</sup></b>	90,42±5,10	70,66±7,88	72,71±6,83	78,34±4,68	76,46±9,17	71,66±8,94	57,92±7,93	57,48±5,95
<b>13<sup>eme</sup></b>	99,16±5,27	71,38±9,54	78,07±9,09	78,8±5,59	78,72±5,96	74,1±11,41	60,72±8,78	54,02±6,73
<b>15<sup>eme</sup></b>	112,72±7,93	71,98±9,72	83,91±9,40	80,56±8,61	79,72±6,70	75,88±13,31	61,02±10,12	48,60±6,30

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Paul MOUNDIPA FEWOU, Maître de Conférences, Université de Yaoundé, Cameroun**

**Monsieur Pierre-Yves PONTALIER, Maître de Conférences, ENSIACET, Toulouse**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Madame MEZAJOUG KENFACK Laurette Blandine**

NANCY BRABOIS  
2, AVENUE DE LA  
FORET-DE-HAYE  
BOITE POSTALE 3  
F - 5 4 5 0 1  
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

« Propriétés nutritionnelles et fonctionnelles des protéines de tourteaux, de concentrats  
et d'isolats de *Ricinodendron heudelotii* (Bail.). Pierre Ex Pax et *Tetracarpidium*  
*conophorum* (Müll. Arg. Hutch. and Dalz)

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »

Fait à Vandoeuvre, le 29 mars 2011

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



**PROPRIETES NUTRITIONNELLES ET FONCTIONNELLES DES PROTEINES DE  
TOURTEAUX, DE CONCENTRATS ET D'ISOLATS DE *Ricinodendron heudelotii*  
(Bail.) Pierre ex Pax ET DE *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg)**

**RESUME**

Cette étude a été menée dans le but d'explorer les nouvelles sources de protéines à valeur nutraceutique. Les graines de *Ricinodendron heudelotii* (Bail. Pierre ex Pax) et de *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg) ont d'abord été cuites dans de l'eau bouillante pendant 90 et 30 min qui sont respectivement leurs temps optimums de cuisson. Après délipidation et tamisage des tourteaux, la fraction 400 - 500 µm s'est révélée la plus représentative avec plus de 70 % et riche en azote protéique (6-7% MS). Les concentrats et les isolats protéiques ont été préparés à partir des tourteaux respectivement dans l'eau distillée à pH 4,5 et dans une solution de NaOH à 0,2 % (*R. heudelotii*), une solution de NaCl 0,6 M (*T. conophorum*) à pH 11. Ces concentrats (65 - 75 % MS de protéines) et ces isolats protéiques (81 - 92 % MS de protéines) ont une composition physico-chimique différente ( $P < 0,05$ ) de celle des tourteaux. Pour les deux Euphorbiacées, les capacités de rétention d'eau (367 - 467 g / 100 g d'échantillon), de rétention d'huile (256 - 410 g / 100 g d'échantillon) et moussante (68 - 71 %) sont maximales dans les isolats protéiques tandis que les capacités gélifiante (6 - 14 %) et émulsifiante (63 - 87 %) le sont dans les concentrats protéiques. Les teneurs en acides aminés essentiels des tourteaux de *R. heudelotii* et de *T. conophorum* sont comparables à celle de la protéine de référence. L'étude de la digestibilité enzymatique *in vitro* a montré que l'azote libéré après 6 h est supérieur à 90 % dans les concentrats et les isolats protéiques. La digestibilité protéique *in vivo* indique que le gain de poids des rats mâles âgés de  $21 \pm 3$  jours durant 15 jours d'expérimentation ainsi que les paramètres de rétention azotée sont plus importants avec les régimes à base de l'aliment de référence (caséine) et du tourteau de *T. conophorum*. Les valeurs corrigées des paramètres de digestibilité par l'indice chimique des acides aminés laissent apparaître que le tourteau de *T. conophorum* renferme les protéines de très bonne qualité nutritionnelle, autant que la caséine.

Mots clés : *R. heudelotii*, *T. conophorum*, tourteaux, concentrats protéiques, isolats protéiques, compositions en acides aminés, digestibilité *in vitro*, digestibilité *in vivo*.

**NUTRITIONAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEINS FROM  
DEFATTED FLOURS, CONCENTRATES AND ISOLATES OF *Ricinodendron  
heudelotii* (Bail.) Pierre ex Pax AND *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg)**

**ABSTRACT**

This study was conducted in order to look for alternative sources of proteins having nutraceutical value. The grains of *Ricinodendron heudelotii* (Bail.) and *Tetracarpidium conophorum* (Müll. Arg) were first cooked in boiled water at their optimal cooking time for 90 and 30 min respectively. After defating, sieving of the defatted cakes showed that samples with a granulometry of 400 - 500 µm were most representative (more than 70%), containing more proteic nitrogen (6–7 %). Protein concentrates and protein isolates were prepared from defatted cakes respectively in distilled water at pH 4.5 and in NaOH 0.2% (*R. heudelotii*) and NaCl 0.6M (*T. conophorum*) at pH 11. Physico-chemical properties of protein concentrates (65 – 75 % of proteins) and protein isolates (81–92 % of proteins) were different from those of the defatted cakes. Water holding (367 – 467 g / 100 g of sample), oil holding (256 – 410 g / 100 g of sample) and foaming capacities (68 – 71 %) were highest with protein isolates whereas gelling (6 – 14 %) and emulsion capacities (63 – 87 %) were highest with concentrates. The amounts of essential amino acids in both defatted flours were comparable to the value in FAO / WHO (2007) scoring pattern. Nitrogen liberated after 6 h of enzymatic digestibility was more than 90 % both in the proteins concentrates and isolates. *In vivo* studies carried out on 21 ± 3 days old Sprague Dawley male rats for 15 days showed that gain of weight and nitrogen retention parameters were higher for rats that consumed casein and *T. conophorum* defatted cake. Corrected values of nitrogen digestibility of the analysed samples showed that *T. conophorum* defatted cake contains protein source with good nutritional quality.

Keywords: *R. heudelotii*, *T. conophorum*, defatted cake, protein concentrates, protein isolates, amino acids compositions, *in vitro* digestibility, *in vivo* digestibility.