

UNIVERSITE DE LILLE 1

Sciences et Technologies

Institut Charles VIOLLETTE

Laboratoire des **Procédés**

**Biologiques, Génie Enzymatique
et Microbien**

UNIVERSITE DE BANGUI

Faculté des Sciences

Laboratoire des **Sciences**

Biologiques et Agronomiques

pour le **Développement**

Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Thèse en Cotutelle présentée pour l'obtention du

DOCTORAT ES SCIENCES

Ingénierie des Fonctions Biologiques de l'Université de Lille 1

Sciences Alimentaires et Nutrition de l'Université de Bangui

***OPTIMISATION D'UNE BOUILLIE INFANTILE ET SON ENRICHISSEMENT EN
PROTEINES ET VITAMINES EN VUE DE SON UTILISATION COMME ALIMENT
DE COMPLEMENT CHEZ LE NOURRISSON ET LE JEUNE ENFANT EN
CENTRAFRIQUE***

Par

Jean – Christian Amédée MANDJEKA

Soutenue le 18 Avril 2016 à l'Université de Lille 1

Devant le Jury composé de

Pr. Pascal **DHULSTER**, ICV/ProBioGEM, Université de Lille1

Pr. Pascal **DEGRAEVE**, BioDyMIA, Université Claude Bernard, Lyon1

MCF, HDR Romain **KAPEL**, LRGP, Université de Lorraine

Pr. Fabienne **PETIT**, Laboratoire M2C, Université de Rouen

MCF, Luc **CHOISNARD**, DPM, Université Joseph Fourier, Grenoble

MCF, HDR, Muriel **BIGAN** ICV/ProBioGEM, Université de Lille1

MCF, HDR, Semballa **SILLA**, LaSBAD, Université de Bangui

Pr. Joseph **MABINGUI**, Laboratoire Lavoisier, Université de Bangui

Pr. Naïma **NEDJAR ARROUME**, ICV/ProBioGEM, Université de Lille1

Pr. Didier **NIEWIADOWSKI**, Afrilex, Université Montesquieu – Bordeaux IV

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur

Co-directeur

Membre invité

Membre invité

Membre invité

*Aux nourrissons et jeunes enfants de
Centrafrique...*

A

Albert & Martine,

Harold, Aurore et Leslie – Petula.

REMERCIEMENTS

A l'issue de ce travail, je voudrai exprimer ma profonde gratitude à l'égard du Pr. Muriel **BIGAN**, Directrice des études de Licence de Chimie et Responsable du Master MOPI. C'est en effet grâce à sa perspicacité scientifique que ce projet doctoral, discuté à Bangui en République centrafricaine (R.C.A) au cours d'une de ses missions d'enseignement sur les Plans d'Expériences, a été validé. Sa volonté inébranlable de mettre en œuvre ce projet a permis d'une part, un accord de financement du Ministère français des affaires étrangères par le biais de la coopération avec l'Université de Bangui et, d'autre part la signature d'une convention de cotutelle avec l'Université de Lille1/Sciences et Technologies. Je témoigne ici de son abnégation, sa sollicitude et sa rigueur qui ont énormément contribué et m'ont aidé à l'aboutissement de cette thèse de Doctorat. Merci.

Au Pr. Semballa **SILLA**, qui, dès mon admission à l'Université de Bangui comme étudiant, puis mon recrutement comme Assistant, a guidé mon choix et a toujours été présent dans les moments de perplexité sur le chemin de la recherche, je lui témoigne mon profond respect.

Au Professeur émérite Michel **WARTEL**, j'ai été touché par votre bienveillance, votre sincérité, votre amabilité, votre marque de confiance envers ma modeste personne, soyez sûr de ma profonde reconnaissance. Que votre ami, collègue et confident Monsieur le Professeur émérite Joseph **MABINGUI** reçoive ici mes remerciements pour ses conseils.

Aux personnalités du Service de Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France en RCA, notamment Jean – Philippe **DESCHAMPS**, Jean – Claude **RICHARD**, Nadja **ISAAC** et Bruno **WILS**, vous qui, en tant qu'administrateurs, aviez su répondre à mes attentes et autres préoccupations sur les prolongements de séjour, recevez mes remerciements chaleureux pour vos contributions multiformes à l'aboutissement de ce projet doctoral.

Laboratoire d'accueil, équipe ProBioGEM

Aux Professeurs Pascal **DHULSTER** et Philippe **JACQUES**, vous qui aviez toujours été présents au cours des différents entretiens de validation des dossiers académiques d'inscription en thèse de Doctorat, je vous adresse mes remerciements pour vos conseils et encouragements.

Au Professeur Naïma **NEDJAR ARROUME**, merci pour votre grandeur scientifique qui m'a éclairé à propos des protéines et leurs propriétés biologiques. Votre présence dans ce jury m'honore particulièrement car j'ai eu beaucoup de joie à apprendre auprès de vous. Recevez toute l'expression de ma profonde et sincère reconnaissance.

Aux Professeurs Fabienne **PETIT**, Pascal **DEGRAEVE**, Didier **NIEWIADOWSKI**, Luc **CHOISNARD** et Romain **KAPEL**, vous aviez accepté de faire partie de ce jury. Je tiens à vous témoigner ma reconnaissance anticipée. Soyez rassurés que vos observations, remarques et suggestions seront tenues en compte et traitées au mieux comme contribution à cette œuvre.

Que les membres de l'équipe ProBioGEM, auprès de qui j'ai eu l'amabilité de travailler ou de demander conseils, reçoivent ici mes remerciements. Je pense notamment à Monsieur le Professeur Djamel **DRIDER** (Tongana nyè? « Comment ça va? »), Dr Gabrielle **CHATAIGNE**, Dr Guillaume **LEFLEM** qui m'a efficacement transmis ses compétences sur les techniques électrophorétiques, Dr Krasimir **DIMITROV**, Messieurs Laurent **BONNEAU** (de la plateforme technologique de Polytech'Lille) ; Bertrand **FERTIN** (au Hall technologique de l'IUT « A »), Marc **MARTEL** (à l'A.T.E.M), Corinne **BOISTEL** et Cathy **OUBLION**.

A Sylvie **DUQUESNOY**, de l'administration pédagogique des études de Chimie (C1), je souhaite exprimer mes sincères remerciements pour sa participation discrète mais très efficace à cette œuvre. Merci beaucoup.

Aux anciens doctorants et ceux avec qui nous avons fait un bout de chemin ensemble, recevez mes remerciements pour le soutien que vous m'avez accordé tout au long de mes séjours d'alternance à ProBioGEM : *Omar, Cédric, Thibaut, Amirouche, Adil, Sonia, Kalim, Rémi, Juliette, Sabrina, Alaa, Ahmed, Qassim et Oumayma.*

Mes stagiaires : *Pierre, Yann, Sébastien, Mathieu, Hildegarde, Li, Clément, Raphaël*, ainsi que toutes celles et ceux qui ont travaillé sur le projet, j'exprime ici ma reconnaissance pour y avoir cru.

Laboratoire d'origine/Université de Bangui

Je tiens à remercier mes collègues du **LaSBAD** : *Jean – Alain, Solange – Patricia, Mariette, Lucie, Firmin – Patrice BOULALA, Jean – Michel, Innocent, Ephrem, Christian K., Didier – Ponel, Simplicie, Dimitri – Régis, Christian B., Marielle, Adonise et Maryse...*ceux du **Laboratoire d'Hydrosciences Lavoisier** : *Saint – Charles et Jérémie¹*, Marie – Céline, Olga – Blanche, Nicole, Belvia, Oscar, Bob, Eric, Serge – Bruno, ...ceux du **Laboratoire d'Energétique Carnot** : Jean, Thierry, *Salomon²MALENGUINZA* et Patrick...et enfin ceux du **Laboratoire Géosciences** : *Rodrigue – Faradey³*, Rock – Gaëtan, David, Hubert – D'Assise, Belmont et Raoul.

¹Paix leurs âmes, ils ont partagé des moments conviviaux avec moi durant les soirées hivernales à Villeneuve d'Ascq.

² Mon célèbre cousin le « roi » Ngaka mandja.

³ Inoubliable Rod...reposes en paix !

A ma grande famille et aux familles alliées, je vous ai manqué dans les moments de fête mais aussi de deuil, merci de m'avoir accordé votre confiance et merci pour vos encouragements constants.

MANDJEKA, IME, BADIGO, TAGBIA, GUIMET – AKOSSI, OUASSERE, METE – YAPENDE, MBINDAYEN, KEBOT, SOKAMBY, AZIAGBIA – YAPENDA, BASSALA, ZACKO.

Mes sœurs et frères

Guy – Roger, Sophie – Loela, Aline – Natacha, Max – Albert, Charly – Bertin, Marina – Viviane, Elodie – Christiane, Sandrine – Immaculée, Michelle – Nina, Sidoine et Prunel – Dieu béni sans oublier Steve – Hubert, Gilles, Bienvenu, Thierry et Sonia.

A toute la communauté centrafricaine des Hauts de France, merci pour votre présence à mes côtés durant ces années d'études...*Thierry – Innocent MAGBONDO, Hortense et Claude, Yangou NINGATA, Roméo – Junior GRIBINGUI et Koumami BENGUEMALET, Maman Cathy, Jean – Bienvenu KOUMAKOMBO, Elysé KAZEOMOOBI et Anicet DAMEYO.*

A celles et ceux que je n'ai pas cité, vous êtes dans mes pensées et sachez que cette œuvre n'est que le reflet de votre confiance en moi placée, soyez sûrs de ma reconnaissance. Merci.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	ii
ACRONYMES.....	viii
INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE 1 : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES.....	6
CHAPITRE 2 : RECHERCHE DE FORMULATION D'UNE BOUILLIE INFANTILE A PARTIR DE LA METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES ET APPRÊTEMENT DES INGREDIENTS.....	14
2.1 INTRODUCTION	14
2.2 LA MÉTHODE DES PLANS D'EXPERIENCES	15
2.2.1 LA MATRICE D'HADAMARD	17
2.2.2 APPLICATION DE LA MATRICE D'HADAMARD A LA CONSTRUCTION DU PLAN D'EXPERIENCES POUR LA FORMULATION ET L'OPTIMISATION D'UNE BOUILLIE INFANTILE.....	20
2.2.3 LES MATRICES DU PLAN D'EXPERIENCES GENEREES PAR MODDE 5.0. 22	
2.3 GENERALITES SUR LES INGREDIENTS : MATERIELS D'ETUDE	48
2.4 LES PROCÉDÉS DE SÉCHAGE DES INGRÉDIENTS.....	51
2.4.1 GÉNÉRALITES SUR LE SECHAGE	51
2.4.2 SECHAGE À L'ÉTUVE.....	53
2.4.3 PROFIL DE SECHAGE DE LA BANANE A L'ETUVE.....	53
2.4.4 SECHAGE PAR LYOPHILISATION	55
2.4.5 DIAGRAMME DE PREPARATION DES BOUILLIES	56
2.5 ANALYSE INSTRUMENTALE DU PROFIL DE TEXTURE (TEXTURE PROFILE ANALYSIS – TPA) DES BOUILLIES	58
2.6 RESULTATS PRELIMINAIRES	60
2.6.1 APPRECIATION ORGANOLEPTIQUE DES BOUILLIES	61
2.6.2 RESULTATS DE L'ANALYSE INSTRUMENTALE DU PROFIL DE TEXTURE DES BOUILLIES DU PLAN D'EXPERIENCES.....	62
2.6.3 COMPARAISON ENTRE LA DURETE ET LE COLLANT DES BOUILLIES AVEC CEUX DES DEUX RECETTES DU COMMERCE	69
2.7 CONCLUSION	69
CHAPITRE 3 : CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES BOUILLIES DU PLAN D'EXPERIENCES.....	70
3.1 INTRODUCTION	70

3.2	GENERALITES SUR LA COMPOSITION DES ALIMENTS	70
3.2.1	LES PROTEINES ALIMENTAIRES	73
3.2.2	LES LIPIDES ALIMENTAIRES	76
3.2.3	LES MICRONUTRIMENTS	80
3.3	CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES BOUILLIES	85
3.3.1	DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL PAR LA MÉTHODE DE KJELDAHL ET DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN PROTÉINES DES BOUILLIES	85
3.3.1.1	PRINCIPE ET METHODOLOGIE.....	85
3.3.1.2	RESULTATS DU DOSAGE DES PROTEINES DES BOUILLIES ET ANALYSES	86
3.3.2	DOSAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE (VITAMINE C) PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)	91
3.3.2.1	INTRODUCTION AUX METHODES CHROMATOGRAPHIQUES	91
3.3.2.2	PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)	91
3.3.2.3	METHODOLOGIE	92
3.3.2.4	RESULTATS DU DOSAGE DE LA VITAMINE C DES BOUILLIES	92
3.3.3	DOSAGE DES LIPIDES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE.....	101
3.3.3.1	PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	101
3.3.3.2	PRINCIPE DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE.....	102
3.3.3.3	METHODOLOGIE	103
3.3.3.4	RESULTATS DU DOSAGE DES ACIDES GRAS DES BOUILLIES.....	108
3.3.3.4.1	RESULTATS DE L'OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES ACIDES GRAS.....	108
3.3.3.4.2	RESULTATS DE L'IDENTIFICATION DES ACIDES GRAS CONTENUES DANS LES 12 BOUILLIES FORMULEES A PARTIR DU PLAN <i>D'HADAMARD</i>	114
3.4	COMPARAISON DE LA FORMULATION OPTIMISEE AVEC DEUX BOUILLIES COMMERCIALES	120
3.5	CONCLUSION	121
3.5.1	PREPARATION DE LA BOUILLIE INFANTILE OPTIMISEE.....	125
3.5.2	ESTIMATION DU PRIX DE VENTE	127
	CHAPITRE 4 : RECHERCHE SPECIFIQUE SUR LES PROTEINES DE CHENILLES ET PROPRIETES BIOLOGIQUES.....	129
4.1	INTRODUCTION	129

4.2	SOLUBILISATION DES PROTEINES A PARTIR D'UNE POUDRE DE CHENILLES	130
4.2.1	RESULTATS DE LA SOLUBILISATION	131
4.3	DOSAGES DE PROTEINES DANS LES FRACTIONS SOLUBILISEES DE POUDRE DE CHENILLES PAR LA METHODE DE KJELDAHL	132
4.3.1	RESULTATS DU DOSAGE DES PROTEINES	132
4.4	SEPARATION PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE – SDS (SDS – PAGE)	134
4.4.1	RESULTATS DE LA SEPARATION PAR SDS PAGE	137
4.5	IDENTIFICATION DES PEPTIDES ET PROTEINES DES FRACTIONS SOLUBILISEES DE POUDRE DE CHENILLES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (LC – MS)	138
4.5.1	RESULTATS DU DOSAGE LC – MS DES FRACTIONS SOLUBILISEES DE LA POUDRE DE CHENILLES	139
4.6	ACTIVITE BIOLOGIQUE DES FRACTIONS SOLUBILISEES DE POUDRE DE CHENILLES	149
4.6.1	HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE FRACTIONS SOLUBLES DE POUDRE DE CHENILLES	149
4.6.2	RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE FRACTIONS SOLUBLES DE POUDRE DE CHENILLES	150
4.6.3	RESULTATS DES TESTS ANTIMICROBIENS	152
4.7	SYSTEMATIQUE ET HABITAT DES ESPECES DE CHENILLES COMESTIBLES UTILISEES	153
4.8	DOSAGE DE MINERAUX PAR ICP – AES SUR LES ESPECES DE CHENILLES UTILISEES	154
4.8.1	RESULTATS DES DOSAGES DES MINERAUX	156
4.9	CONCLUSION	157
	<i>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</i>	158
	<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	160
	<i>LISTE DES FIGURES</i>	169
	<i>LISTE DES TABLEAUX</i>	171
	<i>ANNEXES</i>	173

ACRONYMES

APS : Ammonium Persulfate
ATCC : American Type Culture Collection
BioDyMIA : Bioingénierie et Dynamique Microbienne aux Interfaces Alimentaires
CIQUAL : Centre d'Information sur la Qualité des Aliments
cm : centimètre
CPG / GC : Chromatographie en Phase Gazeuse / *Gas Chromatography*
Da : Dalton
DO : Densité Optique
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
DSRP : Document de Stratégies pour la Réduction de la Pauvreté
EC : Enzyme Commission
EDS : Enquête Démographique et de Santé
EUMAM CAR : European's Military Advisory Mission in Central African Republic
FAO : Food and Agriculture Organisation
g/L : gramme par Litre
HCl : Acide Chlorhydrique
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
ICASEES : Institut Centrafricain des Statistiques et des Etudes Economiques et Sociales
ICP AES : Inductively Coupled Plasma Atomic Emission ElectroSpray
ICV : Institut de recherche Charles VIOLLETTE
K : Kelvin
kCal : kilocalorie
kDa : KiloDalton
LaSBAD : Laboratoire des Sciences Biologiques et Agronomiques pour le Développement
LB : Lysogeny Broth
LC – MS : Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
LRGP : Laboratoire Réactions et Génie des Procédés
M2C : Morphodynamique Continentale et Côtière (Laboratoire de)
MICS : Multiples Indicators Cluster Survey
µg/L : microgramme par Litre
min : minute

MINUSCA : Mission Intégrée multidimensionnelle des Nations Unies de Stabilisation en Centrafrique

mm : millimètre

MS : Mass Spectrometry

MSPPLS : Ministère de la Santé Publique, de la Population et de la Lutte contre le SIDA

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pa.s : Pascal – seconde (Unité de mesure de la viscosité)

PAM : Programme Alimentaire Mondial

pH : potentiel Hydrogène

ProBioGEM : Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien

QSP : Quantité Suffisante Pour

R.C.A : République centrafricaine

RGPG : Recensement Général de la Population Globale

RGPH : Recensement Général de la Population et de l'Habitat

rpm : rotation par minute

SDS – PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis

TEMED : TetraMethyl Ethylène Diamine

TPA : Texture Profile Analysis

UFC : Unité Formant Colonie

UNDAF : United Nations Development Assistance Framework

UNU : Université des Nations Unies

v/v : volume pour volume

WUR : Wageningen University

INTRODUCTION GENERALE

La malnutrition aiguë est un problème de santé publique dans de nombreux pays en développement. Selon les faits et chiffres du Programme Alimentaire Mondial (PAM)⁴, la malnutrition aiguë provoque la **mort de 3,1 millions d'enfants** de moins de 5 ans chaque année, soit près de la moitié (45%) des causes de décès. Un enfant sur six, soit 100 millions d'enfants, souffre d'**insuffisance pondérale** dans les pays en développement d'Afrique où au moins un enfant sur quatre souffre de **retard de croissance**⁵.

La République centrafricaine (R.C.A) est un pays enclavé d'Afrique subsaharienne. Elle couvre une superficie de 623 000 km² avec une population estimée à 4,9 millions d'habitants en 2011 dont, quasiment la moitié (**49,4%**) est âgée de moins de 18 ans. La R.C.A partage ses frontières avec le **Soudan** et le **Soudan du sud** à l'Est, le **Cameroun** à l'Ouest, le **Tchad** au Nord, la **République Démocratique du Congo** et la **République du Congo** au Sud.

L'alimentation du nourrisson et du jeune enfant dans ce pays reste une préoccupation majeure compte tenu du contexte industriel ne disposant pas de capacité de production de denrées infantiles adaptées et appropriées. Le contexte socioéconomique est marqué depuis ces dix dernières années par une paupérisation de la population dont les 2/3 vivent avec moins d'un dollar par jour (Données MICS⁶ – III, 2006 ; DSRP⁷ – 2, 2012 – 2016, UNDAF, 2012 – 2016). Les plus vulnérables dans cette situation sont les femmes et les jeunes enfants qui paient un lourd tribut selon les statistiques.

En 2010, le taux de mortalité infanto – juvénile était de **179‰** chez les enfants de moins de 59 mois selon le rapport des enquêtes à indicateurs multiples (MICS – IV).

Depuis mars 2013, le contexte général du pays s'est détérioré par des troubles militaro – politiques récurrents consécutifs à une guerre menée par une rébellion armée causant d'innombrables dégâts humains et matériels, des déplacements massifs internes de populations et des migrations.

En décembre 2013, le pays étant au bord d'une catastrophe humanitaire, le Conseil de sécurité des Nations – Unies a voté une résolution (2127) autorisant une mission multidimensionnelle

⁴ <http://www.fao.org/3/a-i4674f.pdf>

⁵ <http://fr.wfp.org/faim/faits-et-chiffres>

⁶ Multiple Indicator Clusters Survey. <http://dhsprogram.com/pubs/pdf/FR263/FR263.pdf>

⁷ Document de Stratégie pour la Réduction de la Pauvreté.

intégrée de stabilisation des nations Unies en Centrafrique (MINUSCA) renforcée par deux opérations extérieures de militaires européens (EUMAM CAR) et français (Opération *Sangaris*⁸⁹) qui assurent tant bien que mal l'interposition entre des groupes armés et qui ont à charge la mise en œuvre d'un programme de Démobilisation, Désarmement, Réintégration et Rapatriement¹⁰.

Ce programme, comme l'indique son intitulé, consiste à démobiliser et désarmer les groupes armés non conventionnels ainsi que les rebellions constituées de forces régulières en désertion et de combattants étrangers qui écument le territoire centrafricain. Les forces régulières identifiées pourront réintégrer l'armée centrafricaine en restructuration et les combattants étrangers seront rapatriés dans leurs pays d'origine respectifs.

En janvier 2014, des institutions de transition ont été mises en place afin de réorganiser l'administration, rétablir la sécurité et organiser des élections présidentielles et législatives. Ce qui a été fait à la fin de l'année 2015 et au premier trimestre 2016.

De ce contexte post conflit, découle une forte précarité alimentaire selon les rapports localisés des organisations humanitaires qui y interviennent et dont nous n'en ferons pas échos ici. Toutefois, ces interventions d'urgence qui consistent en des distributions de produits alimentaires et non alimentaires associées à des assistances ponctuelles en soins de santé primaire, n'ont lieu majoritairement que sur les multiples sites de déplacés internes à cause de la situation sécuritaire.

En nous focalisant sur le profil alimentaire et nutritionnel du nourrisson et du jeune enfant qui justifient ce projet, nous avons observé que les indicateurs de mortalité avaient tout de même été alarmants depuis plus de trois décennies dans le pays. La figure n°1 ci – après montre les fluctuations en ce qui concerne la mortalité infantile.

⁸ <http://www.defense.gouv.fr/operations/centrafrique/dossier-de-presentation-de-l-operation-sangaris/operation-sangaris>

⁹ <http://www.defense.gouv.fr/operations/centrafrique/actualites>

¹⁰ <http://www.un.org/en/peacekeeping/missions/minusca/mandate.shtml>

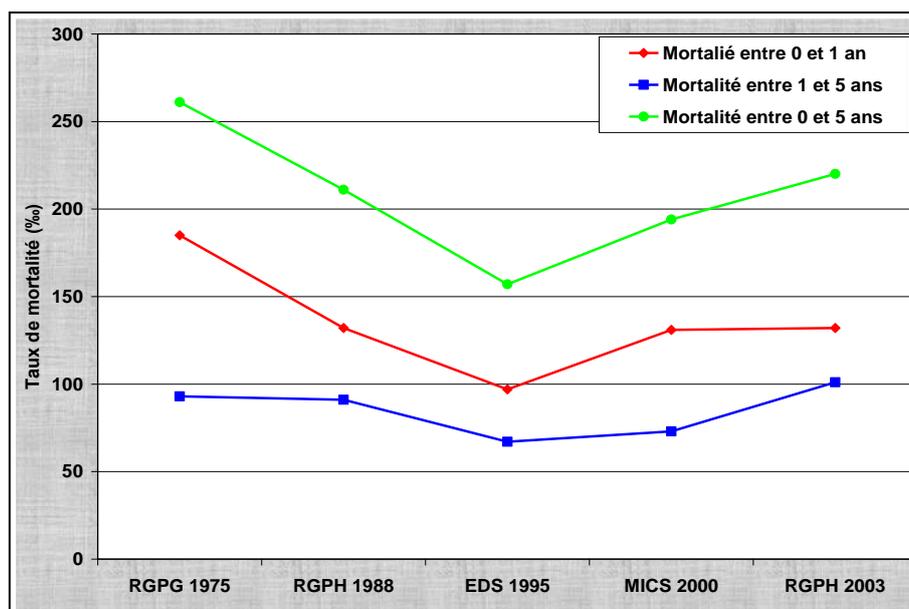


Figure n°1 : Evolution de la mortalité infantile en RCA (EDS¹¹, 1994 – 1995 ; RGP¹², 2003)

Les enquêtes représentatives de la population générale entre 1975 à 2003 représentées sur cette figure montrent que les taux de mortalité sont restés au-delà de 100 décès pour 1000 naissances vivantes (100‰) durant cette période. On note une dégradation entre 1975 à 1995, puis une amélioration légère jusqu'en 2000 et 2003. Une corrélation avec des événements politico-militaires peut être faite puisque le pays a connu des crises ouvertes entre 1977 et 1979 puis dès 1990 et qui se sont poursuivies jusqu'en 2003. Les causes associées à cette mortalité sont entre autre les pratiques alimentaires au cours du sevrage conduisant aux maladies diarrhéiques, les troubles alimentaires conséquences de carences en certains nutriments et bien entendu l'accès aux denrées adaptées, suffisantes et appropriées.

Entre 2006 et 2010, deux enquêtes par grappes à indicateurs multiples (MICS III et IV) ont permis de collecter des données globales du pays. Les résultats publiés par l'Institut Centrafricain des Statistiques et des Etudes Economiques et Sociales (ICASEES) notamment concernant les indicateurs médico – nutritionnels sont représentés dans le tableau ci – dessous. Ces résultats ne traduisent pas une amélioration de la situation sanitaire et nutritionnelle du nourrisson et du jeune enfant.

¹¹ Enquête démographique et de santé.

¹² Recensement Général de la Population et de l'Habitat.

Tableau n°1 : Evolution des indicateurs de nutrition en RCA (ICASEES, 2007 & 2012).

Indicateurs	MICS – III, 2006	MICS – IV, 2010
Mortalité infanto – juvénile	176‰	179‰
Mortalité infantile	106‰	116‰
État nutritionnel		
Prévalence de l'insuffisance pondérale	8.1%	7.9%
Prévalence du retard de croissance	18.7%	18.3%
Prévalence de l'émaciation	2.3%	1.9%

Il est remarquable sur ce tableau que la mortalité chez les nourrissons et les jeunes enfants ne cesse de s'accroître même si l'on observe une amélioration des prévalences quant à l'état nutritionnel attribuable à la mise en place des nouvelles structures de prise en charge nutritionnelle conséquence de la validation d'un protocole national de prise en charge de la malnutrition aiguë (MSPPLS¹³, 2005). Ceci montre bien que les solutions de prise en charge de l'alimentation du nourrisson et du jeune enfant devraient être envisagées aussi en terme préventif.

Dans un tel contexte, il est important et nécessaire de trouver des solutions locales adaptées pour résoudre ce fléau que représente la malnutrition aiguë globale et qui touche une partie essentielle de la population centrafricaine notamment les nourrissons et les jeunes enfants.

Le projet de recherche de formulation d'une bouillie infantile et son enrichissement en protéines et vitamines s'inscrit dans la démarche de mise au point d'un aliment de complément pour le nourrisson et le jeune enfant à partir de denrées disponibles en République centrafricaine. Il a comme avantage d'offrir un aliment à un coût accessible et aussi une qualité nutritionnelle adaptée aux besoins nutritionnels dans la tranche d'âge de 6 à 24 mois. Il est à noter que les farines infantiles importées et vendues sur le marché centrafricain et principalement dans la ville de Bangui coûtent 4 000 FCFA (6 euros) pour une quantité de 750 g. Ce qui correspond à 3 repas de bouillie par jour de 250 g. Sur cette base de calcul, il faudra au moins 120 000 FCFA (183 euros) par mois pour couvrir l'alimentation complémentaire du nourrisson et du jeune enfant dans le contexte centrafricain où le salaire d'un cadre moyen ne dépasse guère 90 000 FCFA (137 euros). Cela rend difficile l'intégration de ces farines importées dans le budget familial et l'observance des recommandations à propos de l'alimentation infantile.

¹³ Ministère de la Santé Publique, de la Population et de la Lutte contre le SIDA

Ce projet a suscité la collaboration entre les laboratoires LaSBAD¹⁴ et ProBioGEM¹⁵ de l'Institut Charles VIOLLETTE¹⁶ respectivement des Universités de Bangui (Bangui, Centrafrique) et de Lille 1 Sciences et Technologies (Villeneuve d'Ascq, France) où les différentes activités de recherche réalisées y ont donc été menées.

La catégorisation des résultats obtenus en quatre chapitres a permis d'exposer de manière graduelle la démarche scientifique d'appropriation du projet. A partir d'une revue bibliographique (Chapitre n°1), nous avons d'abord procédé à une recherche de formulation en utilisant la méthodologie des plans d'expériences (Chapitre n°2). Cela a abouti à une gamme de formulations et a conduit à la préparation de 12 bouillies aux différentes proportions d'ingrédients. Ces 12 bouillies ont ensuite été caractérisées par des méthodes biochimiques (Chapitre n°3) afin d'établir une formulation idéale répondant aux objectifs d'enrichissement en protéines et vitamines. Cette formule a été utilisée pour la préparation de la bouillie infantile optimisée dont une estimation du prix de vente a aussi été faite. Enfin, une caractérisation spécifique des protéines de chenilles utilisées et leur éventuelle activité biologique ont été amorcées (Chapitre n°4).

La mise en œuvre de ce projet s'est faite grâce au financement reçu de partenaires institutionnels à savoir la chancellerie de l'Université de Bangui, le ministère français des affaires étrangères à travers la mission de coopération de l'ambassade de France en RCA, la présidence de l'Université de Lille1 Sciences et Technologies et le Conseil Régional Nord – pas – de – Calais, mais aussi grâce à l'appui de partenaires universitaires techniques notamment le LaSBAD, l'équipe ProBioGEM de l'Institut Charles VIOLLETTE, le LASIR¹⁷ et l'ATEM¹⁸.

¹⁴ Laboratoire des Sciences Biologiques et Agronomiques pour le Développement.

¹⁵ Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien. <http://probiogem.univ-lille1.fr/>

¹⁶ <http://institutcharlesviollette.com/>

¹⁷ Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman. <http://lasir.univ-lille1.fr/>

¹⁸ Atelier de Technologie d'Enseignement de Master de Chimie. <http://atechimie.univ-lille1.fr/>

CHAPITRE 1 : ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

L'enrichissement alimentaire est défini comme l'addition à un aliment de un ou plusieurs nutriments essentiels, initialement présents ou non, avec pour objectif de prévenir ou de corriger une carence en ce ou ces nutriments, au sein d'une population ou un groupe de population spécifiquement vulnérable (ALLEN, 2006).

Les stratégies d'enrichissement utilisent des aliments – vecteurs facilement accessibles et largement consommés. Un exemple d'enrichissement particulièrement réussi et à grande échelle est l'enrichissement du sel en Iode. Le succès d'un programme d'enrichissement requiert une volonté politique affirmée et la collaboration des scientifiques, des industriels, des consommateurs et quelquefois des Agences Internationales et des Organisations Non Gouvernementales (BERGER, 2003).

Dans les pays industrialisés, de nombreux aliments à base de blé (céréales pour croissance, pain, ...) ont été enrichis en un ou plusieurs micronutriments comme le Calcium, le Fer, le Zinc, la Niacine (Vitamine B₅), la Riboflavine (Vitamine B₂), ou encore la Thiamine (Vitamine B₁) en réponse à des carences spécifiques et pour des cibles bien identifiés. Ce qui n'est pas le cas dans les pays en voie de développement où, l'enrichissement des aliments n'est pas courant malgré les troubles alimentaires liés aux carences en nutriments au sein de la population. Parmi les groupes vulnérables de ces pays, le nourrisson et le jeune enfant sont les plus atteints par les effets de carence en nutriments. En 2005, on dénombrait près de 10 millions de décès chaque année et un enfant sur cinq qui ne fêtaient pas leur cinquième anniversaire (DAVIDSSON, 2005), ce qui pose des problèmes de ressources humaines pour le développement dans les pays touchés à moyen terme.

L'alimentation du nourrisson et du jeune enfant est généralement constituée de bouillies à base de farines. Ces farines sont issues de matières premières agricoles qui sont préparées sous forme de bouillies pour être servies aux nourrissons et aux jeunes enfants dès 4 à 6 mois et plus tard durant leurs 59 premiers mois de vie (VAN HUAN, 2008). Les relations entre cette forme d'alimentation dite de complément notamment son niveau d'ingéré énergétique et la malnutrition protéino – énergétique ont suscité l'importance d'identifier et de vulgariser des moyens adaptés aux différents contextes pour augmenter la densité énergétique de ces bouillies élaborées à partir des produits locaux (TRECHE, 1995).

Plusieurs études d'enrichissement de bouillies infantiles dans le but d'améliorer leur qualité ont été menées. Ceci pour répondre à des besoins nutritionnels essentiels du nourrisson et du jeune enfant chez qui diverses formes de malnutrition commencent à se manifester aux alentours de l'âge de six mois, période dite de sevrage où le lait maternel ne suffit plus à couvrir les besoins (GERBOUIN-REROLLE, 1996).

Plusieurs recettes traditionnelles africaines ont été ainsi décrites, réalisées puis optimisées pour augmenter la densité énergétique des bouillies élaborées à partir de produits locaux et destinées aux nourrissons et jeunes enfants. A titre d'exemple, une étude sur la nature et la valeur nutritionnelle des bouillies de sevrage réalisées au **Congo** a mis en évidence les incidences nutritionnelles d'une densité énergétique insuffisante de celles – ci. Ces bouillies préparées à partir de 80% de produits locaux tels que le manioc (21% des cas) et le maïs (47% à 77% selon les zones de disponibilité) contribuent à offrir aux jeunes enfants une ration énergétique en 3 repas d'environ **600 Kcal/jour** pour des besoins évalués à **780 Kcal/jour**. La démarche d'amélioration de ces bouillies a été la mise au point d'un procédé d'augmentation de leur densité énergétique. La densité énergétique, exprimée en kcal/100mL, est la résultante de deux variables : la teneur en matière sèche liée à la quantité d'eau présente dans l'aliment et la valeur énergétique qui dépend de la proportion des lipides, protéines et glucides qui composent cette matière sèche. La densité énergétique du lait maternel est relativement de 70Kcal/100mL (GERBOUIN-REROLLE, 1996). Le procédé d'augmentation de la densité énergétique des bouillies consiste à diminuer le taux de gonflement de l'amidon par l'utilisation d'amylases¹⁹. La capacité de rétention d'eau de l'amidon est ainsi réduite et, par conséquent, la densité énergétique des bouillies augmentée en conservant la même viscosité. Cette étude a montré que la viscosité des bouillies augmente avec la concentration de farine utilisée. La viscosité mesurée présente une légère différence selon que l'on a utilisé la farine de tubercule tel que le manioc ou de céréale telle que le maïs ou le sorgho. Ainsi, ce procédé a permis d'augmenter la densité énergétique des bouillies de **60 Kcal/100mL** à **120 Kcal/100mL** pour une viscosité de 1 Pa.s. Une telle viscosité a été obtenue par incorporation de 10% de farine de sorgho malté comme source naturelle d'amylases facilement accessible au sein des ménages. Ceci offre une consistance satisfaisante pour le nourrisson et le jeune enfant (GIAMARCHI et *al.*, 1991).

¹⁹ Les amylases sont des enzymes capables de couper les chaînes d'amylose et d'amylopectine constitutives de l'amidon.

Différentes bouillies décrites par nombre d'auteurs dans plusieurs pays en développement avec des appellations locales ont été préparées suivant le même principe.

Il s'agit d'utiliser 65% de manioc (farine ou pâte), 32% de pâte d'arachide et 3% de farine de maïs germé, on aboutit à 100mL de bouillie enrichie ayant une teneur en protéines de 10g/100g de matière sèche et une concentration de 30g de matière sèche (TRECHE, 1996). C'est le cas de *ogi* (Nigérian), *poto – pote* (Congo), *mahewu* (Afrique du Sud), *uji* (Kenya), *kenkey* (Ghana), *bogobe* (Botswana), *nasha* (Soudan), *obusera* (Ouganda), *njera* (Ethiopie), *motoho* ou *leshele-shele* (Lesotho) et *koulou* (Centrafrique).

Le schéma de fabrication ci – dessous présente le mélange réalisé permettant de préparer ces différentes bouillies.

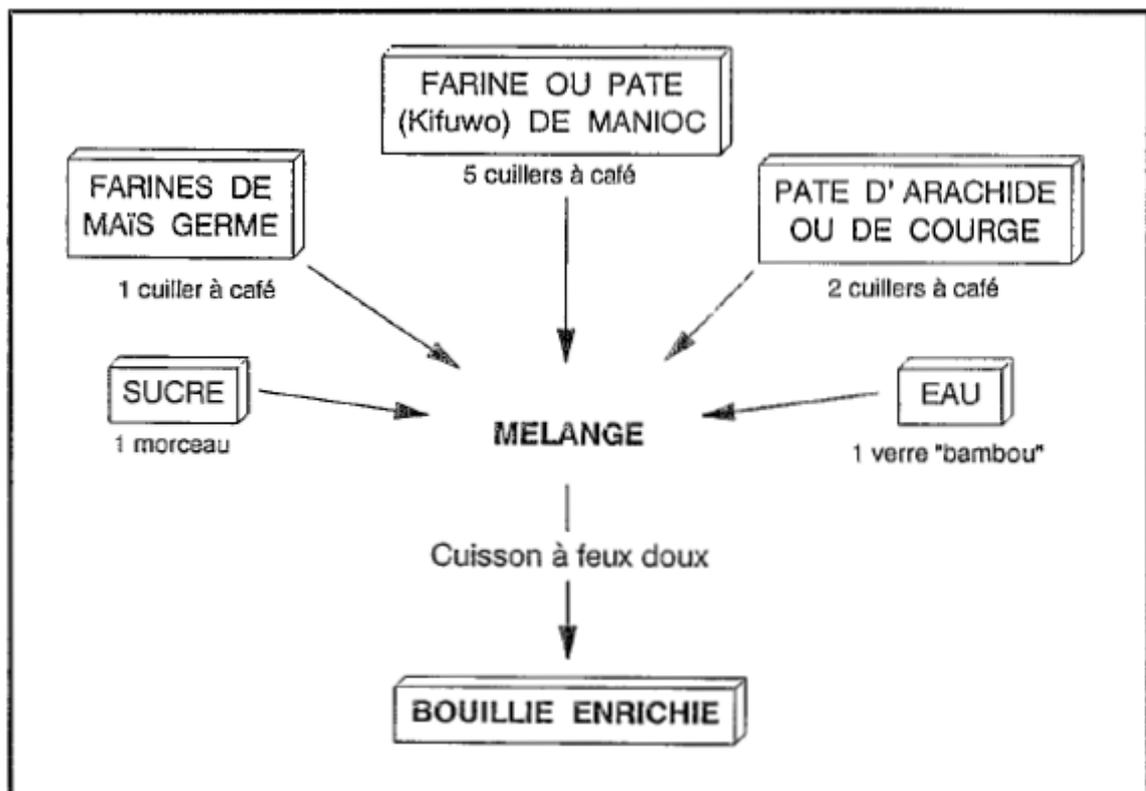


Figure n°2 : Schéma de fabrication d'une bouillie enrichie et de densité énergétique améliorée pour un contexte d'Afrique centrale (TRECHE, 1996)

Le problème de ce schéma de fabrication se pose au niveau des opérations préliminaires à la production d'amylases notamment la germination des grains de maïs ou tout autre type de céréale utilisée. L'amélioration de la densité énergétique des bouillies étant à ce stade basée essentiellement sur la modification de l'amidon et quelle que soit la source, la germination reste relativement longue en temps car elle procède par un décorticage des grains, leur

trempage durant 24 heures, suivi d'un séchage au soleil entre 24 à 48 heures avant dégermage et broyage. Comme solution envisagée autre que la germination, deux autres procédés ont été testés : la cuisson – extrusion et la fermentation.

La technique de cuisson – extrusion procède par l'augmentation contrôlée de la température qui provoque un éclatement du grain d'amidon modifiant sa structure (Cf. figure n°3). Ce qui limite sa capacité de gonflement à la cuisson (GERBOUIN-REROLLE, 1996 ; MOUQUET et *al.*, 2003 ; VAN HOAN et *al.*, 2009). Le coût des équipements et des installations nécessaires à cette technologie de même que l'impact nutritionnel des farines précuites obtenues représentent des facteurs limitatifs à son implémentation dans nombre de pays où elle a été expérimentée.

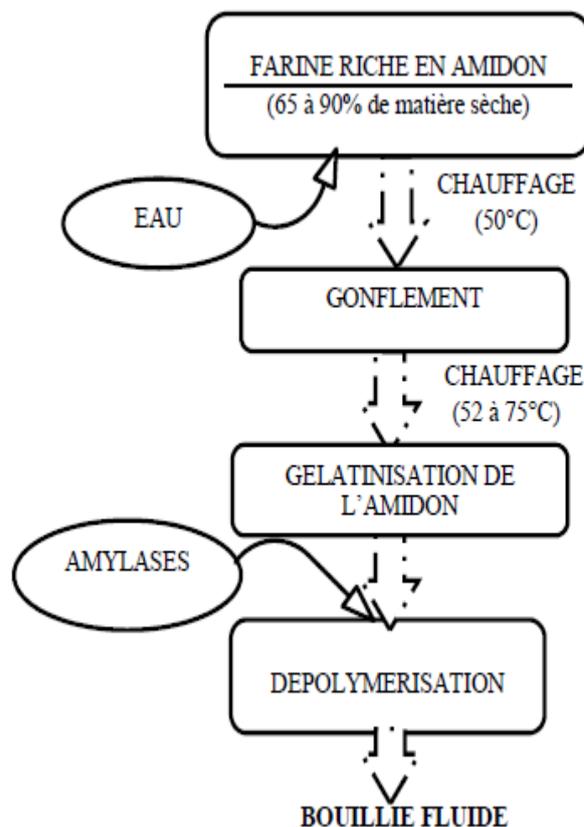


Figure n°3 : Hydrolyse enzymatique de l'amidon après cuisson- extrusion (Adapté de GERBOUIN-REROLLE, 1996)

Quant au procédé de fermentation, les résultats de sa mise en œuvre ont permis d'obtenir une baisse du pH des bouillies, conséquence de la libération d'acides organiques, de la modification de goût et de la valeur nutritionnelle, une digestibilité des protéines et une

disponibilité des minéraux liées à l'hydrolyse partielle des phytates et des oligosaccharides. Sauf que l'impact de la fermentation sur la viscosité n'a pas convaincu et sa longue durée de préparation reste un inconvénient majeur.

Ces approches basées sur l'amélioration de la densité énergétique des bouillies n'ont pas contribué à résoudre les problèmes réels liés aux formes de malnutrition observées chez le nourrisson et le jeune enfant.

Plusieurs résultats sur la physiopathologie de la malnutrition notamment ceux de Golden *et al.* en 2002 ont montré que la malnutrition présente un caractère pluricarenciel et non essentiellement la conséquence d'une carence en énergie comme l'affirmaient les postulats scientifiques antérieurs. De même, ces résultats ont distingué les formes de malnutrition et les carences spécifiques qui y sont liées et ont montré que les effets secondaires d'un épisode de malnutrition chez un enfant réduisent ses performances physiques et psychologiques et peuvent persister tout au long de sa vie (GOLDEN *et al.*, 2002). D'où l'intérêt de rechercher des solutions préventives idoines à de telles menaces. Ce qui a ouvert la voie aux investigations sur la composition biochimique globale des aliments de complément chez le nourrisson et le jeune enfant.

Les travaux de Van GASTEL *et al.* en 2005 en Tanzanie ont permis d'élucider la composition d'une dizaine d'aliments de complément, très appréciés et qui se sont avérés de meilleure qualité. Parmi celles-ci, une recette a été conçue pour les enfants atteints de malnutrition sévère : il s'agit de la recette appelée FORTIMIX qui a été élaboré au sein d'une unité hospitalière. Cette recette découle d'une bouillie traditionnelle dénommée TOTOMIX faite à base de maïs grillé, de lentilles et d'arachides grillées. A ce mélange, sont ajoutés du sucre, de l'huile et du lait écrémé en poudre. Ces différents ingrédients additionnés ont permis d'augmenter la valeur énergétique de cette bouillie fortifiée qui a été baptisé FORTIMIX. Les analyses ont ensuite montré que TOTOMIX n'apportait que **381Kcal** pour 100 grammes de farine sèche tandis que FORTIMIX présentait une valeur énergétique de **415Kcal** pour 100 grammes (Van GASTEL *et al.*, 2005). Dans une région au Sud de l'Éthiopie, des aliments dits de transition destinés aux jeunes enfants ont été formulés à partir du maïs ou de racines d'une plante indigène appelé *Kocho* en langue vernaculaire (ABEBE *et al.*, 2006). Le but de cette formulation est d'améliorer la qualité de l'alimentation des jeunes enfants. Sur cette base, deux formulations ont été testées à savoir la formule MHC (Maïs – Haricot – Courge) et la formule KHC (*Kocho* – Haricot – Courge). Leurs teneurs en protéines ont été évaluées à 14,07g/100g pour MHC et 13,81g/100g pour KHC.

Dans ces deux formules, le maïs contenu dans la formule originelle a été substitué au *kocho* dans la formule améliorée non pas dans l'objectif spécifique d'augmenter la teneur en protéines mais plutôt d'atténuer d'une part le coût du maïs et d'autre part pallier son indisponibilité à certaines saisons de l'année.

Puisque, le maïs et le *kocho* ont une teneur en protéines brutes respectivement de 8,82g/100g et de 1,46g/100g de matière sèche. Les études ont ainsi mis en évidence que l'ajout de la pulpe de courge et du haricot ont permis d'augmenter la teneur en protéines de l'aliment. De même, la courge additionnée dans le KHC et le MHC a donné 54 µg ER²⁰ pour 100 kilocalories, augmentant ainsi la teneur en vitamine A des mélanges de 25 et 180 fois respectivement.

L'ajout de courge et de haricot a été une des voies d'amélioration susceptible d'augmenter la valeur nutritionnelle des aliments traditionnels préparés à base de *kocho* et de maïs et destinés aux nourrissons et jeunes enfants.

En Malaisie, la production d'un gâteau traditionnel à base de manioc, de sucre et de lait de coco a été rapportée (GAN *et al*, 2007). Une étude approfondie de la texture de ce gâteau a été réalisée utilisant la méthode des plans d'expériences dont la modélisation des réponses a été observée par des surfaces de réponses. La formulation de ce gâteau à base de manioc a été optimisée par l'incorporation de 25% de sucre et de 20 % de lait de coco. Les analyses sensorielles ainsi que les mesures de la dureté et de l'élasticité ont montré qu'une relation linéaire existe entre la quantité de sucre et la dureté. Plus la quantité de sucre augmente, plus le gâteau devient élastique, mieux il est apprécié et consommé par les jeunes enfants.

DESHPANDE *et al.* en 2008 ont mis au point une bouillie à base d'arachide et de soja aromatisée au chocolat. Le soja et l'arachide ont été ajoutés compte tenu de leur apport important en protéines et en lipides respectivement. En effet, ces deux sources végétales sont des sources abondantes, disponibles et peu coûteuses dans la région notamment en Géorgie. Le chocolat, selon cette étude a servi à masquer le goût des protéines végétales. Ainsi, une recette a été établie en optimisant les quantités de ces trois ingrédients que sont l'arachide (34,1g/100g – 45,5g/100g), le soja (31,2g/100g – 42,9g/100g) et le chocolat (22,4g/100g – 24,1g/100g) pour une bouillie susceptible de couvrir les besoins nutritionnels chez le jeune enfant, présentant un aspect, une texture et un goût acceptables (DESHPANDE *et al*, 2008). Ces différentes approches ont tenu compte de la disponibilité des denrées alimentaires dans les régions concernées, des technologies appropriées visant la biodisponibilité des nutriments

²⁰ Equivalent Rétinol.

essentiels à la couverture des besoins nutritionnels de croissance et de développement du nourrisson et du jeune enfant mais également de l'aspect structurel de l'aliment à offrir.

Malgré ces innombrables approches scientifiques, les chiffres de la mortalité infantile restent alarmants dans les pays en développement.

La vulnérabilité des nourrissons et des jeunes enfants face aux problèmes de nutrition et de santé demeure un sujet préoccupant. C'est pourquoi, les Nations Unies ont inscrit à l'agenda des Objectifs du Millénaire pour le Développement (O.M.D) 2010 – 2015 la réduction du taux de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans au deux tiers des statistiques des pays.

La République centrafricaine, pays ravagé par des crises politico-militaires récurrentes depuis plus de trois décennies, affiche des statistiques d'état nutritionnel et de mortalité infantiles relativement graves. Les résultats des enquêtes par grappes à indicateurs multiples (MICS²¹) ont révélé une mortalité infanto - juvénile de **179‰**, une mortalité infantile de **116‰** et des prévalences de **7.9%** ; **18.3%** et **1.9%** respectivement de l'insuffisance pondérale sévère, du retard de croissance et de l'émaciation (ICASEES, 2007 & 2012). Le constat fait par des évaluations rapides d'acteurs humanitaires est que l'alimentation du nourrisson et du jeune enfant est à 90% tributaire des denrées importées. De même, les pratiques alimentaires traditionnelles des mères et personnes en charge du nourrisson et du jeune enfant dépendent de la disponibilité de certaines denrées et du minimum de connaissances acquises quelquefois de façon empirique. Le circuit de commercialisation de ces denrées est très divers et souvent inaccessible. Certains produits alimentaires pour nourrissons et jeunes enfants sont vendus dans les rues par des marchands ambulants plutôt que sur des marchés ou dans les établissements agréés. A cela, il faut ajouter qu'il n'existe presque pas de publications scientifiques traitant de la qualité des produits alimentaires traditionnels disponibles en République centrafricaine. Un pic de malnutrition est observé dans le pays de façon récurrente entre les mois de juillet à septembre, période sensée ouvrir la saison agricole. Ce constat a mobilisé certains acteurs humanitaires qui apportent leurs contributions en termes de réponse d'urgence à travers des programmes d'intervention nutritionnelle (dépistage, référencement en centre de santé et/ou prise en charge alimentaire). Face à une telle situation, notre motivation est d'apporter une solution durable afin de contribuer à améliorer le statut nutritionnel du nourrisson et du jeune enfant.

²¹ Multiple Indicators Cluster Survey.

C'est ainsi que, dans le cadre de ce projet d'enrichissement d'une bouillie locale en protéines et vitamines, nous avons, dans cette première partie, abordé les études bibliographiques ayant traité de l'amélioration et de la formulation des aliments de complément en fonction des besoins nutritionnels chez le nourrisson et le jeune enfant. La seconde partie sera consacrée à la description de la méthodologie des plans d'expériences et des techniques d'apprêtement des ingrédients utilisées pour la recherche de formulation.

La caractérisation biochimique des bouillies préparées dans la mise en œuvre du plan d'expériences par des analyses quantitatives et qualitatives a été traitée dans la 3^e partie suivie de la préparation de la bouillie infantile optimisée et d'une estimation de son prix de vente. La quatrième partie a été consacrée à la recherche spécifique sur les protéines de chenilles en vue d'identifier les peptides et leurs propriétés biologiques. Les perspectives de cette étude devraient permettre d'une part, la production à échelle de la formule susceptible de couvrir les besoins nutritionnels du jeune enfant dans le contexte centrafricain et sous – régional et d'autre part conduire une utilisation des peptides actifs issus de protéines de chenilles à des fins alimentaires et/ou thérapeutiques.

CHAPITRE 2
RECHERCHE DE FORMULATION D'UNE BOUILLIE INFANTILE
A PARTIR DE LA METHODE DES PLANS D'EXPERIENCES
ET APPRÊTEMENT DES INGREDIENTS

2.1 INTRODUCTION

Les objectifs d'enrichissement d'une bouillie infantile en protéines et vitamines en vue de son utilisation comme aliment de complément chez le nourrisson et le jeune enfant en Centrafrique assignés au projet ont conduit à définir une méthode pour la formulation de cette bouillie alimentaire comme produit final enrichi. Par définition, une bouillie alimentaire est un repas que l'on prépare en portant à ébullition soit dans de l'eau, soit dans du lait ou encore dans un mélange d'eau et de lait, de la farine ou de la semoule à base de céréales mondées et écrasées²².

Pour notre formulation, les différents ingrédients choisis ont été inspirés par la revue de la littérature présentée dans le chapitre premier à savoir une source d'amidon de céréale et/ou de tubercule, une légumineuse comme source de lipides, des fruits pour un apport en vitamines et une espèce de chenille comestible pour un apport en protéines. Ce choix est basé sur la disponibilité locale des ingrédients cités et leurs apports nutritionnels en macronutriments et micronutriments rapportés par des études antérieures. Ces études portent sur leur utilisation empirique observée au cours des pratiques d'alimentation du nourrisson et du jeune enfant rapportées par des documents d'intervention et de suivi – évaluation de programmes de prise en charge nutritionnelle en Centrafrique.

Dans ce chapitre, nous évoquerons chacune des méthodes envisagées en commençant par la méthode des plans d'expériences qui a été choisie comme technique de base pour établir une composition de la formulation. Les procédés d'apprêtement des ingrédients comme le mode de séchage approprié et les méthodes d'analyses organoleptique et physique des bouillies préparées seront décrits par la suite. Le diagramme technologique de préparation de la bouillie alimentaire formulée et les résultats des analyses de texture, préliminaires à cette première étape d'enrichissement, seront également rapportés.

²²Définition adaptée de NGUYEN Van Huan N., 2008.

2.2 LA MÉTHODE DES PLANS D'EXPÉRIENCES

La méthode des plans d'expériences procède par une étape de planification des tâches avant celle de l'expérimentation. Le mot « plan » s'explique par le contexte originel d'application de la méthode : l'expérimentateur doit concevoir et préparer une démarche complète avant de réaliser concrètement ses expériences. On nomme alors « plans d'expériences » une suite ordonnée d'essais d'une expérimentation. Chaque essai permet d'acquérir de nouvelles connaissances en contrôlant un ou plusieurs paramètres d'entrée pour aboutir aux paramètres de sortie(s) que sont les résultats d'un modèle expérimental valide.

Ainsi, la méthode des plans d'expériences permet d'optimiser un procédé en affinant les connaissances sur celui – ci à partir des essais réalisés. Elle permet aussi d'étudier l'influence des différents paramètres du procédé et de les corrélérer par un modèle mathématique. Cette méthode présente également l'avantage d'organiser les expériences, de faciliter l'exploitation des résultats et de permettre l'acquisition progressive de résultats d'intérêt. Enfin, elle rassure quant aux conditions expérimentales pour lesquelles on obtient la meilleure précision possible avec un maximum d'efficacité, un minimum d'essais et donc de coût investi (GOUPY J. et CREIGHTON L., 2006 ; VIVIER, 2002).

En recherche appliquée, la méthode des plans d'expériences a montré d'importants intérêts pour les secteurs industriels car elle permet de répondre à des obligations de compétitivité et de rentabilité qui sont les objectifs principaux de tout industriel.

En recherche fondamentale, on réussit de plus en plus avec la méthode des plans d'expériences, à intégrer de nouveaux procédés à travers une démarche méthodologique aboutissant à une acquisition de connaissances par des lois physiques et/ou physico – chimiques sur le système étudié.

Plusieurs constructions de plans d'expériences ont été élaborées et validées en fonction de divers procédés étudiés. Il s'agit par exemple de plans factoriels complets, de plans factoriels fractionnaires de type *Plackett & Burman* ou des tables de *Taguchi* ou encore de plans composites centrés – réduits. Ces plans s'appuient sur des modèles expérimentaux en corrélation avec des modèles mathématiques qui permettent une interprétation approfondie des phénomènes étudiés. La modélisation mathématique pourra offrir des qualités prédictives et une orientation fiable des recherches envisagées.

Ainsi, sous forme mathématique, l'étude d'un phénomène se résume à déterminer la fonction f qui lie la **réponse** Y aux différents **paramètres** x étudiés. Ce qui conduit à la relation :

$$Y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_k) \quad (\text{Equation 1})$$

L'inconnue Y ici appelée **réponse** désigne la grandeur d'intérêt, les paramètres x sont les variables de la fonction f et sont encore appelées **facteurs**.

Il est possible alors de généraliser le concept de plan d'expériences en définissant la matrice d'expériences. On introduit alors la notion de N expériences mettant en jeu k facteurs dans un espace centré réduit. Dans le domaine des plans d'expériences, on parle donc de **facteurs** qui influent sur une **réponse**. C'est pourquoi, la construction des plans d'expériences et l'interprétation des résultats dépendent des types de facteurs définis dans l'étude et des niveaux de variation qui leur sont appliqués. Ainsi, un plan d'expériences qui regroupera chaque condition expérimentale correspondant à la variation des différents facteurs étudiés pourra être transposée en modèle mathématique appelée matrice d'expériences qui sera notée X et où chaque condition expérimentale prendra des valeurs définies soit -1 soit $+1$ que l'on appellera variables codées (GOUPY J. et CREIGHTON L., 2006).

Les plans d'expériences sont tous basés sur les matrices d'*Hadamard*. Ces matrices ont été inventées par **Sylvester** en 1867, qui a construit de tout ordre une puissance de 2, grâce à son idée de doublement. **Jacques HADAMARD**, célèbre mathématicien français connu pour son théorème des nombre premiers, en a construit d'ordre 12 et 20 et a formulé une célèbre conjecture en 1893 énoncée comme suit : « *pour tout n multiple de 4, il existe une matrice d'*Hadamard* d'ordre n* » (DROESBEKE et al., 1996).

Notre étude consistant à formuler un aliment de complément enrichi en protéines et vitamines à partir de divers ingrédients afin de couvrir les besoins nutritionnels du nourrisson et du jeune enfant, plusieurs essais avec des proportions d'ingrédients différentes s'avèrent nécessaires. L'idéal serait de choisir une méthode d'expérimentation afin d'optimiser les proportions d'ingrédients au cours de la formulation. Il est important de rappeler que les bouillies sont les modes appropriés d'alimentation et de nutrition chez le nourrisson et le jeune enfant entre 6 à 24 mois.

Nous avons donc opté pour une matrice d'*Hadamard* pour la construction du plan d'expériences tenant compte des objectifs de l'étude et du fait que ce type de plan fait partie des plus simples à mettre en œuvre.

En effet, c'est un large criblage qui fait intervenir un grand nombre de facteurs à étudier en relation avec le plan d'expériences à réaliser et qui permettra de sélectionner les facteurs les plus influents sur les réponses choisies.

2.2.1 LA MATRICE D'HADAMARD

Une matrice d'*Hadamard* d'ordre n est un tableau à n lignes et n colonnes tel que :

- tous ses coefficients valent -1 ou $+1$ en variables codées ;
- pour chaque paire de lignes, il y a autant de concordances que de discordances, c'est – à – dire autant de colonnes où les coefficients sont égaux, que de colonnes où les coefficients sont distincts.

Les matrices d'*Hadamard* possèdent diverses propriétés très utilisées parmi lesquelles 2 nous intéressent :

- Elles permettent de maximiser le déterminant d'une matrice et d'avoir une bonne précision dans les estimations. Le critère appelé *D-Optimalité* (D pour Déterminant). se décrit de la manière suivante : ${}^t\mathbf{X}\cdot\mathbf{X} = \mathbf{n}\cdot\mathbf{I}_n$.

\mathbf{X} : matrice d'expériences en variables codées ;

${}^t\mathbf{X}$: matrice transposée ;

\mathbf{n} : nombre d'expériences ;

\mathbf{I} : matrice identité.

En maximisant le déterminant d'une matrice, on minimise la Variance et la Covariance du résultat, ce qui permet, dans notre système d'équations à résoudre, de minimiser la Variance des effets de chacun des facteurs.

- Elles nous assurent l'orthogonalité : Si le plan est orthogonal, on est assuré qu'un facteur A est pris en compte au même poids qu'un facteur B. Il n'y a donc pas un facteur qui est pris avec plus de considération que l'autre. La somme de chacune des colonnes doit être égale à 0. Ainsi, plus la matrice sera orthogonale et meilleur sera le plan.

Pour construire un plan d'expériences, on procède d'abord par l'identification des facteurs à étudier. Ensuite, à chaque facteur est adjugé un domaine d'étude défini par deux niveaux de variation appelés -1 ou $+1$ et qui correspondent aux réponses possibles liées à ce facteur.

Les plans de *Plackett – Burman* associés constituent un moyen général et simplifié pour l'écriture des matrices d'*Hadamard*.

La construction de la matrice pour un nombre k de facteurs se fait à partir de la relation répertoriée ci – dessous et imposée par *Hadamard* où la répartition des signes – et + est totalement aléatoire.

Tableau n°2 : Tableau de référence pour la construction des matrices d'*Hadamard*.

Nombre de facteurs	N_{exp}	Séquences de niveaux (ou ligne de départ)
$k \leq 3$	4	+ + -
$4 \leq k \leq 7$	8	+ + + - + - -
$8 \leq k \leq 11$	12	+ + - + + + - - - + -
$12 \leq k \leq 15$	16	+ + + + - + - + + - - + - - -
$16 \leq k \leq 19$	20	+ + - - + + + + - + - + - - - - + + -
$20 \leq k \leq 23$	24	+ + + + - + - + + - - + + - - + - - - - -
$24 \leq k \leq 31$	32	- - - - + - + - + + + - + + - - - + + + + - - + + - + - - - +

Les lignes de la matrice d'expériences sont alors définies de toutes les permutations cycliques (vers la droite ou vers la gauche) possibles de la séquence de – 1 et de +1 de la ligne correspondante du tableau n°2 pour la valeur du nombre d'expériences (N_{exp}) et du nombre de facteurs à étudier. Une ligne supplémentaire de – 1 est ajoutée et ensuite une colonne de + 1 sur le côté gauche (colonne de la moyenne) pour obtenir une matrice d'ordre N_{exp} .

Par exemple, pour $k = 2$ (2 facteurs), on choisit $N_{exp} = 4$ (2 deux facteurs à deux niveaux (– 1, = +1, soit 2^2) et par permutation de la droite vers la gauche, on aboutit à la matrice :

$$\begin{bmatrix} + & + & - \\ - & + & + \\ + & - & + \end{bmatrix} \text{ à laquelle on vient ajouter une ligne de } -1 : \begin{bmatrix} + & + & - \\ - & + & + \\ + & - & + \\ - & - & - \end{bmatrix}$$

On obtient la matrice de *Plackett – Burman* pouvant servir à la construction du plan d'expériences en ajoutant la colonne de la moyenne sur le côté gauche qui est une colonne de + 1 :

$$X = \begin{bmatrix} +1 & +1 & +1 & -1 \\ +1 & -1 & +1 & +1 \\ +1 & +1 & -1 & +1 \\ +1 & -1 & -1 & -1 \end{bmatrix}$$

A partir de cette construction matricielle en variables codées, il sera alors possible d'obtenir une matrice en variables naturelles qui en fait sera le plan d'expériences à réaliser en réécrivant cette matrice avec les valeurs des conditions expérimentales définies pour l'étude, (cf. Tableau n°5 et 6). Les facteurs peuvent être qualitatifs ou quantitatifs de même que la réponse obtenue sera respectivement qualitative ou quantitative.

La réponse Y (Cf. Equation 1), qui est fonction des facteurs de l'étude, après modélisation mathématique prenant en compte les différents facteurs et les variations de niveaux qui leur ont été adjugés, peut être calculée à partir de la relation suivante pour un plan factoriel :

$$Y = b_0 + \sum_i^N b_i X_i + \sum_{ij}^N b_{ij} X_i X_j + \dots + \sum_{ij \dots k}^N b_{ij \dots k} X_i X_j \dots X_k + \varepsilon$$

(Equation 2)

b_0 : Coefficient constant représentant la moyenne de tous les résultats

b_i : Effet du facteur i ; b_{ij} : effet d'interaction entre les facteurs i et j .

ε : Erreur expérimentale.

En utilisant ce modèle mathématique, on peut définir des surfaces de réponses.

Le modèle pour un plan d'*Hadamard* sera simplifié à l'expression :

$$Y = b_0 + \sum_i b_i X_i$$

(Equation 3)

En effet, on ne peut déterminer les effets d'interaction en raison de la répartition aléatoire des signes -1 et $+1$ dans une ligne de départ. Ce qui n'est pas le cas des plans factoriels qui sont totalement symétriques (DROESBEKE et *al.*, 1996 ; VIVIER, 2002).

Dans notre cas, ayant ciblé un jeu de 9 facteurs, nous nous sommes limités à la matrice d'*Hadamard* pour la construction d'un plan d'expériences simplifié.

2.2.2 APPLICATION DE LA MATRICE D'HADAMARD A LA CONSTRUCTION DU PLAN D'EXPERIENCES POUR LA FORMULATION ET L'OPTIMISATION D'UNE BOUILLIE INFANTILE

Notre projet de formulation et d'optimisation d'une bouillie infantile en réponse à la couverture des besoins nutritionnels du nourrisson et du jeune enfant en République Centrafricaine a nécessité d'abord une étude du processus traditionnel. Ensuite, à partir des différents ingrédients choisis et apprêtés, une formulation a enfin été proposée. Il a surtout été question de quantifier les proportions de ces ingrédients afin d'atteindre les objectifs de valeur ajoutée à savoir rehausser les teneurs en protéines et en vitamines.

De manière traditionnelle, les recettes observées et décrites comprennent des ingrédients de base et des ingrédients complémentaires.

Pour les ingrédients de base, une farine de céréale (maïs, mil, sorgho, riz...) ou un mélange de deux farines de céréale et de tubercule (manioc principalement) sont utilisées traditionnellement. Ces farines représentent la source de **glucides** et donc d'énergie primordiale.

Les ingrédients complémentaires peuvent être une source de **lipides** (huile de palme rouge, pâte ou poudre d'arachide, etc.), une source de **protéines** (légumineuses, poissons, etc.), une source de **vitamines** et de **minéraux** (jus de fruit de saison, plantes – feuilles, légumes, etc.). Le volume d'eau et l'apport de chaleur restent fonction de l'observation et de l'appréciation au cours de la préparation. Cette diversification d'ingrédients justifie le choix du plan *d'Hadamard* pour notre modèle de départ.

Les facteurs retenus pour ce premier plan d'expériences ont été : **le type de farine (maïs et manioc ou pâte de maïs germé), de l'arachide, de la mangue, de la banane, de l'orange, de la chenille et du sucre en poudre**. Pour les paramètres physico-chimiques, nous avons retenu **la température de cuisson, le temps de cuisson, le volume d'eau et la vitesse d'agitation du mélange** au cours de la préparation (cf. Tableau n°3). Le sucre en poudre a été utilisé puisque de manière traditionnelle, cet ingrédient est ajouté en fin de préparation pour rehausser le goût en fonction de sa disponibilité dans les ménages. Ainsi, les facteurs retenus figurent dans le tableau n°3.

Tableau n°3 : Facteurs du plan d'expériences et les 2 niveaux associés

Variabiles	Facteurs	Niveau – 1	Niveau +1
X1	Type de farine (= 40g)	50% maïs, 50% manioc	pâte de maïs germé
X2	Quantité d'arachide	2,5g	5g
X3	Quantité de sucre	0g	5g
X4	Quantité de mangue	0g	3g
X5	Quantité de poudre d'orange	0g	3g
X6	Quantité de chenille	0g	3g
X7	Quantité de banane	0g	3g
X8	Temps de cuisson	5 min	10 min
X9	Température de cuisson	65°C	85°C
X10	Volume d'eau	150 mL	250 mL
X11	Vitesse d'agitation	200 tours/min	400 tours/min

Les proportions choisies comme niveau le plus bas et niveau le plus élevé respectivement – 1 et + 1 répondent, suivant un ordre de priorités des réponses voulues, à quatre exigences à savoir :

- (i) le volume de bouillie final suffisant pour un repas sachant que le nourrisson ou le jeune enfant, entre 6 à 24 mois, consomme en moyenne 4 à 6 repas par jour ;
- (ii) la valeur alimentaire répondant aux besoins nutritionnels de cette tranche d'âge ;
- (iii) la consistance appropriée et adaptée au nourrisson et jeune enfant consommateur et enfin ;
- (iv) le niveau des proportions à considérer dans la formulation.

De plus, les teneurs en protéines et vitamines devraient, pour chaque repas, contribuer à la couverture des besoins en ces nutriments à la fin d'une journée comme présenté dans le tableau n°4 ci – après en comparaison au lait maternel.

Tableau n°4 : Besoins énergétiques du jeune enfant allaité au sein (Adapté de FAO – OMS – UNU, 1986)

Age (mois)	Besoins énergétiques (kcal/j)	Apport moyen du lait maternel (kcal/j)
6 à 8	615	413
9 à 11	686	379
12 à 23	894	346

En suivant la démarche de la méthode, la prochaine étape a été de construire le plan.

2.2.3 LES MATRICES DU PLAN D'EXPERIENCES GENEREES PAR MODDE 5.0

Un total de 11 facteurs a été défini pour cette étude. Le tableau n°3 précédent résume ces facteurs et leurs niveaux associés au plus bas et au plus haut. Pour les 11 facteurs retenus, la construction d'un plan factoriel complet suivant la logique de 2^k donnerait $2^{11} = 2048$ expériences à réaliser, ce qui ne peut, dans la réalité, se faire à l'échelle matérielle et temporelle de ce projet. Nous avons donc réalisé un plan d'*Hadamard* construit avec la méthodologie décrite dans la partie 2.2.1. Ce plan a également pu être généré à l'aide du logiciel **MODDE (Modeling and design) version 5.0**.

Ainsi, ce plan est reporté dans le tableau n°5 en variables codées et le tableau n°6 en variables naturelles représentés ci – dessous.

Tableau n°5 : Matrice des essais en variables codées générée par MODDE 5.0

Essai n°	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11
1	B	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
2	B	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
3	A	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
4	B	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
5	B	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
6	B	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
7	A	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
8	A	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
9	A	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
10	B	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
11	A	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
12	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Les variables naturelles du tableau n°6 ci – après, qualitatif et quantitatif, correspondent aux conditions expérimentales telles que définies dans le tableau n°3.
Ces proportions ont alors servi à préparer les bouillies.

Tableau n°6 : Matrice des essais en variables naturelles générée par MODDE 5.0.

Essai n°	Type de farine	Arachide	Sucre	Mangue	Orange	Chenille	Banane	Tps de Cuisson	Température de Cuisson	Volume d'Eau	Agitation
1	B	2,5	5	0	0	0	3	10	85	150	400
2	B	5	0	3	0	0	0	10	85	250	200
3	A	5	5	0	3	0	0	5	85	250	400
4	B	2,5	5	3	0	3	0	5	65	250	400
5	B	5	0	3	3	0	3	5	65	150	400
6	B	5	5	0	3	3	0	10	65	150	200
7	A	5	5	3	0	3	3	5	85	150	200
8	A	2,5	5	3	3	0	3	10	65	250	200
9	A	2,5	0	3	3	3	0	10	85	150	400
10	B	2,5	0	0	3	3	3	5	85	250	200
11	A	5	0	0	0	3	3	10	65	250	400
12	A	2,5	0	0	0	0	0	5	65	150	200
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11

Le plan étant construit, sa réalisation a nécessité l'apprêtement des divers ingrédients.

Pour ce faire, quelques méthodes de séchage ont été testées en vue d'obtenir les ingrédients sous forme de farine, forme plus adaptée pour le mélange de matières et la préparation des bouillies.

La recherche de formulation d'une bouillie infantile va être menée avec les 12 essais cités dans le tableau n°6.

2.3 GENERALITES SUR LES INGREDIENTS : MATERIELS D'ETUDE

Dans le cadre de ce projet de formulation, les ingrédients retenus ont été pour la plupart rapportés par les études antérieures comme rappelé en introduction. Il s'agit d'une part du maïs (*Zea mays*) et du manioc (*Manihot esculenta Crantz*) en farine comme ingrédients de base et de l'arachide (*Arachis hypogaea*), de la banane (*Musa sapientum*), de la mangue (*Mangifera indica L*), de l'orange (*Citrus sinensis*) et du sucre comme ingrédients complémentaires (MASSAMBA *et al*, 1991 ; DE BENOIST, 1994 ; ONOFIOK *et al*, 1998 ; DABADIE, 1999 ; BROWN, 2000 ; LUTTER *et al*, 2000 – 2003 ; MENSAH-WILMOT *et al*, 2003 ; FABER *et al*, 2005 ; GAN *et al*, 2007). Le tableau n°7 présenté ci – dessous indique la valeur nutritionnelle pour quelques nutriments présents dans ces différents ingrédients.

Tableau n°7 : Composition nutritionnelle des ingrédients (Adapté de CIQUAL²³, 2013 ; FAO, 2012)

	Maïs	Manioc	Arachide	Banane	Mangue	Orange
Energie (kcal/100g)	61,8	335	622	93,6	63,5	46,5
Eau (g/100g)	84,7	12,7	1,01	74,7	83,1	87,1
Protéines brutes, N*6,25 (g/100g)	1,4	1,9	29,6	1,2	0,7	0,96
Glucides (g/100g)	13,2	78,8	14,8	20,5	13,6	8,32
Lipides (g/100g)	0,31	0,5	49,6	0,23	0,2	0,26
Amidon (g/100g)	10,8	-	5,7	2,1	-	-
Fibres (g/100g)	-	-	6,2	-	1,76	1,82
Acides gras saturés (g/100g)	-	-	9,44	-	-	-
Ac. gras monoinsaturés (g/100g)	-	-	20,2	-	-	-
Ac. gras polyinsaturés (g/100g)	-	-	15,1	-	-	-
Sodium (mg/100g)	3	30	2,12	-	2	4,87
Magnésium (mg/100g)	8,3	45	70,6	32,8	13	12,4
Phosphore (mg/100g)	20	102	370	17,5	16	15,1
Potassium (mg/100g)	26,7	587	54,2	411	180	151
Calcium (mg/100g)	8,9	138	4,94	4,47	12	39
Fer (mg/100g)	-	1,5	-	-	-	-
Iode (µg/100g)	-	-	3,25	3,92	1,14	-
Vitamine A (µg/100g)	-	-	-	148(β)	1220 (β)	248 (β)
Vitamine E (mg/100g)	-	-	1,17	-	1,05	-
Vitamine K ₁ (µg/100g)	-	-	-	-	4,2	-
Vitamine C (mg/100g)	-	4	-	6,54	37	39,7
Vitamine B ₃ (mg/100g)	-	-	24,9	-	-	-
Vitamine B ₅ (mg/100g)	-	1,2	1,49	-	-	-
Vitamine B ₉ (µg/100g)	13	47	96,2	22,9	31	38,7

NB : Les teneurs importantes ont été accentuées en gras.

²³ Centre d'Information sur la Qualité des Aliments <https://pro.anses.fr/TableCIQUAL/index.htm>

Le sucre utilisé est essentiellement du sucre²⁴ de table en poudre.

Les données scientifiques se font de plus en plus abondantes à propos de l'utilisation de chenilles comestibles en zone tropicale. En effet, elles constituent une source de protéines qui contribue à la sécurité alimentaire et aux moyens de subsistance des populations, et aussi à la préservation de l'environnement (FAO/WUR, 2013).

Parmi les ingrédients retenus pour notre étude, nous avons ajouté des chenilles comestibles du genre *Imbrasia*. Avant de développer les méthodes mises en œuvre pour l'apprêtement des ingrédients, il s'avère important de nous appesantir sur l'intérêt nutritionnel de cette denrée dans les habitudes alimentaires de la population mondiale en général et de celle de la République centrafricaine en particulier.

On estime que plus de 1900 espèces d'insectes sont consommées dans l'alimentation humaine à travers le monde, la plupart étant récoltées dans les forêts naturelles (MALAISSE, 2004). Dans le passé, les insectes ont pu constituer une source privilégiée d'éléments nutritifs satisfaisant les besoins physiologiques spécifiques de l'homme. Ils sont reconnus par les populations autochtones comme des aliments riches, faciles à manger et à digérer. Plusieurs auteurs ont rapporté que les insectes contribuent significativement à la sécurité alimentaire en Afrique centrale, en l'occurrence par leur apport en protéines animales et comme source de revenus des populations. Actuellement, une attention accrue est prêtée au rôle des insectes et autres petits invertébrés terrestres dans l'alimentation des sociétés traditionnelles.

Les insectes sont en effet considérés comme un aliment complet et complémentaire et à forte valeur nutritive (DEFOLIART, 1992). Encore mal évaluée, la consommation d'insectes constitue pourtant un apport protéique non négligeable dont l'importance s'est accrue par son caractère saisonnier et par le fait qu'il concerne une fraction de la population, à savoir les femmes et les enfants pour qui cet apport est, peut-être, plus nécessaire. Les insectes présentent comme avantage d'être souvent réunis en colonies (abeilles, fourmis, termites) ou temporairement agrégés (chenilles). Ce qui rend leur quête plus facile et abondante.

Les insectes ingèrent les plantes et synthétisent un certain nombre de composés chimiques, et par là même méritent que l'on développe davantage les recherches sur leur usage comme ressources naturelles et renouvelables pour l'alimentation et pour soigner des maladies et autres formes d'infections (MOTTE-FLORAC et al, 2003).

²⁴ <http://www.beghin-say.fr/>

Une chenille est une larve de lépidoptère²⁵ comme les papillons et les mites. Elle se nourrit principalement de feuilles et d'autres parties des arbres ou d'autres plantes. Les chenilles, tout en se nourrissant des feuilles de l'arbre – hôte, tombent à terre à la suite de leur poids excédant la résistance des feuilles qui les soutiennent et sont ainsi ramassées au sol. Les espèces des chenilles consommées appartiennent à diverses familles à savoir : les *Saturnidae* (*Athletes gigas*, *A.semialba*, *Bunaea alcinos*, *Bunaeopsis aurantiaca*, *Cinabra hyperbius*, *cirina spp.*, *Imbrasia spp.*, etc.), les *Notodontidae*, les *Sphingidae*, les *Platysphinx*, etc. Les *Saturnidae* seuls occupent 59 % (soit 44 espèces) des espèces des chenilles consommées en Afrique tropicale. Les chenilles sont en effet consommées cuites, frites ou grillées. La richesse nutritionnelle de quelques – uns des insectes et chenilles comestibles les plus communs en Afrique, est présentée dans le tableau n°8 ci – dessous.

Tableau n°8 : Valeur nutritionnelle de quelques espèces d'insectes comestibles (Oliveira, 1976 ; Wu leung et al, 1968 ; Dufour et Sanders, 2000 *In* MOTTE-FLORAC et al, 2003)

Insecte (nom vulgaire)	Insecte (nom scientifique)	Préparation	Humidité	Énergie kcal	Protéines g/100g	Lipides g/100g
Chenille du mopane	<i>Gonimbrasia belina</i>	Séchées	6,1	444	56,8	16,4
Larve de charançon du palmier	<i>Rhynchophorus phoenicis</i>	n.s	10,75	562	20,34	41,3
Criquet	<i>Locustana spp.</i>	cru	57,1	n.s	18,2	21,5
		frites	48,7	n.s	30,0	10,0
		farine	7,1	436	47,5	22,9
Sauterelle	<i>Zonocerus sp</i>	cru	62,7	170	26,8	3,8
		grillées moulus	7,0	420	62,2	10,4
Fourmi ailée (femelle)	<i>Carebara sp</i>	Cru	60	n.s	3,0	9,5
Fourmi ailée (mâle)	<i>Carabera sp</i>	Cru	60	n.s	10,1	1,3
Termite ailé (adulte)	<i>Macrotermes subyalinus</i>	n.s	0,94	612	38,42	46,1
Termite (soldat)	<i>Syntermes</i>	n.s	10,3	467	58,9	4,9

Composition pour 100g de portion comestible. n.s = non spécifié

D'après MALAISSE et al, au moins 64 espèces de chenilles dûment déterminées sont consommées tandis qu'en réalité plus d'une centaine d'espèces sont régulièrement concernées (MALAISSE et al, 2003 ; FAO/WUR, 2013).

²⁵ Ordre dans la classification des insectes.

Au Congo Brazzaville, l'importance de la consommation d'insectes a été analysée et il a été rapporté que ces aliments contribuent pour 40 % aux apports en protéines d'origine animale et que les chenilles fumées sont consommées dans l'ordre de 40 g par personne et par jour à Brazzaville entre novembre et janvier (AMISI et al, 2013).

En République Centrafricaine, tout comme au Congo Brazzaville, la consommation d'insectes est importante et fait partie d'une tradition populaire. *Imbrasia* est l'un des genres de chenilles de la forêt de N'gotto qui entre dans l'alimentation quotidienne des centrafricains en remplacement de la viande en période de disponibilité. Cette chenille a pour arbre hôte *Entandrophragma cylindricum*, première essence sollicitée par les sociétés forestières installées en Centrafrique (HLADIK A. et CM, 1995 ; NGASSE, 2003). Cette chenille fait son apparition généralement au cours du mois de juillet au niveau des régions forestières avoisinantes, alors que dans la forêt de Ngotto, c'est à compter de mi – août que les chenilles font l'objet de cueillette ou de ramassage. Elle est présente sur tous les marchés du pays soit fraîche ou séchée respectivement en juillet - août (période de disponibilité) ou au – delà. Sa vente rapporte environ 225 000FCFA (343 euros) de marge bénéficiaire mensuelle aux revendeuses (MBETID – BESSANE, 2005).

Pour nos essais, après identification de l'espèce de chenille d'intérêt, deux échantillons ont été achetés au marché *Simbanza* du quartier *Sango* dans le 3^e arrondissement de Bangui (R.C.A) : une quantité fraîche qui a été conservée au congélateur à – 4°C et une quantité séchée que nous avons réduite en poudre à l'aide d'un robot mixeur et conservée à température ambiante. Ces échantillons ont été conditionnés en sachets appropriés pour la préservation et durant le transport avant les traitements préliminaires notamment le séchage pour les chenilles fraîches.

2.4 LES PROCÉDÉS DE SÉCHAGE DES INGRÉDIENTS

2.4.1 GÉNÉRALITES SUR LE SÉCHAGE

Le séchage est un des procédés de conservation des aliments les plus anciens dont le principe consiste à abaisser l'activité de l'eau (a_w) afin d'atteindre un niveau tel que les microorganismes ne puissent plus se développer, et en général jusqu'à ce que la plupart des réactions de dégradation (chimique et enzymatique) soient ralenties. Le séchage ne tue pas les microorganismes qui contaminent les aliments mais arrête leur développement (BAZINET L. et CASTAIGNE F., 2011). On considère que lorsque le produit à étudier se trouve en équilibre avec un gaz, le rapport entre la pression partielle p de l'eau dans ce gaz et la pression de vapeur p' de l'eau pure à la même température est égal à l'activité de l'eau (a_w) du produit,

grandeur qui représente le *degré hygrosopique* ou l'*humidité relative* (φ) de ce gaz. Elle est aussi appelée l'humidité relative d'équilibre. La déshydratation ou le séchage des aliments procède par le chauffage du produit dans des conditions contrôlées afin d'évaporer la majorité de l'eau qu'il contient. Ceci implique deux phénomènes simultanés :

- un transfert de chaleur **externe** qui apporte l'énergie nécessaire au changement de phase de l'eau (liquide en vapeur) ;
- un transfert de chaleur **interne** qui entraîne l'eau dans l'aliment sous forme de vapeur.

La vitesse de déshydratation, la qualité du produit déshydraté et le coût de séchage seront fonction de ces phénomènes qui sont influencés par la température de séchage, la vitesse de l'air autour du produit, l'humidité relative et la surface du produit en contact de l'air.

Le séchage des aliments peut se faire selon trois types de procédés :

- le séchage par entraînement d'air (convection), ou par contact avec une surface chaude (conduction), où la chaleur est transmise à l'aliment par convection ou par conduction et/ou l'eau évaporée se mélange à l'air qui entoure l'aliment et l'entraîne ;
- le séchage sous vide où la chaleur est transmise à l'aliment par conduction, par radiation, ou par micro-ondes. La vapeur d'eau est enlevée par condensation ;
- la lyophilisation où l'aliment à l'état congelé est placé dans des conditions de température et de pression qui favorisent la sublimation de la glace. Dans ce cas, l'eau sublimée est condensée à l'état de glace (BONAZZI et *al*, 2003 ; BAZINET L. et CASTAIGNE F., 2011).

Pour ce faire, des essais de séchage ont été réalisés à l'étuve, au déshydrateur alimentaire et au lyophilisateur. Pour nous, il était important de tenir compte de l'issue du projet, c'est-à-dire une production locale à moindre coût mais aussi et surtout un produit à valeur nutritionnelle convenable pour le nourrisson et le jeune enfant. C'est pourquoi, les technologies envisagées devraient être transposables dans les conditions des pays en développement ou quelques paramètres tels que l'énergie obligent un investissement souvent non négligeable.

Des trois procédés de séchage décrits, seuls l'entraînement de l'air (convection) et le contact avec une surface chaude (conduction) ont été testés sur les échantillons de chenilles fraîches rapportées de la République Centrafricaine et de bananes douces fraîches achetées en France comme indiqué précédemment. Ces deux technologies pouvant être mises en œuvre dans un contexte – pays comme la République centrafricaine.

D'ailleurs, une étude du niveau d'insolation à partir de deux (2) sites du pays à savoir **Bangui** et **Bégoua** a évalué le séchage de deux produits alimentaires (Banane et Gombo²⁶) utilisant un séchoir solaire pliable et portatif et a montré que le séchage solaire peut être réalisé en conservant les apports nutritionnels de ces produits alimentaires (MALENGUINZA, 2012).

2.4.2 SECHAGE À L'ÉTUVE

La première solution qui a été envisagée est un séchage à l'étuve type *Memmert Incubateur BE 500* sur des échantillons de tranches de bananes coupées en rondelles de 3 et 5 mm d'épaisseur. Elles ont été placées à l'étuve à des températures ajustées respectivement de 65°C et 105°C pendant une durée de 6h. Quatre (4) pesées consécutives à intervalle de deux (2) premières heures ont été effectuées sur cinq (5) morceaux différents de bananes. Ce qui a permis de suivre la cinétique de séchage.

2.4.3 PROFIL DE SECHAGE DE LA BANANE A L'ETUVE

Les résultats de séchage des tranches de bananes aux températures de 65°C et 105°C et pendant 6h ont été présentés sous forme graphique après traitement sous Microsoft Excel 2010. Les figures n°4 et 5 ci – après présentent les évolutions de la déshydratation au cours du temps.

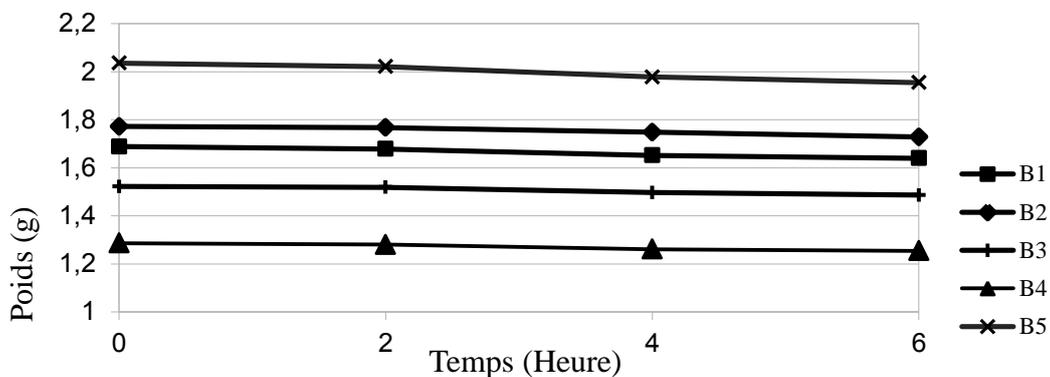


Figure n°4 : Cinétique du séchage de la Banane douce à l'étuve à 65°C

²⁶ *Abelmoschus esculentus*.

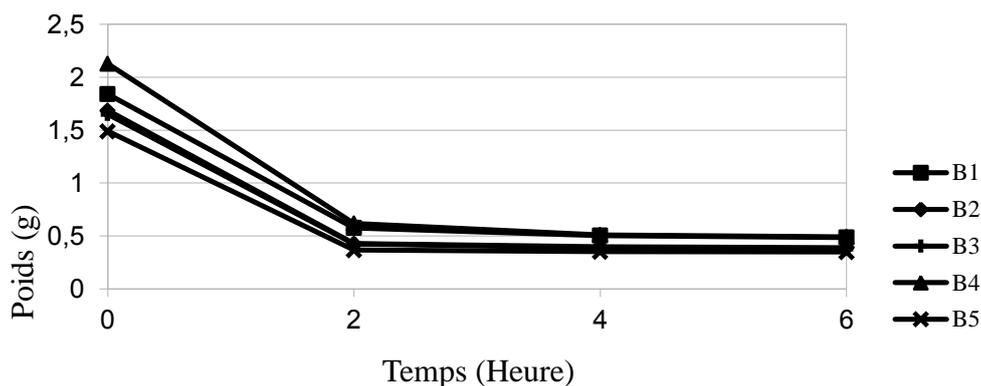


Figure n°5 : Cinétique du séchage de la Banane douce à l'étuve à 105°C

Après les mesures effectuées durant les 6 premières heures de séchage, les échantillons ont été laissés aux mêmes températures durant 24h. Les observations faites après 24h à 65°C et à 105°C montrent des échantillons craquants mais non friables. Leur broyage à l'aide d'un mini hachoir (Capacité : 550mL ; P130 x A 235 x L130mm) a conduit à des farines comportant des particules grossières majoritaires. Le rendement au tamisage étant de l'ordre de 5 à 10% ne permet pas d'envisager ce mode de séchage. En sus, de telles farines composées de moins de particules fines et de plus de particules grossières ne permettent pas d'obtenir une bouillie homogène puisque leur dissolution sera incomplète. C'est une des raisons ayant conduit à l'utilisation de la technique de lyophilisation qui, elle permet d'obtenir des farines composées de fines particules adaptées pour la préparation des bouillies même si cette solution ne sera pas extrapolable à court terme dans le cadre de ce projet. Notons que la mise à échelle de ce projet devra intégrer les normes requises pour les farines destinées à des préparations pour nourrissons. Cela suppose une alternative non seulement au séchage et mais également au broyage des ingrédients.

Un autre essai sur les chenilles a été réalisé. Elles ont été décongelées à température ambiante (entre 22° à 25°C) puis portées au déshydrateur alimentaire *Excalibur®* à 55°C pendant 24h suivant les normes indiquées pour l'utilisation du déshydrateur. Après les 24h, le broyage des chenilles a été effectué à l'aide du mini hachoir utilisé précédemment.

Les différents résultats ont conduit à choisir de sécher les différents ingrédients par lyophilisation avant leur broyage et transformation en poudre pour un meilleur diamètre des particules.

2.4.4 SECHAGE PAR LYOPHILISATION

La lyophilisation, encore appelée cryodessiccation, est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer par sublimation la glace d'un aliment congelé en évitant le passage par une phase liquide. On élimine ainsi la majeure partie de l'eau contenue dans le produit.

La sublimation de la glace peut avoir lieu lorsque le produit est porté à une température inférieure à $0,01^{\circ}\text{C}$ et à une pression résiduelle inférieure à $0,6\text{ kPa}$. Ces conditions permettent d'atteindre le point triple du diagramme de phase de l'eau (Cf. Figure n°6). Le procédé de lyophilisation repose sur deux opérations chronologiques : la congélation et la déshydratation. La congélation est déterminante pour l'obtention du résultat final. La déshydratation recouvre deux principes physiques : la **sublimation** des cristaux formés par congélation et la **désorption** finale de la quantité d'eau résiduelle, non congelée. Cette dernière fraction d'eau peut représenter de 10 à 30 % de l'eau initialement présente dans le produit (MARIN M. et RENE F., 2000).

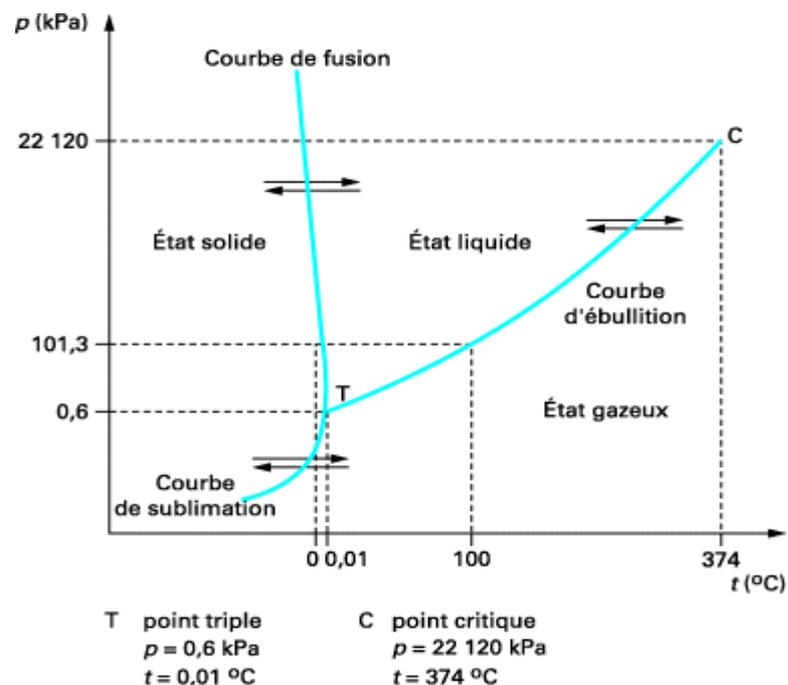


Figure n°6 : Diagramme de phases de l'eau (HEDOUX, 2013)

L'équipement utilisé est un lyophilisateur de type **Heto Power dry PL9000** comprenant des plateaux en acier inoxydable.

La méthode utilisée sur la banane notamment la découpe en tranches de 3 à 5 mm d'épaisseur et les conditions de lyophilisation a été appliquée pour l'apprêtement des autres ingrédients.

Les échantillons de banane, de mangue, d'albédo²⁷ d'orange ont été découpés en tranches carrées de 3 à 5 mm d'épaisseur afin d'augmenter la surface de contact et faciliter les transferts de chaleur. Les tranches, disposées dans un cristalliseur, sont congelées à -25°C puis transférées au lyophilisateur. Le passage de la glace en vapeur s'effectue à une pression basse après chauffage des plateaux. Cette basse pression est obtenue par une pompe à vide. La vapeur d'eau est piégée en la faisant givrer sur la surface froide du condensateur. Afin que la pression partielle de la vapeur d'eau reste faible dans le lyophilisateur, il faut éliminer la vapeur d'eau dès qu'elle est formée. Comme la lyophilisation se fait à l'état congelé, l'eau est évaporée par sublimation. Il n'y a donc pas de concentration additionnelle de solutés (sels, minéraux, sucre...) qui puisse endommager les principaux constituants de l'aliment, il n'y a pas de contraction de volume (il reste le même) et les réactions chimiques et enzymatiques sont quasiment arrêtées. Les chenilles fraîches ont été lyophilisées suivant le même procédé.

Après la lyophilisation, les échantillons ont été ensuite broyés à l'aide du mini hachoir déjà utilisé puis les poudres de bananes, de mangues et d'albédo d'orange ont été homogénéisées par tamisage.

Les poudres de chenilles, de bananes, de mangues et d'albédo d'orange obtenues après lyophilisation, broyage et tamisage, la farine de manioc et la pâte de maïs germé ainsi apprêtés ont ensuite servi à la préparation d'une série de douze bouillies infantiles correspondants aux expériences définies par la matrice d'*Hadamard* et suivant les opérations unitaires de transformation artisanales observées dans différents ménages et reproduites au laboratoire.

Le diagramme technologique de préparation des bouillies est décrit et représenté ci – dessous.

2.4.5 DIAGRAMME DE PREPARATION DES BOUILLIES

Le mode opératoire adopté pour la préparation des bouillies au laboratoire a permis d'établir le diagramme technologique. La description des opérations unitaires réalisées a été la suivante :

1. Mélanger les ingrédients secs suivant les proportions et y ajouter 1/3 de la quantité d'eau (Variable X10) pour obtenir un mélange humide (pâte molle) ;
2. Chauffer 1/3 de la quantité d'eau jusqu'à l'apparition de bulles d'ébullition irrégulière puis ajuster la température (Variable X9) ;

²⁷ Couche interne blanche.

3. Verser progressivement le mélange humide dans l'eau chaude tout en homogénéisant (Variable X11²⁸).
4. Rajouter le 1/3 d'eau, homogénéiser en observant l'apparition des bulles de cuisson ;
5. A l'apparition des bulles de cuisson, démarrer le chronomètre pour mesurer le temps de cuisson ;
6. Arrêter la cuisson une minute au moins avant la fin du temps requis, conditionner et refroidir à 20°C (eau du robinet) avant les mesures de texture.

La suite de ces opérations traduite en diagramme technologique est représentée par la figure n°7.

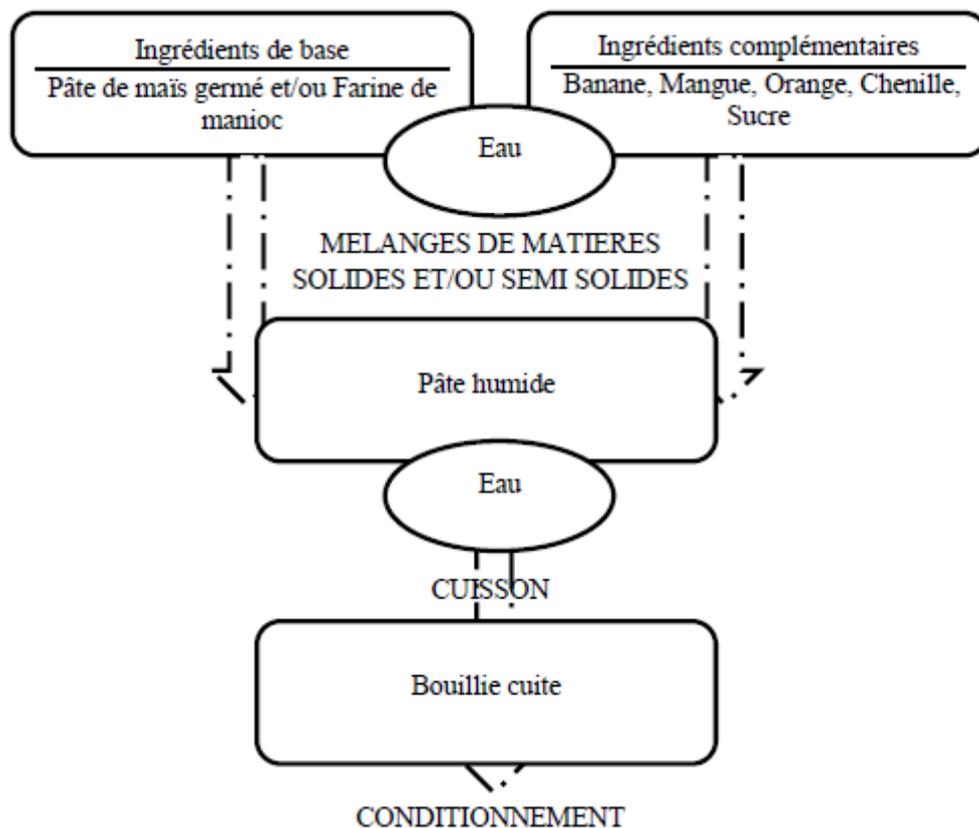


Figure n°7 : Diagramme technologique de préparation des bouillies.

²⁸ La vitesse d'agitation n'a pas été appliquée par un réacteur d'agitation. L'homogénéisation a été faite manuellement.

2.5 ANALYSE INSTRUMENTALE DU PROFIL DE TEXTURE (TEXTURE PROFILE ANALYSIS – TPA) DES BOUILLIES

Dans le domaine alimentaire, la texture est considérée essentiellement comme une propriété sensorielle.

Elle est définie comme la propriété sensorielle d'un aliment résultant de l'ensemble de ses caractéristiques mécaniques et structurales (géométriques et de surface) et perceptibles par des récepteurs tactiles, mécaniques, visuels et auditifs (DELACHARLERIE S. et DE BIOURGE S., 2009).

La texture regroupe un grand nombre de termes tels que la *tendreté* pour la viande, l'*onctuosité* ou la *fermeté* pour des fromages, l'aspect *collant* pour des pâtes ou encore les caractères *craquant*, *friable*, *dur* et *croustillant* pour des biscuits. Les aliments étant des matériaux vivants, ils subissent des modifications de forme, de taille, de structure. Ils sont sensibles à l'humidité, à la température et à l'oxygène. Nonobstant les études sur les produits alimentaires principalement axées sous des aspects nutritionnels, d'une part, et biochimiques, d'autre part et puisque la majeure partie des transformations qui se déroulent dans l'aliment au cours des opérations technologiques ou de conservation sont des opérations à caractère biochimique, le produit alimentaire est aussi un matériau sur lequel il est intéressant de mesurer des propriétés mécaniques. Ainsi, les solides d'origine biologique ont une élasticité qui change avec l'âge et diverses causes physiologiques. Les liquides d'origine biologique ont un comportement, le plus souvent non newtonien. Lors de la préparation, de la transformation ou de la formulation de ces matières premières, de nombreuses techniques sont employées et de nombreuses interactions ont lieu entre les constituants qui viennent modifier profondément et de façon irréversible la texture de ces matériaux (SCHER, 2006 ; NJINTANG et *al*, 2009 ; KARAM et *al*, 2012). Les mesures de texture sont essentiellement utilisées pour la caractérisation des solides (et semi – solides). Pour les fluides ou liquides, ce sont plutôt des mesures rhéologiques qui sont effectuées. C'est une méthode directe permettant de mesurer les propriétés mécaniques du produit, ce qui correspond à la définition de la texture. Le principe est basé sur une déformation du produit et la mesure de sa réaction à la déformation (force de réaction en fonction de la distance de déformation ou distance parcourue en fonction d'une force de déformation). Ces mesures sont réalisées à l'aide de texturomètres qui sont des capteurs de force. Ils permettent d'effectuer plusieurs tests de type compression (TPA), extrusion, cisaillement, flexion, étirement et traction, pénétration, etc.

Les mesures rhéologiques ont été réalisées sur les douze bouillies du plan d'expériences à l'aide d'un texturomètre TA *Plus* « texture analyser » de chez Lloyd Instruments™. Le type de test utilisé est un test de pénétration couplé à un TPA. Il consiste à faire pénétrer une sonde (aiguille, plate ou cylindrique) dans l'aliment et à mesurer la force nécessaire pour atteindre une certaine profondeur. Ce test est généralement utilisé pour évaluer les propriétés mécaniques de produits tels que les fruits et les légumes, mais également pour suivre l'évolution texturale de fromages, mesurer la tendreté de carcasses bovines, la dureté des bonbons, etc.

Le TPA associé permet d'obtenir de façon simultanée plusieurs paramètres structuraux dont la corrélation avec certaines appréciations sensorielles est élevée. La spécificité du TPA est qu'il procède par deux compressions successives cherchant ainsi à imiter les contraintes subies par le produit lors de la mastication (DELACHARLERIE S. et DE BIOURGE S., 2009). Les données recueillies sont traitées à l'aide d'un logiciel et traduites en courbe – type comportant des paramètres tels que la fracturabilité, la dureté, l'adhérence, le filant, l'élasticité, la cohésion et le collant.

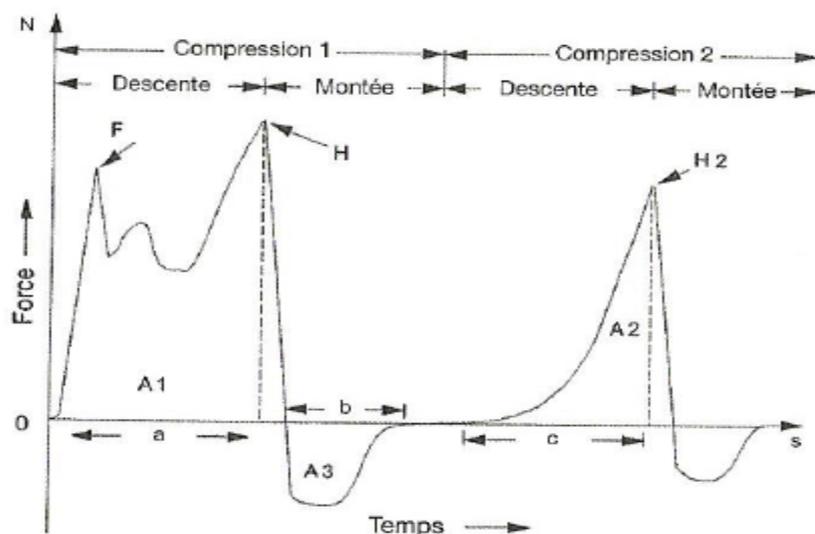


Figure n°8 : Courbe – type obtenue d'un test TPA (BOURNE, 2002 in DELACHARLERIE S. et DE BIOURGE S., 2009).

A partir d'une courbe – type TPA, différents paramètres peuvent être calculés de façon à obtenir une corrélation avec l'analyse sensorielle. La signification de ces paramètres est présentée dans le tableau n°9 ci – après.

Tableau n°9 : Signification des paramètres mesurés lors d'un test TPA

Paramètre	Calcul	Unité	Signification
Fracturabilité	= F	Newton (force)	Force nécessaire pour entrer dans le produit
Dureté	= H	Newton (force)	Force opposée par le produit à l'avancement de la sonde
Adhérence	= A3	Newton x mètre (travail)	Force exercée par le produit sur la sonde qui se retire
Filant	= b	Mètre (distance)	Distance à laquelle le produit reste attaché à la sonde
Elasticité	= c/a	Sans dimension (rapport)	Rapport des distances parcourues lors des deux compressions*.
Cohésion	= A2/A1		
Gumminess (Collant)	= Hx(A1/A2)	Newton (force)	Le produit a été déstructuré par la première compression, la cohésion est faible**.
Chewiness (masticabilité)	= Hx(A1/A2)x(c/a)	Newton (force)	Difficulté à mâcher (cohésif et élastique)

*Plus le rapport est petit (plus la seconde distance est petite), moins le produit a récupéré de la hauteur entre les deux compressions, ce qui indique une élasticité faible.

** Plus le second pic est petit par rapport au premier.

Le mode opératoire qui a servi pour l'analyse du profil de texture est alors décrit en prélude à la présentation des résultats préliminaires.

MODE OPERATOIRE

Les pratiques d'alimentation du nourrisson et du jeune enfant observées et rapportées²⁹ ont montré que très souvent, les bouillies sont liquéfiées par ajout systématique d'eau puis homogénéisation. En choisissant comme réponses la dureté et le collant pour observer le comportement rhéologique des bouillies, il nous a paru important d'identifier les facteurs pouvant influencer sur ces réponses, et qui offriraient une texture de bouillie adaptée.

La sonde utilisée est un cylindre d'aluminium de 36 mm de diamètre. Les paramètres de mesures retenus ont été : une vitesse de pénétration de **70 mm/min** avec une distance de pénétration de **2 cm** ; un temps de maintien **d'une seconde** et une vitesse au retour de **100 mm/min**.

2.6 RESULTATS PRELIMINAIRES

Les résultats préliminaires que nous présenterons dans ce chapitre concernent respectivement l'appréciation organoleptique et l'analyse des matrices du plan d'expériences générées par MODDE 5.0 à partir des facteurs définis.

²⁹ ICASEES, 2012.

Plus précisément, les résultats des analyses des mesures de la dureté et du caractère collant des bouillies avec leurs coefficients de corrélation et le calcul des effets principaux des différents facteurs.

2.6.1 APPRECIATION ORGANOLEPTIQUE DES BOUILLIES

L'évaluation sensorielle des aliments a pour objectif la détermination de leurs propriétés sensorielles ou organoleptiques et l'étude des préférences ou aversions qu'ils suscitent chez le consommateur.

Les caractéristiques organoleptiques d'un aliment sont définies comme l'ensemble des appréciations subjectives perçues à travers les organes de sens humains. (ACTIA, 2014). Dans le cadre de cette étude et au stade actuel des expériences, il ne nous a pas été possible de mettre en œuvre une évaluation sensorielle méthodique. Par contre, quelques caractéristiques organoleptiques ont pu être relevées.

Les bouillies préparées ont été soumises à une appréciation organoleptique par deux observateurs. Deux caractéristiques, à savoir la couleur et l'aspect au toucher ont été appréciées et rapportées dans le tableau n°10 ci – bas.

Une des photos prises au cours des préparations montre l'échantillonnage par transvasement à l'aide d'une spatule dans un bocal pour les mesures de profil de texture.



Figure n°9 : Aspect d'une des bouillies préparées à partir du plan d'expériences

Tableau n°10 : Couleur et aspect des bouillies préparées.

Essai n°	Couleur	Aspect
1	Grisée – beige	Visqueux, collant
2	Jaunâtre	Visqueux, moins collant au doigt
3	Grise	Visqueux
4	Grise, brune avec points noirs	Fluide
5	Jaunâtre	Collant (purée)
6	Jaunâtre	Viscoélastique
7	Grise	Pâteux, collant
8	Jaunâtre	Visqueux, non collant au doigt
9	Grise avec points noirs	Visqueux, non collant au doigt
10	Grise avec points noirs	Visqueux, non collant au doigt
11	Marron – grise avec points noirs	Viscoélastique
12	Jaunâtre	Viscoélastique

2.6.2 RESULTATS DE L'ANALYSE INSTRUMENTALE DU PROFIL DE TEXTURE DES BOUILLIES DU PLAN D'EXPERIENCES

Les mesures de texture des bouillies réalisées à l'aide du *Texture Analyser TA Plus* ont été automatiquement analysées par le logiciel *NEXYGEN Plus* (Lloyd Instruments™). Les valeurs de la dureté et du collant ont permis le tracé de graphique dont l'allure est présentée ci – dessous (Figure n°10).

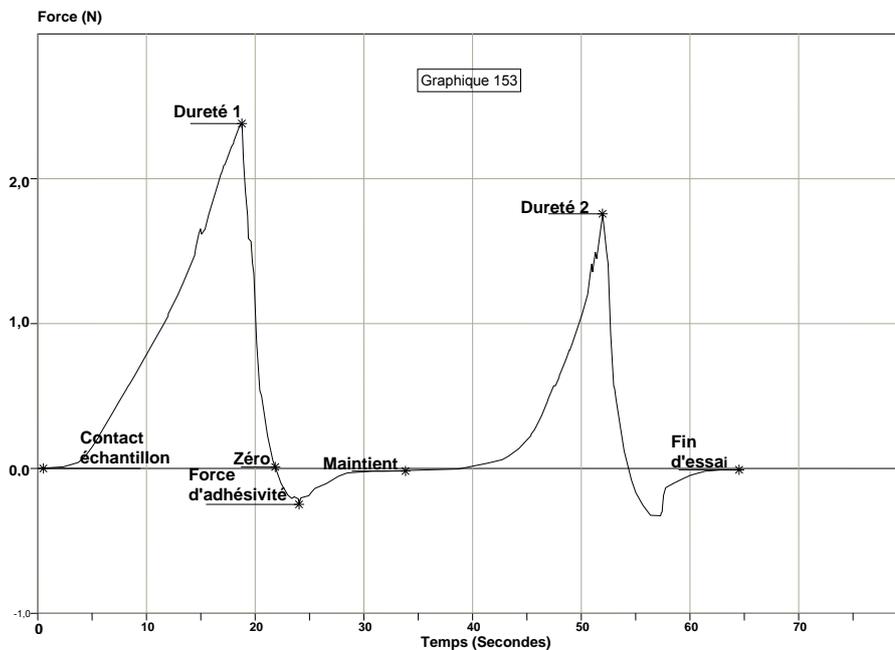


Figure n°10 : Profil de texture d'une des bouillies du plan d'expériences.

Ce graphique présente les courbes à l'allure Gaussienne (en cloche) liées aux mouvements de pénétration et de retrait de la sonde et aux contraintes qui s'y opposent. Les valeurs de force liées à la dureté d'une part et celles liées à l'adhésivité, que nous avons assimilé au collant d'autre part ont été générées par *NEXYGEN Plus*. Ces valeurs, qui représentent les réponses dans le plan d'expériences sont reportées dans le tableau n°11 ci – dessous.

Tableau n°11 : Valeurs des duretés et du collant enregistrées par *NEXYGEN Plus*.

N°	Dureté 1 (N)	Force d'adhésion (N)	Dureté 2 (N)	Collant1 (N)
Essai1	1,911	-0,433	1,664	0,014
Essai2	0,379	-0,116	0,322	0,14
Essai3	0,145	-0,061	0,139	0,041
Essai4	0,049	-0,015	0,049	0,053
Essai5	0,305	-0,228	0,315	-0,012
Essai6	1,605	-0,444	1,501	0,207
Essai7	0,223	-0,123	0,218	0,027
Essai8	0,342	-0,145	0,324	0,063
Essai9	1,146	-0,408	0,933	0,084
Essai10	0,567	-0,243	0,513	0,098
Essai11	0,458	-0,241	0,425	0,014
Essai12	0,251	-0,162	0,248	0,006

N : Newton.

Ces valeurs ont été intégrées comme réponse dans MODDE 5.0 puis analysées afin d'évaluer les effets des différents facteurs étudiés. Ces effets sont représentés par les histogrammes des figures n°11 et 12 respectivement. Les effets des différents facteurs sur la dureté sont étudiés à partir de l'histogramme figure n°11 et le tableau n°12 représentés ci – après.

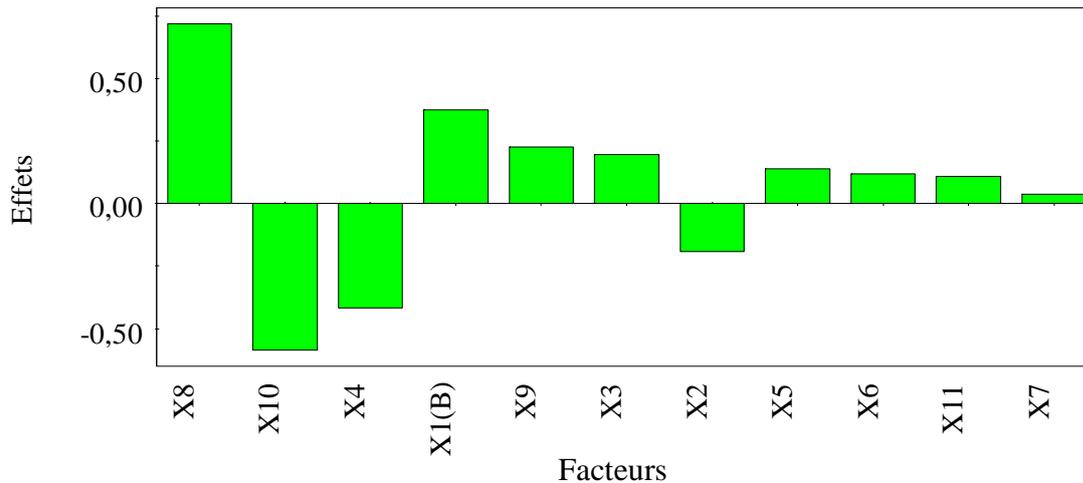


Figure n°11 : Histogramme des effets de facteurs sur la dureté

Tableau n°12 : Coefficient des effets pour la dureté

Dureté 1	Coeff. SC
Constant	0,615
X1	DF = 1
X1(A)	-0,187
X1(B)	0,187
X2	-0,096
X3	0,097
X4	-0,208
X5	0,069
X6	0,059
X7	0,019
X8	0,358
X9	0,114
X10	-0,292
X11	0,054

En ce qui concerne les effets les plus importants, ce sont respectivement les facteurs X8 (**Temps de cuisson**) et X10 (**Volume d'eau**). L'effet du facteur X8 étant positif cela signifie que plus on allonge le temps de cuisson plus la consistance devient dure. En effet, un temps de cuisson plus long (X8) combiné à la température de cuisson (X9) appliquée, entraînent une évaporation de l'eau contenue dans la bouillie et une tendance du milieu à devenir compact et dur. L'effet de cuisson peut aussi entraîner des modifications de propriétés des agents structurants tels que les protéines et l'amidon.

Parallèlement on observe l'effet négatif du facteur X10 (**Volume d'eau**) qui signifie que la quantité d'eau apportée au milieu réduit la consistance dure. Donc, plus on ajoute de l'eau dans le milieu et plus le milieu devient liquide par dilution et donc moins sujet au durcissement. A côté de ces deux facteurs, on retrouve également deux autres paramètres dont l'influence est plus modérée, il s'agit des paramètres X4 (**Quantité de mangue**) et X1 (**Type de farine**). On constate que lorsque l'on ajoute de la mangue la consistance de la bouillie devient moins dure. Cet effet peut s'expliquer par la présence de fibre contenue dans la pulpe de mangue séchée qui peut entraîner une rétention plus importante de l'eau présente dans le milieu et qui aura plus de difficulté à s'évaporer lorsque celui-ci est chauffé (Cf. Tableau n°7³⁰). A l'inverse, on remarque que le type de farine constituée de 100% de farine de maïs germée (X1B) favorise la fluidité du milieu contrairement à une farine composée de 50% de maïs et de 50% de manioc (X1A). En effet, Les travaux de ZANNOU-TCHOCKO et *al.* ont montré que l'incorporation de 5 à 10% de farine de maïs germé à des bouillies à base de manioc permettaient de les rendre fluides ou liquides (ZANNOU-TCHOCKO et *al.*, 2011) conséquence de la richesse en alpha amylases de la farine de maïs germé. Cette solution a été utilisée pour étudier la densité énergétique des bouillies traditionnelles dites de sevrage en vue d'améliorer leurs viscosités (TRECHE, 1999). Le rôle des autres facteurs peut être négligé en comparaison de ces 4 facteurs explicités ci-dessus.

Les effets des facteurs sur le collant sont étudiés à partir de la figure n°12 et du tableau n°13 générés par MODDE 5.0 et représentés ci – dessous.



Figure n°12 : Histogramme des effets des facteurs sur le collant.

³⁰ Tableau n°7 : Composition nutritionnelle des ingrédients.

Tableau n°13 : Coefficient des effets pour le collant

Collant	Coeff. SC
Constant	0,061
X1	DF = 1
X1(A)	-0,022
X1(B)	0,022
X2	0,008
X3	0,006
X4	-0,002
X5	0,018
X6	0,019
X7	-0,027
X8	0,025
X9	0,006
X10	0,007
X11	-0,029

Pour l'étude sur le collant et en se basant sur la figure n°12 et le tableau n°13, on remarque que les facteurs les plus importants sont : X11 (Agitation), X7 (Quantité de banane), X8 (Temps de cuisson), X1B (Type de farine), X6 (Quantité de chenille) et X5 (Quantité de poudre d'orange).

On peut visualiser figure n°12 l'effet négatif de la **vitesse d'agitation** sur le collant de la bouillie. On suppose que la texture collante de la bouillie s'est réalisée suite aux interactions, à des liaisons ou des réactions de groupements fonctionnels de composés organiques présents dans les ingrédients utilisés au cours de la préparation. Ce qui est traduit un comportement de fluide rhéofluidifiant. L'effet négatif de l'agitation peut s'expliquer par le fait que plus on agite et plus les structures de consistance de la bouillie sont rompues. On observe que lorsque l'on ajoute une **quantité de banane**, le collant de la bouillie chute. La banane est un fruit composé d'amidon et de minéraux qui a tendance à s'hydrolyser rapidement (Cf. Tableau n°7). Ce phénomène sera ici amplifié en raison du **volume d'eau** apportée au milieu. Comme pour la dureté, un **temps de cuisson** long entraîne un effet collant soit, en conséquence de l'évaporation de l'eau du milieu, soit des modifications d'agents texturants créant une tendance à une caramélisation. Le **type de farine** impacte également le collant comme la dureté.

Une farine à 100% de maïs germée sera plus favorable à l'augmentation de la valeur du collant pour les raisons que des bouillies obtenues en absence de farine de maïs germé sont lourdes et visqueuses avec des vitesses d'écoulement nulles. C'est pourquoi, il a été recommandé que des proportions de 5 à 15% voire un peu plus soient incorporées afin de réduire considérablement la viscosité des bouillies et obtenir une concentration satisfaisante (TRECHE, 1999 ; ZANNOU-TCHOCKO et *al.*, 2011).

L'apport de chenille et de poudre d'orange est également favorable à l'augmentation du collant. Il a été démontré que, la poudre du blanc d'orange encore appelé albédo contient une part importante de pectine et que celle – ci entre en jeu dans les processus de gélification en raison des effets de structuration qu'elle apporte à la matière (BENALI et *al.*, 2014). L'apport de chenille fait également augmenter le collant. Les travaux réalisés sur les propriétés fonctionnelles telles que la capacité d'absorption de l'eau et la capacité de moussage des chenilles du genre *Imbrasia* ont montré que ces espèces disposaient d'un potentiel de rétention d'eau qui justifie les observations à propos de leur apport au collant des bouillies (AKPOSSAN et *al.*, 2015). Les autres paramètres de l'étude seront considérés comme négligeables sur le collant.

On peut établir les surfaces de réponses (représentées figures n°13 et 14) à partir du modèle mathématique en fonction du temps de cuisson et de la quantité d'eau ajoutée et des autres paramètres listés ci-dessous ajustés pour obtenir les valeurs les plus élevées de collant et de dureté (Tableau n°14).

Tableau n°14 : Facteurs et niveaux correspondants pour une étude par surfaces de réponses.

Facteurs	Quantité (g)	Niveau
Type de farine	B	+ 1
Arachide	5	- 1
Sucre	0	- 1
Mangue	0	- 1
Orange	3	+ 1
Chenille	3	+ 1
Banane	0	- 1
Température de cuisson	85	+ 1
Vitesse d'agitation	200	- 1

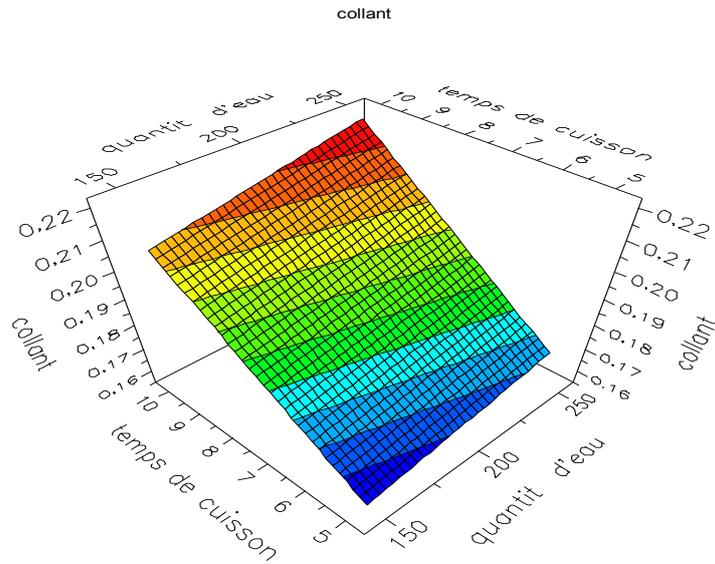


Figure n°13 : Surface de réponses pour le collant.

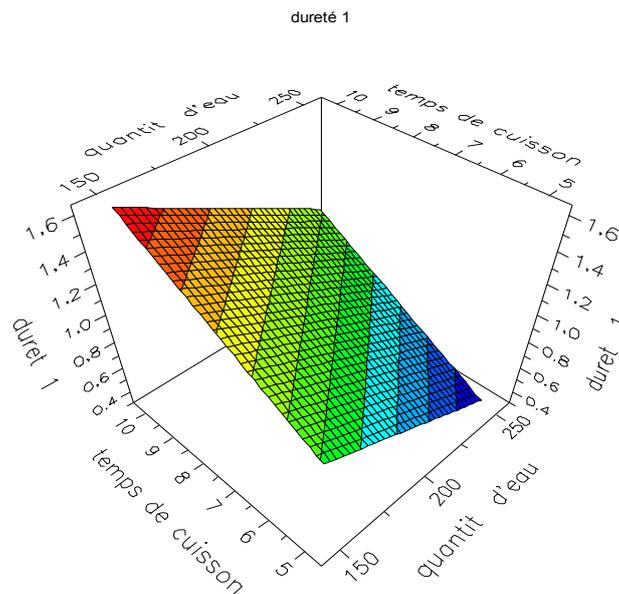


Figure n°14 : Surface de réponse pour la dureté.

Le collant et la dureté sont des éléments de structures importants lorsque l'on étudie un milieu destiné à l'alimentation qui plus est du jeune enfant. Il faut donc trouver un meilleur compromis entre ces deux valeurs. Pour cela, nous avons mesuré au texturomètre la dureté et le collant de deux recettes infantiles disponibles dans le commerce.

Ces deux recettes sont destinées respectivement pour des nourrissons dès 4 mois (R1) et dès 6mois (R2). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau n°15 ci-dessous.

Tableau n°15 : Valeurs des duretés et du collant enregistrées par *NEXIGEN Plus*

Echantillon	Dureté 1 (N)	Force d'adhésion (N)	Dureté 2 (N)	Collant (N)
R1 (4mois)	0,095	- 0,022	0,092	0,065
R2 (6mois)	0,085	- 0,025	0,088	0,048

2.6.3 COMPARAISON ENTRE LA DURETE ET LE COLLANT DES BOUILLIES AVEC CEUX DES DEUX RECETTES DU COMMERCE

En comparant les valeurs du tableau n°15 avec celles du tableau n°11, on observe une approximation entre les duretés de R1 et les duretés de l'essai n°3. De même, les valeurs du collant de R1 et R2 correspondent sensiblement à celles des essais 3, 4 et 8.

Tableau n°16 : Comparaison de la dureté et du collant des bouillies expérimentales avec 2 recettes de bouillies commerciales

Echantillons	Dureté (N)	Collant (N)
R1 (4mois)	0,095	0,065
<i>R2 (6mois)</i>	-	<i>0,048</i>
Essai3	0,145	<i>0,041</i>
<i>Essai4</i>	-	<i>0,053</i>
<i>Essai8</i>	-	0,063

2.7 CONCLUSION

En faisant varier les différentes quantités d'ingrédients sur les 12 essais du plan d'expériences, nous pouvons retenir que la quantité d'eau (X10) doit être maintenue à 250ml et qu'il est préférable d'ajouter du sucre³¹ de table (X3) à hauteur de 5g pour obtenir une dureté et un collant acceptables. Le reste des paramètres ne semble pas avoir d'impact aussi significatif que ces deux facteurs au regard de ces deux caractéristiques que sont la dureté et le collant. Toutefois, les analyses que nous décrivons au chapitre n°3 concernant les protéines, vitamines et lipides sont importantes et voire prioritaires afin d'établir la meilleure composition nutritionnelle de l'aliment souhaité.

³¹ Saccharose.

CHAPITRE 3
CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES BOUILLIES
DU PLAN D'EXPERIENCES

3.1 INTRODUCTION

Les objectifs du projet étaient, à titre de rappel, la formulation et l'enrichissement en protéines et vitamines d'une bouillie alimentaire destinée aux nourrissons et jeunes enfants à partir de 6 mois, période de l'amorce du sevrage et surtout moment de leur vie qui requiert une alimentation complémentaire saine et équilibrée. Nous avons construit un plan d'expériences de type *Hadamard* qui a permis la préparation d'une série de douze (12) bouillies à base de divers ingrédients à des proportions différentes et avec des paramètres physico – chimiques contrôlés. Une analyse organoleptique et une analyse rhéologique ont été réalisées sur des échantillons de ces bouillies. Ces analyses ont permis d'apprécier, de prime abord, une qualité sensorielle susceptible de satisfaire le profil attendu du produit selon les objectifs fixés. Il reste que la valeur nutritionnelle du produit nécessite des analyses biochimiques quantitative et qualitative pour les nutriments cibles.

Dans ce chapitre, nous allons présenter les analyses quantitatives de composés biochimiques d'intérêt nutritionnel à savoir les macronutriments, essentiellement les protéines et des lipides et les micronutriments, spécifiquement, la vitamine C. Ces voies d'exploration de la valeur nutritionnelle des bouillies devraient nous orienter quant aux meilleures proportions d'ingrédients à utiliser pour aboutir à la formule enrichie répondant aux besoins nutritionnels chez l'enfant dans la tranche d'âge entre 6 à 24 mois. En avant – propos, un rappel sur quelques propriétés des aliments sera fait.

3.2 GENERALITES SUR LA COMPOSITION DES ALIMENTS

La nourriture est essentielle à la vie. Chaque jour, notre prise alimentaire se compose d'aliments solides et liquides. Une partie des aliments que nous ingérons sert à construire et à renouveler nos structures cellulaires et à synthétiser des molécules fonctionnelles nécessaires au maintien de notre homéostasie. La plus grande partie des aliments ingérés représente une source d'énergie qui alimente les nombreuses réactions métaboliques au niveau de la cellule, de même qu'au sein de l'organisme tout entier (MURAT, 2009). On désigne par aliment une matière d'origine agricole ou industrielle dont la consommation sert d'abord à couvrir les besoins nutritionnels puis à maintenir l'individu en état de santé.

Les aliments tirent leur valeur nutritionnelle d'un nombre restreint de substances chimiques qui, au cours de leur métabolisme, ont la propriété de libérer de l'énergie et/ou de servir de matériaux de construction ou de protection : ce sont les nutriments.

Un nutriment est défini comme un élément simple et absorbable de la ration alimentaire qui sert à la couverture des besoins nutritionnels. Les besoins nutritionnels sont subdivisés en besoins énergétiques et en besoins plastiques (construction et protection) et sont satisfaits par les nutriments qui sont fournis par l'alimentation (FAO/OMS/UNU, 1986 ; FRENOT *et al*, 2001 ; FARDET *et al*, 2013). L'énergie et les matériaux de construction et/ou de protection apportés à l'organisme doivent être en quantité suffisante mais aussi et surtout en adéquation avec les besoins nutritionnels de celui – ci. En biochimie alimentaire, l'énergie produite par la combustion des aliments est mesurable et constitue l'énergie calorifique. Son unité de mesure est la kilocalorie (kcal) qui équivaut à la chaleur nécessaire pour faire passer un litre d'eau de 14,5°C à 15,5°C tel que défini en sciences physiques. En nutrition et en sciences alimentaires, **1 kcal** est équivalent à **4,184 kJ**. Le Joule est l'unité de chaleur nécessaire pour déplacer 1 kg sur une distance de 1 mètre par une force équivalente à 1 Newton. Sur cette base, les nutriments sont classés en deux catégories :

- Les **macronutriments** : protéines, lipides, glucides et certains sels minéraux dont les apports sont supérieurs à 1g/jour ;
- Les **micronutriments**, qui regroupent les vitamines, certains minéraux et les oligoéléments dont les apports respectifs sont évalués comme étant de l'ordre de milligrammes par jour (mg/jour) ou de microgrammes par jour (µg/jour).

Il existe d'autres constituants alimentaires qui ont un intérêt nutritionnel non négligeable tels que :

- Les fibres alimentaires non digestibles mais susceptibles d'intervenir de manière significative dans la régulation des métabolismes digestifs, ou comme véhicule pour d'autres nutriments et habitat pour la flore bactérienne. Elles contribuent à l'élimination des déchets métaboliques ;
- L'eau, quant à elle, assure le rôle plastique de protection, de régulation et de construction par excellence. L'eau corporelle conditionne le métabolisme des électrolytes tels que le Sodium, présent dans les liquides extracellulaires et le Potassium intracellulaire.

Chez un nourrisson en bonne santé, le lait d'une mère également en bonne santé apporte suffisamment d'eau et d'électrolytes pendant au moins quatre à six mois et il n'a pas besoin de suppléments d'eau, même dans les climats chauds. L'apport d'eau et l'équilibre électrolytique sont importants chez le nourrisson malade. Par exemple, en cours d'un épisode de diarrhées ou de maladie quelconque (paludisme, etc.), le nourrisson a besoin de boissons supplémentaires. L'eau est éliminée principalement sous forme d'urine par les reins, qui régulent l'élimination de façon à maintenir l'équilibre hydro-électrolytique et acido-basique de l'organisme. Enfin, une faible quantité d'eau est éliminée dans les selles, sauf en cas de diarrhée, où cette quantité peut devenir très importante (DE BENOIST *et al*, 2011). Le tableau n°17 ci – dessous présente les éléments de classification et les fonctions principales de quelques nutriments dans l'organisme.

Tableau n°17 : Catégories de nutriments et fonctions principales dans l'organisme (Adapté de LATHAM, 2001 & MURAT, 2009)

Classification	Catégories	Nutriments cellulaires absorbés	Fonctions principales dans l'organisme
Macronutriments	Protéines	Acides aminés, peptides	Structurale et énergétique, de croissance et réparation/cicatrisation
	Lipides	Acides gras, glycérol, cholestérol	Energie et acides gras essentiels
	Glucides complexes	Oses	Structurale et énergétique, (Energie mécanique & de régulation thermique)
	Glucides simples		
	Certains sels minéraux (Ca*, P**) dont les apports sont supérieurs à 1g/j	Sels minéraux	Structurale, Formation des tissus, métabolisme et protection
	Eau	Eau	Structurale, Fournit les liquides du corps et contribue à la régulation thermique
Micronutriments	Minéraux et vitamines dont les apports se situent entre les milli et les microgrammes	Minéraux et vitamines	Structurale et catalytique, Formation des tissus, métabolisme et protection

*Calcium ; ** Phosphore

L'alimentation apporte quotidiennement des quantités suffisantes de ces électrolytes. Mais, en cas de perte liquidienne, par diarrhée ou hémorragie, l'équilibre sanguin peut être perturbé.

A la suite de cette présentation synoptique, nous allons rappeler quelques éléments d'importance sur les nutriments qui feront fait l'objet de nos analyses quantitatives dans les bouillies.

3.2.1 LES PROTEINES ALIMENTAIRES

Les protéines sont des macromolécules essentielles à la vie. Elles sont constituées d'un enchaînement d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques. Le besoin quotidien en protéines chez l'homme se situe entre 15% et 25 % de matière sèche. Les protéines alimentaires représentent les principales sources d'azote et d'acides aminés. Certains de ces acides aminés assurent plusieurs fonctions métaboliques : substrats de la synthèse protéique et du métabolisme énergétique et précurseurs de composés azotés importants dans l'organisme (acides nucléiques, monoxyde d'azote, glutathion...). Elles permettent de satisfaire aux besoins en acides aminés essentiels qui varient en fonction de l'âge et de l'état physiologique (BOUTRY et *al*, 2008). Les sources alimentaires de protéines sont constituées par les sources animales (viande, poisson, lait) et végétales (blé, riz, soja, pomme de terre) traditionnelles et des sources alternatives (microbiennes ou d'organismes génétiquement modifiés) (TOME et *al*, 1997). Les acides aminés sont une classe de composés chimiques possédant deux groupements fonctionnels : un groupement carboxyle $-\text{COOH}$ et un groupement amine $-\text{NH}_2$. Parmi ceux – ci, les acides α -aminés se distinguent par un groupement amine lié à l'atome de carbone adjacent au groupement acide carboxylique (le carbone α), ce qui leur confère la structure générique ci – dessous dans laquelle R représente la chaîne latérale qui identifie l'acide α -aminé (BADOUD et *al*, 2010).

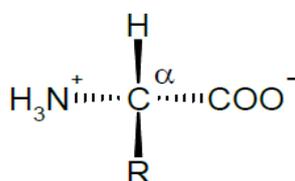


Figure n°15 : Forme générique d'un acide aminé³².

³² Advanced Chemistry Development/ChemSketch 12.01, <http://www.acdlabs.com/>

Le carbone portant quatre groupements différents (sauf pour la Glycine Cf. figure n°16 – 8) est asymétrique. Ce qui permet de caractériser les acides aminés en molécules chirales possédant deux isomères possibles : l'un de la série D et l'autre de la série L. Il s'est trouvé que tous les acides aminés naturels isolés du vivant sont de la série L.

On dénombre vingt (20) acides aminés constituant de protéines alimentaires (BOUTRY et al, 2008 ; DUBOIS, 2008). Les structures chimiques de ces 20 acides aminés sont représentées par la figure n°16.

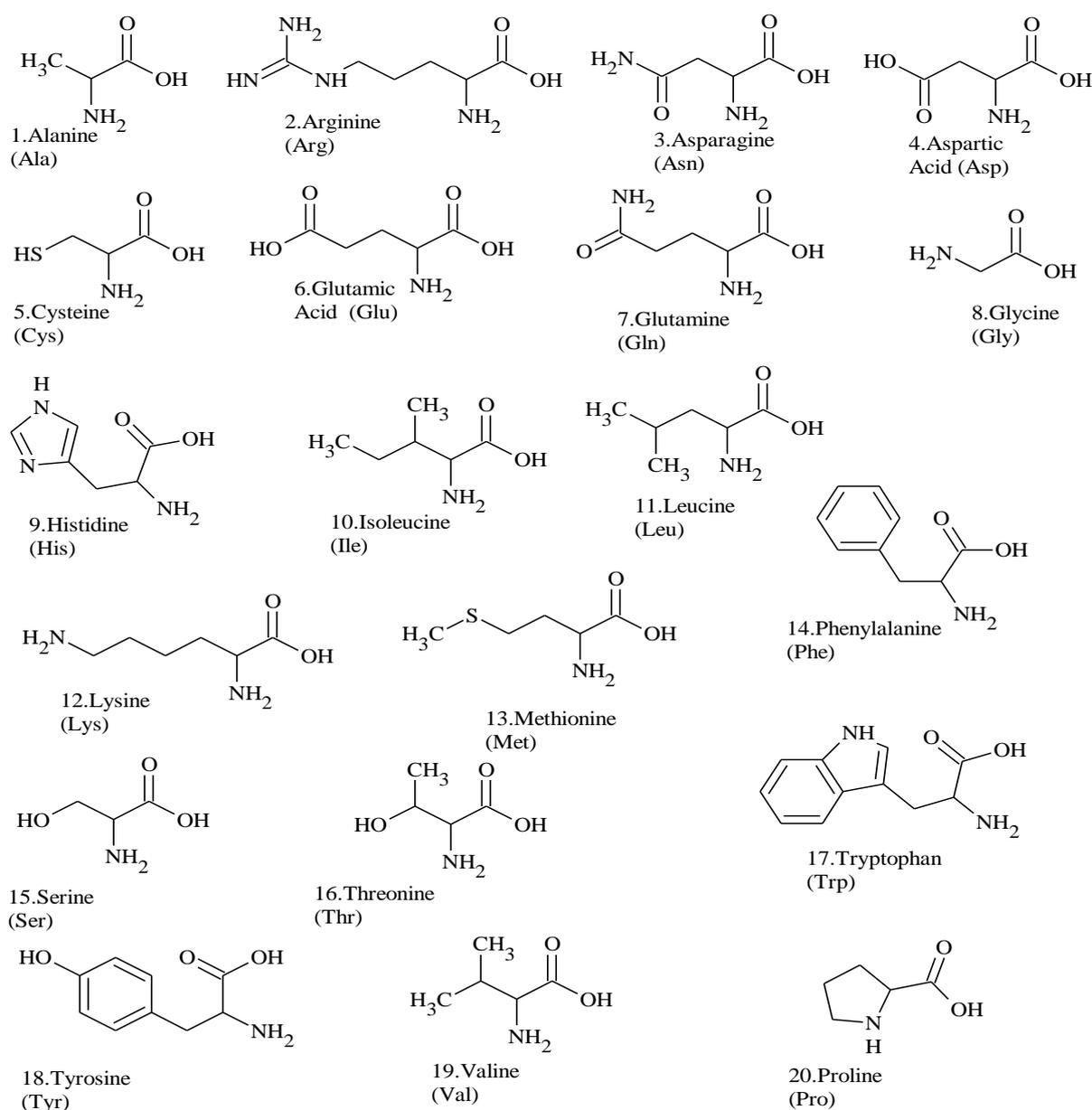


Figure n°16 : Structures chimiques des vingt principaux acides aminés.

Plusieurs résultats ont montré que tous les 20 acides aminés sont essentiels au bon fonctionnement de l'organisme. Neuf de ces acides aminés ont été identifiés comme nutritionnellement indispensables chez l'homme à savoir : le **Tryptophane**, la **Valine**, la **Leucine**, l'**Isoleucine**, la **Lysine**, la **Thréonine**, la **Méthionine**, la **Phénylalanine** et l'**Histidine**. Ces acides aminés ne peuvent pas être synthétisés à partir des composés disponibles au sein de l'organisme d'où nécessité d'un apport extérieur. Toutefois, parmi les acides aminés indispensables, on distingue la **Serine** et le **Glutamate** que l'organisme peut synthétiser à partir de composés non aminés contrairement à la **Lysine** et la **Thréonine** qui sont considérés comme strictement indispensables, donc ne pouvant provenir que des apports précurseurs d'origine alimentaire. Certains acides aminés servent de précurseurs à la synthèse d'autres. C'est l'exemple de la Méthionine, précurseur de la Cystéine et de la Phénylalanine qui contribue à la synthèse de la Tyrosine (BOUTRY *et al*, 2008 ; DE BENOIST *et al*, 2011). La combinaison des acides aminés en peptides puis leur polymérisation en protéines s'effectue par une liaison amide dite peptidique (cf. figure n°17).

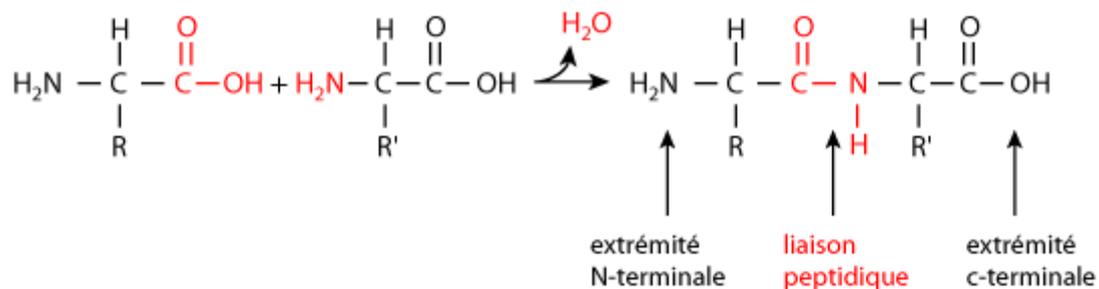


Figure n°17 : Liaison peptidique entre 2 acides aminés formant un peptide³³.

C'est une liaison covalente qui s'établit entre la fonction carboxyle portée par le carbone α d'un acide aminé et la fonction amine portée par le carbone α de l'acide aminé suivant.

Les protéines ont également des fonctions spécifiques de régulation du métabolisme dans l'organisme (enzymes, hormones). C'est pourquoi, l'ingestion régulière de sources alimentaires protéiques a un impact sur des processus physiologiques et physiopathologiques. Les peptides sont des composés naturels ou de synthèse qui résultent de l'enchaînement par une liaison peptidique d'un nombre limité d'acides aminés (2 à 50) comme le montre la figure n°17.

³³ http://www.lemm.univ-lille1.fr/biologie/biocellulaire/apprendre/chapitre2/ch2_page4.htm

Les acides aminés sont utilisés pour la synthèse de protéines corporelles qui sont notamment des constituants structuraux majeurs des tissus et incluent aussi de très nombreux effecteurs fonctionnels tels les enzymes, les anticorps et divers médiateurs cellulaires. Certains acides aminés tels que la Leucine ont également des fonctions régulatrices et des fonctions de signalisation cellulaire (LATHAM, 2001 ; TOME *et al*, 2007 ; DUBOIS, 2008).

Trois types de protéines sont utilisés dans les préparations infantiles : protéines de lait de vache (caséines), hydrolysats de protéines et isolats de protéines de soja. Il existe des formules pour les petits poids de naissance où le taux de protéines peut atteindre jusqu'à **2g/100mL**. Plusieurs travaux ont montré qu'une formule avec des protéines hydrolysées favorise la maturation du système digestif des nourrissons. De même, La teneur en protéines détermine la vitesse de croissance des nourrissons (FARDET *et al*, 2013 ; LE HUËROU-LURON *et al*, 2010). Les différences essentielles sur les teneurs en acides aminés entre les protéines animales et les protéines végétales ne seront pas abordées dans ce cadre.

3.2.2 LES LIPIDES ALIMENTAIRES

Le terme "lipides alimentaires", encore appelés corps gras alimentaires, englobe toutes les graisses comestibles dans l'alimentation humaine, qu'elles soient solides à température ambiante comme le beurre et le saindoux (isolés du lait ou de tissus adipeux animaux) ou liquides comme les huiles d'arachide, de palme, d'olive, de colza, de tournesol, de coprah ou de coton (extraites de graines oléagineuses, de fruits ou de germes). Les lipides sont des dérivés naturels d'acides gras condensés avec des alcools ou des amines. Elles sont solubles dans des solvants chimiques comme l'hexane, l'éther, le chloroforme et le benzène.

Dans la plupart des pays en développement, les lipides ne constituent qu'une faible part de la ration énergétique, souvent 8 à 10 % seulement contrairement aux pays industrialisés, où, cette proportion est bien plus élevée. Aux Etats-Unis par exemple, elle est de 36% en moyenne (LATHAM, 2001 ; FARDET *et al*, 2013 ; FRENOT *et al*, 2001).

Ce sont des composés essentiellement énergétiques de sorte que l'oxydation de **1 g** de lipides libère **9 kcal** soit environ **38 kJ** (ATWATER, 1906). L'analyse élémentaire des lipides a permis de les classer en lipides simples et complexes (Cf. Tableau n°18).

Tableau n°18 : Classification élémentaire des lipides (FRENOT et *al*, 2001).

Lipides simples	
Composés ternaires formés de C, H et O	
<ul style="list-style-type: none"> - Glycérides ou acylglycérols : esters d'acides gras et de glycérol - Cérides : esters d'acides gras et d'alcool « gras » - Stérides : esters d'acides gras et de cholestérol 	
Lipides complexes	
composés formés de C, H, O, N, P et éventuellement S	
<ul style="list-style-type: none"> - Glycérophospholipides <ul style="list-style-type: none"> - Acide phosphatidiques - Phosphatidylcholines (Lécithines) - Phosphatidyléthanolamines et phosphatidylsérines (Céphalines) 	<ul style="list-style-type: none"> - Sphingolipides <ul style="list-style-type: none"> - Céramides (Acylsphingosines) - Sphingophospholipides - Glycosphingolipides

Les lipides complexes et homogènes comportent des glycérophospholipides, des sphingomyélines, des glycolipides et du cholestérol.

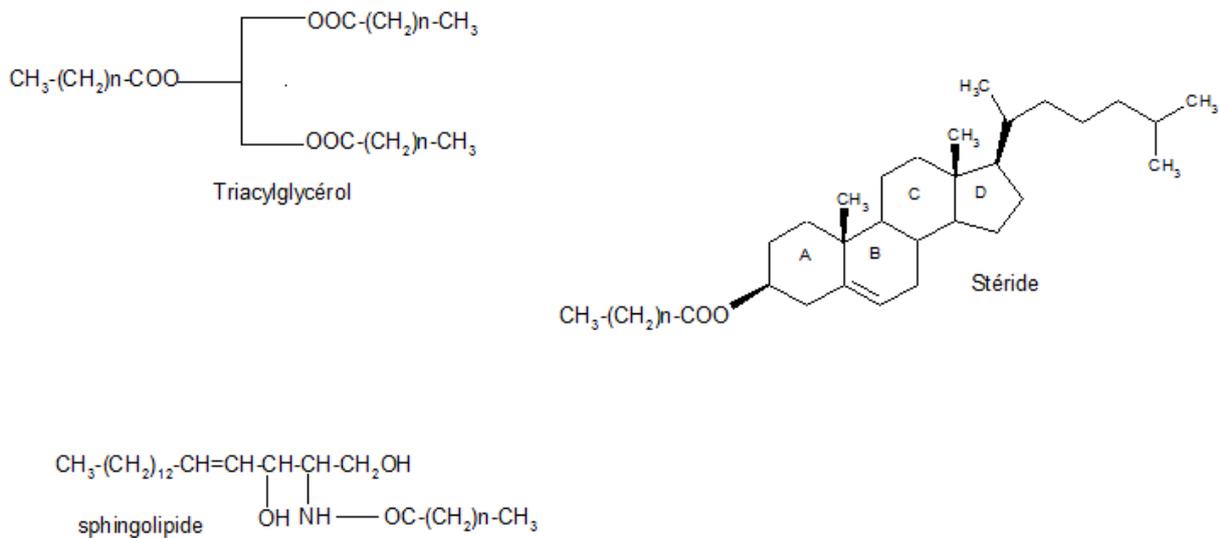


Figure n°18 : Structures chimiques de quelques lipides³⁴

Selon leur nature et leur distribution dans l'organisme humain, les lipides assurent diverses fonctions. Les fonctions de **réserve** d'énergie sont assurées par des lipides formés de triacylglycérols et accumulés dans le tissu adipeux sous-cutané. Les fonctions de **structure** sont assurées par les lipides formant des bicouches membranaires.

³⁴ http://biochim-agro.univ-lille1.fr/lipides/co/Cours_A_3_intro.html

Les lipides fonctionnels tels que les hormones lipophiles, les prostaglandines et les vitamines liposolubles sont des **médiateurs** cellulaires (ARMAND et *al*, 2008).

Les acides gras sont les constituants permanents hydrophobes des lipides. Ils sont constitués par une réaction entre la fonction acide carboxylique avec les alcools et les amines produisant ainsi des esters et des amides, formes sous lesquelles existent les acides gras dans les aliments. Les acides gras naturels sont alors des acides carboxyliques à nombre pair de carbone, à longue chaîne carbonée, saturée ou non.

Les acides gras **saturés** sont désignés soit par un nom en rapport avec leur origine, soit par la nomenclature officielle des acides carboxyliques. Ils sont présents dans les graisses animales qui contiennent aussi du cholestérol (jaune d'œuf, abats,...). Le cholestérol se trouve dans toutes les membranes cellulaires. Il joue un rôle important dans le transport des lipides et il est le précurseur des sels biliaires et des hormones surrénaliennes et sexuelles. L'organisme dispose de systèmes enzymatiques pour synthétiser et renouveler les acides gras saturés destinés à être intégrés dans les phospholipides (surtout l'acide stéarique), les sphingolipides de la myéline et les triglycérides de réserve du tissu adipeux qui assurent une grande part des dépenses énergétiques. Les acides gras saturés surtout ceux à 12 et 14 atomes de carbone (C₁₂ et C₁₄), ont la réputation d'être responsables de l'hypercholestérolémie et d'induire l'agrégation des plaquettes de la plaque d'athérome (ARMAND et *al*, 2008).

Les acides gras **insaturés** sont désignés selon les mêmes règles, qui précisent en outre la nature de l'isomère cis – trans, soit Z ou E. Les acides gras **monoinsaturés** ayant entre 4 à 10 atomes de carbone sont neutres sur les pathologies citées précédemment. Les acides gras **polyinsaturés** à 18, 20, 22 atomes de carbone comportent des doubles liaisons, en général cis, position **malonique** [– CH = CH – CH₂ – CH = CH –] ou **conjuguée** [– CH = CH – CH = CH –] comme dans l'acide linoléique C₁₈: 2 ω 6. Ces molécules d'origine végétale s'oxydent facilement (MURAT, 2009 ; FRENOT et *al*, 2001).

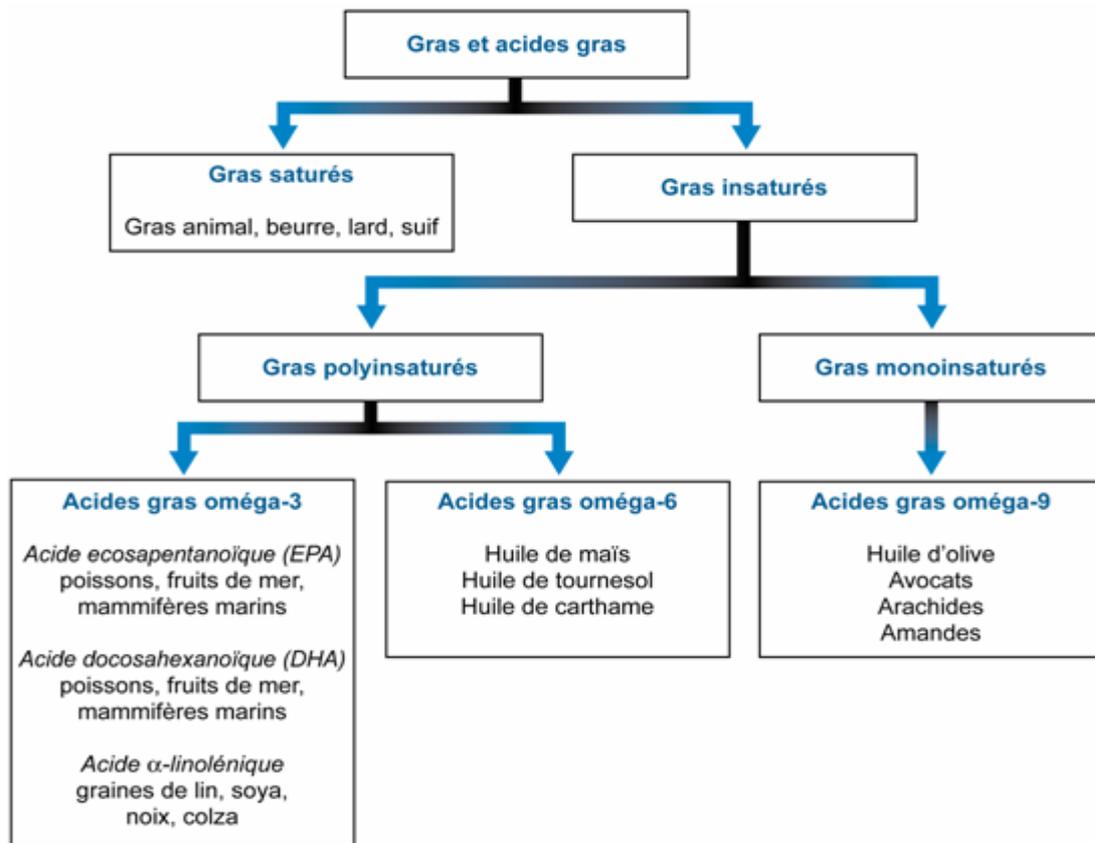


Figure n°19 : Principaux acides gras retrouvés dans le plasma humain (BELANGER, 2007)

Les acides gras oméga – 9 sont des acides gras monoinsaturés possédant une double liaison carbone – carbone en neuvième position à partir de l'atome noté oméga (ω). Le principal acide gras oméga – 9 est l'*acide oléique*. Contrairement aux oméga – 3 et oméga – 6, les oméga – 9 ne sont pas indispensables : l'organisme humain est capable de les fabriquer à partir d'autres acides gras insaturés. Parmi les rôles physiologiques des acides polyinsaturés (ω 6) série linoléique {AGPI ω 6}, on note une fonction reproductrice, cellulaire, plaquettaire et régulatrice des lipides du plasma. Les AGPI (ω 3) ont des fonctions spécifiques dans le développement de la rétine, du cerveau et du système nerveux. L'*acide docosahexaénoïque* (DHA) s'incorpore dans ces tissus durant la vie intra utérine et au cours de l'allaitement. La teneur du lait maternel en DHA est corrélée à l'apport alimentaire de la mère à qui il est fortement conseillé la consommation d'aliments vecteurs comme les poissons gras (MOZAFFARIAN et al, 2012). La plupart des lipides utilisés dans les préparations infantiles est d'origine végétale. L'*acide arachidonique* (C20 :4, ω 6 ; ARA) et l'*acide docosahexaénoïque* (C22 :6, ω 3 ; DHA) qui sont présents dans le lait maternel sous forme de phospholipides ont un effet positif sur le développement cérébral et rétinien du nouveau – né (BELANGER, 2007 ; LE HUËROU-LURON et al, 2010 ; FARDET et al, 2013).

3.2.3 LES MICRONUTRIMENTS

Les micronutriments organiques (vitamines) et inorganiques (minéraux et oligoéléments) ont deux fonctions principales au sein de l'organisme : un rôle clé dans le métabolisme intermédiaire comme cofacteurs ou coenzymes, et un rôle de neutralisation des radicaux libres ayant pour conséquence la protection de l'organisme contre le stress oxydant. Pour certains micronutriments, leur rôle a été mis en évidence dans des états carenciels sévères qui ont pu être traités, dans un premier temps, par des aliments spécifiques contenant la substance déficiente, ensuite, par le composé chimique actif lorsque celui-ci a été identifié et purifié. (BERGER, 1995). De nombreux exemples ont été rapportés. Déjà au 18^{ème} siècle, des preuves ont été établies quant à l'apport de la vitamine C sous forme de jus de citron pour prévenir la survenue du scorbut chez les marins Britanniques (PAQUOT N. et SCHEEN A., 2006).

Les vitamines sont des substances organiques chimiquement hétérogènes aux fonctions variées et sans valeur énergétique spécifique. Elles sont présentes dans les aliments à doses infimes mais indispensables au métabolisme basal de l'organisme humain (LATHAM, 2001). L'homme ne peut en synthétiser que quelques – unes mais en quantité insuffisante, et donc elles doivent être fournies en majorité par l'alimentation. Leur solubilité, caractéristique physico – chimique d'intérêt, permet de comprendre que certaines vitamines sont essentiellement apportées par certains groupes d'aliments. Cette caractéristique a servi de base pour leur classement en vitamines liposolubles et en vitamines hydrosolubles respectivement solubles dans les matières grasses (solvants organiques) et dans l'eau (MURAT, 2009). Le fonctionnement de ces micronutriments peut être affecté de deux manières : soit par une réduction de leur absorption entérale suite à une malabsorption, une malnutrition par inappétence, soit alors par une augmentation des pertes au cours d'une maladie, d'une chirurgie ou de traumatismes. Il a été démontré que les vitamines A, D, K et B₉ doivent être renforcées dans les formulations infantiles pour se rapprocher du lait maternel (LE HUËROU-LURON *et al*, 2010)

Les structures chimiques de quelques vitamines, leurs descriptions et rôles sont présentés dans ce chapitre par les figures n°20 ; n°21 et le tableau n°19.

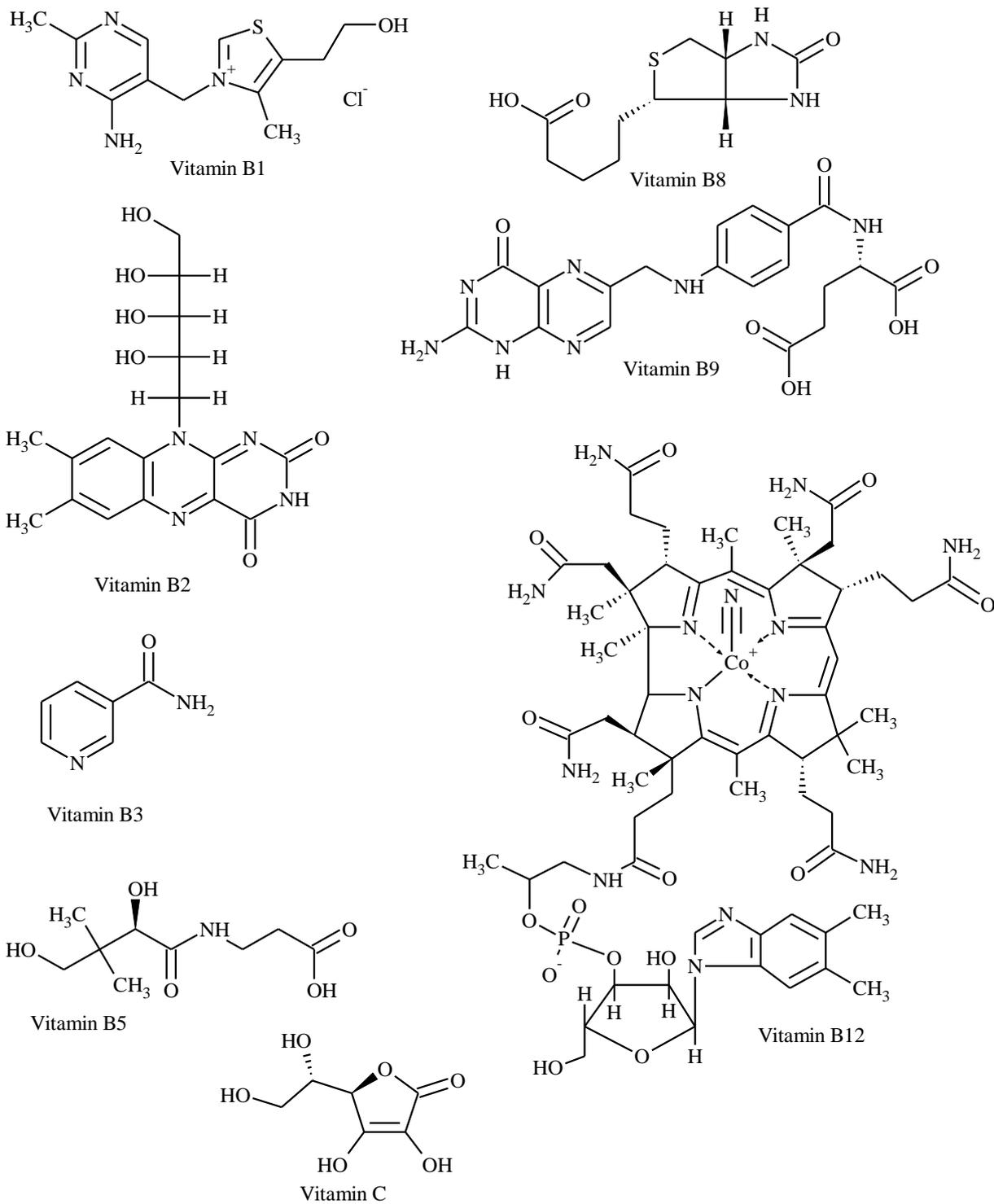


Figure n°20 : Structures des quelques vitamines hydrosolubles

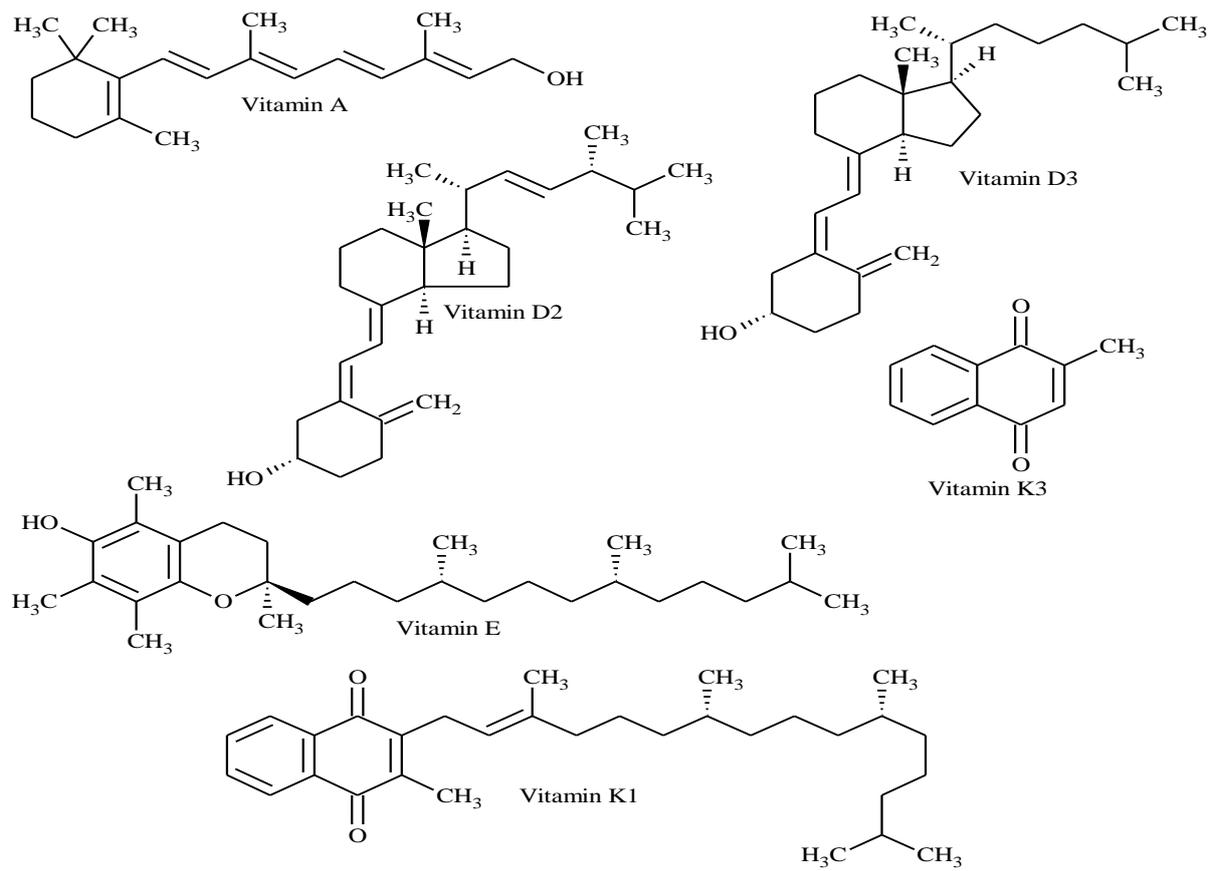


Figure n°21 : Structures des vitamines liposolubles

Tableau n°19 : Localisation et rôles physiologiques des vitamines (Adapté de MURAT, 2009)

	Vitamines	Description et localisation	Rôles physiologiques majeurs
LIPO SOLUBLES	Vitamine A (Rétinol)	Formé à partir du Bêta-carotène et de la Provitamine A, 90% stockée dans le foie	<ul style="list-style-type: none"> - Mécanisme de la vision, croissance et maintien de la peau et des muqueuses - Effet anti – oxydant par la provitamine A
	Vitamine D (Calciférol ; D3 : Cholécalférol ; D2 Ergocalciférol)	Groupes de stérols chimiquement distincts par la nature de la chaîne carbonée et son degré de saturation. Origine endogène, synthèse par l'épiderme en quantité après exposition solaire	<ul style="list-style-type: none"> - Régulation du métabolisme du calcium et du phosphore assurant le développement normal du squelette (activité anti – rachitique)
	Vitamine E (Tocophérols)	Structure chimique comparable à celle des hormones sexuelles ; stockée surtout dans le muscle et le tissu adipeux	<ul style="list-style-type: none"> - Neutralisation des radicaux libres et protection des membranes des cellules, - Ralentissement de l'oxydation des AGI et du Cholestérol, empêchant les dommages cellulaires et à l'athérosclérose.
	Vitamine K (Quinones : K1 Phylloquinone, K2 Ménaquinone)	Dérive d'un noyau quinone, petite quantité emmagasinée dans le foie, grande partie synthétisée par les bactéries intestinales	<ul style="list-style-type: none"> - Indispensable à la coagulation sanguine, - Participation à la phosphorylation oxydative au niveau cellulaire
	Vitamine B ₁ (Thiamine)	Formée par un cycle pyrimidique et un cycle thiazolique, en très petite quantité dans le foie, muscles, rein et système nerveux ; excédent éliminé dans l'urine.	<ul style="list-style-type: none"> - Métabolisme des glucides, - Transformation de l'acide pyruvique en AcétylCoA, rôle dans le cycle des pentoses, Neurotransmetteur du système nerveux et musculaire.
	Vitamine B ₂ (Riboflavine)	Stockée dans le rein et le cœur et les tissus ; excédent rejeté dans l'urine.	<ul style="list-style-type: none"> - Métabolisme des glucides, lipides et protéines car coenzymes dans multiples réactions, apport d'énergie nécessaire au bon fonctionnement cellulaire, - Maintien en bon état de la peau et des yeux.

HYDRO SOLUBLES	Vitamine B ₃ ou PP (Niacine : Acide nicotinique, Nicotinamide)	Composée par une molécule d'acide nicotinique et un amide de l'acide nicotinique en très petite quantité dans le foie et les tissus, excédent éliminé dans l'urine	<ul style="list-style-type: none"> - Fourniture d'énergie dans toutes les réactions métaboliques de l'organisme, - Fonctionnement du système nerveux
	Vitamine B ₅ (Acide pantothénique)	Résulte de la combinaison de l'acide pantoïque et d'une molécule d'Alanine De grande quantité dans le foie, les reins, l'encéphale et le cœur.	<ul style="list-style-type: none"> - Métabolisme des glucides, acides aminés et acides gras, - Synthèse des stéroïdes et de l'hème.
	Vitamine B ₆ (Pyridine : Pyridine, Pyridoxal, Pyridoxamine)	C'est un dérivé de la pyridine, en très petite quantité dans le foie et le sang ; l'excédent est éliminé dans l'urine.	<ul style="list-style-type: none"> - Métabolisme des protéines et des acides aminés : coenzyme de plus de 60 systèmes enzymatiques, - Glycogénolyse, à la formation d'anticorps et de l'hémoglobine
	Vitamine B ₈ (Biotine)	Formée par la fusion de deux cycles, en très petite quantité dans le foie, les reins, l'encéphale et les glandes surrénales	<ul style="list-style-type: none"> - Coenzyme dans de nombreuses réactions en particulier dans le cycle de Krebs et dans la production d'énergie à partir des acides aminés
	Vitamine B ₉ (Acide folique)	Composé construit à partir de l'acide glutamique essentiellement dans le foie	<ul style="list-style-type: none"> - Métabolisme des acides aminés et des acides nucléiques
	Vitamine B ₁₂ (Cobalamine)	Composée d'un noyau tétrapyrrolique qui renferme un atome de Cobalt au centre, essentiellement dans le foie	<ul style="list-style-type: none"> - Synthèse de l'ADN, ainsi qu'à la formation des globules rouges, Catalyse de nombreuses réactions enzymatiques,
	Vitamine C (Acide ascorbique)	Environ 1500mg stockés dans les glandes surrénales, la rétine, l'intestin, et l'hypophyse ; l'excédent est excrété par les reins en cas de saturation.	<ul style="list-style-type: none"> - Indispensable à la coagulation sanguine, - Participation à la phosphorylation oxydative au niveau cellulaire

Nous ne nous sommes pas appesantis sur les **glucides alimentaires** dans cette partie de notre étude. Notons tout de même qu'un des facteurs du plan d'expériences est le **saccharose**, diholoside (Glucose lié au Fructose) largement utilisé en alimentation humaine.

3.3 CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES BOUILLIES

Les 12 bouillies préparées ont été analysées par plusieurs méthodes aux fins de déterminer leur composition en protéines totales, en vitamines et en lipides. Il s'agit du dosage de l'azote total par la méthode de Kjeldahl, de la quantification de la vitamine C par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), de l'extraction par un protocole optimisé des acides gras présents dans les bouillies, de leur séparation et identification par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC – MS). Les principes de ces méthodes seront décrits suivis des modes opératoires appliqués et les résultats analysés et commentés feront partie de la suite de ce chapitre.

3.3.1 DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL PAR LA MÉTHODE DE KJELDAHL ET DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN PROTÉINES DES BOUILLIES

3.3.1.1 PRINCIPE ET METHODOLOGIE

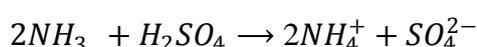
En présence d'Acide Sulfurique (H_2SO_4) concentré et à chaud, le Carbone, l'Oxygène, l'Hydrogène et l'Azote des composés organiques sont transformés sous forme de CO_2 , H_2O et NH_3 . Tout l'azote organique est transformé sous forme minérale et peut alors être dosé par titrimétrie acide – base. De manière opérationnelle, on procède par trois (3) étapes à savoir, une **minéralisation**, une **distillation** et une **titration**.

Les équipements utilisés sont notamment un Minéralisateur de type BÜCHI Scrubber B® – 414 couplé à un Aspirateur – laveur et un Distillateur de type BÜCHI B – 324. Le distillateur est muni d'un Titracteur de type Schott, Mettler Toledo®.

La minéralisation est effectuée avec un excès d'acide sulfurique H_2SO_4 concentré et chauffé entre 340 à 370°C en présence d'un mélange catalyseur (constitué par 100g de Sulfate de potassium, 100g de Sulfate de Cuivre et 5g de Sélénium) qui augmente la vitesse de digestion du composé. La réaction globale de dégradation de la matière organique azotée sous forme de sel d'ammonium se présente comme suit :



L'acide sulfurique étant en excès, on obtient un mélange tel que :

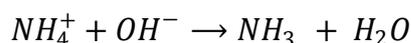


L'azote total est donc maintenu sous forme d'ions ammonium NH_4^+ tandis que l'acide sulfurique est partiellement décomposé et réduit en SO_2 et SO_3 qui forment des vapeurs

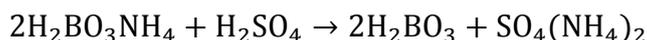
blanches irritantes et toxiques. Lesquelles vapeurs sont aspirées et piégées dans un mélange de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) H_2O_2 .

La solution obtenue après la minéralisation contient des ions ammonium NH_4^+ qu'il faut déplacer chimiquement en ammoniac NH_3 , forme dosable afin de déterminer la concentration en azote total. Avant la distillation, on procède à une alcalinisation avec une solution de soude NaOH en excès.

Ce qui conduit à la réaction suivante :



L'ammoniac NH_3 ainsi formé est piégé dans une solution d'acide borique (H_3BO_3). L'acide borique est un acide faible qui ne réagit pas avec l'ammoniac mais favorise son isolement. La réaction provoquée est la suivante :



La titration de la solution après minéralisation est effectuée par une solution d'acide sulfurique dilué. C'est une réaction de neutralisation qui est suivie par les fluctuations d'un pH basique vers un pH acide (de l'ordre de 4). Le pourcentage d'azote total est calculé à partir du volume d'acide sulfurique à l'issue de la titration, puis la teneur en protéines est déterminée en utilisant le facteur de conversion de 6,25 conventionnellement admis correspondant à un taux moyen de 16% d'azote dans les protéines alimentaires. Pour chaque bouillie, ce dosage a été répété trois fois. Le tableur Excel 2010 et le logiciel MODDE 5.0 ont été utilisés pour le traitement des résultats.

3.3.1.2 RESULTATS DU DOSAGE DES PROTEINES DES BOUILLIES ET ANALYSES

Les teneurs en protéines totales des 12 bouillies du plan d'expériences ont été calculées à partir des résultats du dosage par la méthode de Kjeldahl. Cette méthode décrite en **3.3.1.1** permet de quantifier l'azote total de chaque bouillie. Puis, on calcule la teneur en protéine de chaque essai en utilisant la relation ci – dessous.

$$M (\%) \text{ protéine} = N (\%) \text{ azote} * 6,25.$$

Il est conventionnellement admis que les protéines renferment 16% d'azote. Ainsi, le coefficient 6,25 est utilisé comme facteur de conversion de l'azote total en protéines.

Ces valeurs obtenues ont été rapportées pour 100g d'échantillons de bouillie. L'écart – type a aussi été calculé pour chaque dosage réalisé en triplicat (Cf. Tableau n°20).

Tableau n°20 : Valeurs de la concentration en protéines des 12 expériences

Expériences	Conc. en protéines (g/100g) ±Ecart - type
1	4,63 ± 0,18
2	4,20 ± 0,19
3	2,83 ± 0,53
4	5,52 ± 0,19
5	6,94 ± 0,66
6	8,04 ± 1,21
7	5,56 ± 1,43
8	2,04 ± 0,46
9	6,22 ± 1,37
10	6,52 ± 0,89
11	5,43 ± 1,21
12	3,49 ± 0,52

Ces valeurs ont été utilisées pour le tracé des histogrammes de la figure n°22 ci – dessous à partir du tableur Microsoft Excel 2010.

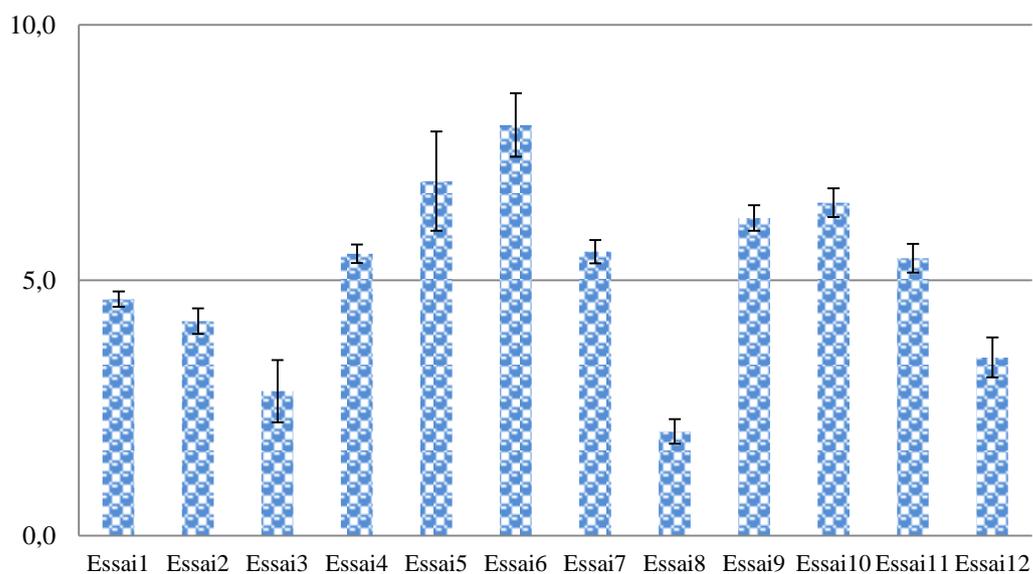


Figure n°22 : Teneur en Protéines totales (g/100g) des bouillies du plan d'expériences

On observe que les essais n° 4, 5, 6, 7, 9, 10 et 11 présentent une teneur en protéines au-delà de **5g/100g** de bouillie et que parmi ces 7 essais seul l'essai n°5 ne contient pas de poudre de chenille dans sa formulation de départ contrairement aux autres. Ce qui est notable même si l'on ne peut, à ce stade, attribuer la totalité de l'apport en protéine à la proportion de poudre de chenille intégrée dans la formulation. L'essai n°6 présente une proportion d'environ **8,5g** de protéines totales pour 100g de bouillie soit près de 10% de la quantité totale de bouillie. Ces résultats ont été analysés comme réponse utilisant le plan *d'Hadamard* sous MOODE 5.0. Les histogrammes de la figure n°23 ci – après présentent les effets déterminés à partir de la relation mathématique décrite au chapitre 2 paragraphe 2.2.1 et qui sont liés à la quantité de protéines totales.

On remarquera sur ces résultats que les effets favorisant la quantité de protéines totales sont X1B (type de farine), X6 (quantité de chenille) et X10 (quantité d'eau). Les effets correspondants au type de farine et à la quantité de chenille sont tous deux positifs de plus celui qui est relatif à l'apport en poudre de chenille est le plus important ce qui corrèle bien le diagramme exposé ci – dessus.

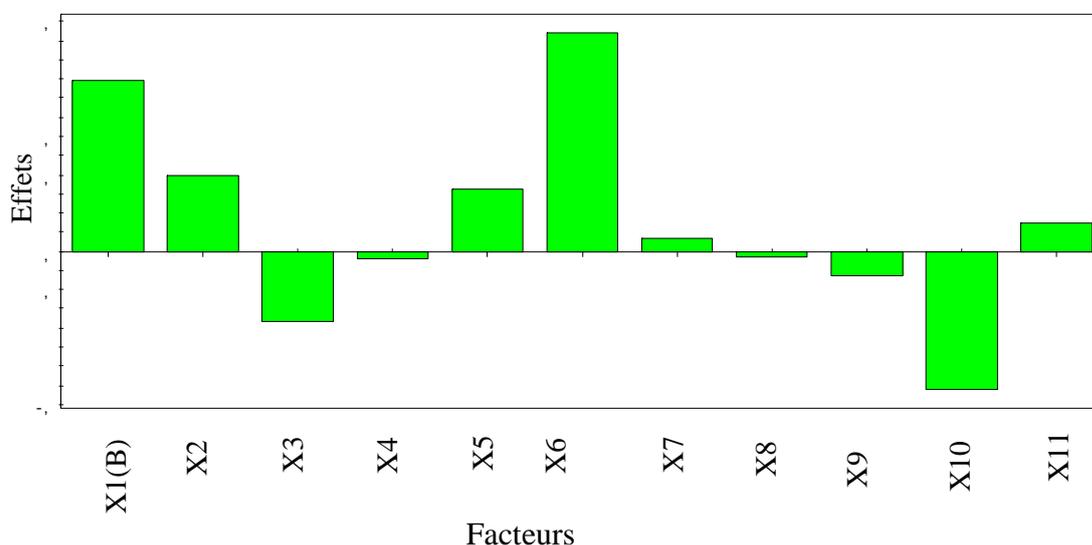


Figure n°23 : Effets de la quantité en protéines totales des bouillies sur les différents facteurs.

On peut donc confirmer que l'incorporation de la poudre de chenille à la bouillie alimentaire favorise l'apport en protéine de celle – ci. Reste à savoir si les protéines contenues dans la poudre de chenille se retrouvent sous forme identique dans la bouillie et sous quelle configuration ?

Cette problématique sera soulevée dans le chapitre n°4 qui est focalisé sur l'identification des peptides et protéines de chenille et leurs propriétés biologiques. On constate également que le type de farine est important et que l'emploi d'une pâte de maïs germée est favorable à la viscosité plutôt qu'un mélange de farine de manioc et de maïs. La solution d'utilisation de maïs germé a déjà été évoquée à propos de l'amélioration de la densité énergétique des aliments de complément par les travaux de TRAORE et *al.* et de ZANNOU-TCHOKO et *al.* (ZANNOU – TCHOKO et *al.*, 2011 ; TRAORE et *al.*, 2004). Parallèlement, quelques travaux sur la germination des céréales et des légumineuses ont montré qu'elle favorise la réduction des facteurs antinutritionnels notamment les phytates qui sont des composés réducteurs de l'absorption des métaux tels que le fer ou le zinc, indispensables pour l'organisme (DONANGELO et *al.*, 1995). Les résultats positifs observés sur l'effet de la pâte de maïs germé et les avantages qu'offre cet ingrédient confirment la nécessité de son utilisation dans la formulation recherchée. La quantité d'eau est également un facteur important. Toutefois, l'effet négatif de ce facteur vis-à-vis de la quantité de protéines montre qu'en augmentant la quantité d'eau dans la préparation de la bouillie, la quantité de protéines diminue. Ce phénomène pourrait être lié à un effet de dilution même s'il n'est pas improbable que certaines protéines puissent être solubles dans l'eau sous certaines conditions de température par exemple. Les effets X2 (quantité d'arachide), X3 (quantité de sucre) et X5 (poudre d'orange) ont des influences moindres. La poudre d'albédo d'orange étant une source de pectine (BENALI et *al.*, 2014), on peut conclure à une association entre la pectine et les protéines sous forme de complexe stabilisé que l'on retrouvera alors dans la bouillie. L'apport en arachide, comme source de lipides s'est avéré favorable aussi à la quantité de protéines relevée dans les bouillies suivant l'analyse des effets de facteurs. HÄBERLE et *al.* ont montré que les complexes lipoprotéiques qui contribuent à la circulation des lipides dans l'organisme sont hydrosolubles (HÄBERLE et *al.*, 2013). A ce stade, même si nous ne pouvons confirmer une complexation, il faut relever que plusieurs auteurs ont montré la présence de lipides dans certaines espèces de chenilles (DE GUEVARA et *al.*, 1995 ; RAMOS-ELORDUY et *al.*, 1997 ; KELEMU et *al.*, 2015). Ainsi, un effet synergique peut être noté entre les lipides des arachides et les lipides existant sous forme d'apolipoprotéines libérés dans le milieu par effet d'hydratation. Une décomplexation de ces apolipoprotéines peut aussi être favorable à la teneur en protéines du milieu.

On a observé aussi que l'effet du sucre est défavorable vis-à-vis de la teneur en protéine. Le sucre ajouté est du saccharose.

Même si à ce niveau de température de cuisson (65°C ou 85°C), il est difficile de penser à une caramélisation, il est tout de même possible qu'en présence de protéines (la fonction amine étant libre) et de saccharides, nous soyons dans les conditions d'une réaction de brunissement non enzymatique ou réaction de Maillard. Il faudra tout de même un dosage qualitatif des produits de réaction dans les bouillies pour nous indiquer les phénomènes ayant eu lieu.

Les autres facteurs pouvant être considérés comme négligeables, nous avons utilisé les valeurs du dosage des protéines par Kjeldahl pour analyser par surface de réponses le profil d'ingrédients susceptible d'optimiser la teneur en protéines totales de la bouillie.

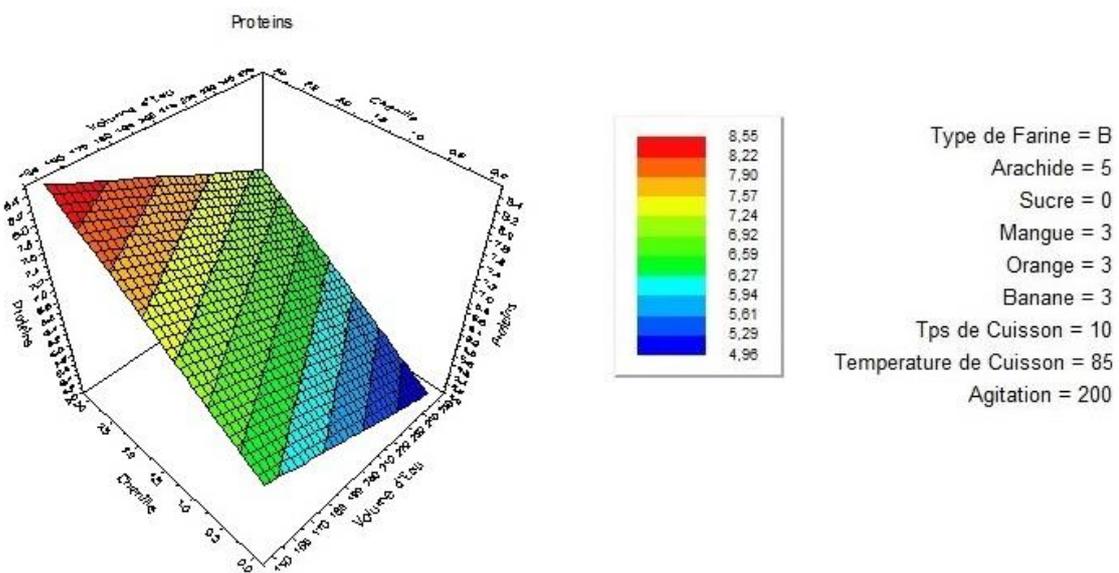


Figure 24 : Surface de réponses liées à la concentration en protéines et combinaison de facteurs pour une réponse optimale en quantité de protéines.

On observe à travers cette surface de réponses et la combinaison y relative qu'une bouillie préparée suivant ces proportions pourrait permettre d'atteindre **8,5 g** de protéines pour **100g** de bouillie bien sûr en prenant en compte que les facteurs volume d'eau (X10) et quantité de chenille (X6) doivent être respectivement à leurs niveaux minimum et maximum.

Toutefois, par ce dosage où l'azote total est converti en masse de protéines totales utilisant un facteur de conversion, la présence d'azote non protéique ou de groupements -NH₂ de chaînes latérales peut rendre les résultats peu spécifiques d'une source donnée. Ce qui a conduit à envisager une recherche spécifique sur les propriétés des protéines de chenilles dont les résultats seront présentés au chapitre n°4.

3.3.2 DOSAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE (VITAMINE C) PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

3.3.2.1 INTRODUCTION AUX METHODES CHROMATOGRAPHIQUES

Les méthodes chromatographiques permettent de séparer les éléments d'un mélange en solution plus ou moins complexe tels que des molécules, des ions, etc. Au cours des analyses, le mélange est entraîné par une **phase mobile** qui circule au contact d'une **phase stationnaire** liquide ou solide. Ce qui génère des interactions physico – chimiques entre la phase stationnaire, offrant une grande surface de contact, et les molécules à séparer conduisant à des échanges rapides et réversibles dont la force dépend de la nature chimique des molécules. Les molécules sont alors entraînées puis séparées en fonction de leurs propriétés physico – chimiques dans un but analytique quantitatif, qualitatif ou préparatif.

Différentes méthodes chromatographiques ont été mises au point en fonction de diverses applications. . Pour notre étude, la HPLC et la GC – MS ont été utilisées (ROUESSAC et *al.*, 2004 ; HAINQUE et *al.*, 2008).

3.3.2.2 PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

Une installation de Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP), désignée fréquemment par son abréviation en anglais HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) est composé d'un **injecteur** permettant d'introduire le mélange à séparer dans le système, d'une **pompe** distribuant la **phase mobile** à débit constant à travers la **phase stationnaire** placée dans une **colonne**, d'un **détecteur** traversé par l'éluat (défini comme la phase mobile sortant de la colonne), le tout relié à un ordinateur. Le principe de séparation s'appuie non seulement sur les interactions des composés avec la phase stationnaire, mais aussi selon leur solubilité dans la phase mobile. La réponse du détecteur en fonction du temps est enregistrée pour donner un **chromatogramme** qui comprend autant de pics qu'il y a de composés séparés.

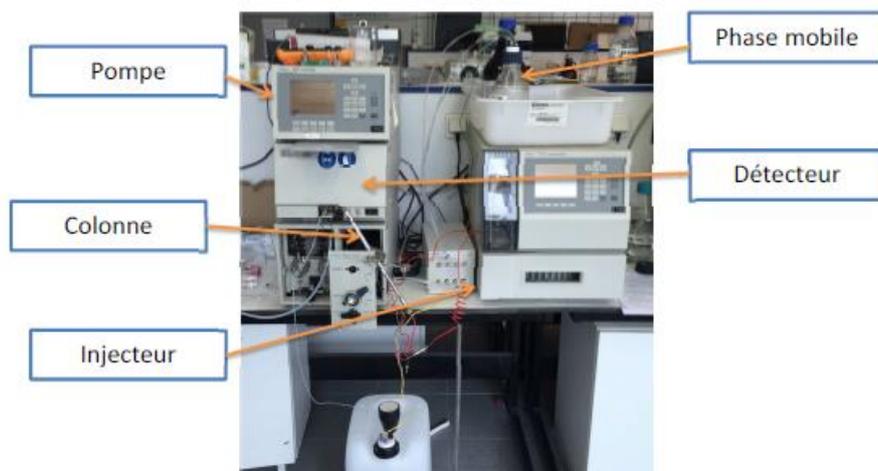


Figure n°25 : Photographie de la chaîne pour HPLC n°4 (ProBioGEM³⁵).

3.3.2.3 METHODOLOGIE

MODE OPERATOIRE POUR LE DOSAGE PAR HPLC DE LA VITAMINE C

Le mode opératoire mis en œuvre a consisté à peser 1 mg d'échantillon de bouillie à laquelle est ajouté 1 mL d'acide orthophosphorique 2% (v/v). Le mélange est homogénéisé au vortex puis le volume total est ajusté à 5 mL avec de l'eau déionisée.

On procède ensuite à une centrifugation à 10 000 tours/minutes pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est prélevé et filtré à 0,2 µm avant d'être injecté pour l'analyse par HPLC. La **Colonne** utilisée est de type Diol Lichrosorb de 5 µm (RT 250-4 E. Merck Darmstadt F.R. Germany). La **phase mobile** est composée d'acide métaphosphorique (HPO₃) à pH 2,2 pour un **débit** de 0,5 mL/min à **température** ambiante du laboratoire (22 à 25°C). Le **volume d'injection** est de 20 µL pendant 35 minutes à une longueur d'onde de 254 nm.

Les chromatogrammes obtenus ont servi, pour chaque échantillon de bouillie, à identifier les pics de vitamine C en comparaison avec un standard et à calculer les concentrations correspondantes.

3.3.2.4 RESULTATS DU DOSAGE DE LA VITAMINE C DES BOUILLIES

L'étalon utilisé est une solution de vitamine C à 0,075 mg/L. Le chromatogramme obtenu est présenté ci – après.

³⁵ Institut Charles VIOLLETTE, Equipe ProBioGEM (Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien). <http://probiogem.univ-lille1.fr/fr/presenhist.php>

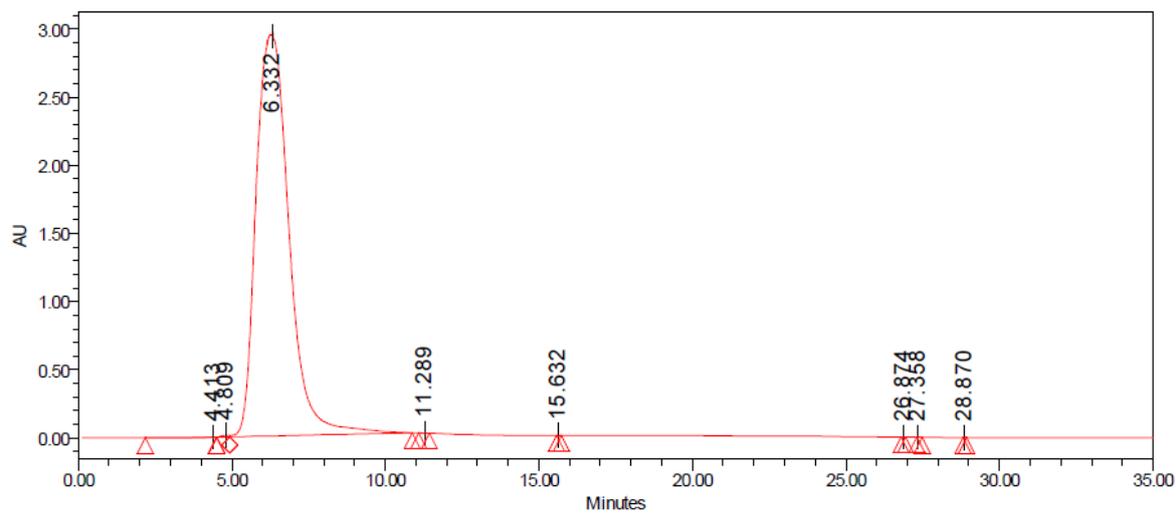
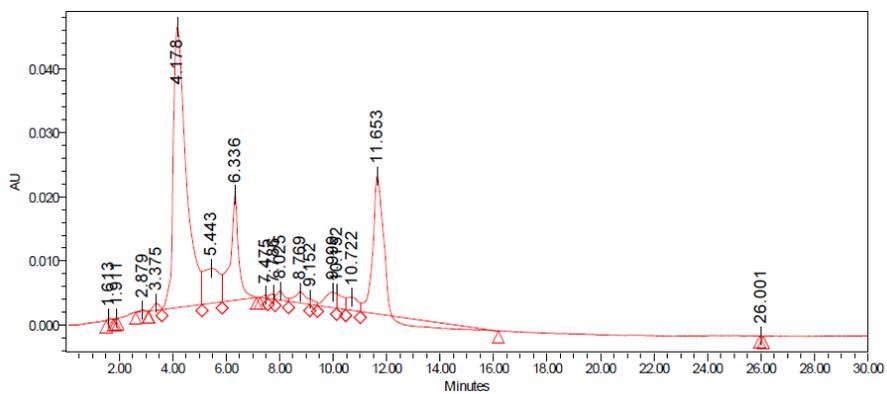
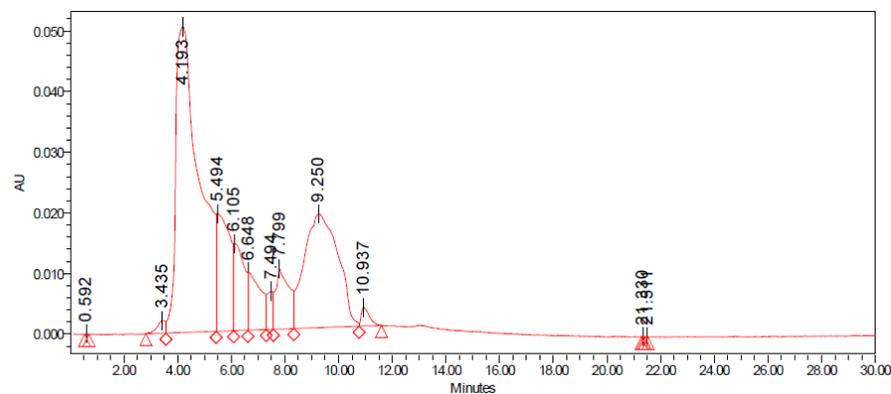


Figure n°26 : Chromatogramme de la solution standard de vitamine C.

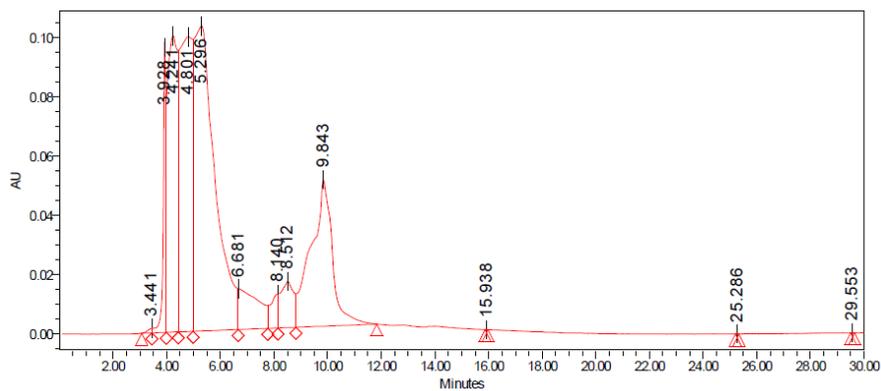
Pour les 12 bouillies du plan d'expériences, les chromatogrammes obtenus sont représentés à la page suivante.



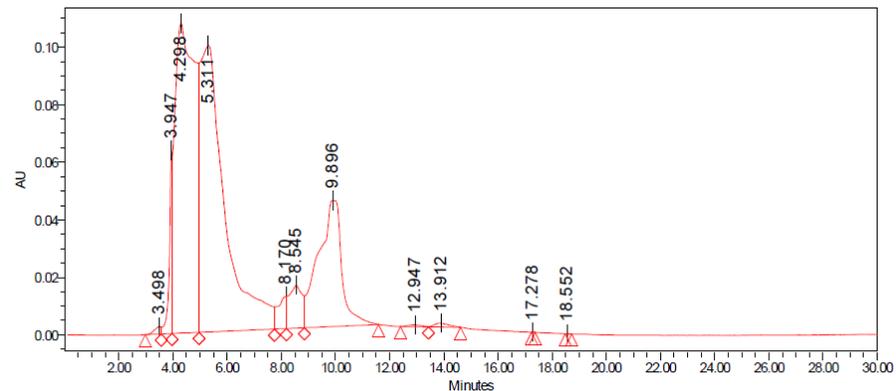
Essai n°1



Essai n°2

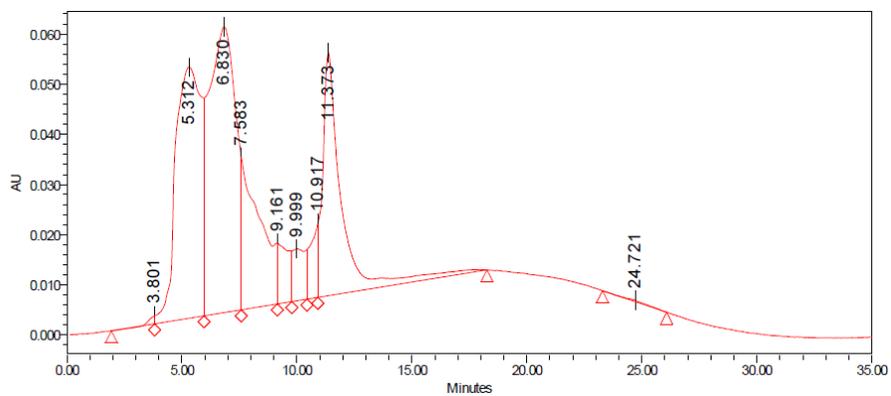


Essai n°3

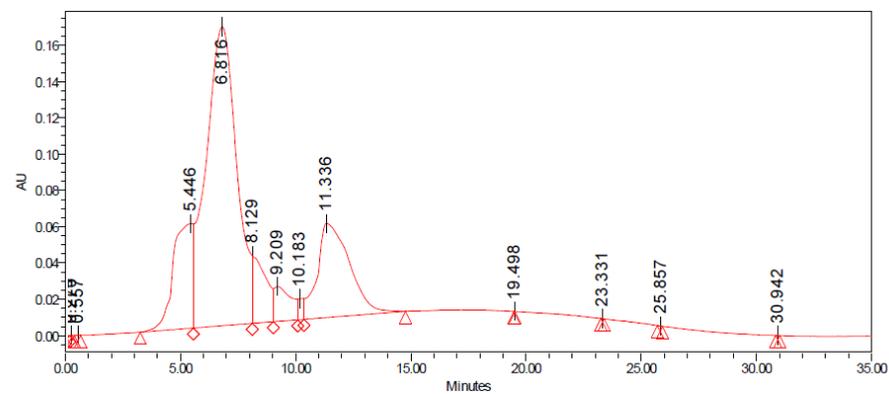


Essai n°4

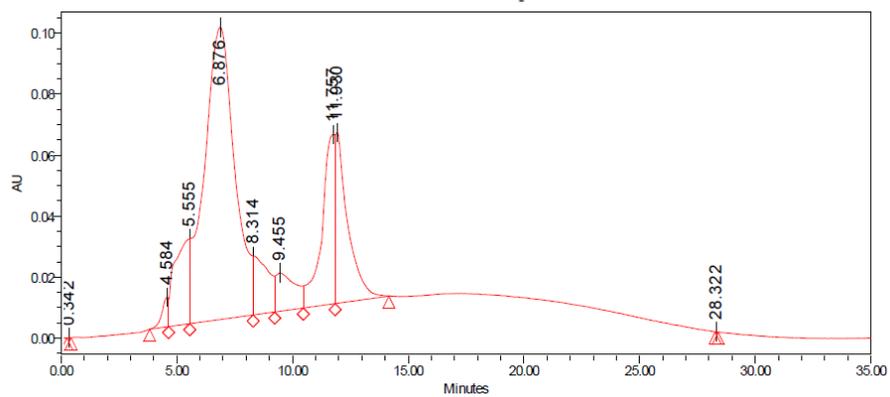
Figure n°27 : Chromatogrammes des dosages de la vitamine C dans les bouillies (essai 1 à 4)



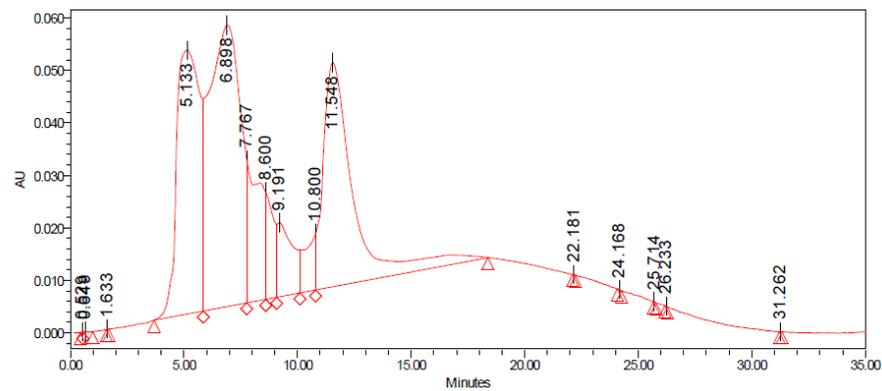
Essai n°5



Essai n°6

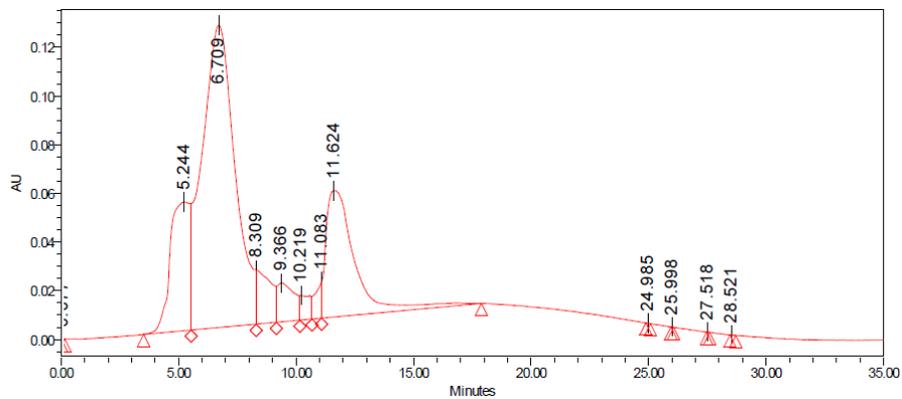


Essai n°7

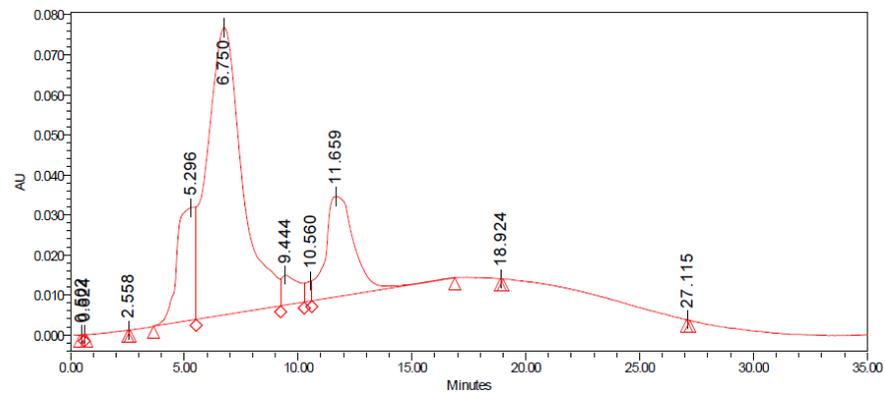


Essai n°8

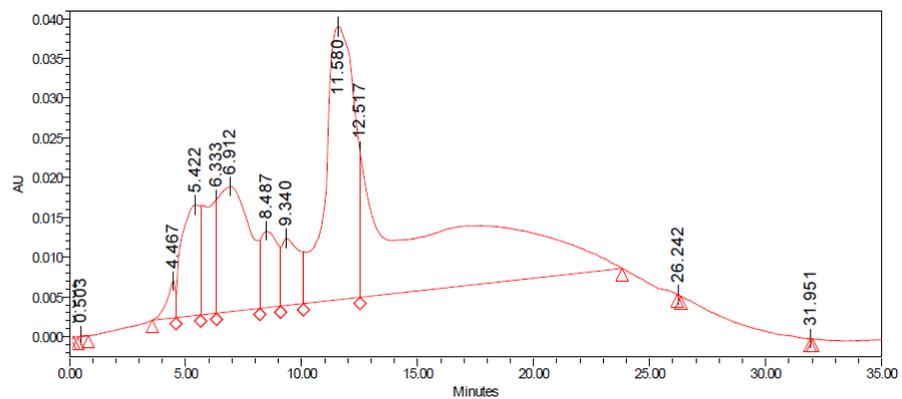
Figure n°28 : Chromatogrammes des dosages de la vitamine C dans les bouillies (essai 4 à 8)



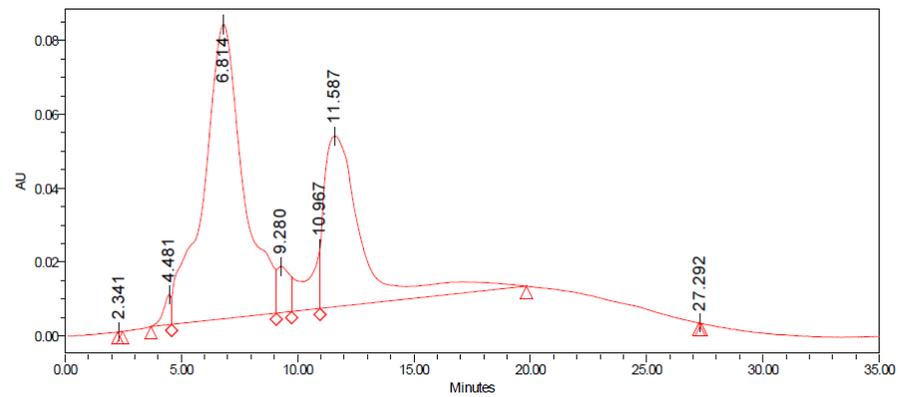
Essai n°9



Essai n°10



Essai n°11



Essai n°12

Figure n°29 : Chromatogrammes des dosages de la vitamine C dans les bouillies (essai 9 à 12)

Pour chaque échantillon de bouillie, ces chromatogrammes donnent les valeurs des temps de rétention et des aires de pics. Ces valeurs ont permis de calculer les concentrations en vitamine C dans chaque échantillon de bouillie à partir des valeurs du chromatogramme obtenues pour le standard de vitamine C (Figure n°25). Les concentrations en vitamine C pour les 12 bouillies calculées (Cf. Tableau n°21) ont été représentées sous forme d'histogrammes utilisant Microsoft Excel 2010 (Cf. Figure n°26, 27 et 28).

Tableau n°21 : Valeurs de la concentration en vitamine C des 12 essais

Expériences	Conc. Vitamine C (µg/L)
1	0,179
2	0,188
3	0,535
4	0,188
5	0,659
6	1,216
7	1,436
8	0,465
9	1,368
10	0,893
11	1,208
12	0,518

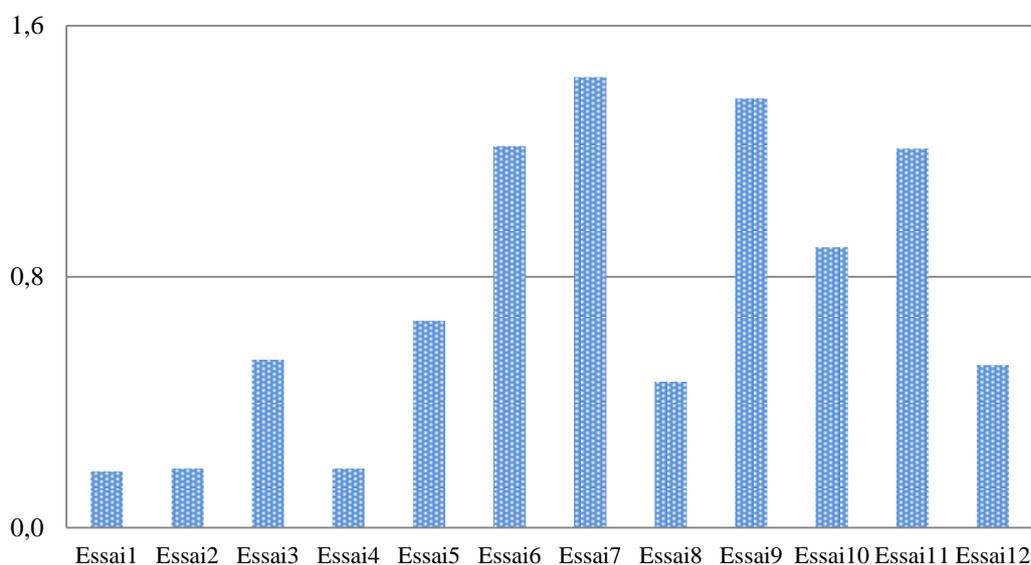


Figure n°30 : Teneur en Vitamine C (µg/L) des bouillies du plan d'expériences

Ces résultats montrent des proportions notables d'acide ascorbique dans les essais **n° 6, 7, 9, 10 et 11**. Sachant à partir des études antérieures que la vitamine C est présente dans les fruits de façon générale et à des fortes concentrations dans les agrumes. Cette proportion pourrait être attribuée à l'apport de la poudre d'orange (essai n° 6,9 et 10) mais aussi de mangue (essai n°7) et de la banane (essai n°11) qui ont été ajoutées comme ingrédients aux formulations de départ. Une analyse avec MODDE 5.0 des effets des facteurs à partir des valeurs de concentration en vitamine C (Cf. Tableau n°21) comme réponse a été faite. La figure n°30 et le tableau n°22 ci – après présentent respectivement les histogrammes des effets relatifs de chaque facteur et les paramètres statistiques générés par l'analyse des effets de facteurs.



Figure n°31 : Effets des facteurs en fonction de la concentration en vitamine C.

Tableau n°22 : Coefficient des effets liés à la concentration en vitamine C.

Vitamine C	Coeff. SC
Constant	0,738
X1	DF = 1
X1(A)	0,183
X1(B)	-0,184
X2	0,134
X3	-0,068
X4	-0,020
X5	0,118
X6	0,314
X7	0,069
X8	0,033
X9	0,029
X10	-0,156
X11	-0,049

On remarque par l'analyse des effets que l'effet du facteur X6 (quantité de chenille) est le plus important. Celui – ci étant positif, on peut en conclure que, plus la quantité de chenille sera importante et plus la teneur en vitamine C sera aussi importante.

Les chenilles, et principalement le genre *Imbrasia* utilisé, sont au stade larvaire de leur croissance connu comme stade d'accumulation de réserves pour préparer le stade nymphal. On sait à travers les travaux de LISINGO et *al.* sur les plantes hôtes des chenilles comestibles que les feuilles de plusieurs de ces essences telles que *Entandrophragma sp.*, *Funtunia sp.*, *Petersianthus sp.* et *Ricinodendron sp.* ont une composition chimique riche en vitamine C. Les chenilles se nourrissant essentiellement des feuilles de ces arbres pourraient bio – accumuler cette vitamine ou des précurseurs de celle – ci ou d'autres précurseurs de vitamine tel que la provitamine A comme l'ont montré des résultats antérieurs (FLOCH, 1957 ; BAHUCHET, 1978 ; LISINGO J. et LISINGO WA, 2009). Ces observations et l'absence de données scientifiques sur les vitamines de chenilles du genre *Imbrasia* devraient nous orienter vers cette piste de recherche.

Les effets des facteurs X1 (type de farine), X2 (quantité d'arachide) et enfin X5 (quantité de mangue) ne sont pas négligeables non plus. Le type de farine de par sa proportion est déterminant et nous notons que le type B (X1B) composé essentiellement de farine de maïs germé est défavorable par rapport à la concentration en vitamine C que le type A (X1A) composé d'un mélange de farines de maïs germé et de manioc. Les travaux de BERGERET sur la vitamine C dans les fruits et légumes du sud – Cameroun ont relevé 30mg/100g et 285mg/100g d'acide ascorbique respectivement dans les tubercules et feuilles de manioc (BERGERET et *al.*, 1958). Ce qui justifie une teneur notable en vitamine C dans les formulations à partir de la farine composée plutôt que dans les formulations à base essentiellement de maïs germé.

L'effet du facteur X10 (quantité d'eau) est négatif vis-à-vis de la concentration en vitamine C. Ce qui traduit qu'un effet contraire c'est – à – dire qu'une augmentation de la quantité d'eau sera en faveur de la dilution de la vitamine C qui est une vitamine hydrosoluble et en conséquence une baisse de sa concentration dans le milieu.

La quantité de mangue (X5) a montré un effet positif qui est tout à fait logique puisque 100g de mangue peut contenir environ 37 mg de vitamine C (Cf. tableau n°7).

Après l'analyse des effets de facteurs sur la concentration en vitamine C, une autre analyse par surfaces de réponse a été faite à l'aide de MODDE 5.0. Cette analyse complémentaire a permis, en fonction des surfaces générées, de définir le meilleur profil de formulation à considérer à partir du plan d'expériences pour obtenir une bouillie idéale avec une proportion en vitamine C acceptable (Cf. Figure n°32 ;Tableau n°23).

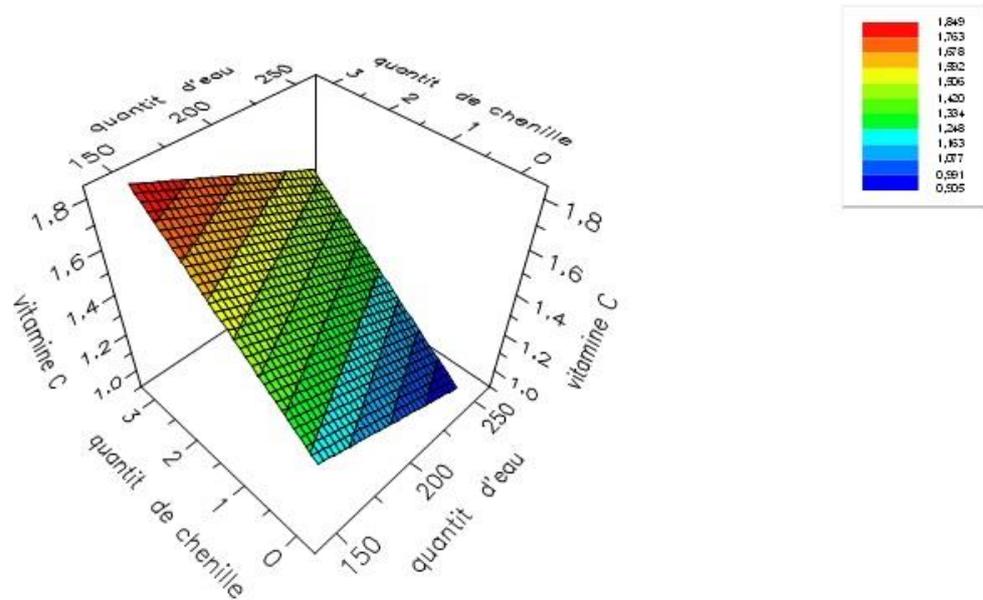


Figure n°32 : Surface de réponses liées à la concentration en vitamine C

Tableau n°23 : Combinaison de facteurs pour une réponse optimale en vitamine C

Facteurs	Quantité (g)	Niveau
Type farine (Manioc/Maïs)	20/20	- 1
Quantité d'arachide	5	+ 1
Quantité de sucre	0	- 1
Quantité de mangue	3	+ 1
Quantité orange	3	+ 1
Quantité de banane	3	+ 1
Temps de cuisson (min)	5	- 1
Température de cuisson (°C)	85	+ 1
Vitesse agitation (Tour/min)	200	- 1
Quantité d'eau (mL)	250	+ 1
Quantité de chenille	0	- 1

En définitive, une bouillie composée à partir des ingrédients du tableau n°23 ci – dessus, aux proportions indiquées et dans les conditions d'agitation, de temps et de température de cuisson décrites représente la combinaison optimale pour obtenir une concentration en

vitamine C de l'ordre de **0,8 à 1,4µg/L**. Cette combinaison optimale de facteurs d'entrée (ingrédients) permet d'optimiser la concentration en vitamine C (réponse) telle que nous l'avons obtenu à partir des formulations **n°6,7, 9, 10** et **11** (Cf. tableau n°21 et figure n°30) parmi lesquelles, les formulations **7** et **9** sont celles pour lesquelles des concentrations plus élevées en vitamine C ont été relevées.

A la suite des dosages de protéines et de la vitamine C, nous nous sommes intéressés au profil en acides gras des bouillies puisque leurs sources probables sont multiples parmi les ingrédients retenus pour la recherche de formulation. Ainsi, nous avons opté pour une extraction des acides gras à partir des bouillies. Il a fallu d'abord optimiser l'extraction par une autre méthode de plans d'expériences pour améliorer son rendement puis ensuite identifier les acides gras extraits par des méthodes chromatographiques.

3.3.3 DOSAGE DES LIPIDES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

3.3.3.1 PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou *Gas Chromatography* (GC) en anglais est une des techniques chromatographiques dotée, en sus des trois modules classiques à savoir injecteur, colonne et détecteur d'un four thermostaté. Elle permet de séparer les composés thermostables d'un mélange sur une colonne (portée à température élevée si nécessaire) qui contient une phase stationnaire et qui est parcourue par un gaz. L'échantillon à analyser est placé, à l'aide d'une micro-seringue, dans l'injecteur. L'injecteur, situé dans le four, est porté à une température qui permet aux composés de se volatiliser. La phase mobile constituée du **gaz vecteur** et de l'échantillon passe ensuite dans la colonne capillaire maintenue à une certaine température à l'aide du four. La séparation des constituants se fait alors par affinité avec les constituants de la colonne.

Plus il y a d'affinité entre les constituants de la colonne et les composés du mélange, plus ceux – ci seront retenus et sortiront sur le chromatogramme avec un temps de rétention correspondant au plus important. L'équipement qui a servi à l'analyse est présenté figure n°32.



Figure n°33 : Photographie de l'équipement pour CPG (A.T.E.M)³⁶.

3.3.3.2 PRINCIPE DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse ou *Mass Spectrometry* (MS) est une méthode d'analyse qui permet la détermination des masses moléculaires, l'identification et la quantification des composés analysés. Elle est basée sur l'ionisation des molécules de l'échantillon, l'accélération des ions formés dans un champ électrique, leur séparation en fonction du rapport de leur masse avec leur charge (m/z) et enfin leur détection. Le schéma fonctionnel est présenté figure n°34.

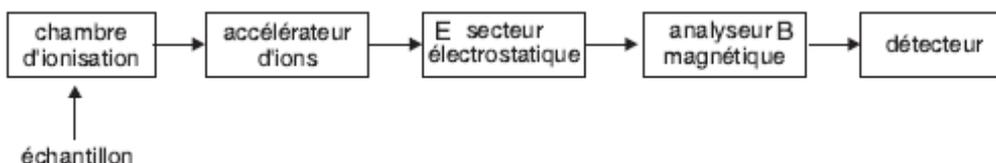


Figure n°34 : Schéma fonctionnel d'un appareil de GC (ROUESSAC et *al.*, 2004).

³⁶ Atelier de technologie d'Enseignement de Chimie. <http://atechimie.univ-lille1.fr/>



Figure n°35 : Photographie de l'équipement pour GC – MS

3.3.3.3 METHODOLOGIE

La MS peut être couplée aux méthodes chromatographiques, et notamment ici à la CPG, afin d'apporter une autre dimension à l'identification des composés analysés. A l'issue des analyses, on génère un **spectre de masse** regroupant les pics de produits détectés et aussi un rapport d'analyse précisant les détails (Cf. Annexes).

Pour les analyses de matières grasses présentes dans les bouillies par cette méthode couplée, il a fallu les extraire par un solvant sous forme de triglycérides. Ceux – ci ont ensuite été saponifiés par un mélange de soude méthanolique pour libérer les acides gras. Les acides gras libérés sont ensuite estérifiés afin de les rendre détectables par la GC – MS. La figure n°36 ci – dessous présente le protocole réactionnel.

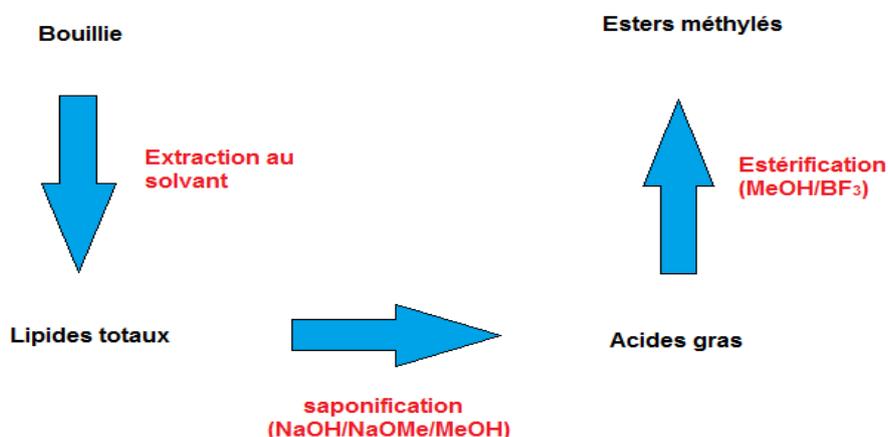


Figure n°36 : Protocole d'extraction des acides gras (adapté de BAUER, 2010).

Ce protocole d'extraction a été réalisé à partir de 500 mg de bouillie lyophilisée à laquelle est ajoutée 5 mL d'un mélange de solvant composé d'Hexane et d'Ethanol. La solution obtenue est soumise à agitation pendant 20 minutes dans un bécher de 50 mL. Le contenu est homogénéisé au vortex pendant 1 minute, puis laissé à décanter. Le surnageant est récupéré dans un ballon afin d'éliminer le solvant à l'évaporateur rotatif. Le résidu est mélangé à 5 mL d'une solution de soude méthanolique NaOH/NaOMe/MeOH puis chauffé à reflux pendant 30 minutes à l'aide d'un chauffe – ballon.

Il est refroidi 5 à 10 minutes avant d'y ajouter 10 mL d'une solution méthanolique de Trifluorure de Bore MeOH/BF₃ et 1 mL d'acide heptadécanoïque servant d'étalon interne pour la quantification des acides gras. Le mélange ainsi obtenu est porté à reflux pendant 30 minutes. Enfin, la quantité d'esters méthylés est extraite en ajoutant 20 mL d'eau saturée de sel (NaCl) afin de relarguer ces derniers en présence de 2 mL d'Hexane. On prélève 1 mL de la phase organique dans un vial pour l'analyse.

Afin d'améliorer le rendement en acides gras pour les analyses GC – MS, ce protocole d'extraction a été optimisé par la méthode des plans d'expériences. Ce qui a d'abord conduit à définir les facteurs à étudier et leurs niveaux de variations respectifs (Cf. Tableau n°24). Sans toutefois revenir sur les généralités concernant le plan d'expériences, nous précisons dans la suite, les particularités du type de matrice généré par MODDE 5.0.

Tableau n°24 : Facteurs et domaine de variation pour l'extraction des esters d'acides gras.

Facteurs	Niveau – 1	Niveau 0	Niveau +1
X1 : Solvant de 1 ^{ère} extraction	Hexane	Dichlorométhane	Hexane/Ethanol (1/1)
X2 : Température d'extraction (°C)	20	30	40
X3 : Temps d'extraction (min)	10	20	30
X4 : Temps de saponification (min)	10	20	30
X5 : Quantité de MeOH/BF ₃ (mL)	5	7,5	10
X6 : Temps d'estérification (min)	10	20	30
X7 : Solvant de fin d'extraction	Hexane	-	Dichlorométhane

La matrice a été construite à partir d'un algorithme d'échange de type FEDOROV puisque l'on étudie un ensemble de facteurs quantitatif et qualitatif soit à deux niveaux soit à trois niveaux. Le logiciel MODDE 5.0 a permis de générer la matrice d'expériences ci – après (Cf. Tableau n°25).

La réponse étudiée est le nombre d'acides gras estérifiés identifiables pour chacune des expériences du plan à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. On estime que plus le nombre d'acide gras obtenus sera important et meilleures seront les conditions dans lesquelles ces acides gras auront été extraits.

Tableau n°25 : Plan d'expériences et résultats d'extraction des esters d'acides gras.

Exp No	Solvant	T° extraction	Tps extraction	Tps de saponification	Qté MEOH /BF ₃	Tps de reflux	Solvant de fin	Nbre total d'AG
1	Hexane	40	10	10	5	10	Hexane	9
2	Hexane	40	30	30	5	10	Hexane	9
3	Hexane	40	30	30	10	30	Hexane	9
4	Hexane	20	10	30	10	20	Hexane	9
5	Hexane	20	10	20	5	30	Hexane	8
6	Hexane	20	30	10	7,5	30	Hexane	8
7	Hexane	20	20	10	10	10	Hexane	9
8	Dichlorométhane	20	30	10	5	10	Hexane	5
9	Dichlorométhane	40	10	30	5	30	Hexane	9
10	Dichlorométhane	20	30	30	10	30	Hexane	9
11	Dichlorométhane	20	10	30	7,5	10	Hexane	7
12	Dichlorométhane	40	10	10	10	20	Hexane	8
13	Dichlorométhane	40	20	30	10	10	Hexane	5
14	Dichlorométhane	30	10	10	5	30	Hexane	1
15	Dichlorométhane	30	30	20	7,5	20	Hexane	6
16	Hexane/Ethanol	40	30	10	10	10	Hexane	10
17	Hexane/Ethanol	20	30	30	10	10	Hexane	8
18	Hexane/Ethanol	40	30	10	5	30	Hexane	8
19	Hexane/Ethanol	20	30	30	5	30	Hexane	12
20	Hexane/Ethanol	20	10	10	5	20	Hexane	9
21	Hexane/Ethanol	20	10	20	10	30	Hexane	9
22	Hexane/Ethanol	40	10	30	7,5	30	Hexane	9
23	Hexane/Ethanol	30	10	30	5	10	Hexane	7
24	Hexane	20	10	10	5	10	Dichloro méthane	5
25	Hexane	40	10	30	10	10	Dichloro méthane	4
26	Hexane	20	10	10	10	30	Dichloro méthane	5
27	Hexane	20	30	30	10	30	Dichloro méthane	5
28	Hexane	40	30	10	10	20	Dichloro méthane	5
29	Hexane	40	20	30	5	30	Dichloro méthane	7
30	Hexane	30	30	10	5	30	Dichloro méthane	1
31	Dichlorométhane	40	30	10	5	10	Dichloro méthane	5

32	Dichlorométhane	20	30	30	5	10	Dichlorométhane	5
33	Dichlorométhane	20	10	10	10	10	Dichlorométhane	5
34	Dichlorométhane	20	30	10	5	30	Dichlorométhane	5
35	Dichlorométhane	40	10	20	5	10	Dichlorométhane	4
36	Dichlorométhane	40	30	30	7,5	30	Dichlorométhane	4
37	Dichlorométhane	40	20	10	10	30	Dichlorométhane	5
38	Dichlorométhane	30	10	30	10	30	Dichlorométhane	10
39	Dichlorométhane	30	30	10	10	10	Dichlorométhane	7
40	Hexane/Ethanol	40	30	30	5	10	Dichlorométhane	5
41	Hexane/Ethanol	40	10	10	10	10	Dichlorométhane	5
42	Hexane/Ethanol	20	10	30	10	10	Dichlorométhane	7
43	Hexane/Ethanol	40	10	10	5	30	Dichlorométhane	6
44	Hexane/Ethanol	20	10	30	5	30	Dichlorométhane	9
45	Hexane/Ethanol	20	30	10	10	30	Dichlorométhane	5
46	Hexane/Ethanol	40	30	30	10	30	Dichlorométhane	7
47	Hexane/Ethanol	20	30	20	5	10	Dichlorométhane	5
48	Hexane/Ethanol	30	20	10	7,5	20	Dichlorométhane	10

Ce plan permet de calculer les effets des différents facteurs à partir de la relation matricielle suivante :

$$b = ({}^tX.X)^{-1} . {}^tX.Y \quad (1)$$

X : matrice d'expériences en variable codée et tX : matrice transposée,

Y : réponses obtenues à partir du plan d'expériences.

Une modélisation mathématique de type polynômiale permet également de déterminer la réponse optimale, elle s'écrit sous la forme suivante :

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii} X_i^2 + \sum b_{ij} X_i X_j \quad (2)$$

b_0 : constante moyenne des résultats du plan ;

b_i : effet du facteur i,

b_{ii} : terme quadratique

b_{ij} : effet de l'interaction entre les facteurs i et j.

Toutes ces méthodes étant décrites, leur mise en œuvre a permis de collecter des résultats qui ont été traités d'une part par Microsoft Excel 2010 et d'autre part par MODDE 5.0. Ces résultats sont décrits dans la partie **3.3.3.4** ci – après.

La GC - MS utilisée pour notre quantification est un modèle *Shimadzu*, équipé d'un passeur d'échantillon AOC-20s. Le gaz vecteur est l'**azote** qui, en tant que phase mobile, véhicule les composants ionisés du mélange au détecteur à ionisation de flamme (**FID**). La colonne utilisée est une colonne capillaire en silice fondue imprégnée extérieurement de polyimide de 30m de long et de 0,53mm de diamètre. On procède en injectant 1µL de solution dans la colonne chauffée à 240°C en mode *Splitless*. Ce mode, recommandé pour la détection des éléments traces, consiste à piéger le solvant et le soluté en tête de colonne par la fermeture de la vanne de fuite pendant l'injection. La température du détecteur est fixée à 250°C. Le mélange gazeux passe dans la colonne située dans le four et chauffée à 60°C. La température augmente linéairement jusqu'à 240°C par palier de 8°C toutes les minutes pour au final atteindre 240°C et y être maintenue pendant 40 minutes.

Un mélange de composés standards de concentration connue (Tableau n°26) a été utilisé pour le traitement par comparaison des résultats du chromatogramme obtenu d'une bouillie. Ceci afin de déterminer les concentrations en acides gras dans la bouillie.

Tableau n°26 : Données des standards

Composés standard	Conc. (mg/L)	Aire
C4	5,050	11811201
C7	5,860	14332474
C9	5,910	10670088
C11	4,850	12741563
C16 :1	4,470	7289050
C17	0,000	0
C13	5,170	9398735
C18 :1	9,460	7794563
C18 :2	5,910	12988242
C18 :3	4,330	5600745
C14	5,000	8726252
C19 :1	2,515	2435971
C20 :4	1,725	1791948
C15	5,120	7055522
C22 :1	2,285	2621270
C17 :0 methyle	4,910	4617341
C24 :1	1,895	1991945
C20 :0	1,990	2290831
C21 :0	2,685	2139381
C23 :0	2,635	3900371

3.3.3.4 RESULTATS DU DOSAGE DES ACIDES GRAS DES BOUILLIES

Le profil en acides gras des bouillies exprimés ici dépend d'une part, des résultats du plan d'expériences mis en œuvre pour leur extraction et d'autre part des analyses effectuées par GC – MS. Pour ce faire, nous présenterons d'abord les résultats issus de l'optimisation de l'extraction des acides gras, ensuite les meilleures conditions d'extraction appliquées aux acides gras présents dans les bouillies et enfin les acides gras séparés et analysés par GC – MS.

3.3.3.4.1 RESULTATS DE L'OPTIMISATION DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES ACIDES GRAS

Ainsi, l'analyse statistique du plan d'expériences à partir des coefficients de corrélation R2 et Q2 a montré que le modèle est valide puisque **R2 = 1 et Q2 = 0,987**. Ce qui signifie que **98,7%** des réponses sont expliquées par le modèle mathématique. On peut donc conclure sur la fiabilité des expériences menées. Ce résultat est présenté par l'histogramme ci – après.

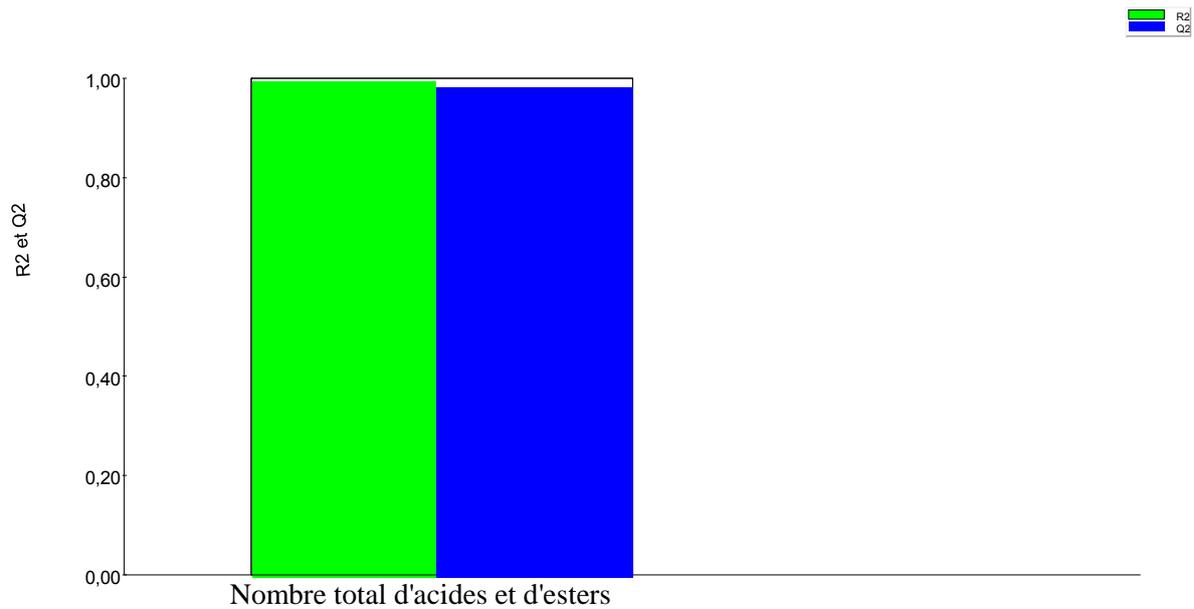


Figure n°37 : Qualité statistique du plan d'extraction des esters d'acides gras générée par MODDE 5.0.

A partir du plan d'expériences réalisé et de la relation matricielle (1) énoncée au paragraphe 3.3.3.3, on peut déterminer l'influence des différents facteurs mais également les interactions entre ces facteurs à partir de MODDE 5.0. La figure n°38 présente les résultats obtenus.

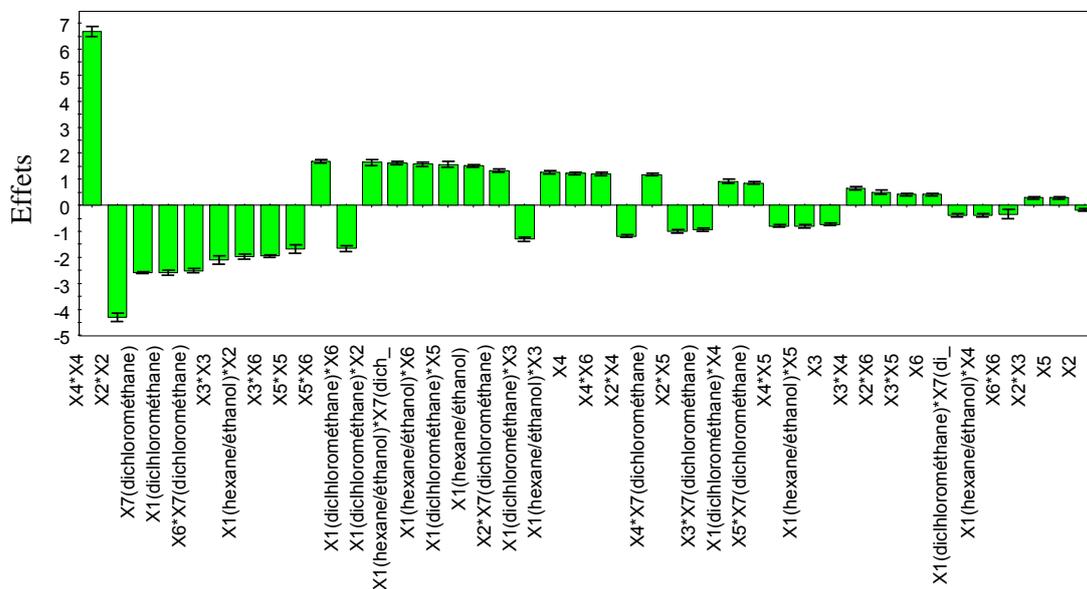


Figure n°38 : Effets principaux et effets d'interaction sur l'extraction des esters d'acides gras.

Des différents effets observés sur cet histogramme, on déduit que les facteurs principaux les plus importants sont la nature du **solvant de 1^{ère} extraction (X1)**, la nature du **solvant de fin d'extraction (X7)** et le **temps de saponification (X4)**.

En ce qui concerne les interactions, on peut relever l'interaction X6*X7 entre le **temps d'estérification (X6)** et le **solvant de fin d'extraction (X7)**, interaction qui est essentiellement dû à l'effet du facteur X7. De la même façon, plusieurs interactions notables ont lieu entre le facteur X1 et les autres facteurs mais qui sont dus à l'effet important du facteur X1. Les valeurs des coefficients des effets de chaque facteur et de leurs interactions sont rassemblées dans le tableau n°27 ci – bas.

Tableau n°27 : Valeurs numériques des effets principaux et d'interactions

Nombre total d'esters	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int(±)
Constant	7,40	0,03	1,45E-05	0,12
X1	DF = 2			
X1(Hexane)	0,54	0,01	3,53E-04	0,04
X1(Dichlorométhane)	-1,29	0,01	5,61E-05	0,04
X1(Hexane/Ethanol)	0,76	0,01	7,99E-05	0,03
X2	-0,09	0,01	3,62E-03	0,02
X3	-0,37	0,01	1,98E-04	0,02
X4	0,61	0,01	9,41E-05	0,02
X5	0,14	0,01	1,44E-03	0,02
X6	0,20	0,01	7,95E-03	0,02
X7	DF = 1			
X7(Hexane)	1,29	0,01	1,40E-05	0,02
X7(Dichlorométhane)	-1,29	0,01	1,40E-05	0,02
X2*X2	-2,14	0,02	7,66E-05	0,08
X3*X3	-1,05	0,02	2,94E-04	0,08
X4*X4	3,34	0,02	4,56E-05	0,09
X5*X5	-0,85	0,02	4,93E-04	0,08
X6*X6	-0,17	0,02	0,0126808	0,08
X1*X2	DF = 2			
X1(hexane)*X2	0,17	0,01	2,55E-03	0,04
X1(Dichlorométhane)*X2	0,82	0,01	2,6E-04	0,06
X1(Hexane/Ethanol)*X2	-0,99	0,01	1,15E-04	0,04
X1*X3	DF = 2			
X1(hexane)*X3	0,02	0,01	0,113468	0,03
X1(Dichlorométhane)*X3	-0,65	0,01	1,6E-04	0,04
X1(Hexane/Ethanol)*X3	0,63	0,01	1,39E-04	0,03
X1*X4	DF = 2			
X1(Hexane)*X4	-0,26	0,01	1,04 E-03	0,04
X1(Dichlorométhane)*X4	0,45	0,01	4,40 E-04	0,04

X1(Hexane/Ethanol)*X4	-0,19	0,01	2,07 E-03	0,04
X1*X5	DF = 2			
X1(Hexane)*X5	-0,38	0,01	5,90 E-04	0,04
X1(Dichlorométhane)*X5	0,78	0,01	2,37 E-04	0,05
X1(Hexane/Ethanol)*X5	-0,40	0,01	3,92 E-04	0,03
X1*X6	DF = 2			
X1(Hexane)*X6	0,04	0,01	0,05222	0,04
X1(Dichlorométhane)*X6	-0,83	0,01	2,49 E-04	0,06
X1(Hexane/Ethanol)*X6	0,79	0,01	1,49 E-04	0,04
X2*X3	0,14	0,01	2,21 E-03	0,03
X2*X4	-0,60	0,01	1,15 E-04	0,02
X2*X5	-0,50	0,01	1,34 E-04	0,02
X2*X6	0,25	0,01	1,30 E-03	0,04
X2*X7	DF = 1			
X2*X7(Hexane)	-0,66	0,01	1,33 E-04	0,03
X2*X7(Dichlorométhane)	0,66	0,01	1,33 E-04	0,03
X3*X4	0,32	0,01	4,51 E-04	0,03
X3*X5	0,21	0,01	7,11 E-04	0,02
X3*X6	-0,98	0,01	3,62E-05	0,03
X3*X7	DF = 1			
X3*X7(Hexane)	0,46	0,01	1,75 E-04	0,03
X3*X7(Dichlorométhane)	-0,46	0,01	1,75 E-04	0,03
X4*X5	-0,40	0,01	2,44 E-04	0,027
X4*X6	0,60	0,01	1,27 E-04	0,03
X4*X7	DF = 1			
X4*X7(Hexane)	-0,60	0,01	1,31 E-04	0,03
X4*X7(Dichlorométhane)	0,60	0,01	1,31E-04	0,03
X5*X6	0,85	0,01	8,62E-05	0,01
X5*X7	DF = 1			
X5*X7(Hexane)	-0,41	0,01	2,25 E-04	0,03
X5*X7(Dichlorométhane)	0,43	0,01	2,25 E-04	0,03
X6*X7	DF = 1			
X6*X7(Hexane)	1,25	0,01	4,69E-05	0,04
X6*X7(Dichlorométhane)	-1,25	0,01	4,69E-05	0,04
N = 43	Q2 =	0,987	Cond. no. =	23,05
DF = 2	R2 =	1	Y-miss =	0
	R2 Adj. =	1	RSD =	0,03
			Conf. lev. =	0,95

A partir des valeurs des coefficients, on a pu établir le modèle mathématique suivant la relation (2) énoncée au paragraphe 3.3.3.3. Il devient alors possible de prévoir le nombre de pics représentant un acide gras.

Pour ce faire, on utilise ce modèle mathématique pour tracer la surface de réponses ci – dessous décrivant les meilleures conditions opératoires à appliquer pour l’identification des acides gras extraits.

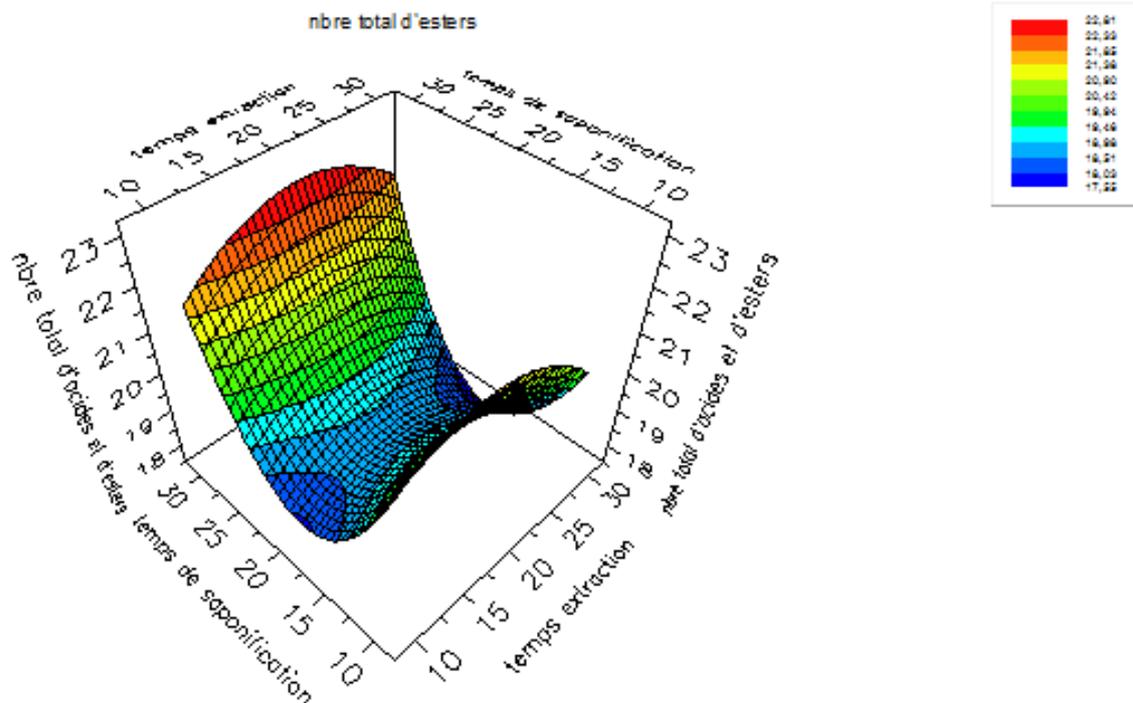


Figure n°39 : Surface de réponses concernant le nombre d’esters d’acides gras extraits à partir du plan d’expériences

Sur cette surface de réponses, et pour les conditions précédemment évoquées, on peut voir que **le maximum d’esters extraits sera atteint pour un temps d’extraction (X3) de 20 minutes et un temps de saponification (X4) à 30 minutes**. Ainsi, les conditions opératoires générées par surface de réponses sont rapportées dans le tableau ci – dessous.

Tableau n°28 : Conditions opératoires optimales pour l’extraction des esters d’acides gras

Facteurs		Niveau
X1	Solvant de 1 ^{ère} extraction (mL)	Ethanol/Hexane (1/1) [+1]
X2	Température d’extraction (°C)	20 [- 1]
X5	Quantité de MeOH/BF3 (mL)	10 [+ 1]
X6	Temps de reflux (min)	30 [+ 1]
X7	Solvant d’extraction finale	Hexane [- 1]

Ces conditions ont été vérifiées afin de déterminer si elles permettent l'obtention d'un maximum d'acides gras ou non afin de valider la méthode. Les deux chromatogrammes obtenus avant et après optimisation de l'extraction sont présentés ci-dessous.

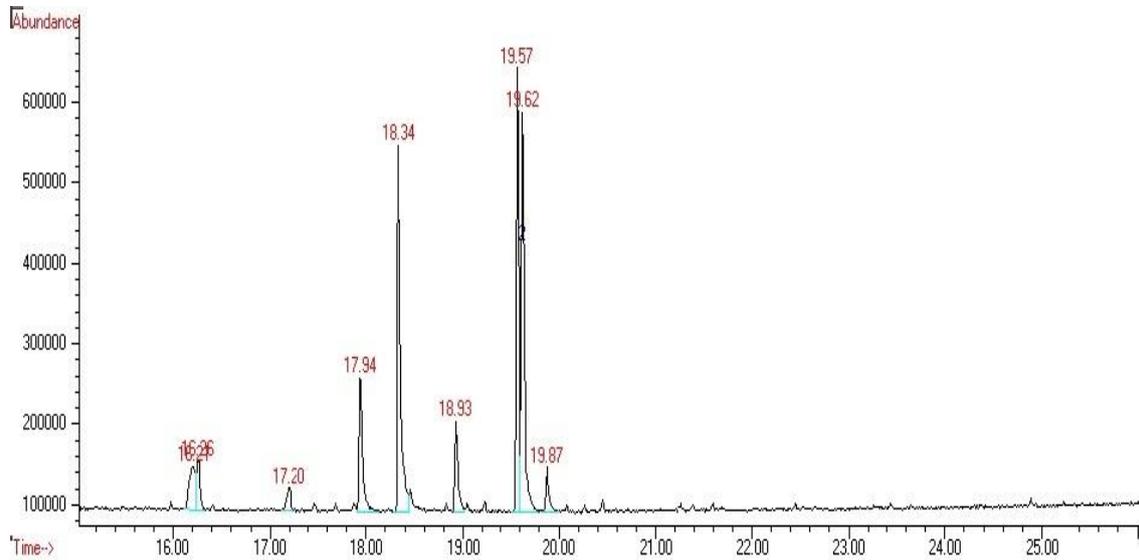


Figure n°40 : Chromatogramme dans des conditions non optimisées.

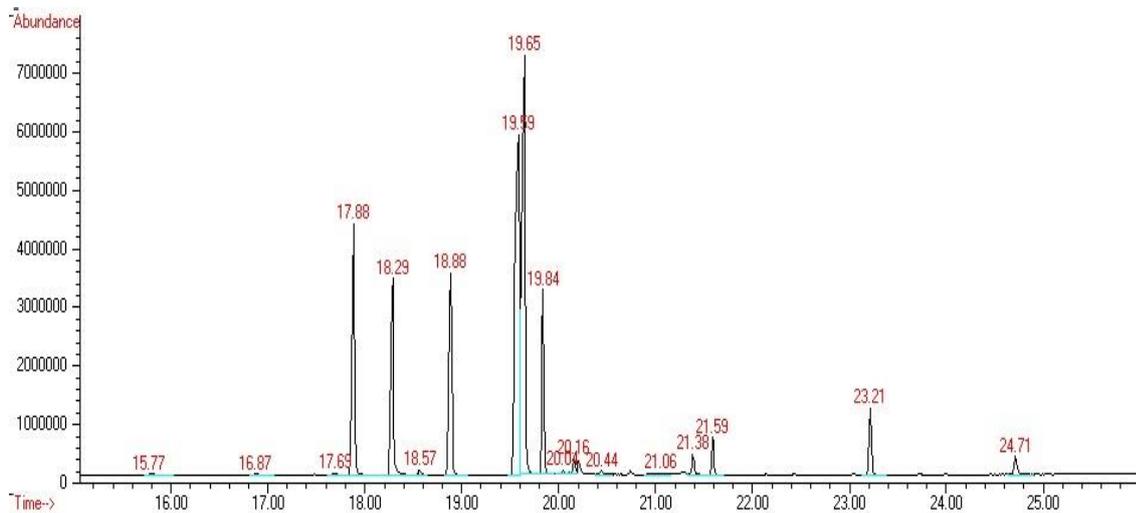


Figure n°41 : Chromatogramme dans les conditions optimales du plan d'expériences

Quelques acides gras isolés dans les conditions optimales sont résumés dans le tableau n°29 ci – après.

Tableau n°29 : Liste des acides gras identifiés par spectrométrie de masse

Formule	Nom usuel	Temps de rétention (min)
H ₃ C-(CH ₂) ₁₂ -COOH	Acide myristique	15,81
H ₃ C-(CH ₂) ₁₃ -COOH	Acide pentadécanoïque	16,88
H ₃ C-(CH ₂) ₁₄ -COOH	Acide palmitique	17,91
H ₃ C-(CH ₂) ₁₄ -COOEt	Acide palmitoléique	17,69
H ₃ C-(CH ₂) ₁₅ -COOH	Acide margarique	18,87
H ₃ C-(CH ₂) ₁₆ -COOH	Acide stéarique	19,83
C18 à 1 insaturation (C18 :1 n – 7)	Acide octadécanoïque	19,55
C18 à 2 insaturations (C18 :2 n – 6)	Acide linoléique	19,70
C18 à 2 insaturations cis (C18 :3 n – 6)	Acide gamma linoléique	19,65
C18 à 1 insaturation cis (C18 :1 n – 9)	Acide oléique	20,07
H ₃ C-(CH ₂) ₁₈ -COOH	Acide arachidique	21,57
H ₃ C-(CH ₂) ₂₀ -COOH	Acide béhénique	23,18

3.3.3.4.2 RESULTATS DE L'IDENTIFICATION DES ACIDES GRAS CONTENUES DANS LES 12 BOUILLIES FORMULEES A PARTIR DU PLAN D'HADAMARD

A partir des conditions optimisées de l'extraction des acides gras établies dans le paragraphe précédent, nous avons cherché à identifier les acides gras contenus dans les 12 bouillies formulées à partir du plan *d'Hadamard*

Le plan *d'Hadamard* associé à cette étude comporte 12 expériences (Tableau n°4 Chapitre n°2 paragraphe 2.2.3) pour lesquelles les niveaux correspondants à chaque facteur sont donnés par permutation circulaire des signes – 1 et +1 à partir d'une ligne de signes préétablis. Les effets Y de chacun des facteurs sur ce type de matrice peuvent être calculés de façon simplifiée en utilisant la relation suivante :

$$b_i = 1/2 [M_{X_i=+1} - M_{X_i=-1}]$$

On définit comme réponse Y la quantité d'acides gras extraits des bouillies et détectés par GC – MS dans les conditions optimales d'identification déterminées à partir du plan précédent.

A ces conditions (tableau n°27) est ajouté **5,2 mg/mL** d'ester d'acide margarique (C17) comme étalon interne. La solution étalon de concentration connue est injectée afin que les paramètres tels que le temps de rétention et l'aire du pic soient comparés à ceux de l'échantillon pour calculer la concentration de l'échantillon à partir de la relation suivante :

$$M_x = (\text{Surface de } x / \text{Surface de l'étalon}) * \text{Concentration de l'étalon}$$

Toutes les réponses Y sont exprimées en mg/mL.

Le tableau n°30 ci – dessous est une reprise du tableau n°4 chapitre n°2 paragraphe 2.2.3, complétée avec les valeurs des réponses Y calculées.

Tableau n°30 : Plan *d'Hadamard* en variables codées sur la préparation des bouillies et effets des facteurs

Essai	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	Y
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	0,90
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	0,28
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	0,57
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	1,92
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	3,25
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	3,62
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	1,97
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	4,10
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	3,04
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	5,08
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	5,44
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1,35

L'importance des effets est visualisée sur l'histogramme ci-dessous :

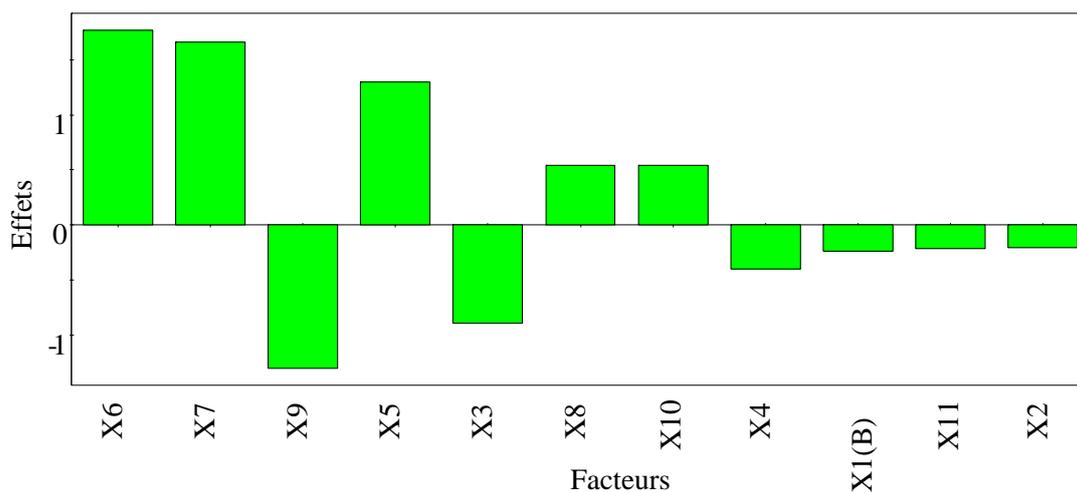


Figure n°42 : Histogramme des effets principaux sur la quantification des esters d'acides gras.

On observe sur la figure n°42 que les facteurs les plus importants sont, une fois de plus, la quantité de chenille (X6), la quantité de banane (X7), la température de cuisson (X9), et la quantité d'orange (X5). Les facteurs X5, X6 et X7 étant positifs, cela signifie que la réponse étudiée augmente lorsque ces facteurs passent du niveau - 1 au niveau +1.

L'intérêt de l'étude étant d'obtenir la réponse la plus élevée, c'est-à-dire le taux de lipides le plus important, il sera donc judicieux de placer ces facteurs au niveau +1, ce qui correspond à introduire une quantité **3 g** respectivement pour les poudres de l'albédo d'orange, de chenilles et de banane.

L'effet positif de la quantité d'orange (X5) peut s'expliquer par la quantité relativement importante de vitamine C d'environ **39,7 mg/100g** (Cf. tableau n°6) susceptible de libérer par hydrolyse acide des triglycérides, des acides gras présents dans les échantillons de bouillies.

L'analyse du plan d'expériences montre également un effet positif de la quantité de banane (X7) sur la quantité de lipides. La banane douce fraîche présente de façon naturelle un profil intéressant en acides gras comme exposé dans le tableau ci – dessous.

Tableau n°31 : Apport des acides gras pour 100g de bananes fraîches³⁷

Lipides	227 mg
Acide Gras saturés	61,6 mg
- Acide laurique	0,23 mg
- Acide myristique	0,64 mg
- Acide palmitique	52,5 mg
- Acide stéarique	2,07 mg
Acide Gras monoinsaturés	18,4 mg
Acide Gras polyinsaturés	73,8 mg
Acides Gras Oméga 3	
- Acide alpha-linolénique / ALA	26,3 mg
Acides Gras Oméga 6	
- Acide linoléique	39 mg
- Acide arachidonique / AA ou ARA	0,28 mg
Acides Gras Oméga 9	
- Acide oléique	10,4 mg

Ce qui représente une source non négligeable d'apport à considérer dans les bouillies.

³⁷ <http://informationsnutritionnelles.fr/banane>

Pour le facteur température de cuisson (X9), son effet est significatif, toutefois celui – ci étant négatif il implique une diminution de la réponse lorsque ce facteur passe du niveau – 1 au niveau +1. Aussi, la température de cuisson sera fixée à 65°C qui est le niveau le plus bas.

Pour la chenille (X6), on constate que son apport en lipides a un effet considérable sur la quantité de lipides mesurée. Ce qui a conduit à extraire à partir de **0,5 g** de poudre de chenille environ **1,5%** d'acides gras soit une concentration de **7,47 mg/mL** de lipides totaux.

En effet, la quantité de lipides extraits de la poudre de chenille a révélé une composition non négligeable en acide gras comme on peut le constater sur le chromatogramme ci-dessous :

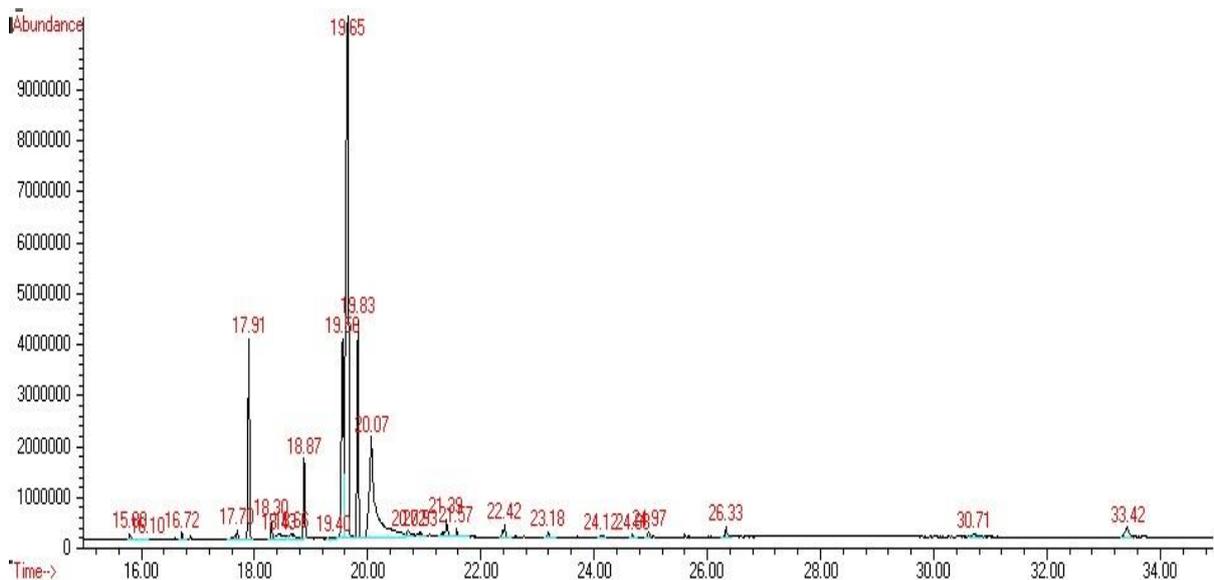


Figure n°43 : Chromatogramme de quantification des acides gras extrait de la chenille

L'objet de cette partie étant la connaissance des rapports des acides gras les plus importants en comparaison d'un mélange alimentaire avec un autre et non un dosage de composition, la quantification d'acides gras de la chenille fera l'objet d'une étude approfondie en perspective de ce projet.

Quant aux autres facteurs de cette recherche notamment l'arachide (X2), la mangue (X4), le type de farine (X1B), et la vitesse d'agitation (X11), leurs effets étant négligeables, on fixera ces derniers au niveau le plus rentable c'est – à – dire au niveau le moins élevé.

On peut s'étonner de l'effet négligeable de la quantité d'arachide (X2) sur l'étude menée puisque ce composant est une source riche en lipides. Toutefois, ce qui est mesuré est l'impact

de la différence apportée par les niveaux +1 et – 1 choisis pour ce facteur. Si, comme pour les autres composants, nous avons choisi 2 niveaux considérant l’apport ou non de la quantité d’arachide, l’effet apporté par ce paramètre aurait été sans doute bien plus important. Cependant, l’abondance d’arachide en Centrafrique et son faible coût, contribuent à son ajout de façon systématique aux préparations de bouillie de base. C’est pourquoi, nous avons considéré d’emblée ce facteur à un certain niveau de présence.

Les valeurs des différents effets, déterminées à partir de la relation $b_i=1/2 [M_{X_i=+1} - M_{X_i=-1}]$, sont rassemblées dans le tableau n°32.

Tableau n°32 : Valeurs numériques des effets

Y	Coefficient
Constant	2,63
X1(A)	0,12
X1(B)	-0,12
X2	-0,11
X3	-0,45
X4	-0,21
X5	0,65
X6	0,88
X7	0,83
X8	0,27
X9	-0,65
X10	0,27
X11	-0,11

La modélisation mathématique sur un plan d’*Hadamard* est exprimée selon la relation suivante : $Y = b_0 + \sum b_i X_i$. Cette relation permet de générer par MODDE 5.0 la surface de réponses jointe ci – après.

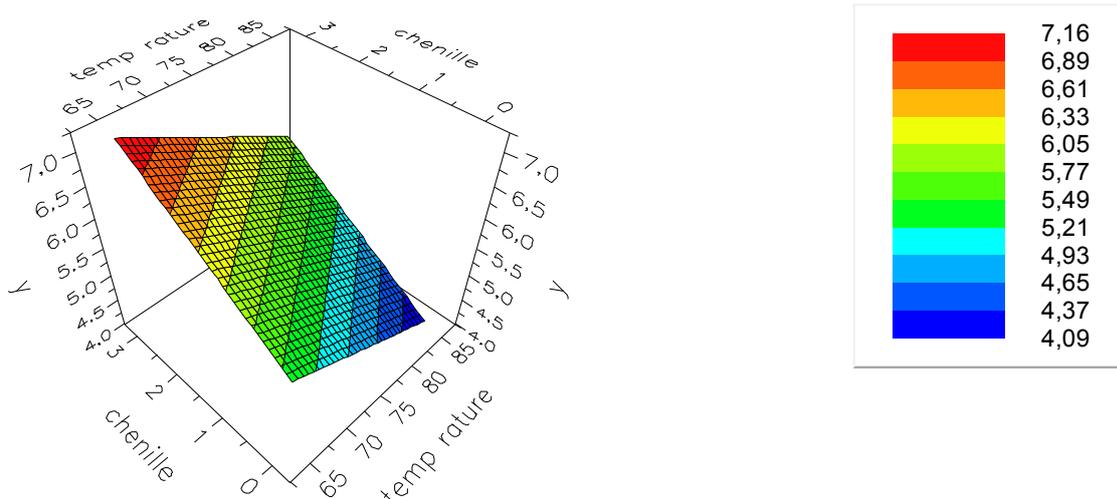


Figure n°44 : Surface de réponses pour la quantité d'esters d'acides gras (mg/mL) extraite.

On remarquera sur cette surface de réponses que la température de cuisson (X9) est un facteur important par rapport à la quantité de lipides et que celui – ci doit être fixé à **65°C** pour obtenir une bonne réponse.

En effet, l'augmentation de la température peut provoquer une dégradation partielle de certains lipides et influencer sur la quantité totale de lipides présents dans chaque bouillie.

Dans cette étude, certains facteurs peuvent être considérés à une valeur limite, c'est le cas de la quantité de sucre (X3), le temps de cuisson (X8) et le volume d'eau (X10). Pour ces derniers, l'effet est plutôt positif sur la quantité de lipides extraits des bouillies.

En effet, on a observé que plus le temps de cuisson est long, plus il faut une quantité d'eau importante qui facilite les réactions d'hydrolyse et plus la libération d'acides gras (à partir de triglycérides) sera favorisée. Concernant l'effet de la quantité de sucre, on constate que celui – ci est négatif sur la réponse. On en conclut que la présence de sucre chimiquement composé de motifs glucosidiques (cycle à 6 atome de carbone et comportant des groupements hydroxyle) qui sont susceptibles de subir, dans les conditions de préparation de la bouillie, une réaction de complexation avec les acides gras libérés et masquer les lipides présents dans la préparation.

En conséquence, la complexation d'acides gras libérés dans le milieu aux groupements hydroxylés peut entraîner l'apparition de saccharolipides ou lipopolysaccharides non détectables par la méthode chromatographique utilisée.

En conclusion et en tenant compte des éléments apportés ci – dessus on peut dresser le tableau des meilleures conditions à la quantification des lipides totaux présents dans une bouillie alimentaire comme présenté ci – bas.

Tableau n°33 : Valeurs des facteurs jouant sur une réponse optimale à partir de la réponse en quantité de lipides.

Facteur		Niveau
X1	Type farine	A
X2	Arachide	2,5
X3	Sucre	0
X4	Mangue	0
X5	Orange	3
X7	Banane	3
X8	Temps cuisson	10
X10	Volume d'eau	250
X11	Agitation	200
X6	Chenille	3g
X9	Température de cuisson	65°C

Ce qui peut correspondre aux formulations n°8, 10 et 11 pour avoir la meilleure teneur en lipides.

3.4 COMPARAISON DE LA FORMULATION OPTIMISEE AVEC DEUX BOUILLIES COMMERCIALES

Les principes et conseils édictés dans le cadre d'une meilleure alimentation du nourrisson et du jeune enfant précisent qu'il n'est pas possible de donner des prescriptions nutritionnelles mondiales pouvant garantir l'apport adéquat de tous les éléments nutritifs essentiels. Cependant, des suggestions basées sur des arguments scientifiques permettent d'orienter les choix des denrées alimentaires à partir desquelles des formulations pour nourrissons et jeunes enfants devraient s'appuyer et à des proportions relatives tenant compte des tables de composition des aliments locaux (OPS, 2003).

A la fin du chapitre n° 2 consacré la recherche de formulation d'une bouillie infantile, deux bouillies alimentaires présentes dans le commerce et choisis au hasard ont été utilisées en comparaison de texture aux 12 bouillies du plan d'expériences. Les profils nutritionnels de ces deux denrées sont présentés dans le tableau ci – dessous.

Tableau n°34 : Valeurs nutritionnelles de deux aliments de complément.

	Dès 4mois*	Dès 6mois**
Analyse moyenne	Pour 100g	
Valeur énergétique	119kJ/28 Kcal	324kJ/77kcal
Matières grasses dont	0,1g	3,6g
Acides gras saturés	0,02g	1,2g
Glucides dont	4,3g	4g
Sucres	0,5g	<1g
Fibres alimentaires	1,6g	<0,5g
Protéines	1,7g	7g
Sel	0,07g	0,08g
Sodium	28mg	0,03g

*Epinards, Pomme de terre sans gluten, Eau.

**Viande de poulet, Amidons, Huiles végétales (colza, tournesol).

De ce tableau, on retiendra que les valeurs moyennes de protéines varient entre **1,7 à 7%** dans les denrées offertes dès 4 mois et à partir de 6 mois respectivement.

Sur les 12 essais de formulation par plan d'expériences, nous avons obtenus des teneurs en protéines de l'ordre de **5 à 8%** (Cf. tableau n°20 et figure n°23) sur les essais contenant de la poudre de chenilles qui représente la source principale de protéines. Les essais **n°4, 6, 7, 9, 10 et 11** ont été les formulations ayant les plus fortes teneurs en protéines et particulièrement l'essai **n°6** avec **8,04 g** de protéines pour 100g de bouillie.

Pour les teneurs en lipides, les essais **n°8, 10 et 11** ont permis d'avoir des quantités importantes d'acide gras (Cf. tableau n°30) parmi lesquels l'essai **n°11** avec une valeur plus importante de l'ordre de **5,44 mg/mL**.

Pour la vitamine C, les essais **n°7 et 9** sont celles sur lesquelles les concentrations en vitamine C sont les plus élevées.

3.5 CONCLUSION

La caractérisation biochimique des bouillies préparées à partir d'un plan d'expériences de type *Hadamard* a permis de quantifier une gamme de concentration en protéines totales et en vitamine C conformément aux objectifs d'enrichissement définis. Un intérêt a été porté aux lipides des bouillies préparées compte tenu de leur importance dans l'alimentation des nourrissons et des jeunes enfants : Ils (i) fournissent des acides gras essentiels, (ii) facilitent l'absorption des vitamines liposolubles, (iii) augmentent la densité énergétique et les qualités sensorielles des bouillies (OPS, 2003).

Notons tout de même que certains composés lipidiques peuvent être la cause de dyslipidémies et donc représenter un facteur de risque important d'apparition d'anomalies affectant des organes tels que le foie ou les reins chez les nourrissons et les jeunes enfants. C'est ainsi que la poudre de chenille, qui est une des sources de lipides (avec l'arachide) faisant partie des ingrédients ajoutés à cette recherche de formulation a fait l'objet de caractérisation. D'abord, une extraction optimisée des acides gras des bouillies qui ont ensuite été identifiés par GC – MS.

Ainsi, au vu des résultats auxquels nous avons abouti, une approche de formulation optimale susceptible de répondre aux objectifs de couverture des besoins nutritionnels du nourrisson et du jeune enfant en protéines et vitamines à partir des ingrédients que nous avons choisi et dans les conditions définies de nos expériences devra tenir compte de quatre paramètres mesurés au cours de cette étude : la texture, la teneur en protéines, la teneur en lipides et la teneur en vitamine C. Sur cette base et en fonction des résultats précédents, **la formulation n°9** est la combinaison idéale pour l'atteinte de nos objectifs. Nous déduisons ainsi les proportions de cette formule optimisée à partir du tableau n°5 du Chapitre n° 2.

Tableau n°35 : Formulation pour un enrichissement en protéines et vitamines d'une bouillie infantile.

Essai n°	Type de farine	Arachide (g)	Mangue (g)	Orange (g)	Chenille (g)	Tps de cuisson (min)	Température de cuisson (°C)	Volume d'eau (mL)
9	20/20	2,5	3	3	3	10	85	150
	X1A	X2	X4	X5	X6	X8	X9	X10

Cette formulation représentée en proportion d'ingrédients pour 100 mL de bouillie peut être représentée comme suit :

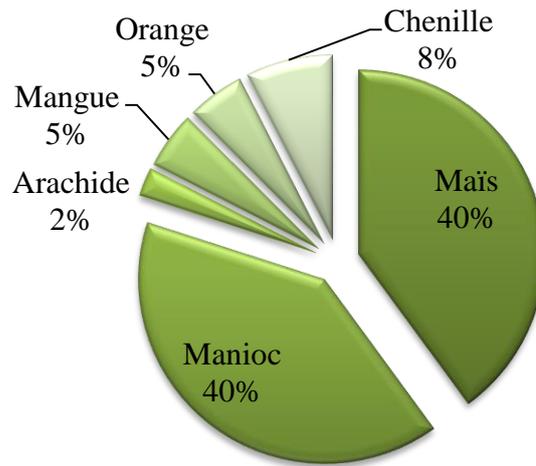


Figure n°45 : Portions d'ingrédients pour 100mL de bouillie.

L'énergie métabolisable de cette formule optimisée est calculable à partir des coefficients d'Atwater (ATWATER, 1906), des données de la table de composition nutritionnelle du Centre d'Information sur la Qualité des Aliments (CIQUAL, 2013) et des résultats des travaux de Rumpold et *al.* à propos des chenilles comestibles (RUMPOLD B.A et SCHLÜTER O.K., 2013).

Tableau n°36 : Extraits des tables de composition nutritionnelle des ingrédients inclus dans la formule optimisée (CIQUAL, 2013 ; RUMPOLD B.A et SCHLÜTER O.K., 2013)

	Maïs	Manioc	Arachide	Mangue	Orange	Chenille ³⁸
Protéines (g/100g)	1,4	0,3	29,6	0,7	0,95	62,03
Glucides (g/100g)	13,2	38	14,8	13,6	8,32	n.d
Lipides (g/100g)	0,31	1,4	49,6	0,2	0,26	25,36

La conversion de ces valeurs de références en tenant compte des quantités de la formule optimisée donne les résultats du tableau n°37 ci – après.

³⁸ *Imbrasia sp.*

Tableau n°37 : Apport en énergie métabolisable de la formule optimisée.

	Maïs (g)	Manioc (g)	Arachide (g)	Mangue (g)	Orange (g)	Chenille (g)
Formule opt.	20	20	2,5	3	3	3
Protéines (g/100g)	0,28	0,06	0,74	0,021	0,029	1,86
Glucides (g/100g)	2,64	7,6	0,37	0,41	0,25	n.d
Lipides (g/100g)	0,06	0,28	1,24	0,006	0,008	0,77

En énergie métabolisable, cette formule optimisée offrira des proportions d'ingrédients telles que résumées dans le tableau n°38.

Tableau n°38 : Apport nutritionnel de la formule optimisée.

	Maïs	Manioc	Arachide	Mangue	Orange	Chenille	Total
Formule opt.	20	20	2,5	3	3	3	
Protéines (Kcal)	1,12	0,24	2,96	0,084	0,114	7,44	11,96
Glucides (Kcal)	10,56	30,4	1,48	1,63	0,99	n.d	45,07
Lipides (Kcal)	0,56	2,52	11,16	0,054	0,07	6,85	21,21

Cette formule offre alors **78,24 Kcal** d'énergie métabolisable pour 100 g de bouillie avec une proportion en protéines totales de l'ordre de **12 Kcal**.

En considérant une moyenne de trois (3) un repas par jour à raison de 250 g de bouillie par repas, l'apport nutritionnel sera de **586, 8 Kcal** couvrant les besoins supplémentaires du nourrisson et du jeune enfant évalués à 550 Kcal suivant les recommandations du groupe de travail FAO/OMS/UNU (Cf. tableau n°4).

Fort de ces résultats, nous nous sommes attelés d'une part à la préparation de la bouillie infantile optimisée et d'autre part à une estimation du prix de l'offre alimentaire proposée tenant compte des dépenses du ménage consacrées à l'intégration de cet aliment de complément dans le régime alimentaire du nourrisson et du jeune enfant dans un contexte comme celui de la République centrafricaine.

3.5.1 PREPARATION DE LA BOUILLIE INFANTILE OPTIMISEE

Cette préparation s'est faite suivant le diagramme technologique (Figure n°7 paragraphe 2.4.5). Notons que l'apprêtement des ingrédients a été décrit au chapitre n°2 paragraphe 2.2.4. Les photographies ci – après montrent quelques opérations unitaires réalisées.

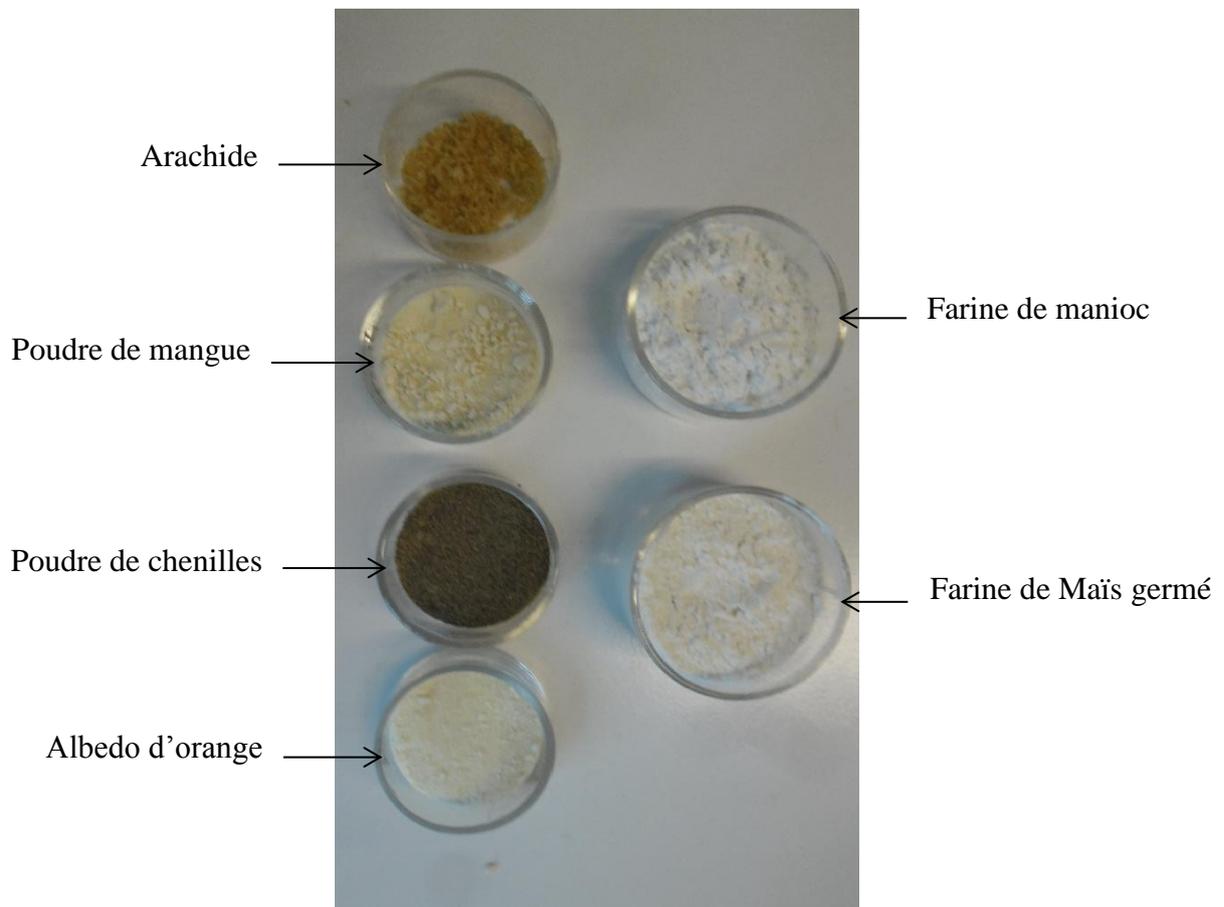


Figure n°46 : Ingrédients après pesée.

Les proportions pesées respectent la formulation du tableau n°35 paragraphe 3.5.



Figure n°47 : Mélange sec et Pâte humide



Figure n°48 : Cuisson et homogénéisation



Figure n°49 : Transvasement et conditionnement de la bouillie optimisée

3.5.2 ESTIMATION DU PRIX DE VENTE

Nous nous sommes essentiellement basés sur un éventuel prix d'acceptabilité³⁹ de l'offre en fonction du pouvoir d'achat tel que rapporté à l'introduction générale page 4. Le prix d'acceptabilité ou prix psychologique est le prix qui sera accepté par le plus grand nombre de clients. Il est suffisamment important pour donner une image de qualité et de fiabilité du produit sans être trop élevé pour devenir un frein à l'achat. Il peut être défini suite à une enquête. Pour notre cas, nous nous sommes basés sur la connaissance du contexte et les rapports socioéconomiques (ICASEES, 2012, DSRP-II, 2012 – 2016⁴⁰).

Ainsi, partant du prix de l'existant composé essentiellement de farines infantiles importées et vendues à 4000 FCFA (6€), nous envisageons deux solutions : soit une réduction du prix à partir du prix de l'existant en maintenant la quantité journalière à savoir un emballage de 750g à 1000FCFA (~2€), soit une formulation en emballage de 500g à 500FCA (~1€).

Le tableau ci – dessous résume le profil des dépenses éventuelles consacrées à l'alimentation du nourrisson et du jeune enfant sur la base de la bouillie infantile optimisée dans le cadre de ce projet.

Tableau n°39 : Estimation des dépenses alimentaires chez le nourrisson et le jeune enfant en Centrafrique.

Quantité moyenne (g)	Prix Unitaire (FCFA)	Prix Unitaire (EUR)	Nombre de repas journalier	Dépenses mensuelles moyennes (FCFA)	Dépenses mensuelles moyennes (EUR)
750	4 000 XAF	6 €	3	120 000 XAF	183 €
Solution de réduction sur le coût					
750	1 000 XAF	2 €	3	30 000 XAF	46 €
Solution de réduction de la quantité journalière					
500	500 XAF	1 €	2	15 000 XAF	23 €

En sachant que l'aliment de complément est intégré au régime du nourrisson et du jeune enfant en complément soit du lait maternel, soit du plat familial et autres denrées telles que les

³⁹ <http://blog.businessstoolbox.fr/wp-content/uploads/downloads/2013/02/La-fixation-du-prix-de-vente-V2.pdf>

⁴⁰ http://www.cf.undp.org/content/dam/car/docs/op%C3%A9rations/cadrelegal/rcafb_pp-rca2012-2016-NtesyntFINAL.pdf

fruits de saison qui sont très souvent disponibles, notre approche représente une garantie de prévention quant aux risques de malnutrition infanto – juvénile dans le contexte centrafricain où il est plus aisé de déboursier 15 000FCFA (23€) pour l'alimentation complémentaire du nourrisson et du jeune enfant plutôt que 30 000FCFA (46€) représentant les 2/3 du revenu moyen en République centrafricaine.

Bien entendu, l'évaluation du coût de production n'a pas été tenue en compte dans l'estimation du prix de vente de l'aliment de complément formulé. Toutefois, ces deux approches notamment la formulation et les dépenses alimentaires du ménage devraient pouvoir, à court terme, permettre d'analyser le coût de production, préalable nécessaire pour la mise à exécution des objectifs du projet.

Enfin, ayant remarqué que l'ajout de chenille est un paramètre qui a une influence marquée sur les niveaux d'apport en protéines, lipides et vitamine C, ces résultats ont conduit à envisager une caractérisation plus spécifique des protéines de chenilles. Cette étude a fait l'objet du chapitre n°4 suivant.

CHAPITRE 4
RECHERCHE SPECIFIQUE SUR LES PROTEINES DE CHENILLES
ET PROPRIETES BIOLOGIQUES

4.1 INTRODUCTION

L'entomophagie est la consommation d'insectes par les humains. Elle est pratiquée dans de nombreux pays au monde, principalement dans les régions d'Asie, d'Afrique et d'Amérique latine. MALAISSE et *al.* ont rapporté des témoignages anciens de consommation d'insectes dans les manuscrits relatant l'expédition de **Simon Van der Stel** entre 1685 et 1686 au Namaqualand⁴¹. L'entomophagie n'est pas une curiosité mais elle fait partie de toutes les cultures. Certaines l'ont conservée, d'autres l'ont oubliée (MALAISSE et *al.*, 2003).

Selon les estimations de la FAO/WUR, plus de 1900 espèces d'insectes complètent les régimes alimentaires d'environ 2 milliards de personnes dans le monde en général et en particulier dans les pays en développement comme la République centrafricaine. Ce nombre augmente à mesure que les recherches prennent de l'ampleur (FAO/WUR, 2013 ; KWIRI et *al.*, 2015). Les espèces d'insectes comestibles sont mangées souvent crues, séchées voire fumées. Lorsqu'elles sont fumées pour en assurer une meilleure conservation, elles peuvent être ensuite bouillies, grillées, frites ou préparées sous forme de galettes (MIGNON, 2003).

La croissance démographique, l'urbanisation et la montée des classes moyennes ont fait augmenter la demande mondiale en aliments, notamment en protéines d'origine animale. D'ici à 2030, plus de 9 milliards de personnes devront être nourries, tout comme les milliards d'animaux élevés chaque année pour l'alimentation, les loisirs et comme animaux de compagnie. C'est pourquoi, en considérant les insectes comestibles comme une source naturelle renouvelable d'aliments qui garantira des avantages nutritionnels, économiques et écologiques à toutes les communautés, de nouvelles preuves scientifiques doivent être recherchées. Au paragraphe **2.3** du chapitre n°2 à propos des généralités sur les ingrédients inclus dans la recherche de formulation de la bouillie, des données sur la composition biochimique de quelques espèces d'insectes et notamment de chenilles comestibles ont été rapportées (Cf. paragraphe **2.3** Tableau n°8).

⁴¹ Région d'Afrique du sud et de la Namibie.

Dans ce chapitre consacré à la recherche spécifique sur les protéines de chenilles comestibles utilisées dans une formule alimentaire pour nourrisson et jeune enfant, nous avons utilisé une technique procédant par solubilisation à partir d'une poudre de chenilles pour en extraire les protéines. Ensuite, par un dosage de l'azote par la méthode de Kjeldahl, les protéines totales ont été quantifiées dans les deux fractions après solubilisation. Une autre technique à savoir l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été appliquée en vue de séparer et identifier les protéines et/ou peptides à travers leurs masses moléculaires et leurs propriétés physico-chimiques. Puis, des méthodes chromatographiques (HPLC, LC – MS) ont également été utilisées pour caractériser les fractions protéiques. L'activité biologique de ces fractions a été testée. Enfin, quelques éléments de systématique sur les espèces utilisées ont été rapportés ainsi qu'un dosage des minéraux a été effectué par la technique de plasma induit couplée à une spectrométrie d'émission atomique (ICP – AES).

4.2 SOLUBILISATION DES PROTEINES A PARTIR D'UNE POUDRE DE CHENILLES

La solubilité est la capacité d'une substance à être dissoute. Un solide, un liquide ou un gaz peuvent être mis en solution. Ainsi, une substance peut être isolée dans la phase où elle est miscible. Dans le cas des protéines et compte tenu de multiples groupes acido – basiques qui les composent, leur solubilité est influencée par des facteurs tels que la température, le potentiel d'Hydrogène (pH), la polarité du solvant (constante diélectrique) et la concentration en sels dissous (force ionique). La structure et l'ultrastructure de nombreuses protéines en solution dépendent du pH notamment à cause des groupes acido – basiques qu'elles portent. Ainsi, pour éviter d'endommager ces substances biologiques par des variations de pH, on utilise des solutions tampons qui maintiennent le pH dans la zone de stabilité de ces substances. Dans ces solutions tampon, les protéines ont une solubilité minimale, correspondant à une charge nette nulle (VOËT, 2005). La valeur de pH pour laquelle il y a autant de charges positives que de charges négatives sur la protéine est appelée *point isoélectrique*, *pI*, de la protéine. Cette valeur est caractéristique de chaque protéine.

Le tableau n°40 ci – après présente quelques valeurs de point isoélectrique de protéines connues.

Tableau n°40 : Points isoélectriques de quelques protéines (VOËT, 2005)

Protéines	pH isoélectrique
Pepsine	<1.0
Ovalbumine (Poule)	4.6
Sérum albumine (Homme)	4.9
Insuline (Bœuf)	5.4
Myoglobine (Cheval)	7.0
Hémoglobine (Homme)	7.1
Histone (Bœuf)	10.8
Salmine (Saumon)	12.1

C'est ainsi que nous nous sommes basés sur le pH pour les essais d'extraction des protéines à partir d'une poudre de chenilles.

MODE OPERATOIRE

A partir de la poudre brute de chenilles, cinq solutions à 10% (p/v) ont été préparées. Ces solutions ont été ionisées soit par de l'acide chlorhydrique (HCl, 1 mol.L⁻¹) pour une acidification, soit par de l'hydroxyde de sodium (NaOH, 1 mol.L⁻¹) pour les alcaliniser. Ce qui a permis de disposer de solutions à différents **pH** notamment **3, 4, 7, 10 et 11**. Ces mélanges ont ensuite été conservés 24 heures à température ambiante. Les deux phases (surnageant et culot) ont été collectées séparément et conservées au réfrigérateur pour les analyses.

4.2.1 RESULTATS DE LA SOLUBILISATION

Les photographies prises après 24 heures et avant séparation des deux phases.



Figure 50 : Photographie de fractions totales à pH 3, 4, 7, 10 et 11 à partir d'une poudre de chenilles



Figure n°51 : Photographie de surnageants à pH 3, 4, 7, 10 et 11 à partir d'une poudre de chenilles.

Ces photographies montrent des solutions troubles à **pH 7, 10 et 11**. Ce qui n'est pas le cas à **pH 3 et 4** où l'on observe des solutions presque limpides. Ces solutions troubles traduisent la présence de substances insolubles à ces différents pH. Ce qui est éventuellement lié à la densité des substances épineuses qui recouvrent le thorax de certaines espèces de chenilles notamment *I. oyemensis* et qui sont résistantes au broyage. Notre extrait brut étant constitué de deux espèces (*I. oyemensis* et *I. epimethea*), nous avons opté, à ce stade, pour le dosage de protéines totales dans chacune des fractions solubilisées afin d'envisager une caractérisation avancée sur la fraction la plus concentrée en protéines.

4.3 DOSAGES DE PROTEINES DANS LES FRACTIONS SOLUBILISEES DE POUDRE DE CHENILLES PAR LA METHODE DE KJELDAHL

Le principe de ce dosage a été décrit au paragraphe 3.3.1.1 du chapitre n°3 et le choix de cette méthode a été fait pour conserver l'homogénéité des résultats.

MODE OPERATOIRE

Les échantillons issus de la solubilisation ont été traités selon les phases. D'une part, le culot à partir d'une prise d'essai de **5 g** et d'autre part le surnageant à partir de **5 mL** (équivalent à 5 g). La suite des opérations a consisté à minéraliser, distiller puis titrer le distillat obtenu suivant le principe de la méthode de Kjeldahl.

Les résultats obtenus ont été présentés après traitement par Microsoft Excel 2010.

4.3.1 RESULTATS DU DOSAGE DES PROTEINES

Le tableau n°41 des valeurs calculées et les figures n°52, n°53 et 54 suivantes présentent l'analyse des résultats du dosage des protéines totales.

Tableau n°41 : Valeurs des concentrations en protéines totales des échantillons

Echantillons	Conc. en protéines	
	Culot (g/100g)	Surnageant (g/L)
pH11	2,037	2,457
pH10	4,501	0,808
pH7	4,492	0,532
pH4	4,535	0,451
pH3	2,421	0,476

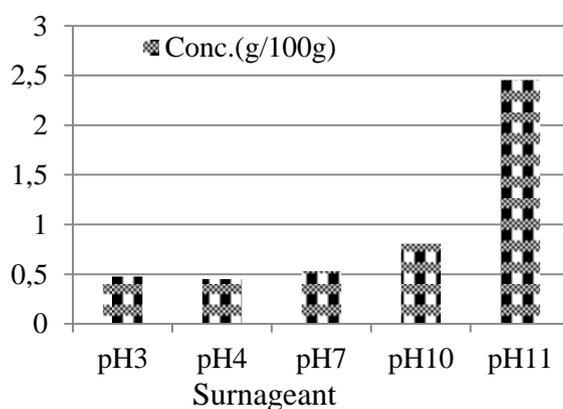


Figure n°52 : Concentration en protéines totales dans les surnageants.

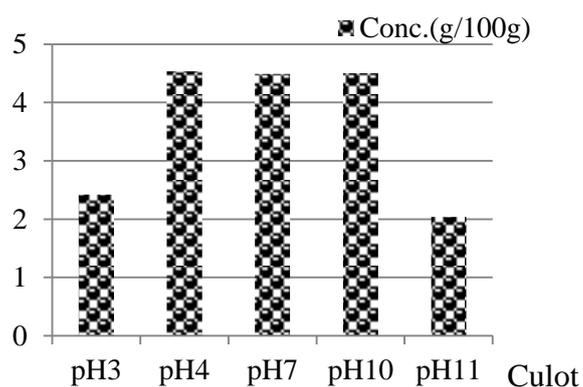


Figure n°53 : Concentration en protéines totales dans les culots

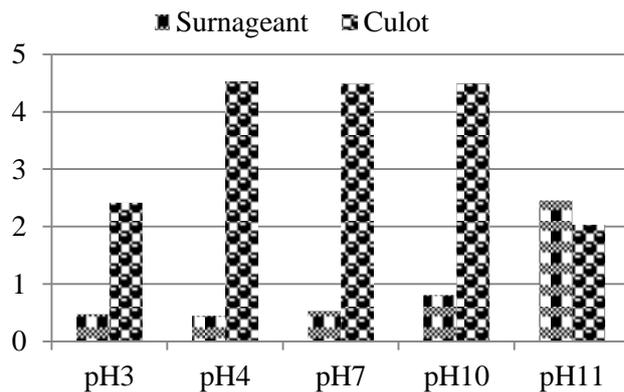


Figure n°54 : Résumé comparatif des concentrations en protéines totales.

Ces résultats montrent que, à ces différents pH, la solubilisation des protéines à partir de la poudre de chenilles reste incomplète. A l'observation des pH testés, il y a une proportion plus importante en protéines totales dans le culot plutôt que dans le surnageant sauf à **pH 11** où les teneurs en protéines totales dosées sont presque idem à **2 g/100g** dans le culot que le surnageant.

A ce stade, nous avons envisagé une séparation par électrophorèse sur gel de polyacrylamide afin d'identifier par leurs poids moléculaires les différentes protéines concentrées dans les fractions ionisées.

4.4 SEPARATION PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE – SDS (SDS – PAGE)

Le principe général de l'électrophorèse consiste à séparer, par fractionnement pour les analyser, des constituants d'un mélange sous forme de particules chargées électriquement suite à leur migration différentielle sous l'action d'un champ électrique. Elle utilise le caractère amphotère dans le cas des protéines dû à la présence de radicaux amine et carboxylique dans la molécule. En solution aqueuse, les protéines qui sont des polyélectrolytes sont entourées de contre – ions qui créent un champ supplémentaire augmentant l'intensité du champ électrique. La mobilité électrophorétique μ de ces macromolécules est donc approximative. Toutefois, au point isoélectrique de ces polyélectrolytes, il a été démontré que leur mobilité électrophorétique est nulle car elle est fonction du pH (VOËT *et al.*, 2005).

Pour l'étude des protéines de chenilles comestibles et vu les résultats précédents, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis* ou PAGE) en

conditions dénaturantes utilisant le SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) comme détergent anionique a été la méthode utilisée. La SDS – PAGE permet la migration des chaînes peptidiques vers l'anode (+) puisque, dans les conditions préalables, l'ajout du SDS permet de charger toutes les protéines négativement et favoriser leur migration. Leur charge négative et leur taille étant toutes proportionnelles à leur masse moléculaire.

Le gel est créé par la polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide (l'acrylamide forme les chaînes et le bis-acrylamide relie les chaînes entre elles) en présence d'agents de polymérisation telle que le TetraMéthylène Diamine (TEMED) qui catalyse la réaction et l'Ammonium Persulfate (APS) qui forme des radicaux libres.

De façon générale, une concentration en acrylamide élevée laisse de petits pores dans le gel qui retiendront les grosses protéines conduisant ainsi les petites protéines à migrer le plus loin le long du gel.

MODE OPERATOIRE

Préparation des gels

Pour faire une SDS – PAGE, plusieurs solutions sont apprêtées à savoir un gel de séparation, un gel de concentration, une solution de coloration, une solution de décoloration et les réactifs nécessaires à la méthode. Dans notre cas, pour aboutir à un gel permettant une migration observable et interprétable des extraits protéiques de la chenille, différentes concentrations de gels ont été testées. Les concentrations de gels ayant permis d'aboutir au résultat que nous présentons ici sont composées suivant les tableaux n°42 et 43 ci – après.

Tableau n°42 : Gel de séparation 10%

Produits	Quantité (µL)
Eau milli Q	4900
Tampon Tris HCl, 1,5 M, pH 8,8	2500
Solution Acrylamide – Bis – Acrylamide 19/1	2500
SDS 10 %	100
APS	75
TEMED	6

Tableau n°43 : Gel de concentration 4%

Produits	Quantité (µL)
Eau milli Q	3000
Tampon Tris HCl, 0,5 M, pH 6,8	1100
Solution Acrylamide – Bis – Acrylamide 19/1	700
SDS 10 %	50
APS	30
TEMED	6

Le dispositif procède par un coulage du gel de séparation entre deux plaques en verre disposées verticalement sur un support de maintien et laissant une épaisseur servant de moule. Une interface est conservée pour le coulage du gel de concentration. Après polymérisation du gel de séparation, l'interface est lavée à l'eau distillée puis séchée au papier *whatman*. Le gel de concentration est ensuite coulé à l'interface puis on y insère un peigne pour faire les puits nécessaires au dépôt des échantillons. Le peigne est retiré après 10 à 15 minutes, temps nécessaire pour la polymérisation du gel de concentration. Les gels sont alors prêts comme support pour recevoir les échantillons et contribuer à la migration des particules protéiques.

Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés à partir d'une solution mère de 1 g/L où l'on prélève 10 µL auquel on ajoute 10 µL d'un tampon de charge. Ce mélange est mis à chauffer à 95°C pendant 5 minutes. Tous les échantillons sont traités de la même façon. On prélève ensuite 5 µL de chaque mélange échantillon que l'on dépose dans les puits. Un mélange de 5 µL d'un marqueur de taille (*PageRuler™ Prestained Protein Ladder*) est également déposé dans un des puits et l'ensemble est transféré dans le tank de migration. La figure n°51 suivante montre le dispositif.

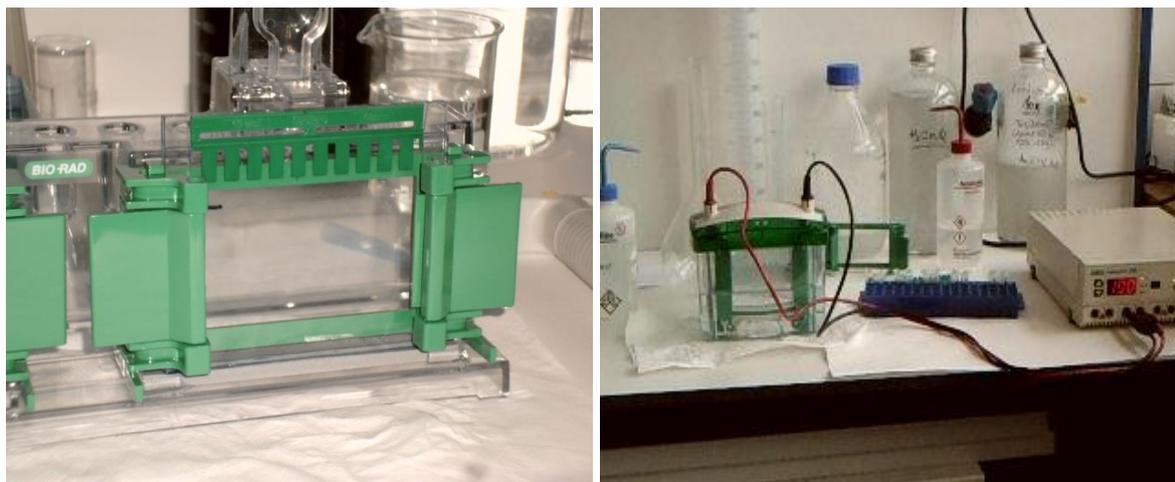


Figure n°55 : Photographies du dispositif SDS – PAGE

Le tampon de migration Tris est ajouté dans le tank de migration, les électrodes sont banchées au voltmètre et la migration démarre par la mise en route du voltmètre à 150 V durant 1 h 30 minutes. A la sortie du front de migration observable par une ligne bleue au fond du tank, le gel est retiré du tank et de son support de maintien, puis mis à colorer pendant une heure. Il est ensuite laissé en décoloration sous agitation. Le tableau n°44 ci – après précise les proportions de réactifs utilisées pour les préparations de solutions tampon Tris, de coloration et de décoloration.

Tableau n°44 : Solutions complémentaires à la réalisation du SDS – PAGE.

Tampon de Charge	Tampon Tris	Solution de coloration	Solution de décoloration
3,75mL Tris HCl, 0,5 M à pH 6,8 ; 15mL Glycerol 50% 3mg de Bleu de Bromophénol 6mL de SDS 10% 5,25mL d'Eau MilliQ	3g de Tricine 14,4g de Glycine 1g de SDS Eau milliQ, QSP	10 % Acide acétique 45 % Ethanol 0,25 % Bleu de Coomassie R250 Eau milliQ, QSP	10 % Acide acétique 25 % Ethanol Eau milliQ, QSP

4.4.1 RESULTATS DE LA SEPARATION PAR SDS PAGE

Les échantillons traités par SDS – PAGE sont les surnageants issus des 5 solutions ionisées. Le gel ici présenté (figure n°52) a permis d'identifier deux fragments de **55 kDa** et **25 kDa** dans le surnageant à **pH7**.

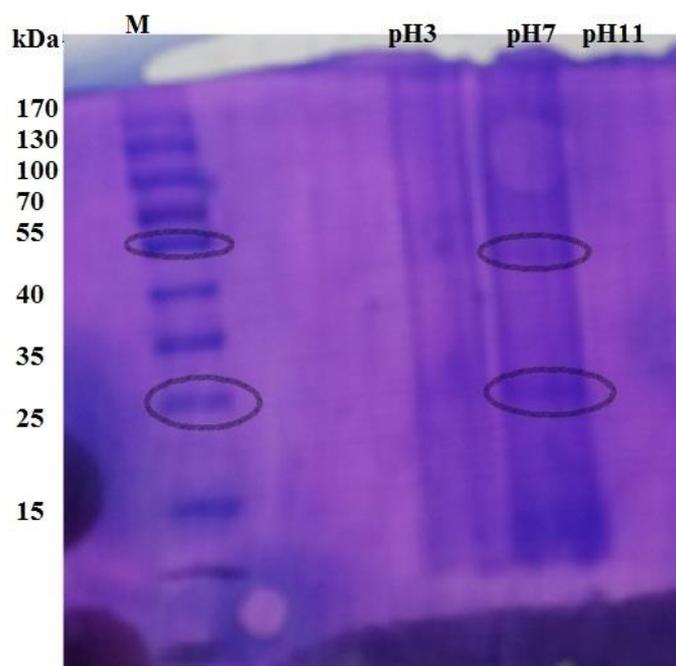


Figure n°56 : Gel SDS – PAGE après migration de fractions protéiques de chenilles

M : Marqueur de taille.

Notre conclusion à ce stade serait que les constituants protéiques présents dans le surnageant à pH7 seraient de faible poids moléculaire de l'ordre de **25000 Da** et **55 000 Da**.

Une analyse par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en vue d'une identification plus avancée a été réalisée. Entre autre, l'activité biologique notamment antibactérienne de ces fractions ionisées a aussi été testée.

4.5 IDENTIFICATION DES PEPTIDES ET PROTEINES DES FRACTIONS SOLUBILISEES DE POUDRE DE CHENILLES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE (LC – MS)

Un système LC – MS (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*) est constitué de deux composants :

- un appareil de chromatographie liquide ;
- un spectromètre de masse.

La technologie LC – MS implique l'utilisation d'une HPLC, dans lequel les composants individuels d'un mélange sont d'abord séparés suivis par ionisation et la séparation des ions en fonction de leur rapport masse / charge (m/z). Les ions séparés sont ensuite dirigés vers un détecteur photo ou un multiplicateur d'électrons tube, qui identifie et quantifie chaque ion. La source d'ions est un élément important dans toute analyse de MS, car cela contribue

essentiellement dans la production efficace des ions pour l'analyse. Pour ioniser des molécules intactes, la source d'ions pourrait être APCI (Pression atmosphérique ionisation chimique), ESI (*Electrospray Ionisation*), etc.. Le choix de la source d'ions dépend également de la nature chimique de l'analyte d'intérêt à savoir polaire ou non polaire. Les principaux avantages de cette technologie incluent la sensibilité, la spécificité et la précision que l'analyse se fait au niveau moléculaire. En outre, les détails structuraux de l'analyte peuvent être déchiffrés (PITT J. et HOCKING A., 2009).

MODE OPERATOIRE

Les fractions utilisées pour cette analyse ont été les surnageants (n) et culots (Cn) aux pH respectifs de 3, 4, 7, 10 et 11 sur lesquels les dosages des protéines au Kjeldahl avaient été réalisés. Les culots ont été lyophilisés et différents mélanges ont été préparés à 2 g/L puis filtrés à 0,2 µm. Une quantité de 20µL de ces mélanges est ensuite injecté au niveau de la LC, puis séparé par chromatographie sur une colonne apolaire, type C4. Au cours de leur élution, les constituants sont soumis à ionisation par Electrospray (ESI). Chaque échantillon est analysé durant 60 minutes. Quelques chromatogrammes obtenus de ces analyses ont été traités sous forme de comparaison entre les différentes fractions.

4.5.1 RESULTATS DU DOSAGE LC – MS DES FRACTIONS SOLUBILISEES DE LA POUDRE DE CHENILLES

Les chromatogrammes ci – dessous présentent les différents profils obtenus. Nous proposons une observation comparative d'une part des 5 culots au pH 3, 4, 7, 10 et 11 puis des surnageants à ces mêmes pH. D'autre part, une observation des profils en comparaison culot – surnageant pour chaque pH.

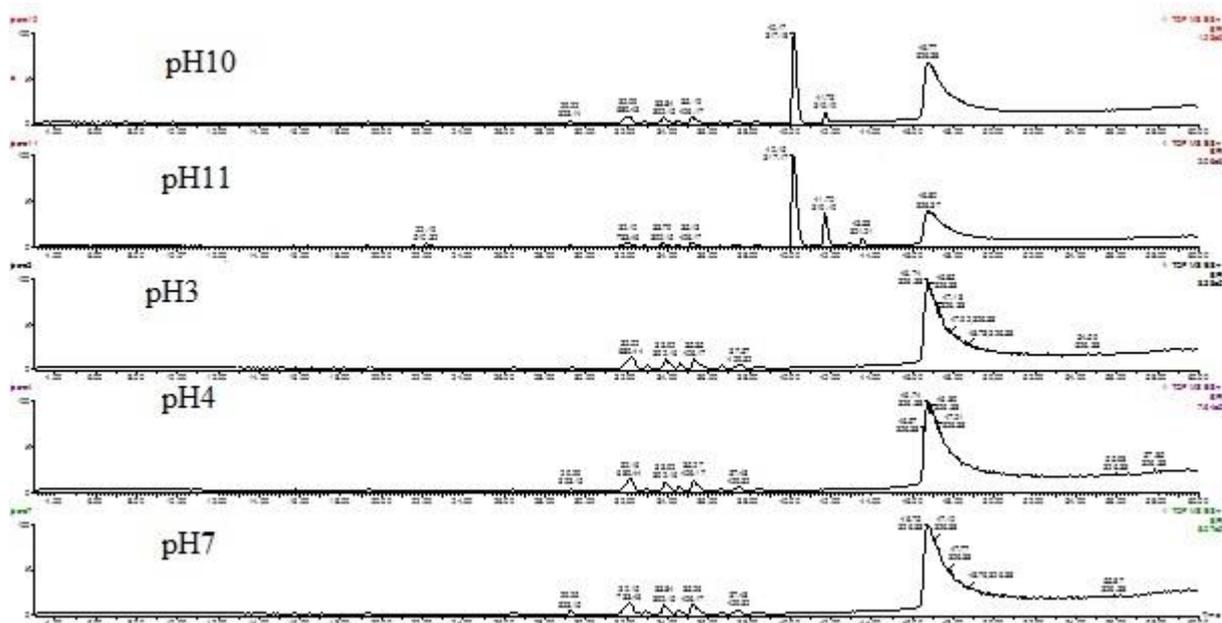


Figure n°57 : Comparaison en base peak des 5 échantillons n (Surnageant)

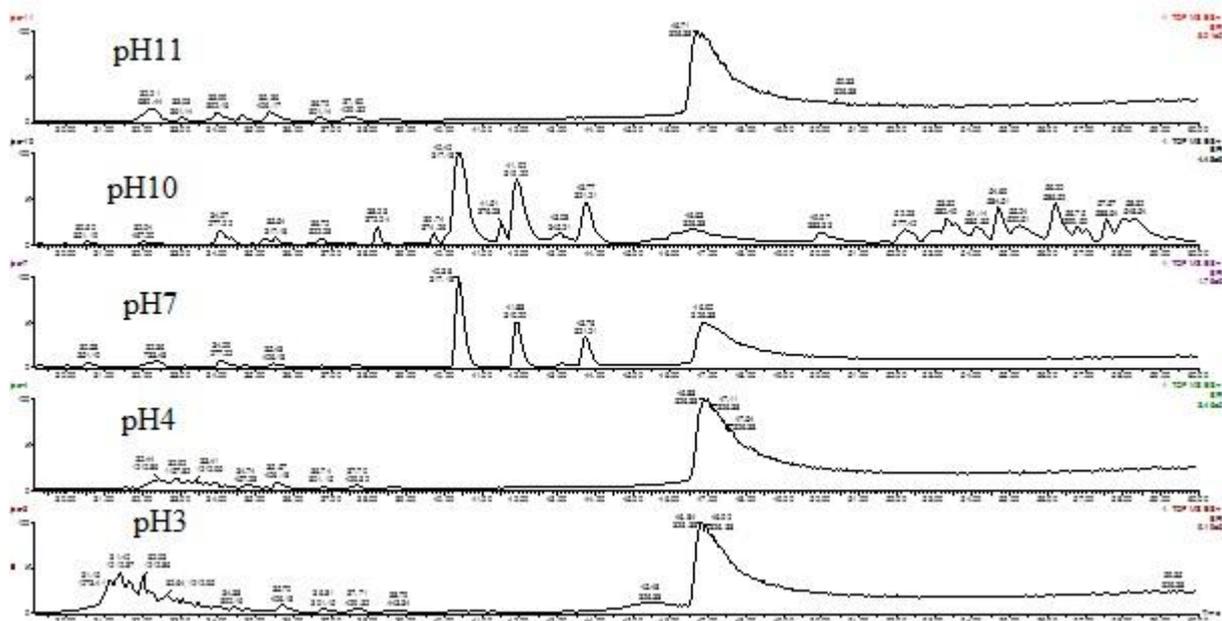


Figure n°58 : Comparaison en base peak des 5 échantillons Cn (Culot)

Une autre comparaison des chromatogrammes à chaque pH pour le surnageant et le culot a été faite. Les figures ci – dessous présentent les résultats obtenus.

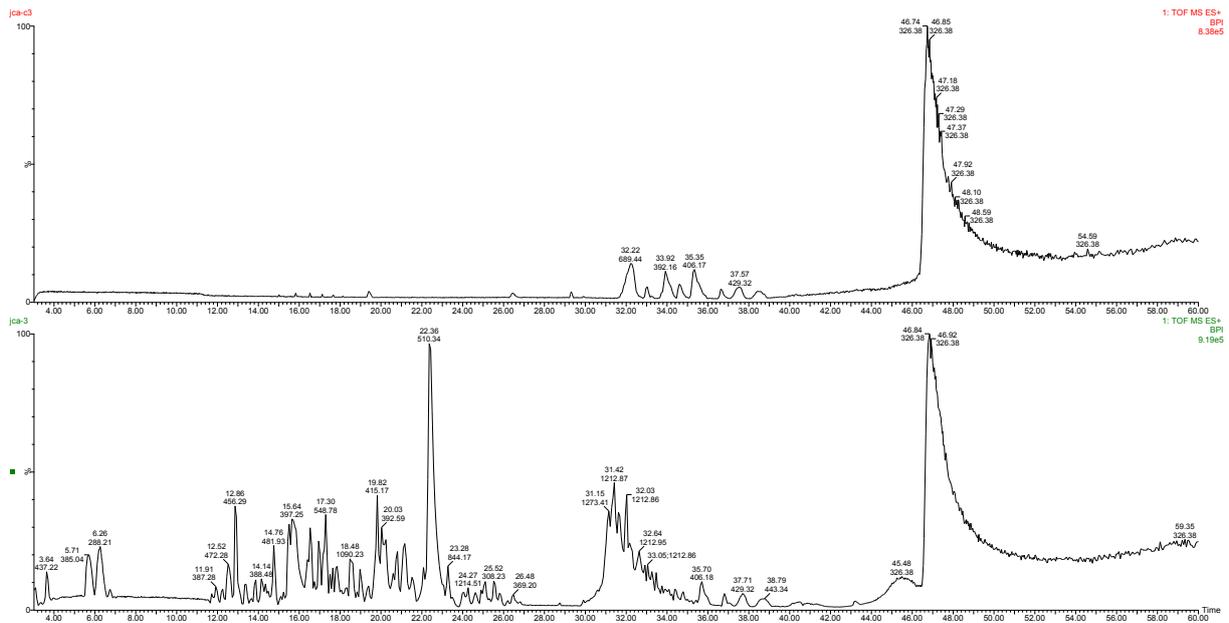


Figure n°59 : Comparaison des chromatogrammes obtenus pour les échantillons n et Cn
(Surnageant et Culot à pH 3)

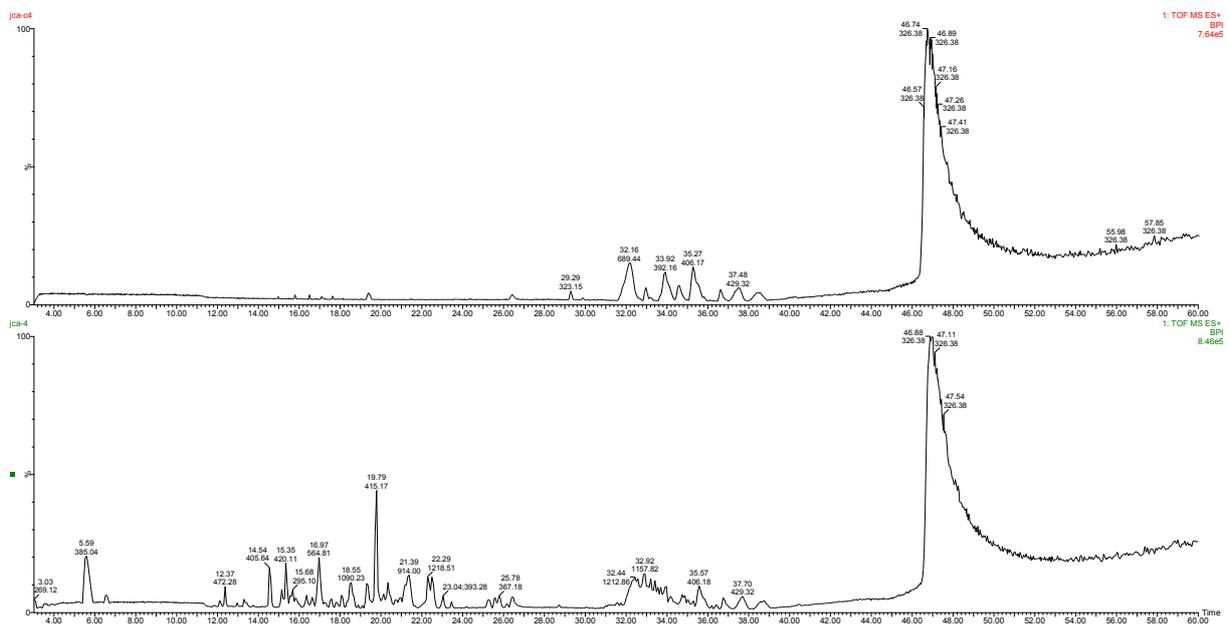


Figure n°60 : Comparaison des chromatogrammes obtenus pour les échantillons n et Cn
(Surnageant et Culot à pH 4)

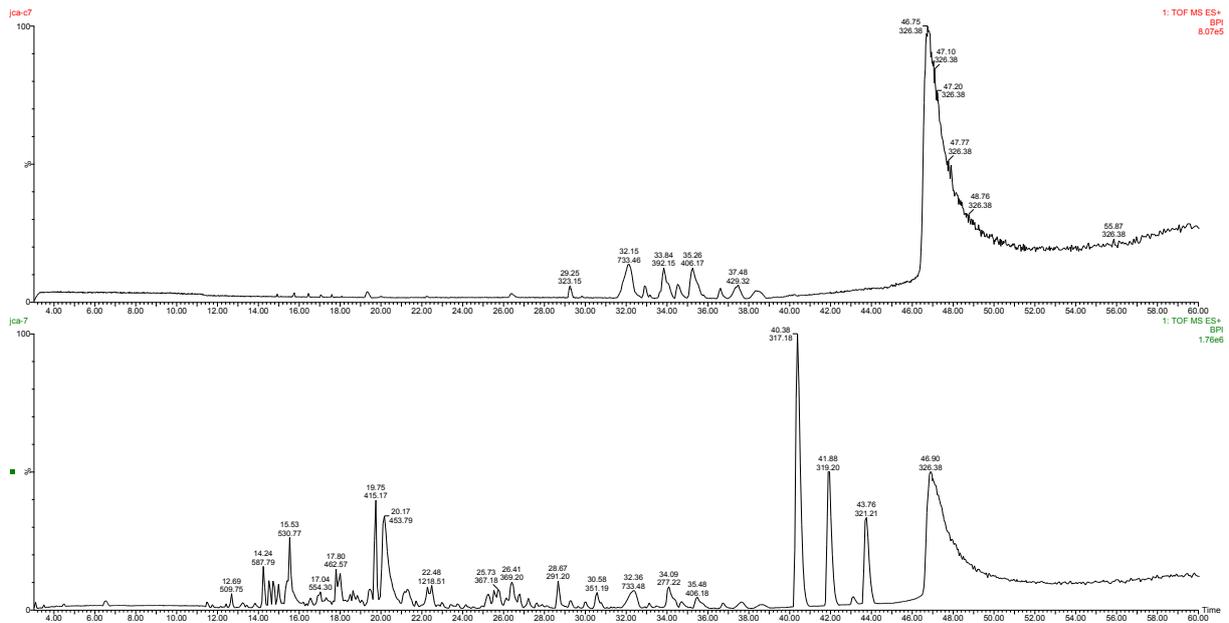


Figure n°61 : Comparaison des chromatogrammes obtenus pour les échantillons n et Cn
(Surnageant et Culot à pH 7)

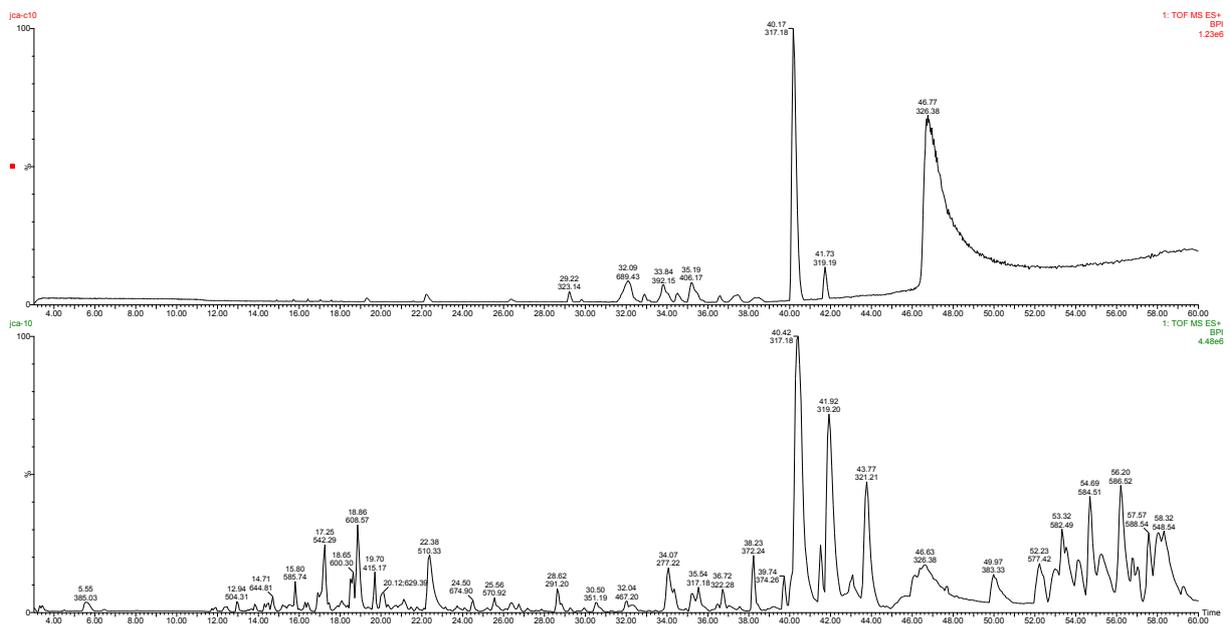


Figure n°62 : Comparaison des chromatogrammes obtenus pour les échantillons n et Cn
(Surnageant et Culot à pH 10)

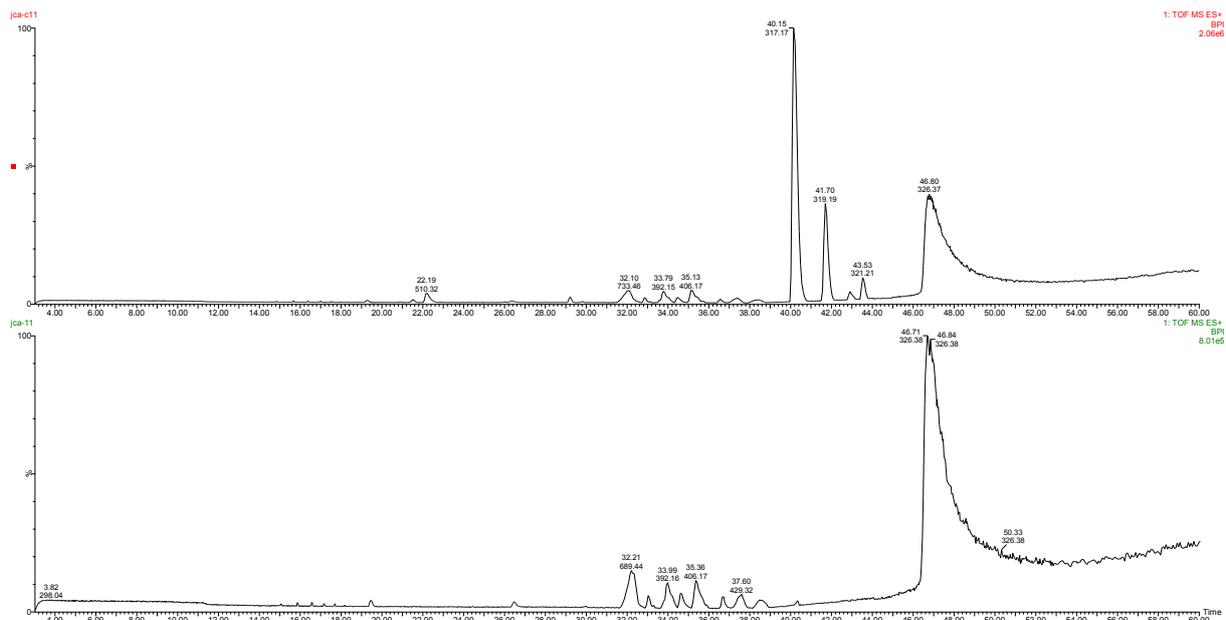


Figure n°63 : Comparaison des chromatogrammes obtenus pour les échantillons n et Cn
(Surnageant et Culot à pH 11)

Cette comparaison permet d’entrevoir les concordances avec les résultats du dosage des protéines totales par Kjeldahl où les concentrations dans les culots sont plus élevées que celles dans les surnageants aux pH 3, 4, 7 et 10. A pH 11, on a observé une légère similarité dans les 2 fractions, ce qui s’observe sur les chromatogrammes de la figure n°60.

D’autres comparaisons ont été réalisées en appel d’ion en fonction du rapport masse – sur – charge (m/z) et à différents intervalles du temps de vol.

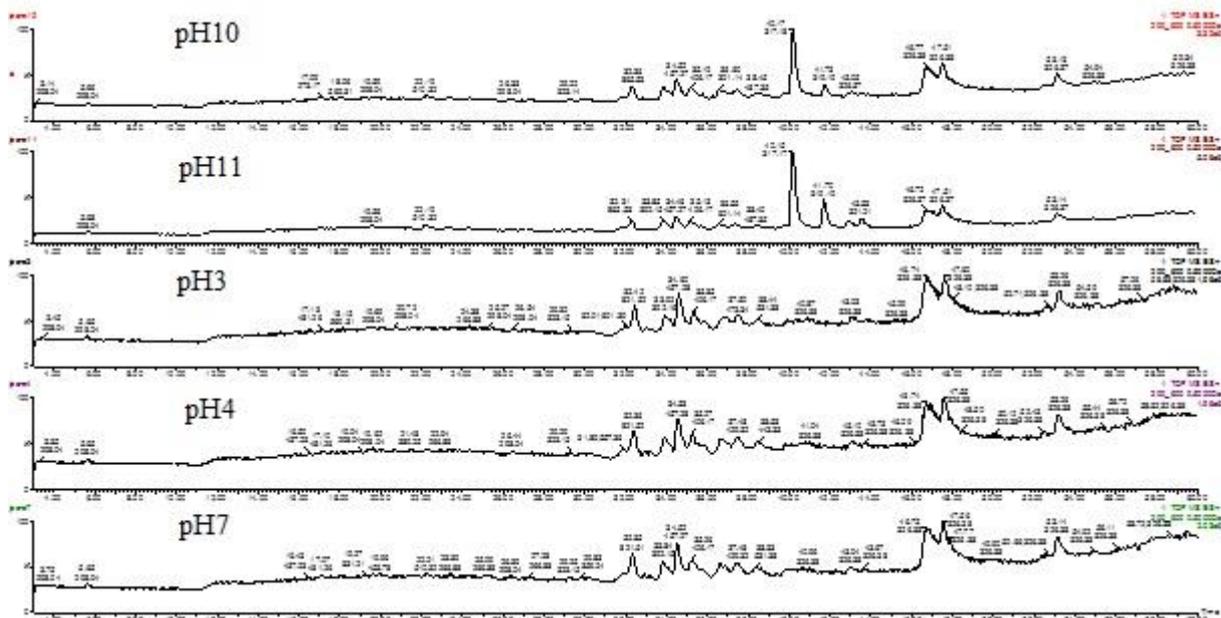


Figure n°64 : Comparaison des 5 échantillons de surnageant en appel d'ion de m/z 200-600

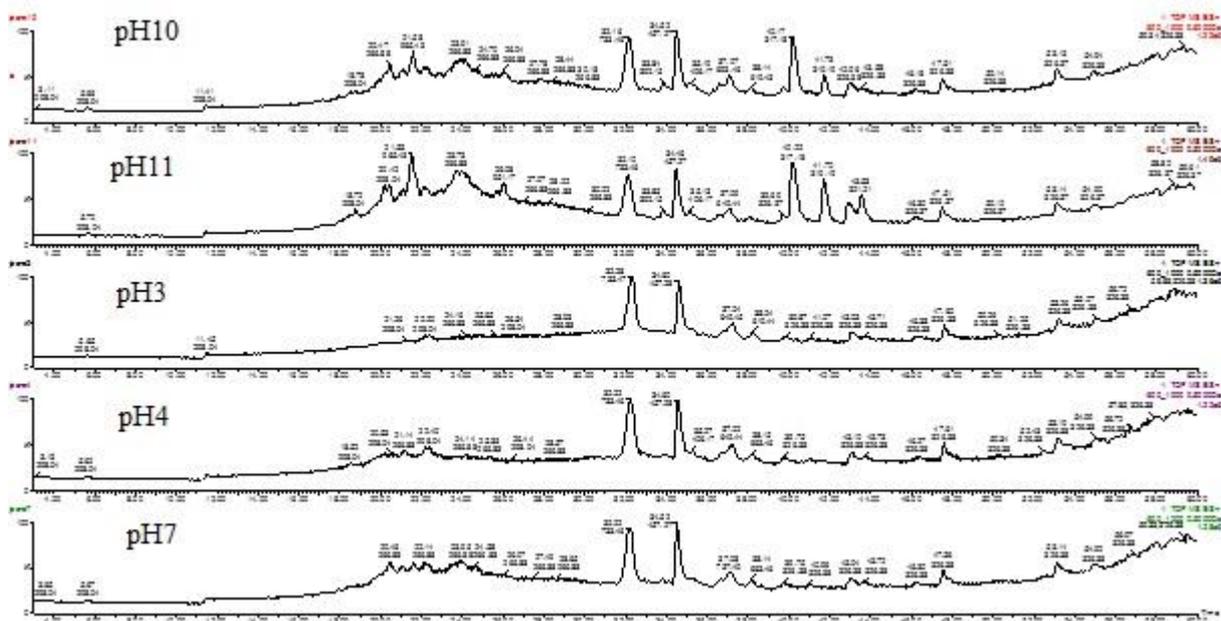


Figure n°65 : Comparaison des 5 échantillons de surnageant en appel d'ion de m/z 600-1000

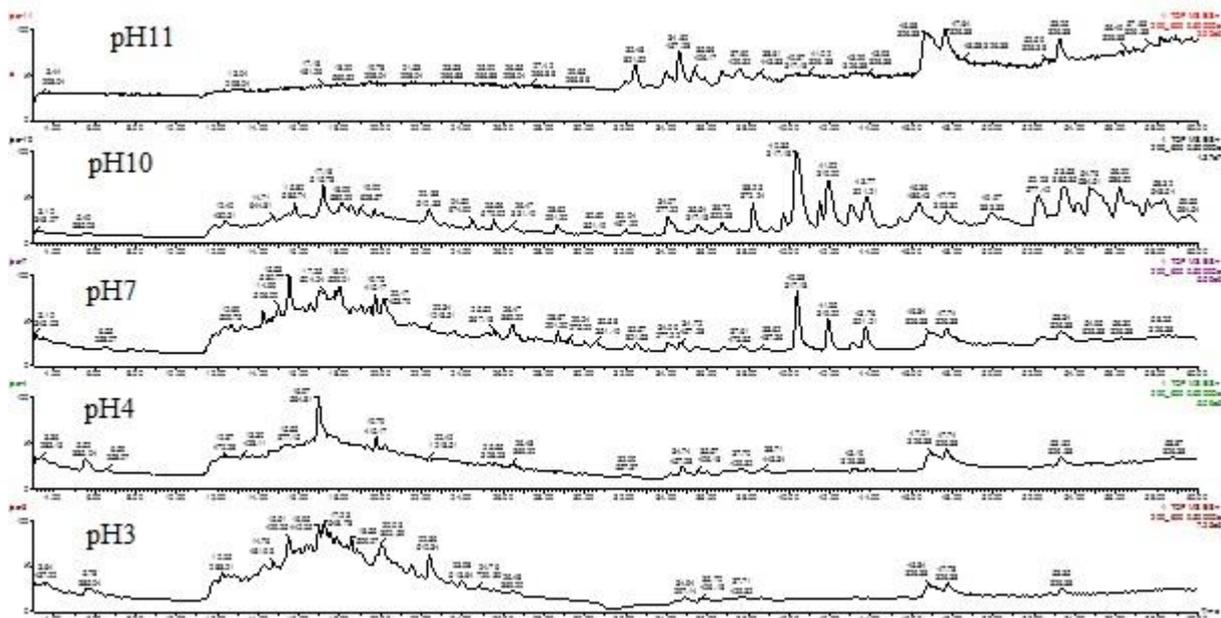


Figure n°66 : Comparaison des 5 échantillons de culot en appel d'ion de m/z 200-600

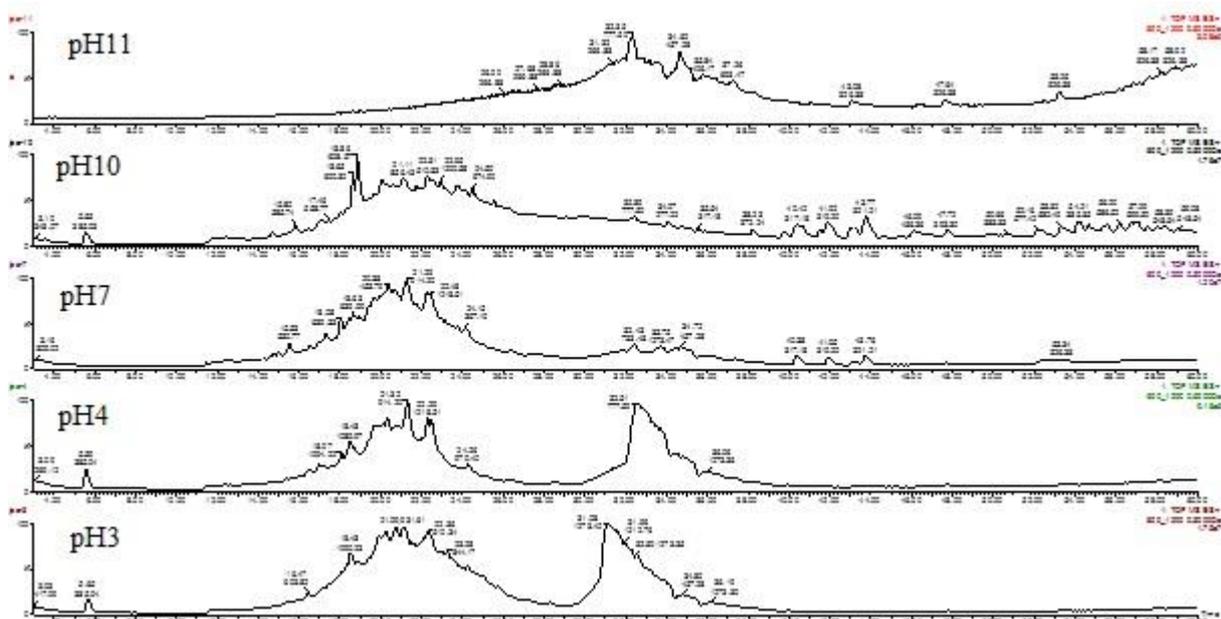
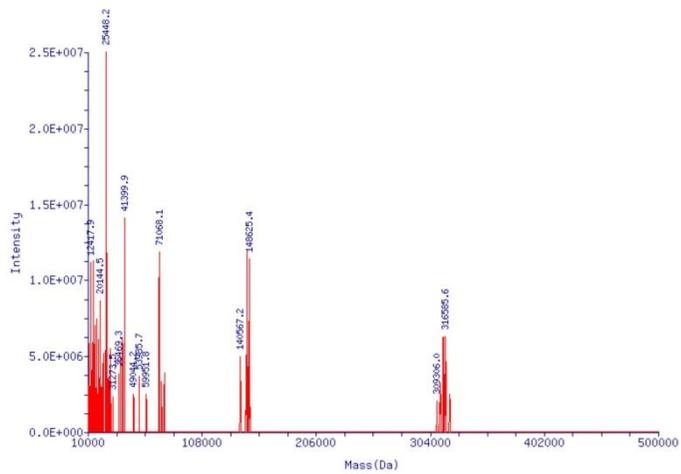


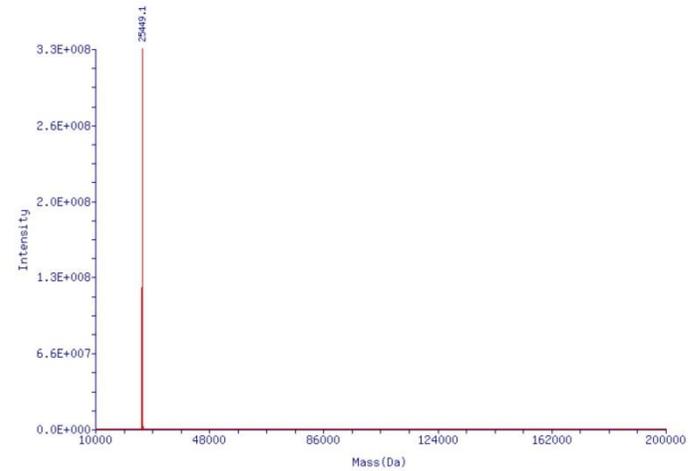
Figure n°67 : Comparaison des 5 échantillons de culot en appel d'ion de m/z 600-1200

Le couplage a permis de produire des spectres de masse déconvolués à l'aide du logiciel ⁴²*Thermo Scientific™ ProMass Deconvolution™*. Les figures n°68/1 et n°68/2 présentent les différents spectres en fonction du pH.

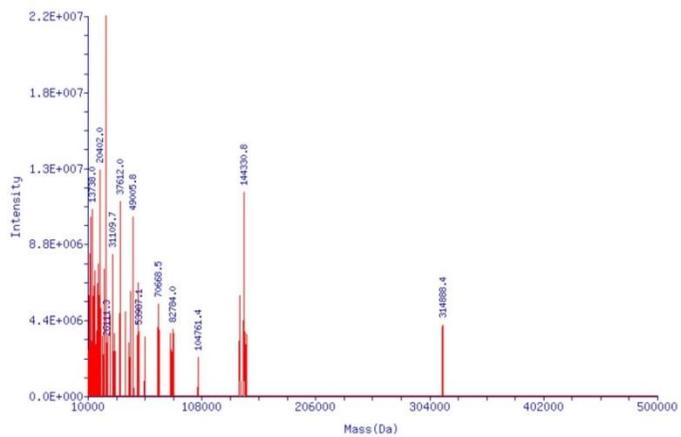
⁴² <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/OPTON20885>



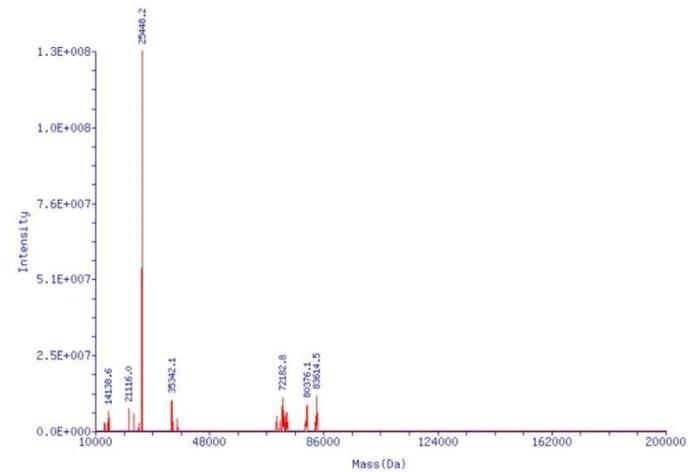
Surnageant pH3



Culot pH 3

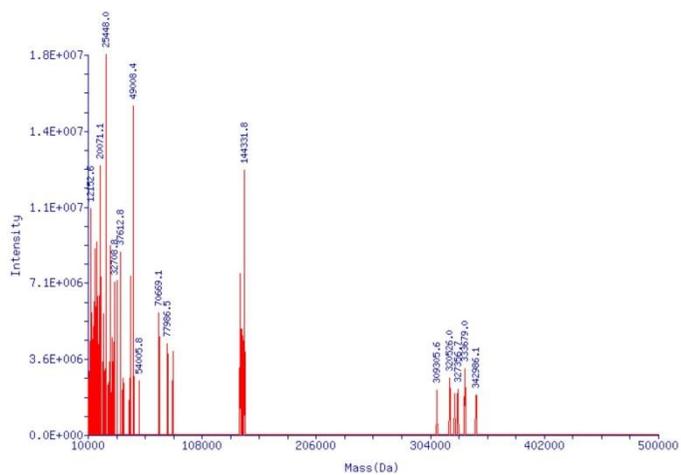


Surnageant pH 4

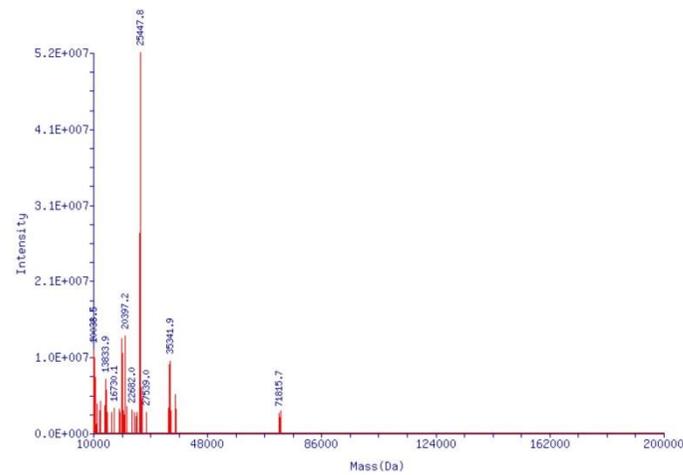


Culot pH 4

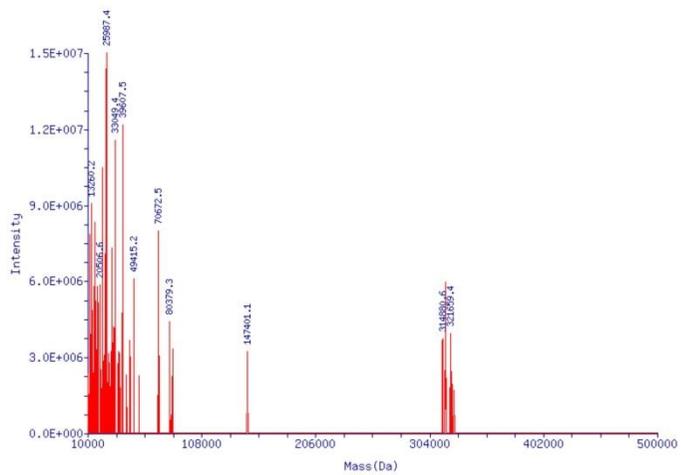
Figure n°68/1 : Spectres de masse des fractions solubilisées de poudre de chenilles.



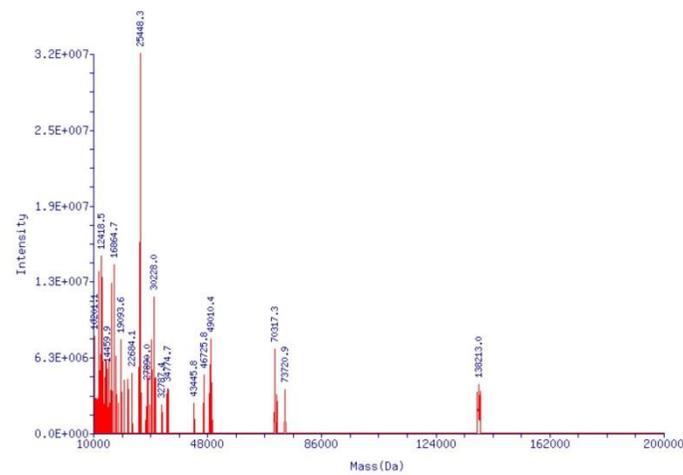
Surnageant pH 7



Culot pH 7



Surnageant pH 11



Culot pH 11

Figure n°69/2 : Spectres de masse des fractions solubilisées de poudre de chenilles.

Les rapports d'analyse de chaque échantillon (voir exemple en annexe) donnent les poids moléculaires. Le tableau n°45 résume les poids moléculaires de protéines obtenues pour les différentes fractions.

Tableau n° 45 : Poids moléculaire des protéines identifiées par LC-MS dans les échantillons de chenilles à différents pH (surnageant et culot).

Mw (Da)	pH3 Surn	pH4 Surn	pH7 Surn	pH10 Surn	pH11 Surn	pH3 culot	pH4 culot	pH7 culot	pH10 culot	pH11 culot
1	10201	11805	10121	10952	11207	25449	14138	10038	10951	10201
2	12418	13738	12152	13260	13260		21116	13833	13256	12418
3	15241	15918	14981	15919	15917		25448	16730	15680	14459
4	17475	17998	17476	17933	18134		35342	20397	19735	16864
5	20145	20402	20071	20402	20506		72182	22682	21907	19093
6	23336	23546	23336	22684	22684		80376	25447	25448	22684
7	25448	25448	25448	25448	25907		83614	27539	27519	25448
8	28635	31109	28733	30091	28035			35341	30924	27890
9	30960	33025	30714	35999	30405			71815	35126	30228
10	37616	42001	32708	45797	33049				39210	32787
11	41398	46616	34782	49012	36026				46929	34774
12	45706	49005	37612	52649	39607				50353	43445
13	53985	52806	39636	70669	46608				52482	46725
14	59951	58640	46224	82784	49415				54756	49010
15	70677	70668	49008	141323	54006				63084	70317
16	72928	82784	54005	144338	70672				66610	73720
17	75488	104761	70669	147395	80379				69548	138213
18	140567	140558	77986	149368	82783				75247	
19	146638	144330	82785	151363	147400				183107	
20	146638	146236	140558							
21	148625	157437	144331							

Il ressort de ces analyses que toutes les fractions aux différents pH contiennent une protéine de **25448** Daltons qui peut être isolée dans le culot à pH 3 puisque son pic se distingue très bien. C'est aussi le cas d'une protéine de **183107** Da dont le pic est observable dans spectre de masse du culot à pH 10. Dans les surnageants aux différents pH, on observe des pics de protéines de poids moléculaire de l'ordre de **140 000** à **150 000** Da. Les résultats obtenus par chromatographie sur gel de polyacrylamide (SDS – PAGE, cf. **paragraphe 4.4**) montraient deux bandes protéiques de **25000 Da** et **55 000 Da** sur l'échantillon de poudre brute de chenilles à pH 7. En LC – MS, on retrouve ces composés protéiques non seulement à pH 7,

mais également à pH 3, 4, 10 et 11 dans les deux fractions (Surnageant et culot). C'est ainsi que nous avons, à ce stade, engagé hydrolyse enzymatique en vue d'une recherche d'activité antimicrobienne.

4.6 ACTIVITE BIOLOGIQUE DES FRACTIONS SOLUBILISEES DE POUDRE DE CHENILLES

En prélude à l'étude de l'activité antimicrobienne, nous avons procédé à une hydrolyse enzymatique des protéines de chenilles.

4.6.1 HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE FRACTIONS SOLUBLES DE POUDRE DE CHENILLES

Il s'est agi dans cette partie d'hydrolyser les protéines présentes dans la poudre de chenilles avec la pepsine afin d'obtenir des peptides, utilisables pour les tests antimicrobiens. La pepsine de porc utilisée est de type A (EC 3.4.23.1). C'est une endoprotéase appartenant à la famille des protéases à acide aspartique, incluant la chymosine, la rénine, la cathepsine D et des enzymes microbiennes apparentées telles que l'endothiapepsine et la penicillopepsine. La pepsine sécrétée dans l'estomac des mammifères, est produite par les cellules de la muqueuse gastrique sous la forme d'un précurseur inactif, le pepsinogène. Le pepsinogène est converti à pH acide ($\text{pH} < 5$) de façon autocatalytique en pepsine par le clivage de la liaison peptidique entre la Leucine et l'Isoleucine (NEDJAR-ARROUME et *al.*, 2008).

MODE OPERATOIRE

Réactifs

- Solution de Pepsine 10% (0,25g dans 2,5 mL eau distillée),
- HCl 0,1mol/L,
- NaOH 0,1 mol/L et 0,2 mol/L.

Un mélange de poudre de chenille 10% (w/v) et à pH 11 a été réalisé, puis centrifugé à 10000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été séparé et son pH réajusté à pH 3, puis il est transféré dans le bioréacteur. La solution d'enzyme y est ajoutée à un temps t_0 au rapport E/S (enzyme/substrat) de 1/100 et les réactions d'hydrolyse sont stoppées par ajout de NaOH à 0,2 mol/L et les prélèvements sont conservés au congélateur à -20°C. Les temps respectifs de prélèvement étaient de : t_0 , $t_{1\text{min}}$, $t_{2.5\text{min}}$, $t_{5\text{min}}$, $t_{10\text{min}}$, $t_{15\text{min}}$, $t_{30\text{min}}$, $t_{1\text{h}}$, $t_{2\text{h}}$, $t_{3\text{h}}$, $t_{8\text{h}}$ et $t_{24\text{h}}$. L'échantillon t_0 est considéré comme le témoin (solution avant l'ajout de l'enzyme). Les échantillons ont été ensuite lyophilisés puis conservés pour les tests antimicrobiens.

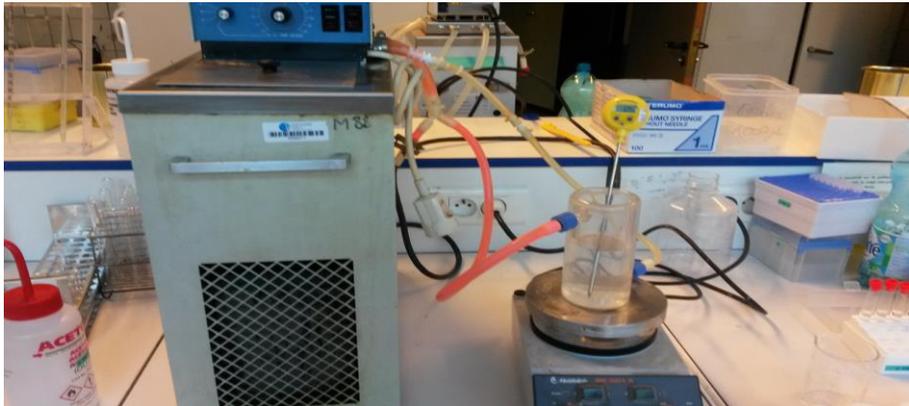


Figure n°70 : Photographie du montage bioréacteur.

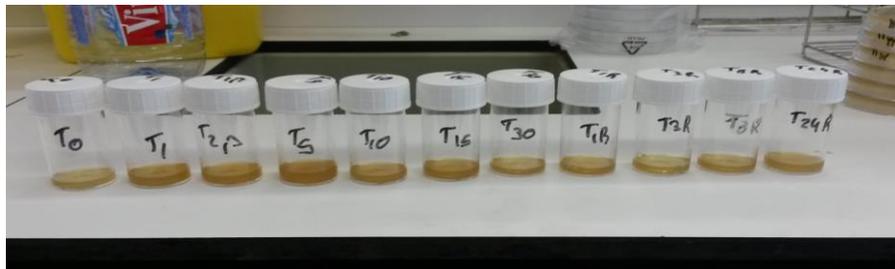


Figure n°71 : Photographie des hydrolysats

4.6.2 RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE FRACTIONS SOLUBLES DE POUDRE DE CHENILLES

Un des objectifs visés a été de rechercher des peptides à activité antimicrobienne dans les différentes fractions de poudre de chenilles. Pour ce faire, trois souches bactériennes notamment *Bacillus cereus* ATCC LMG2098, *Escherichia coli* ATCC GM109 et *Micrococcus luteus* ATCC 4698 ont été utilisées pour les tests d'activité. Ces souches ont été entretenues par isolement et repiquage sur gélose nutritive favorable à leur croissance pendant 24h à 37°C afin de garantir leur pureté. Le milieu de culture utilisé est un le milieu Luria – Bertani (ou Bouillon Lysogène) selon Miller adapté pour des souches non exigeantes.

Composition :

LB liquide

Tryptone	10g/L
Extrait de levures	5g/L
NaCl	5g/L

LB solide

Tryptone	10g/L
Extrait de levures	5g/L
NaCl	5g/L
Agar agar	17g/L

MODE OPERATOIRE

Réactifs

1. Milieu LB – Miller
2. Solution de l'échantillon à 10g/L
3. Ampicilline à 1g/L et à 10^{-3} g/L : l'ampicilline est ici utilisée à 10^{-3} g/L pour la sensibilité de *M. luteus* contrairement aux autres souches.

Apprêtement des souches

Les solutions d'échantillon à 10g/L ont été préparées dans des tubes stériles puis filtrées à 0,2 μ m et conservées sous PSM⁴³

1. Isoler les souches sur milieu LB,
2. Ensemencer 10mL de bouillon LB à incuber 2 à 4h à 37°C,
3. Prélever 1mL de bouillon ensemencé et mesurer au spectrophotomètre à 620 nm, le témoin est constitué du LB non ensemencé,
 - a. Pour une DO₆₂₀ égale à 0,1, on y dénombre environ 106 /UFC⁴⁴/mL dans le bouillon
 - b. Pour une DO₆₂₀ supérieure à 0,1, on dilue le mélange avec du LB liquide et on reprend la mesure au spectrophotomètre,
 - c. Pour une DO₆₂₀ inférieure à 0,1, on laisse le bouillon à incubation et on reprend la mesure après 2h.

Méthode des puits

Sur toute la surface d'une boîte de Pétri préparée et contenant 15mL de LB, on étale 1mL de bouillon ensemencé pour faire le tapis bactérien, puis on laisse en incubation 2 h à 4°C

On y dépose ensuite selon chaque souche :

- i) 20 μ L de la solution d'échantillon (hydrolysats et/ou brut) dans les puits périphériques,
- ii) 20 μ L d'ampicilline dans le puits central comme témoin positif.

⁴³ Poste de Sécurité Microbiologique.

⁴⁴ Unité Formant Colonie

On laisse incuber 24h à 37°C.

Lecture des résultats

1. Sur le témoin positif

Absence de halo transparent autour de l'ampicilline, il y a résistance de la bactérie donc, les peptides et/ou protéines de l'échantillon ne peuvent pas être mis en évidence.

2. Sur le témoin négatif

Présence d'un halo transparent autour de l'échantillon brut, il y a un effet antimicrobien à ce stade de l'échantillon ;

3. Sur les échantillons

Présence d'un halo autour d'un des puits contenant un échantillon (hydrolysats), l'échantillon contient un peptide et/ou une protéine à activité antibactérienne.

En cas d'absence totale de halo d'inhibition, il n'y a donc pas d'activité antimicrobienne.

4.6.3 RESULTATS DES TESTS ANTIMICROBIENS

Les échantillons testés sont des extraits bruts. Une seule des souches testées a réagi notamment *Micrococcus luteus* ATCC 4698 formant un halo d'inhibition comme le montre la figure n°68 ci – dessous.

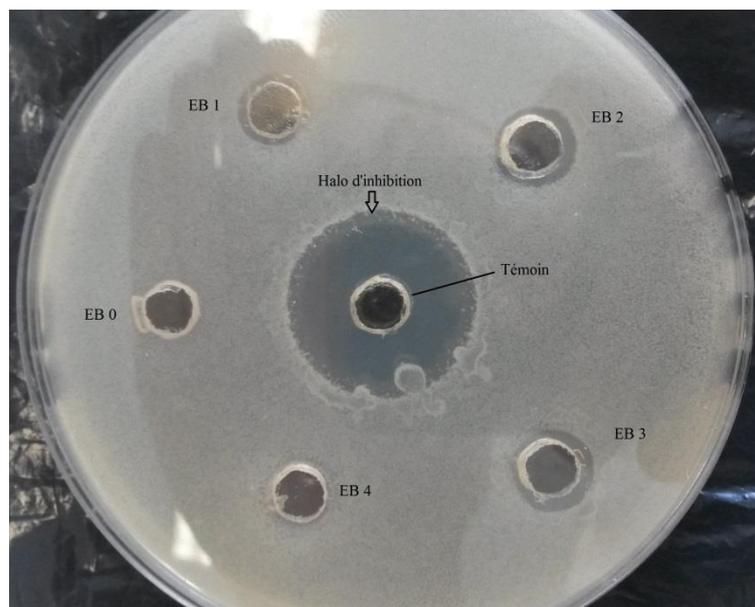


Figure n°72 : Réaction des extraits protéiques de chenilles à *Micrococcus luteus* sur boîte de Pétri.

Ce résultat traduit bien une présence d'extraits protéiques à activité antimicrobienne.

Tableau n°46 : Diamètre d'inhibition en fonction des différents hydrolysats testés.

Temps hydrolyse (min)	<i>B. cereus</i> DI*(cm)	<i>M. luteus</i> DI(cm)	<i>E. coli</i> DI(cm)
0	0	0	0
1	4	12	12
2,5	4	12	12
5	6	18	18
10	1	3	3
15	2	6	6
30	1	3	3
60	3	9	9
180	5	15	15
1440	3	9	9

*DI : Diamètre d'Inhibition

On observe à travers ces diamètres d'inhibition que tous les hydrolysats sont actifs sur les souches testées. L'activité de l'hydrolysat à 5 minutes est plus remarquable. Il reste néanmoins à affiner les méthodes d'extraction et à envisager une purification des extraits protéiques pour confirmer ce résultat. Dans cette logique, nous avons procédé à des dosages de substances minérales éventuellement présentes dans les échantillons bruts de chenilles. Cette perspective nous a orienté vers une observation systématique des espèces utilisées.

4.7 SYSTEMATIQUE ET HABITAT DES ESPECES DE CHENILLES COMESTIBLES UTILISEES

Les deux espèces chenilles ci – dessous (Cf. figure n°73) représentent les espèces de chenilles utilisées dans le cadre de ce projet. Leur taxonomie est reconstituée ici pour relever les appréhensions souvent défavorables à leur consommation.

Règne : *Animalia*

Embranchement : *Arthropoda*

Classe : *Insecta*

Ordre : *Lepidoptera*

Famille : *Saturniidae*

Genre : *Imbrasia*

Espèce : *oyemensis, epimethea*.



Figure n°73 : Photographies de chenilles (*I.oyemensis*⁴⁵ & *I.epimethea*⁴⁶) dans leur habitat naturel.

L'habitat naturel connu de ces espèces est un arbuste dénommé Sapelli (*Entandrophragma*⁴⁷ *cylindricum*). Les chenilles du genre *Imbrasia*, majoritairement consommées en République centrafricaine, y sont abondantes entre les mois de juin à septembre (N'GASSE, 2003 ; MBETID-BESSANE, 2005). Les différences de coloration directement observable supposent une composition pigmentaire différente. Ce qui a décidé le dosage des minéraux.

4.8 DOSAGE DE MINÉRAUX PAR ICP – AES SUR LES ESPÈCES DE CHENILLES UTILISÉES

Le dosage de quelques minéraux des échantillons de chenilles a été réalisé par la technique de plasma⁴⁸ induit couplée à une spectrométrie d'émission atomique. L'acronyme couramment utilisé est ICP – AES ou *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*. Cette technique analytique a une sensibilité permettant l'identification et la quantification des éléments chimiques dans divers échantillons. Les hautes limites de détection sont rendues possibles par les températures extrêmement élevées dans les systèmes à base de plasma (jusqu'à 10.000 K). Un photodétecteur convertit la longueur d'onde sortant du monochromateur en un signal électrique. La température élevée de la conception du système d'ICP contribue à l'excellente atomisation et l'excitation de nombreux éléments.

⁴⁵ http://gbif.africamuseum.be/lincaocnet_dev/details_insectes?key=26

⁴⁶ http://gbif.africamuseum.be/lincaocnet_dev/details_insectes?key=22

⁴⁷ http://database.prota.org/PROTAhtml/Entandrophragma%20cylindricum_En.htm

⁴⁸ Le plasma ici est constitué par un mélange gazeux contenant des cations et des électrons qui conservent leur conductance électrique.

MODE OPERATOIRE

Le modèle ICP - AES *Varian Pro axial view* que nous avons utilisé procède par la détection simultanée de multiple longueurs d'onde émises par des éléments chimiques excités utilisant un spectrophotomètre polychromateur. Nos échantillons ont été incinérés au four à 550°C durant une nuit. Les cendres récoltées des 3 g de chaque échantillon de départ ont été dissoutes dans 3 mL d'acide nitrique 65% puis portées à ébullition entre 150 à 200°C pendant 5 minutes. Les résidus ont été ensuite dilués à 25 mL d'eau déionisée. Le dosage est ensuite réalisé contre une gamme étalon de 0 à 50 mg/L des éléments chimiques d'intérêt alimentaire tels que l'Aluminium (Al), le Calcium (Ca), le Fer (Fe), le Magnésium (Mg) et le Zinc (Zn).

Les résultats ci – dessous présentent les quantités de matières minérales totales (cendres) concentrations des différents éléments chimiques dosés dans les échantillons de chenilles.

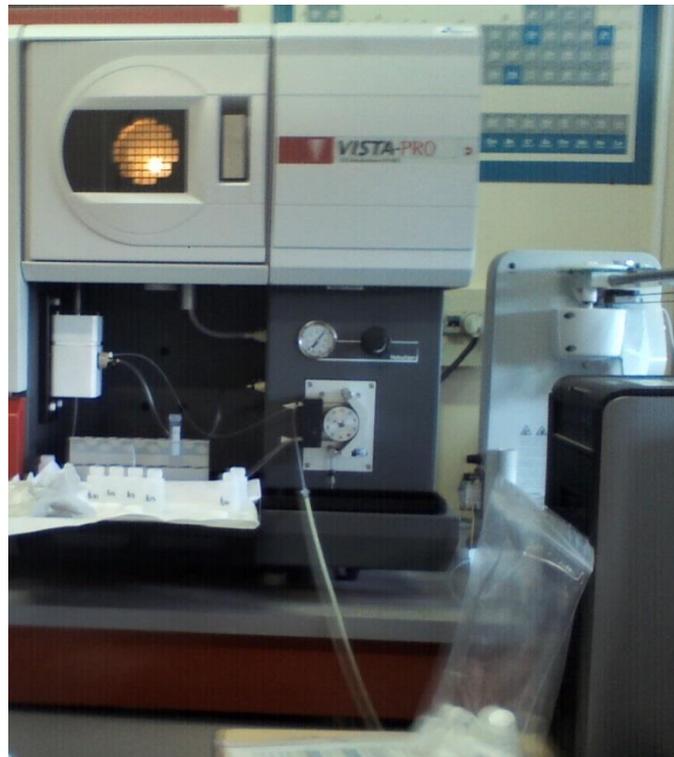


Figure n°74 : Photographie de l'équipement ICP – AES utilisé⁴⁹.

⁴⁹ Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman (LASIR), UMR 8516. http://lasir.univ-lille1.fr/?page_id=7767#ICP

4.8.1 RESULTATS DES DOSAGES DES MINERAUX

Trois échantillons ont été soumis à ce dosage. Il s'agit d'un échantillon brut (EBT) constitué d'un tout venant probablement constitué d'un mélange des espèces de chenilles noires *I. epimethea* (EBN) et vertes *I. oyemensis* (EBV) respectivement. Les teneurs en cendres totales calculées sont résumées dans le tableau n°47 et les proportions respectives des minéraux ont été analysées par Microsoft Excel 2010 et représentées par la figure n°75 ci – bas.

Tableau n°47 : Teneur en cendres totales (%) et composition minérale (mg/L) des échantillons de chenilles.

Ech.	Cendres totales (%) ±E.T	Al	Ca	Fe	Mg	Zn
EBT	4,32 ± 0,01	0,7 ± 0,05	1,01 ± 0,01	0,34 ± 0,02	1,60 ± 0,03	0,28 ± 0,02
EBN	4,30 ± 0,02	2,72 ± 0,06	1,02 ± 0,01	1,39 ± 0,01	1,51 ± 0,01	0,23 ± 0,01
EBV	3,31 ± 0,02	0,92 ± 0,03	1,01 ± 0,01	0,55 ± 0,03	1,60 ± 0,01	0,29 ± 0,01

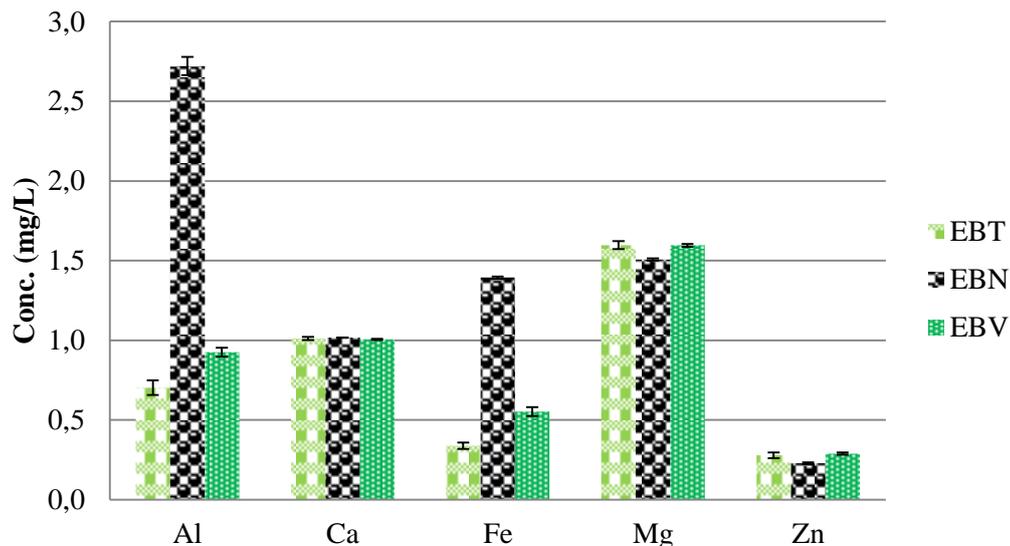


Figure n°75 : Concentration minérale des échantillons de chenilles.

Les teneurs en cendres totales présentent une différence de 1% entre les espèces noires (EBN) et le *totum* (EBT) et les espèces vertes (EBV). A l'analyse élémentaire, on remarquera que les concentrations en Calcium, Magnésium et Zinc sont presque identique dans les 3 échantillons, une concentration en Fer et en Aluminium plus accentuée dans les échantillons EBN.

En définitive, il serait intéressant de relever que les deux espèces de chenilles *Imbrasia* présente un apport en Calcium et Magnésium non négligeable à l'état brut. Les proportions de Fer et de Zinc de l'ordre de 0,75 mg/L et 1,5 mg/L respectivement nécessitent une attention

particulière puisqu'on sait que l'apport en Fer contribue à lutter contre les anémies et la malnutrition et que le Zinc prévient les troubles métaboliques, cellulaires et du développement osseux et favorise la croissance en hauteur. Il conviendrait de doser ces minéraux dans la bouillie formulée afin d'établir leurs proportions réelles.

4.9 CONCLUSION

A l'issue de cette recherche spécifique sur les protéines de chenilles utilisables dans une formule de bouillie alimentaire pour nourrisson et jeune enfant, il sied de reconnaître que le choix de cette denrée comme source de protéines a été judicieux non seulement sur le coût, mais aussi sur la valeur alimentaire. Le genre *Imbrasia* représente un atout important comme source de protéine alimentaire à moindre coût pour les ménages centrafricains. Les fractions protéiques aux différents pH ont montré une multitude de peptides et protéines à l'analyse LC – MS. La solubilisation par ionisation a permis d'isoler quelques protéines notamment dans le culot à pH 3 pour la protéine de **25449 Da** et dans le surnageant à pH 10 pour la protéine de poids moléculaire **183107 Da**. Un autre fractionnement pourra éventuellement révéler les propriétés physico – chimiques de ces protéines en vue de les isoler et caractériser de manière avancée.

Les résultats des tests microbiologiques et surtout la réaction positive vis-à-vis de *Micrococcus luteus* ATCC 4698 observée avec les extraits bruts devraient également être poursuivis sur d'autres souches afin de confirmer l'activité antimicrobienne des protéines de chenilles du genre *Imbrasia*. Les essais d'hydrolyse enzymatique entamés devraient se poursuivre pour révéler des hydrolysats protéiques ainsi que leurs activités biologiques.

Ces résultats démontrent d'un grand intérêt à l'affinement de la recherche sur les protéines de chenilles du genre *Imbrasia* en vue d'une valorisation alimentaire mais aussi thérapeutique que nous souhaitons vivement auprès de tous les partenaires de ce projet.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En conclusion et perspectives à ce projet, il s'agira d'affiner les différentes activités biologiques des protéines de chenilles du genre *Imbrasia* parallèlement à une analyse sensorielle de la bouillie formulée.

En effet, la recherche de formulation d'une bouillie infantile, utilisant la méthode des plans d'expérience type *d'Hadamard*, nous a permis de faire varier différentes proportions d'ingrédients locaux de la République centrafricaine notamment le maïs, le manioc, l'arachide, la mangue, la banane, albédo d'orange et des chenilles comestibles aux fins d'aboutir à une formule dont les paramètres physico-chimiques, biochimiques et nutritionnels ont été testés et se sont révélés convenables aux réponses recherchées.

Nous avons abouti à une formule idéale avec des proportions de 40% de farine de manioc, de 40% de farine de maïs germé, de 8% de chenilles *Imbrasia* en poudre, de 5% respectives d'albédo d'orange et de mangue en poudre et de 2% d'arachide en poudre en suivant les conditions définies du couple temps – température de cuisson de 10min à 85°C dans un volume d'eau maintenu à 250 mL. Cette formule idéale a permis de préparer 100g de bouillie infantile optimisée offrant 78,24 Kcal d'énergie métabolisable avec une proportion de 12Kcal en protéines totales, un profil minéral en Fer et en Zinc notable, une activité antimicrobienne vis-à-vis de *Micrococcus luteus* ATCC 4698 et enfin une dureté et un collant acceptables pour le nourrisson et le jeune enfant.

Les objectifs visés, à savoir enrichir une bouillie infantile en protéines et vitamines pour combler le déficit en ces nutriments dans l'alimentation complémentaire du nourrisson et le jeune enfant en CENTRAFRIQUE ont été atteints.

La source de protéine utilisée, notamment les chenilles *Imbrasia*, a contribué par un apport à hauteur de **8,5 g/100g** de bouillie à la couverture des besoins protéiques. Ce qui accorde, de façon essentielle, une valeur ajoutée à la composition nutritionnelle de la bouillie.

L'activité antimicrobienne testée est une des voies d'exploration non négligeables puisque l'effet antimicrobien observé représente un gage de préservation de la bouillie infantile contre les éventuels agents de détérioration de la qualité de cette denrée surtout lorsqu'on observe que les bouillies infantiles, dans cette partie du monde, sont souvent exposées aux risques biologiques de l'environnement.

Ces risques sont liés au fait que les bouillies préparées ne sont pas très souvent données totalement aux nourrissons et jeunes enfants durant le repas pour plusieurs raisons entre autre le refus de ces derniers (satiété ou non), les multiples occupations de la maman ou de la personne en charge d'alimenter l'enfant, l'inexpérience aux pratiques alimentaires des sœurs et frères aînés à qui l'enfant est souvent confié. Et donc, à défaut de moyens de conservation appropriés, les bouillies ont exposées principalement à des risques notamment microbiologiques (vents et poussière permanents en milieu tropical) mais aussi des risques physico-chimiques (séparation de phase suite au refroidissement).

Il reste cependant aussi à procéder à une analyse sensorielle de la bouillie infantile optimisée afin de motiver sur son acceptabilité et évaluer son impact nutritionnel auprès de la population cible représentée par le couple mère – enfant.

Les différents profils protéiques obtenus en LC – MS sur la recherche spécifique montrent une multitude de composés protéiques d'intérêt. Les poids moléculaires obtenus devraient contribuer à la suite de la caractérisation.

Il serait idéal de poursuivre l'identification de ces composés, d'engager un fractionnement et une caractérisation sur la base de l'activité antimicrobienne observée et aussi effectuer des tests d'autres activités notamment satiétogène ou antioxydante sur les hydrolysats de protéines de chenilles *Imbrasia*.

L'achèvement idéal de ce projet sera la mise à échelle industrielle de la production de la bouillie infantile optimisée qui, comme nous l'avons montré dans ce manuscrit, peut apporter jusqu'à **600 Kcal** par jour en complément du plat familial.

Il serait surtout important d'engager la poursuite d'autres alternatives alimentaires et/ou thérapeutiques à partir des espèces de protéines sur lesquelles un pan important vient d'être ouvert.

L'agenda 2030 pour le développement durable a inscrit et engagé toute la communauté mondiale à « Sortir 500 millions de personnes des pays en développement de la faim et de la malnutrition d'ici à 2030 », notre engagement à travers ce projet sera « l'amélioration de la nutrition du nourrisson et du jeune enfant ».

BIBLIOGRAPHIE

1. ABEBE, Yewelsew, BOGALE, Alemtsehay, HAMBIDGE, K. Michael, *et al.* Phytate, zinc, iron and calcium content of selected raw and prepared foods consumed in rural Sidama, Southern Ethiopia, and implications for bioavailability. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2007, vol. 20, no 3, p. 161-168.
2. ACTIA, 2014. Evaluation sensorielle : Guide des bonnes pratiques, 2^e éd.
3. AKPOSSAN, Raphael Amon, DIGBEU, Yolande Dogoré, KOFFI, Michel Djary, *et al.* Protein Fractions and Functional Properties of Dried *Imbrasia oyemensis* Larvae Full-Fat and Defatted Flours. *International Journal of Biochemistry Research & Review*, 2015, vol. 5, no 2, p. 116.
4. ALLEN, Lindsay H. Guidelines on food fortification with micronutrients. In : *Guidelines on food fortification with micronutrients*. World Health Organization. Dept. of Nutrition for Health and Development, 2006.
5. AMISI, Muvundja Fabrice, HÉRITIER, Uwikunda Serondo, PAUL, Mande, *et al.* Valorisation de la chenille comestible *Bunaeopsis aurantiaca* dans la gestion communautaire des forêts du Sud-Kivu (République Démocratique du Congo). *Vertigo-la revue électronique en sciences de l'environnement*, 2013, no Hors-série 16.
6. ARMAND, Martine. Chapitre 25. Armand M. Stratégies de contrôle de la biodisponibilité des lipides. *Structure des aliments et effets nutritionnels*, 2013, p. 373-413.
7. ATWATER, Wilbur Olin, WOODS, Charles Dayton, et BRYANT, Arthur Peyton. *The chemical composition of American food materials*. US Government Printing Office, 1906.
8. BADOUD, Raphaël, LÖLIGER, Jürg, et ETOURNAUD, Alain. *Science et technologie des aliments: principes de chimie des constituants et de technologie des procédés*. PUR Presses polytechniques, 2010.
9. BAHUCHET, Serge. La cueillette chez les Pygmées Aka, chasseurs-cueilleurs de la forêt centrafricaine. *Bulletin de la Société d'Ethnozoologie et d'Ethnobotanique*, 1978, vol. 4, p. 21-25.
10. BAZINET, Laurent et CASTAIGNE, François. *Concept de génie alimentaire : Procédés associés et applications à la conservation des aliments*. Lavoisier, 2011
11. BÉLANGER, Marie-Claire. Statut redox, inflammatoire et métabolique chez une population inuit. Effets d'une alimentation traditionnelle riche en acides gras omega-3 et en sélénium, mais contaminée par du mercure et des biphényles polychlorés. *METHODS*, 2007, vol. 10, p. 1.

12. BENALI, Sonia, BENAMARA, Salem, BIGAN, Muriel, *et al.* Feasibility study of date (Phoenix dactylifera L.) fruit syrup-based natural jelly using central composite design. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, p. 1-10.
13. BERGER J., Enrichissement des aliments en micronutriments: élément d'une stratégie intégrée de lutte contre les carences en micronutriments, en particulier en fer, dans les pays en développement. *Ilème Atelier international Voies alimentaires d'amélioration des situations nutritionnelles*, 2003, p. 23-28.
14. BERGER, M. M. Rôle des oligo-éléments et des vitamines en nutrition périopératoire. *Nutrition clinique et métabolisme*, 1995, vol. 9, no 1, p. 91-103.
15. BERGERET, Bernard et MASSEYEFF, René. La vitamine C dans les fruits et légumes du Sud-Cameroun. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*, 1958, vol. 3, no 1, p. 192-201.
16. BONAZZI, Catherine et BIMBENET, Jean-Jacques. Séchage des produits alimentaires principes. *Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire*, 2003, vol. 2, no F3000, p. F3000. 1-F3000. 14.
17. BOUTRY, Claire, BOS, Cécile, et TOMÉ, Daniel. Les besoins en acides aminés. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2008, vol. 22, no 4, p. 151-160.
18. BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 1976, vol. 72, no 1, p. 248-254.
19. BROWN, Kenneth H. et LUTTER, Chessa K. Potential role of processed complementary foods in the improvement of early childhood nutrition in Latin America. *Food & Nutrition Bulletin*, 2000, vol. 21, no 1, p. 5-11.
20. BRUGÈRE, Hubert, AUVRAY, Frédéric, MARIANI-KURKDJIAN, Patricia, *et al.* E. coli producteurs de shigatoxines (STEC): définitions, virulence et propriétés des souches entérohémorragiques (eHeC). *Santé animale-alimentation*, 2012, p. 23.
21. CULBERTSON, Jeff D. Food Protein Functionality 7. *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering-4 Volume Set*, 2005.
22. DABADIE, Alain. Alimentation de l'enfant. *Rennes: Institut Mère-enfant*, 1999.
23. DAVIDSSON Lena. Les premières années : les clés de la nutrition et de la santé infantiles. *Bulletin AIEA*, 2005, vol.47, no 1, pp 33 -35.
24. DE BENOIST, Bruno, DARY, Omar, HURRELL, Richard, *et al.* Directives sur l'enrichissement des aliments en micronutriments. 2011.

25. DE BENOIST, Bruno. Le sevrage: un défi pour l'enfant et pour sa mère. *in Trèche S., De Benoist B., Benbouzid D., Delpeuch F., L'alimentation de complément du jeune enfant*, 1994, p. 7-13.
26. DE FOLIART, Gene R. Insects as food: why the western attitude is important. *Annual review of entomology*, 1999, vol. 44, no 1, p. 21-50.
27. DE GUEVARA, O. Ladron, PADILLA, P., GARCÍA, L., *et al.* Amino acid determination in some edible Mexican insects. *Amino Acids*, 1995, vol. 9, no 2, p. 161-173.
28. DEBROAS, Didier, DEPARDON, Nathalie, et BLANCHART, Gérard. Hydrolyse enzymatique des protéines par les bactéries du rumen. *L'Année Biologique*, 1998, vol. 37, no 4, p. 233-248.
29. DELACHARLERIE, Sophie et DE BIOURGE, Sandrine. *HACCP organoleptique: Guide pratique*. Presses Agronomiques de Gembloux, 2009.
30. DESHPANDE, R. P., CHINNAN, M. S., et MCWATTERS, K. H. Optimization of a chocolate-flavored, peanut-soy beverage using response surface methodology (RSM) as applied to consumer acceptability data. *LWT-Food Science and technology*, 2008, vol. 41, no 8, p. 1485-1492.
31. DONANGELO, C. M., TRUGO, L. C., TRUGO, N. M. F., *et al.* Effect of germination of legume seeds on chemical composition and on protein and energy utilization in rats. *Food chemistry*, 1995, vol. 53, no 1, p. 23-27.
32. DROESBEKE, Jean-Jacques, SAPORTA, Gilbert, et FINE, Jeanne. *Plans d'expériences: applications à l'entreprise*. Editions technip, 1997.
33. DUBOIS, Mathieu. *Développement de techniques analytiques pour l'évaluation des protéines thérapeutiques et des biomarqueurs par spectrométrie de masse*. 2008. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie-Paris VI.
34. EKPO, K. E., AZEKE, M. A., et UGBENYEN, A. M. Functional properties of dried *Imbrasia belina* larvae flour as affected by mesh size and pH. *Nigerian Annals of Natural Sciences*, 2008, vol. 8, no 1, p. 6-9.
35. FABER, Mieke, KVALSVIG, Jane D., LOMBARD, Carl J., *et al.* Effect of a fortified maize-meal porridge on anemia, micronutrient status, and motor development of infants. *The American journal of clinical nutrition*, 2005, vol. 82, no 5, p. 1032-1039.
36. FAO/OMS/UNU, Besoins énergétiques et besoins en protéines. Rapport d'une consultation conjointe d'experts. *Série de rapports techniques, 724. Organisation Mondiale de la Santé*, 1986.
37. FAO/WUR., 2013. *Edible insects : future prospects for food and feed security*. Rome, FAO.

38. FARDET, Anthony, SOUCHON, Isabelle, et DUPONT, Didier. *Structure des aliments et effets nutritionnels*. Editions Quae, 2013.
39. FLOCH H. Sur la richesse exceptionnelle en vitamine C de feuilles de plantes guyanaises (Manioc, Yucca, Agave). In: *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée*, vol. 4, n°9-10, Septembre-octobre 1957. pp. 385-391.
40. FRÉNOT, Marlène et VIERLING, Elisabeth. *Biochimie des aliments: diététique du sujet bien portant*. Wolters Kluwer France, 2001.
41. GAN, H. E., KARIM, Roselina, MUHAMMAD, S. K. S., *et al.* Optimization of the basic formulation of a traditional baked cassava cake using response surface methodology. *Lwt-Food Science and Technology*, 2007, vol. 40, no 4, p. 611-618.
42. GERBOUIN-RÉROLLE, Pascale. Comment améliorer les aliments de complément du jeune enfant?. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé*, 1996, vol. 6, no 4, p. 229-235.
43. GIAMARCHI, P., BAHOUNOUKA, G., et TRÈCHE, Serge. Pourquoi et comment augmenter la densité énergétique des bouillies de sevrage au Congo?. 1991.
44. GOLDEN, Michael HN, SOUTHALL, D., COULTER, B., *et al.* Severe malnutrition. *International child health care: a practical manual for hospitals worldwide*, 2002, p. 241-252.
45. GOUPY, Jacques et CREIGHTON, Lee. *Introduction aux plans d'expériences-3ème édition*-Dunod, 2006.
46. HÄBERLE, Johannes, LÄMMLE, Alexander, et BAUMGARTNER, Matthias R. Troubles du métabolisme lipidique de l'enfant. *Paediatrica* 2013, vol.24, no.4, p. 20 – 23.
47. HAINQUE, Bernard, BAUDIN, Bruno, et LEFEBVRE, Philippe. *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*. Flammarion Médecine-Sciences Publications, 2008.
48. HANCE, Pierre, TEYSSOU, Rémy, NICAND, Elizabeth, *et al.* Sources alimentaires des diarrhées bactériennes. Toxi-infections alimentaires collectives. *Médecine thérapeutique/Pédiatrie*, 1998, vol. 1, no 1, p. 25-30.
49. HEDOUX, Alain. Lyophilisation des produits pharmaceutiques et biopharmaceutiques. *Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire*, 2013, no pha2026.
50. HLADIK, Annette et HLADIK, Claude Marcel. RCA, forêt de Ngotto: les produits forestiers, des ressources à développer. *Canopée*, 1995, vol. 4, p. 7-8.
51. HUI, Yiu H. *Handbook of food science, technology, and engineering*. CRC press, 2006.

52. ICASEES (Institut Centrafricain des Statistiques, des Etudes Economiques et Sociales), 2007. Résultats de l'enquête par grappes à indicateurs multiples couplée avec la sérologie VIH et l'anémie en RCA 2006, Rapport préliminaire. Bangui, RCA, ICASEES. 52p.
53. ICASEES (Institut Centrafricain des Statistiques, des Etudes Economiques et Sociales), 2012. Enquête par grappes à indicateurs multiples MICS – RCA 2010, Rapport final. Bangui, RCA, ICASEES. 375p.
54. KARAM, Marie Celeste, GAIANI, Claire, BARBAR, Reine, *et al.* Effect of dairy powder rehydration state on gel formation during yogurt process. *Journal of Dairy Research*, 2012, vol. 79, no 03, p. 280-286.
55. KARAM, Sandrine. *Application de la méthodologie des plans d'expériences et de l'analyse de données à l'optimisation des processus de dépôt*. 2004. Thèse de doctorat. Université de Limoges.
56. KOUADIO, Soumaila Dabonné, DUÉ, Edmond Ahipo, et KOUAMÉ, Lucien Patrice. Nutritional characteristics of the caterpillars (*Imbrasia oyemensis*) from Côte d'Ivoire. *Int. J. Rec. Biotech*, 2014, vol. 2, no 3, p. 1-5.
57. KWIRI, Clive Winini, MUREDZI, Perkins, TONGONYA, Jeritah, *et al.* Mopane Worm (*Gonimbrasia belina*) Utilisation, a Potential Source of Protein in Fortified Blended Foods in Zimbabwe: A Review. *Global Journal of Science Frontier Research*, 2015, vol. 14, no 10.
58. LATHAM, Michael C. *La nutrition dans les pays en développement*. Food & Agriculture Org., 2001.
59. LAPRÉVOTE, Olivier. Spectrométrie de masse organique et bio-organique. *Laboratoire de spectrométrie de masse, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR CNRS2301, Gif-sur-Yvette*, 2001.
60. LE HUËROU-LURON, Isabelle, BLAT, Sophie, et BOUDRY, Gaëlle. Breast-v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutrition research reviews*, 2010, vol. 23, no 01, p. 23-36.
61. LISINGO, Janvier LISINGO WA. Typologie des forêts denses des environs de Kisangani en RDC par une méthode d'analyse phytosociologique multistrate. 2009.
62. LOWRY, Oliver H., ROSEBROUGH, Nira J., FARR, A. Lewis, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol Chem*, 1951, vol. 193, no 1, p. 265-275.
63. LUTTER, Chessa K. et DEWEY, Kathryn G. Proposed nutrient composition for fortified complementary foods. *The Journal of nutrition*, 2003, vol. 133, no 9, p. 3011S-3020S.

64. LUTTER, Chessa K. et RIVERA, Juan A. Nutritional status of infants and young children and characteristics of their diets. *The Journal of nutrition*, 2003, vol. 133, no 9, p. 2941S-2949S.
65. LUTTER, Chessa K. Processed complementary foods: summary of nutritional characteristics, methods of production and distribution, and costs. *Food & Nutrition Bulletin*, 2000, vol. 21, no 1, p. 95-100.
66. MALAISSE, F. Ressources alimentaires non conventionnelles. *Tropicultura*, 2004, vol. 22.
67. MALAISSE, François et LOGNAY, Georges. Les chenilles comestibles d'Afrique tropicale. " *Insects*" in *oral literature and traditions*, 2003, vol. 11, p. 279.
68. MALENGUINZA, Salomon. Profils de transferts de chaleur et de masse en régime transitoire d'un capteur solaire double vitrage équipant un séchoir solaire pliable et portatif: Modélisation, Simulation et optimisation par la méthode des plans d'expériences. 2012. Thèse de doctorat. Université d'Abomey – Calavi.
69. MARIN, Michèle et RENE, Frédéric. Lyophilisation. *Techniques de l'ingénieur. Agroalimentaire*, 2000, vol. 2, no F3240, p. F3240. 1-F3240. 11.
70. MASSAMBA, Joachim et TRÈCHE, Serge. COMPOSITION EN NUTRIMENTS DES ALIMENTS DE SEVRAGE ADAPTES AU CONTEXTE DE L'AFRIQUE CENTRALE. 1991.
71. MBÉTID-BESSANE, E. Commercialisation des chenilles comestibles en République Centrafricaine. *TROPICULTURA TROPICULTURA*, 2005, vol. 23, no 1, p. 3-5.
72. MENSA-WILMOT, Y., PHILLIPS, R. D., LEE, J., *et al.* Formulation and evaluation of cereal/legume-based weaning food supplements. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2003, vol. 58, no 3, p. 1-14.
73. MIGNON, Jacques. L'entomophagie: une question de culture?. *Tropicultura*, 2002, vol. 20, no 3, p.151-155.
74. MILNER, John A. et ALLISON, Richard G. The role of dietary fat in child nutrition and development: summary of an ASNS workshop. *The Journal of nutrition*, 1999, vol. 129, no 11, p. 2094-2105.
75. MOTTE-FLORAC, Élisabeth et THOMAS, Jacqueline MC (ed.). " *Insects*" in *oral literature and traditions*. Peeters Publishers, 2003.
76. MOUQUET, Claire, SALVIGNOL, B., VAN HOAN, N., *et al.* Ability of a "very low-cost extruder" to produce instant infant flours at a small scale in Vietnam. *Food Chemistry*, 2003, vol. 82, no 2, p. 249-255.

77. MOZAFFARIAN, Dariush et WU, Jason HY. (n-3) fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary?. *The Journal of nutrition*, 2012, vol. 142, no 3, p. 614S-625S.
78. MURAT, Murielle. *Nutrition humaine et sécurité alimentaire*. Tec. & Doc Lavoisier, 2009.
79. N'GASSE, G. Contribution des chenilles/larves comestibles à la réduction de l'insécurité alimentaire en République Centrafricaine (RCA). *Rapport de Consultation*, 2003.
80. NEDJAR-ARROUME, Naïma, DUBOIS-DELVAL, Véronique, ADJE, Estelle Yaba, *et al.* Bovine hemoglobin: an attractive source of antibacterial peptides. *Peptides*, 2008, vol. 29, no 6, p. 969-977.
81. NGUYEN Van Hoan, 2008. Conditions d'utilisation d'un «ciseur-extrudeur à très faible coût» pour la fabrication de farines infantiles au Vietnam. Thèse de Doctorat de l'Université Montpellier II, France (*Discipline Nutrition et sciences des aliments*).
82. NJINTANG, Nicolas Y., SCHER, Joel, MBOFUNG, Carl MF, *et al.* Texture, microstructure and physicochemical characteristics of taro (*Colocasia esculenta*) as influenced by cooking conditions. *Journal of food engineering*, 2009, vol. 91, no 3, p. 373-379.
83. ONIMAWO, I. A. et AKUBOR, P. I. Food Chemistry. Integrated Approach with Biochemical Background. 2005.
84. ONOFIOK, N. O. et NNANYELUGO, D. O. Weaning foods in West Africa: Nutritional problems and possible solutions. *Food & Nutrition Bulletin*, 1998, vol. 19, no 1, p. 27-33.
85. OPS, Organisation Panaméricaine de la Santé. Principes Directeurs pour l'Alimentation de complément de l'enfant allaité au sein. *Alimentation et Nutrition*, 2003.
86. OWUSU-APENTEN, Richard. Food Protein Analysis: Determination of Proteins in the Food and Agriculture System. *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering-4 Volume Set*, 2005.
87. PAQUOT, Nicolas et SCHEEN, André. La place des micronutriments en medecine. *Revue Médicale de Liège*, 2006, vol. 61, no 5-6.
88. PITT, James J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev*, 2009, vol. 30, no 1, p. 19-34.
89. RAMOS-ELORDUY, Julieta, MORENO, Jose Manuel Pino, PRADO, Esteban Escamilla, *et al.* Nutritional value of edible insects from the state of Oaxaca, Mexico. *Journal of food composition and analysis*, 1997, vol. 10, no 2, p. 142-157.
90. ROUESSAC, Francis, ROUESSAC, Annick, et CRUCHÉ, Daniel. *Analyse chimique-6ème édition-Méthodes et techniques instrumentales modernes: Méthodes et techniques instrumentales modernes*. Dunod, 2004.

91. RUMPOLD, Birgit A. et SCHLÜTER, Oliver K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Molecular nutrition & food research*, 2013, vol. 57, no 5, p. 802-823.
92. SCHER, Joël. Rhéologie, texture et texturation des produits alimentaires. *Techniques de l'Ingénieur-F3300V2*, 1998.
93. SIX, Sabrina Cadel, DE BUYSER, Marie-Laure, VIGNAUD, Marie-Léone, *et al.* Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus*: bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation/Sécial Risques alimentaires microbiologiques*, 2012, vol. 50, p. 57-61.
94. TOME D, MAHE S, HUNEAU JF. Métabolisme et homéostasie des acides aminés et des protéines. In : *Les protéines : le métabolisme et les besoins protéiques chez l'homme*, ed. Paris : Institut Français de la Nutrition ; 1997 : 23-40.4
95. TONG, Lee-Ing et SU, Chao-Ton. OPTIMIZING MULTI-RESPONSE PROBLEMS IN THE TAGUCHI METHOD BY FUZZY MULTIPLE ATTRIBUTE DECISION MAKING. *Quality and Reliability Engineering International*, 1997, vol. 13, no 1, p. 25-34.
96. TRAORÉ, Tahirou, MOUQUET, Claire, ICARD-VERNIÈRE, Christèle, *et al.* Changes in nutrient composition, phytate and cyanide contents and α -amylase activity during cereal malting in small production units in Ouagadougou (Burkina Faso). *Food chemistry*, 2004, vol. 88, no 1, p. 105-114.
97. TRÈCHE, Serge. Aliments de complément: caractéristiques nutritionnelles et hygiéniques, production, utilisation. 1999.
98. TRÈCHE, Serge. Influence de la densité énergétique et de la viscosité des bouillies sur l'ingéré énergétique des nourrissons. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Santé*, 1996, vol. 6, no 4, p. 237-243.
99. Van GASTEL, S., & van den Wijngaart, A. *AD22F La fabrication à petite échelle des aliments de sevrage*. Agromisa Foundation.
100. VAN HOAN, Nguyen, VAN PHU, Pham, SALVIGNOL, Bertrand, *et al.* Effect of the consumption of high energy dense and fortified gruels on energy and nutrient intakes of 6–10-month-old Vietnamese infants. *Appetite*, 2009, vol. 53, no 2, p. 233-240.
101. VIVIER, Stéphane. *Stratégies d'optimisation par la méthode des plans d'expériences et application aux dispositifs électrotechniques modélisés par éléments finis*. 2002. Thèse de doctorat. Ecole Centrale de Lille.
102. VOËT, D. et VOËT, J. G. *Biochimie, 2 édition. Édité par De Boeck et Larcier*. ISBN 978-2-8041-4795-2. ième, 2005.
103. YADA, Rickey (ed.). *Proteins in food processing*. Elsevier, 2004.

104. ZANNOU-TCHOKO, Viviane Jocelyne, AHUI-BITTY, Louise Berthe, KOUAME, Koffi, *et al.* Utilisation de la farine de maïs germé source d'alpha-amylases pour augmenter la densité énergétique de bouillies de sevrage à base de manioc et de son dérivé, l'attiéké. *Journal of Applied Biosciences*, 2011, vol. 37, p. 2477-2484.

LISTE DES FIGURES

<i>Figure n°1 : Evolution de la mortalité infantile en RCA (EDS, 1994 – 1995 ; RGPH, 2003).....</i>	<i>3</i>
<i>Figure n°2 : Schéma de fabrication d'une bouillie enrichie et de densité énergétique améliorée pour un contexte d'Afrique centrale (TRECHE, 1996).....</i>	<i>8</i>
<i>Figure n°3 : Hydrolyse enzymatique de l'amidon après cuisson- extrusion (Adapté de GERBOUIN-REROLLE, 1996).....</i>	<i>9</i>
<i>Figure n°4 : Cinétique du séchage de la Banane douce à l'étuve à 65°C.....</i>	<i>53</i>
<i>Figure n°5 : Cinétique du séchage de la Banane douce à l'étuve à 105°C.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure n°6 : Diagramme de phases de l'eau (HEDOUX, 2013).....</i>	<i>55</i>
<i>Figure n°7 : Diagramme technologique de préparation des bouillies.....</i>	<i>57</i>
<i>Figure n°8 : Courbe – type obtenue d'un test TPA (BOURNE, 2002 in DELACHARLERIE S. et DE BOURGE S., 2009).</i>	<i>59</i>
<i>Figure n°9 : Aspect d'une des bouillies préparées à partir du plan d'expériences</i>	<i>61</i>
<i>Figure n°10 : Profil de texture d'une des bouillies du plan d'expériences.....</i>	<i>62</i>
<i>Figure n°11 : Histogramme des effets de facteurs sur la dureté.....</i>	<i>64</i>
<i>Figure n°12 : Histogramme des effets des facteurs sur le collant.....</i>	<i>65</i>
<i>Figure n°13 : Surface de réponses pour le collant.....</i>	<i>68</i>
<i>Figure n°14 : Surface de réponse pour la dureté.....</i>	<i>68</i>
<i>Figure n°15 : Forme générique d'un acide aminé.....</i>	<i>73</i>
<i>Figure n°16 : Structures chimiques des vingt principaux acides aminés.....</i>	<i>74</i>
<i>Figure n°17 : Liaison peptidique entre 2 acides aminés formant un peptide.</i>	<i>75</i>
<i>Figure n°18 : Structures chimiques de quelques lipides</i>	<i>77</i>
<i>Figure n°19 : Principaux acides gras retrouvés dans le plasma humain (BELANGER, 2007).....</i>	<i>79</i>
<i>Figure n°20 : Structures des quelques vitamines hydrosolubles.....</i>	<i>81</i>
<i>Figure n°21 : Structures des vitamines liposolubles.....</i>	<i>82</i>
<i>Figure n°22 : Teneur en Protéines totales (g/100g) des bouillies du plan d'expériences.....</i>	<i>87</i>
<i>Figure n°23 : Effets de la quantité en protéines totales des bouillies sur les différents facteurs.....</i>	<i>88</i>
<i>Figure 24 : Surface de réponses liées à la concentration en protéines et combinaison de facteurs pour une réponse optimale en quantité de protéines.</i>	<i>90</i>
<i>Figure n°25 : Photographie de la chaîne pour HPLC n°4 (ProBioGEM).....</i>	<i>92</i>
<i>Figure n°26 : Chromatogramme de la solution standard de vitamine C.....</i>	<i>93</i>
<i>Figure n°27 : Chromatogrammes des dosages de la vitamine C dans les bouillies (essai 1 à 4).....</i>	<i>94</i>
<i>Figure n°28 : Chromatogrammes des dosages de la vitamine C dans les bouillies (essai 4 à 8).....</i>	<i>95</i>
<i>Figure n°29 : Chromatogrammes des dosages de la vitamine C dans les bouillies (essai 9 à 12).....</i>	<i>96</i>
<i>Figure n°30 : Teneur en Vitamine C (µg/L) des bouillies du plan d'expériences</i>	<i>97</i>
<i>Figure n°31 : Effets des facteurs en fonction de la concentration en vitamine C.....</i>	<i>98</i>
<i>Figure n°32 : Surface de réponses liées à la concentration en vitamine C</i>	<i>100</i>
<i>Figure n°33 : Photographie de l'équipement pour CPG (A.T.E.M).</i>	<i>102</i>
<i>Figure n°34 : Schéma fonctionnel d'un appareil de GC (ROUESSAC et al., 2004).</i>	<i>102</i>
<i>Figure n°35 : Photographie de l'équipement pour GC – MS</i>	<i>103</i>
<i>Figure n°36 : Protocole d'extraction des acides gras (adapté de BAUER, 2010).....</i>	<i>103</i>
<i>Figure n°37 : Qualité statistique du plan d'extraction des esters d'acides gras générée par MODDE 5.0.....</i>	<i>109</i>
<i>Figure n°38 : Effets principaux et effets d'interaction sur l'extraction des esters d'acides gras.....</i>	<i>109</i>
<i>Figure n°39 : Surface de réponses concernant le nombre d'esters d'acides gras extraits à partir du plan d'expériences.....</i>	<i>112</i>
<i>Figure n°40 : Chromatogramme dans des conditions non optimisées.....</i>	<i>113</i>

Figure n°41 : Chromatogramme dans les conditions optimales du plan d'expériences.....	113
Figure n°42 : Histogramme des effets principaux sur la quantification des esters d'acides gras.	115
Figure n°43 : Chromatogramme de quantification des acides gras extrait de la chenille	117
Figure n°44 : Surface de réponses pour la quantité d'esters d'acides gras (mg/mL) extraite.	119
Figure n°45 : Portions d'ingrédients pour 100mL de bouillie.	123
Figure n°46 : Ingrédients après pesée.	125
Figure n°47 : Mélange sec et Pâte humide	126
Figure n°48 : Cuisson et homogénéisation	126
Figure n°49 : Transvasement et conditionnement de la bouillie optimisée	126
Figure 50 : Photographie de fractions totales à pH 3, 4, 7, 10 et 11 à partir d'une poudre de chenilles	131
Figure n°51 : Photographie de surnageants à pH 3, 4, 7, 10 et 11 à partir d'une poudre de chenilles.	132
Figure n°52 : Concentration en protéines totales dans les surnageants.	133
Figure n°53 : Concentration en protéines totales dans les culots	133
Figure n°54 : Résumé comparatif des concentrations en protéines totales.	134
Figure n°55 : Photographies du dispositif SDS – PAGE.....	137
Figure n°56 : Gel SDS – PAGE après migration de fractions protéiques de chenilles	138
Figure n°57 : Comparaison en base peak des 5 échantillons n (Surnageant).....	140
Figure n°58 : Comparaison en base peak des 5 échantillons Cn (Culot).....	140
Figure n°59 : Comparaison des chromatogrammes obtenus pour les échantillons n et Cn (Surnageant et Culot à pH 3).....	141
Figure n°60 : Comparaison des chromatogrammes obtenus pour les échantillons n et Cn (Surnageant et Culot à pH 4).....	141
Figure n°61 : Comparaison des chromatogrammes obtenus pour les échantillons n et Cn (Surnageant et Culot à pH 7).....	142
Figure n°62 : Comparaison des chromatogrammes obtenus pour les échantillons n et Cn (Surnageant et Culot à pH 10).....	142
Figure n°63 : Comparaison des chromatogrammes obtenus pour les échantillons n et Cn (Surnageant et Culot à pH 11).....	143
Figure n°64 : Comparaison des 5 échantillons de surnageant en appel d'ion de m/z 200-600	144
Figure n°65 : Comparaison des 5 échantillons de surnageant en appel d'ion de m/z 600-1000	144
Figure n°66 : Comparaison des 5 échantillons de culot en appel d'ion de m/z 200-600	145
Figure n°67 : Comparaison des 5 échantillons de culot en appel d'ion de m/z 600-1200	145
Figure n°68/1 : Spectres de masse des fractions solubilisées de poudre de chenilles.	146
Figure n°69/2 : Spectres de masse des fractions solubilisées de poudre de chenilles.	147
Figure n°70 : Photographie du montage bioréacteur.	150
Figure n°71 : Photographie des hydrolysats.....	150
Figure n°72 : Réaction des extraits protéiques de chenilles à <i>Micrococcus luteus</i> sur boîte de Pétri.	152
Figure n°73 : Photographies de chenilles (<i>I.oyemensis</i> & <i>I.epimethea</i>) dans leur habitat naturel. ...	154
Figure n°74 : Photographie de l'équipement ICP – AES utilisé.....	155
Figure n°75 : Concentration minérale des échantillons de chenilles.	156

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau n°1 : Evolution des indicateurs de nutrition en RCA (ICASEES, 2007 & 2012).</i>	4
<i>Tableau n°2 : Tableau de référence pour la construction des matrices d'Hadamard.</i>	18
<i>Tableau n°3 : Facteurs du plan d'expériences et les 2 niveaux associés.</i>	21
<i>Tableau n°4 : Besoins énergétiques du jeune enfant allaité au sein (Adapté de FAO – OMS – UNU, 1986).</i>	22
<i>Tableau n°5 : Matrice des essais en variables codées générée par MODDE 5.0.</i>	22
<i>Tableau n°6 : Matrice des essais en variables naturelles générée par MODDE 5.0.</i>	24
<i>Tableau n°7 : Composition nutritionnelle des ingrédients (Adapté de CIQUAL, 2013 ; FAO, 2012).</i>	48
<i>Tableau n°8 : Valeur nutritionnelle de quelques espèces d'insectes comestibles (Oliveira, 1976 ; Wu leung et al, 1968 ; Dufour et Sanders, 2000 In MOTTE-FLORAC et al, 2003).</i>	50
<i>Tableau n°9 : Signification des paramètres mesurés lors d'un test TPA.</i>	60
<i>Tableau n°10 : Couleur et aspect des bouillies préparées.</i>	62
<i>Tableau n°11 : Valeurs des duretés et du collant enregistrées par NEXIGEN Plus.</i>	63
<i>Tableau n°12 : Coefficient des effets pour la dureté.</i>	64
<i>Tableau n°13 : Coefficient des effets pour le collant.</i>	66
<i>Tableau n°14 : Facteurs et niveaux correspondants pour une étude par surfaces de réponses.</i>	67
<i>Tableau n°15 : Valeurs des duretés et du collant enregistrées par NEXIGEN Plus.</i>	69
<i>Tableau n°16 : Comparaison de la dureté et du collant des bouillies expérimentales avec 2 recettes de bouillies commerciales.</i>	69
<i>Tableau n°17 : Catégories de nutriments et fonctions principales dans l'organisme (Adapté de LATHAM, 2001 & MURAT, 2009).</i>	72
<i>Tableau n°18 : Classification élémentaire des lipides (FRENOT et al, 2001).</i>	77
<i>Tableau n°19 : Localisation et rôles physiologiques des vitamines (Adapté de MURAT, 2009).</i>	83
<i>Tableau n°20 : Valeurs de la concentration en protéines des 12 expériences.</i>	87
<i>Tableau n°21 : Valeurs de la concentration en vitamine C des 12 essais.</i>	97
<i>Tableau n°22 : Coefficient des effets liés à la concentration en vitamine C.</i>	98
<i>Tableau n°23 : Combinaison de facteurs pour une réponse optimale en vitamine C.</i>	100
<i>Tableau n°24 : Facteurs et domaine de variation pour l'extraction des esters d'acides gras.</i>	104
<i>Tableau n°25 : Plan d'expériences et résultats d'extraction des esters d'acides gras.</i>	105
<i>Tableau n°26 : Données des standards.</i>	108
<i>Tableau n°27 : Valeurs numériques des effets principaux et d'interactions.</i>	110
<i>Tableau n°28 : Conditions opératoires optimales pour l'extraction des esters d'acides gras.</i>	112
<i>Tableau n°29 : Liste des acides gras identifiés par spectrométrie de masse.</i>	114
<i>Tableau n°30 : Plan d'Hadamard en variables codées sur la préparation des bouillies et effets des facteurs.</i>	115
<i>Tableau n°31 : Apport des acides gras pour 100g de bananes fraîches.</i>	116
<i>Tableau n°32 : Valeurs numériques des effets.</i>	118
<i>Tableau n°33 : Valeurs des facteurs jouant sur une réponse optimale à partir de la réponse en quantité de lipides.</i>	120
<i>Tableau n°34 : Valeurs nutritionnelles de deux aliments de complément.</i>	121
<i>Tableau n°35 : Formulation pour un enrichissement en protéines et vitamines d'une bouillie infantile.</i>	122
<i>Tableau n°36 : Extraits des tables de composition nutritionnelle des ingrédients inclus dans la formule optimisée (CIQUAL, 2013 ; RUMPOLD B.A et SCHLÜTER O.K., 2013).</i>	123
<i>Tableau n°37 : Apport en énergie métabolisable de la formule optimisée.</i>	124
<i>Tableau n°38 : Apport nutritionnel de la formule optimisée.</i>	124

<i>Tableau n°39 : Estimation des dépenses alimentaires chez le nourrisson et le jeune enfant en Centrafrique.</i>	127
<i>Tableau n°40 : Points isoélectriques de quelques protéines (VOËT, 2005)</i>	131
<i>Tableau n°41 : Valeurs des concentrations en protéines totales des échantillons</i>	133
<i>Tableau n°42 : Gel de séparation 10%</i>	136
<i>Tableau n°43 : Gel de concentration 4%</i>	136
<i>Tableau n°44 : Solutions complémentaires à la réalisation du SDS – PAGE.</i>	137
<i>Tableau n° 45 : Poids moléculaire des protéines identifiées par LC-MS dans les échantillons de chenilles à différents pH (surnageant et culot).</i>	148
<i>Tableau n°46 : Diamètre d'inhibition en fonction des différents hydrolysats testés</i>	153
<i>Tableau n°47 : Teneur en cendres totales (%) et composition minérale (mg/L) des échantillons de chenilles</i>	156

ANNEXES

1. Rapport GC - MS

131211A
Area Percent Report -- Sorted by Signal

Information from Data File:
File : C:\HPCHEM\1\DATA\MANDJEKA\131211A.D
Operator :
Acquired : 11 Dec 113 3:53 pm using AcqMethod CLEMMUR
Sample Name: chenille
Misc Info :
Vial Number: 1
CurrentMeth: C:\HPCHEM\1\METHODS\LAFON.M

Retention Time	Area	Area %	Ratio %	Type	Width
Total Ion Chromatogram					
2.531	209671	0.252	0.642	rVB	0.168
2.954	352680	0.425	1.080	rVB	0.253
15.800	181503	0.219	0.556	rVB	0.106
16.105	77877	0.094	0.239	rBV	0.273
16.716	199356	0.240	0.611	rVB	0.148
17.698	532358	0.641	1.630	rVB	0.255
17.909	6833538	8.226	20.929	rBV	0.212
18.300	677084	0.815	2.074	rBV	0.126
18.427	938316	1.130	2.874	rVV	0.213
18.661	425640	0.512	1.304	rVV	0.212
18.874	2563717	3.086	7.852	rVB	0.128
19.401	77995	0.094	0.239	rBV	0.147
19.558	9799344	11.797	30.012	rBV	0.125
19.649	32651097	39.307	100.000	rVV	0.187
19.828	6990192	8.415	21.409	rVB	0.126
20.069	16077131	19.354	49.239	rBV	0.756
20.721	341095	0.411	1.045	rVB	0.170
20.933	168011	0.202	0.515	rVB	0.147
21.388	773843	0.932	2.370	rVB	0.254
21.568	210239	0.253	0.644	rVB	0.298
22.416	687007	0.827	2.104	rVB	0.213
23.182	233288	0.281	0.714	rVB	0.211
24.123	244858	0.295	0.750	rBV	0.169
24.685	91638	0.110	0.281	rVB	0.144
24.969	247058	0.297	0.757	rBV	0.128
26.328	291704	0.351	0.893	rBV	0.189
30.715	230688	0.278	0.707	rVB	0.228
33.417	960587	1.156	2.942	rBV	0.231

Wed Dec 16 09:13:49 2015

140109A
Area Percent Report -- Sorted by Signal

Information from Data File:
 File : C:\HPCHEM\1\DATA\MANDJEKA\140109A.D
 Operator :
 Acquired : 9 Jan 114 3:02 pm using AcqMethod CLEMMUR
 Sample Name: ech28
 Misc Info :
 Vial Number: 1
 CurrentMeth: C:\HPCHEM\1\METHODS\LAFON.M

Retention Time	Area	Area %	Ratio %	Type	Width
Total Ion Chromatogram					
1.442	40391188	32.551	66.350	rBV	0.146
1.504	10003894	8.062	16.433	rVV	0.073
1.682	60875702	49.059	100.000	rVV	0.242
1.830	1921256	1.548	3.156	rVV	0.053
1.883	6797420	5.478	11.166	rVB	0.708
16.214	249331	0.201	0.410	rBV	0.127
16.256	147106	0.119	0.242	rVB	0.105
17.200	81270	0.065	0.134	rVB	0.127
17.936	384850	0.310	0.632	rVB	0.243
18.335	932794	0.752	1.532	rBV	0.158
18.925	239652	0.193	0.394	rBV	0.117
19.568	886249	0.714	1.456	rBV	0.094
19.621	1046243	0.843	1.719	rVV	0.201
19.875	129792	0.105	0.213	rVB	0.201

Wed Dec 16 09:29:44 2015

140107B
Area Percent Report -- Sorted by Signal

Information from Data File:
 File : C:\HPCHEM\1\DATA\MANDJEKA\140107B.D
 Operator :
 Acquired : 7 Jan 114 9:57 am using AcqMethod CLEMMUR
 Sample Name: ech19
 Misc Info :
 Vial Number: 1
 CurrentMeth: C:\HPCHEM\1\METHODS\LAFON.M

Retention Time	Area	Area %	Ratio %	Type	Width
Total Ion Chromatogram					
0.897	16448910	6.359	9.595	rBV	0.084
1.148	171437359	66.277	100.000	rVV	0.948
2.056	380613	0.147	0.222	rVB	0.568
7.175	168197	0.065	0.098	rBV	0.419
15.773	85950	0.033	0.050	rBV	0.315
16.866	110178	0.043	0.064	rVB	0.254
17.689	111142	0.043	0.065	rVB	0.168
17.879	9153938	3.539	5.340	rBV	0.422
18.291	7050755	2.726	4.113	rVV	0.297
18.566	189965	0.073	0.111	rVB	0.148
18.884	6849626	2.648	3.995	rBV	0.252
19.587	17933719	6.933	10.461	rBV	0.124
19.647	19248760	7.441	11.228	rVV	0.145
19.837	4844577	1.873	2.826	rVB	0.212
20.038	134391	0.052	0.078	rBV	0.106
20.155	436941	0.169	0.255	rBV	0.106
20.442	153444	0.059	0.090	rVB	0.191
21.057	111479	0.043	0.065	rBV	0.276
21.385	521233	0.202	0.304	rVB	0.191
21.586	944346	0.365	0.551	rVB	0.191
23.214	1739190	0.672	1.014	rVB	0.254
24.713	613543	0.237	0.358	rVB	0.275

Wed Dec 16 09:09:18 2015

2. Extrait Rapport déconvolution

[<<]

Data File: C:\Program Files (x86)\ProMassXcali\results\Mar_30_2016_115910.txt

Mode:

Scan:

Retention Time:



Summary Report

Base Peak Mass (Da)	Intensity	Spectral Quality
25448,2	2,50E+007	ok

[<<] [Top] [ESI Mass Spectrum] [Deconvolution] [View Data] [Log File]

Deconvolution Peak Report:

Mass (Da)	Intensity	Score	Delta Mass	%Relative	%Total
25448,2	2,50E+007	5,42	0,0	100,00	6,60
41399,9	1,41E+007	9,02	15951,7	56,40	3,72
71068,1	1,18E+007	7,26	45619,9	47,35	3,13
25985,9	1,18E+007	8,46	537,7	47,14	3,11
148625,4	1,14E+007	6,51	123177,2	45,60	3,01
12417,9	1,12E+007	7,56	-13030,3	44,57	2,94
70677,5	8,79E+006	6,94	45229,3	35,13	2,32
20144,5	8,62E+006	6,40	-5303,7	34,46	2,28
146638,1	8,34E+006	9,88	121189,9	33,34	2,20
11564,1	1,39E+006	4,53	-13884,1	5,54	0,37
13329,1	1,15E+006	3,14	-12119,1	4,59	0,30

ZNova 2,9,4 ©2001-2009 Novatia, LLC