

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



**Valorisation des matières protéiques de céréales locales:  
Sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) et  
mil perlé (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br)**

Par  
MOKRANE Hind

Thèse  
Présentée pour l'obtention du diplôme de  
Doctorat d'état en Génie de l'environnement

Soutenue le 14 Juillet 2010 devant le Jury composé par

	Nom	Prénom	Etablissement
<b>Président</b>	<b>Prof. MAMERI</b>	<b>Nabil</b>	<b>ENP</b>
<b>Rapporteur</b>	<b>Prof. NADJEMI</b>	<b>Boubekeur</b>	<b>ENS-Kouba</b>
	<b>Prof BELHANECHÉ-BENSEMRA</b>	<b>Naima</b>	<b>ENP</b>
<b>Examineurs</b>	<b>Prof. KAMELI</b>	<b>Abdelkrim</b>	<b>ENS-Kouba</b>
	<b>Prof. SELATNIA</b>	<b>Amar</b>	<b>ENP</b>
	<b>Prof. YOUSFI</b>	<b>Mohamed</b>	<b>U.A.T- Laghouat</b>
	<b>Prof. LOUNICI</b>	<b>Hakim</b>	<b>U. M.M Tizi Ouzou</b>

2009/2010

La moindre chose contient un peu d'inconnu.

Trouvons-le!

Guy De Maupassant,

"Pierre et Jean" Préface

## ملخص

يزرع عدد كبير من الحبوب مثل الدخن و الذرة الرفيعة في جنوب الجزائر. وهي حبوب تتميز بغناها بالبروتينات ( 10-17%) و بالأحماض الأمينية الأساسية (40-44%).

طبقت عدة طرائق لاستخلاص وتحليل مجاميع البروتينات (الألبومينات و الغلوبينات و البرولامينات و الغلوتينات). تم عزل وتنقية عدة بروتينات من مجاميع الألبومينات و البرولامينات للكشف عن بروتينات ذات فعالية حيوية مميزة ، و قد تبين أن البروتينات المعزولة من الألبومينات هي مثبطات قوية لحفز انزيمات الأندوكسيلاناز (XIP). للمرة الأولى، تم تنقية البروتين من نوع دالتا-كافيرين.

كما قمنا بتعيين القيمة الغذائية لبروتينات الحبوب المدروسة بقياس قابلية هضمها بإجراء تحلل مائي في وجود أنزيم البييسن. وتبين من النتائج أنه يوجد إختلاف كبير بين عينات الحبوب المدروسة في قيمة قابلية هضم بروتيناتها. وهذه النتيجة بالغة الأهمية لأنها تمكن من إختيار الحبوب الملائمة للتغذية. ولزيادة قابلية البروتينات للتحلل قمنا بإجراء دراسة حركة التحلل المائي الأنزيمي بإستعمال أنزيمات أخرى هي الألكلاز، الإسبيراز، البابين، التريسين والفلافورزيم، فتحصلنا على نواتج بيبتيدية تمكننا من تحليلها بطرائق الكروماتوغرافية العالية الجودة و الإليكتروفورازو تبين من التحليل إختلاف نسب التحلل عند استعمال الانزيمات المختلفة. و بذلك تبين النتائج إمكانية الحصول على بروتينات و مستخلصاتها ذات استعمالات في ميادين عديدة مثل: التغذية، الطب و عدة صناعات أخرى.

**الكلمات المفتاحية:** بروتين، الذرة الرفيعة، الدخن، الفعالية البيولوجية، مثبطة لأنزيمات الإندوكسيلاناز، قابلية الهضم، التحلل المائي الأنزيمي.

## RESUME

Au sud algérien de nombreux cultivars de sorgho et de mil perlé ont été échantillonnés, l'analyse du taux de protéines et de la teneur en acides aminés essentiels, a révélé des pourcentages appréciables allant respectivement de 10 à 17% et de 40 à 44% (pourcentage en matière sèches).

Plusieurs protéines ont été extraites et purifiées pour la première fois à partir des albumines et des prolamines de sorgho et de mil perlé. Ce sont, des protéines de type XIP (xylanase inhibiteur protéine) et  $\delta$ -kafirine. Les autres protéines ont été caractérisées en détail par HPLC et électrophorèse. Les protéines de sorgho et de mil perlé trouvent leur application dans la production d'excipient en pharmacie, d'emballage biodégradable et dans les applications alimentaires.

La mesure de la digestibilité *in vitro* des protéines de sorgho et de mil perlé en utilisant la pepsine a permis la sélection des génotypes les mieux appropriés pour une utilisation alimentaire. Plusieurs autres enzymes ont été testées: l'espérase et l'alcalase ont conduit à la production d'un hydrolysate à degré d'hydrolyse élevé, par contre la papaïne, la trypsine ainsi que la flavourzyme ont toutes générés un hydrolysate à faible degré d'hydrolyse. L'hydrolysate enzymatique a été caractérisé par HPLC d'exclusion stérique, ainsi que par électrophorèse.

**Mots clés :** Protéine, Sorgho, Mil perlé, Bioactivité, Protéine inhibitrices des endoxylanases, Digestibilité *in vitro*, Hydrolyse enzymatique

## ABSTRACT

In the Algerian Sahara several cultivars of sorghum and pearl millet were sampled. Protein contents ranged from 10 to 17% (percentage dry matter), with high levels of essential amino acids representing more than 40% for all cultivars. Several proteins were extracted and purified for the first time from sorghum and pearl millet albumins and prolamins. They are the XIP type proteins (xylanase inhibiting protein) and  $\delta$ -kafirin. The other proteins were characterized in detail by HPLC and electrophoresis. These proteins are used in the production of coatings in pharmacy, of biodegradable packing and in many other food and non-food applications.

The measure of the protein *in vitro* digestibility in sorghum and pearl millet using pepsin allowed the selection of the best genotypes for a food use.

Several other enzymes were tested: esperase and alcalase led to the production of a hydrolysate with high degree of hydrolysis, while papain, trypsin as well as flavourzyme generated all a hydrolysate with small degree of hydrolysis. The enzymatic hydrolysates were characterized by size exclusion HPLC and electrophoresis.

**Keywords:** Protein, Sorghum, Pearl millet, Bioactivity, Endoxylanase inhibitor proteins, *In vitro* digestibility, Hydrolysis enzymatic

## DEDICACES

À la mémoire de mon Père,

À ma Mère,

À Souad et mes frères, beau frère et belles sœurs,

À mes nièces et mes neveux,

À tous ceux qui m'ont soutenu.

HIND

# REMERCIEMENTS

Mes plus vifs remerciements sont adressés aux Professeurs Naima BELHANECHÉ-BENSEMRA et Boubekour NADJEMI qui m'ont témoigné de leur confiance en m'accueillant dans leurs laboratoires respectifs et au sein de leurs équipes. Au cours de ces années de thèse, leurs disponibilités sans faille, leurs suivis, leurs soucis de la valorisation des travaux accomplis, leurs calmes inébranlables devant les difficultés, ont beaucoup contribué à l'aboutissement de ce travail de thèse. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance.

Les Professeurs Jan Delcour, Christophe Courtin et le Dr Kurt Gebruers ont guidé mes travaux en Belgique au laboratoire " Food Chemistry and Biochemistry " à l'université catholique de Leuven en BELGIQUE. Je resterai toujours impressionnée par leur rigueur et leur sens de la critique. Je tiens à leur exprimer ma profonde gratitude.

J'adresse de vifs remerciements aux Professeurs Abdelkrim Kameli, Mohamed Yousfi, Amar Selatenia et Hakim Lounici qui ont accepté de consacrer un peu de leur temps, en cette période chargée de l'année pour examiner cette thèse, et qui ont tous manifesté leur intérêt pour mon travail.

Je suis très honoré que le Professeur Nabil Mameri ait accepté de présider le jury de ma thèse de doctorat. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance.

Mes premiers pas dans la recherche ont été initiés par le Professeur Belhocine Djamila, je dédis ce travail à sa mémoire, en coencadrant avec le Professeur Nabil Mameri mes travaux de magister, et par le Dr Haddoud Farah en encadrant mes travaux d'ingéniorat.

Je ne saurais oublier la contribution de plusieurs enseignants du département génie de l'environnement de l'école nationale polytechnique et tant d'autres enseignants que cette humble page de remerciements ne saurait contenir.

Pendant ces années de thèse, J'ai eu à côtoyer plusieurs chercheurs Algériens et de plusieurs nationalités: Nadia, Amina, Annissa, Farida, Nafila, Taoues, Amel, Hadjira, Ilham, Leila, Habiba, Mohamed, Chahira, Fatiha B., Fatiha M. et Fatiha A., Baya, Djamila, Fadéla, Mme Mami, Nadia Boulelouah, Wahida et Hedi, Muna et Djamel, Amal, Hana, Anja et Winfredo, Marwa, Yakout, Souhila et Sourrou. Je tiens à leur exprimer ma gratitude pour leur patience et leur écoute durant mes longs monologues sur la recherche quand la chance était de mon côté et mes longues heures de plaintes quand la motivation était absente. Leur amitié et leur soutien m'ont beaucoup apporté. J'ai aussi beaucoup apprécié leur sens de l'humour et leur convivialité.

**HIND**

# Table des matières

	<i>page</i>
Résumés.....	i
Dédicace.....	ii
Remerciements.....	iii
Liste des abréviations.....	x
Liste des figures.....	xii
Liste des tableaux.....	xv
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>5</b>
<b>Chapitre 1 SORGHO (<i>Sorghum bicolor</i> L. Moench) et MIL PERLE (<i>Pennisetum glaucum</i> (R.) Br).....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Le sorgho (<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench) .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Introduction.....	6
1.1.2 Description de la panicule de sorgho.....	7
1.1.3 Production du sorgho et applications.....	8
1.1.4 Structure du grain de sorgho.....	9
1.1.5 Composition du grain de sorgho.....	11
1.1.5.1 <i>Protéines</i> .....	11
1.1.5.1.1 <i>Prolamines et glutélines</i> .....	13
1.1.5.1.2 <i>Albumines et globulines</i> .....	14
1.1.5.2 <i>Glucides</i> .....	20
1.1.5.2.1 <i>Amidon</i> .....	20
1.1.5.2.2 <i>Polysaccharide non amidonien (NSP)</i> .....	21
1.1.5.3 <i>Constituants mineurs</i> .....	24
1.1.5.3.1 <i>Lipides</i> .....	24
1.1.5.3.2 <i>Vitamines et sels minéraux</i> .....	24
1.1.5.3.3 <i>Polyphénols</i> .....	25
1.1.6 Conclusion.....	25
<b>1.2 Le mil perlé (<i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. Br) .....</b>	<b>26</b>
1.2.1 Introduction.....	26

1.2.2	Description de la panicule de mil perlé.....	27
1.2.3	Production et applications du mil perlé.....	28
1.2.4	Structure du grain de mil perlé.....	29
1.2.5	Composition du grain de mil perlé .....	31
1.2.5.1	<i>Protéines</i> .....	31
1.2.5.1.1	<i>Prolamines et glutélines</i> .....	32
1.2.5.1.2	<i>Albumines et globulines</i> .....	33
1.2.5.2	<i>Glucides</i> .....	35
1.2.5.2.1	<i>Amidon</i> .....	35
1.2.5.2.2	<i>Polysaccharide non amidonien (NSP)</i> .....	36
1.2.5.3	<i>Constituants mineurs</i> .....	36
1.2.5.3.1	<i>Lipides</i> .....	36
1.2.5.3.2	<i>Vitamines et sels minéraux</i> .....	36
1.2.6	Conclusion.....	38
<b>Chapitre 2</b>	<b>GENERALITES SUR LES PROTEINES DE CEREALES....</b>	<b>39</b>
<b>2.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>39</b>
<b>2.2</b>	<b>Structures et classes des protéines.....</b>	<b>39</b>
2.2.1	Les acides aminés.....	39
2.2.2	Les protéines.....	40
2.2.2.1	<i>Structure des protéines</i> .....	41
2.2.2.2	<i>Différents types de protéines</i> .....	42
2.2.2.2.1	<i>Les protéines fibreuses (Scléroprotéines)</i> .....	42
2.2.2.2.2	<i>Les protéines globulaires</i> .....	43
<b>2.3</b>	<b>Les protéines de céréales .....</b>	<b>43</b>
<b>2.4</b>	<b>Techniques de séparation et d'analyse des protéines de céréales.....</b>	<b>45</b>
2.4.1	Techniques électrophorétiques .....	45
2.4.2	Techniques chromatographiques.....	46
2.4.2.1	<i>La chromatographie d'exclusion stérique (SE-HPLC)</i> .....	46
2.4.2.2	<i>La chromatographie en phase inverse (RP-HPLC)</i> .....	46
2.4.2.3	<i>La chromatographie d'affinité</i> .....	47
2.4.2.4	<i>Electrophorèse capillaire à haute performance et Electrophorèse capillaire à zone libre: Free Zone Capillary Electrophoresis (FZCE)</i> .....	47
<b>2.5</b>	<b>Qualité nutritionnelle des protéines.....</b>	<b>47</b>
2.5.1	Digestibilité <i>in vitro</i> des protéines.....	48
2.5.2	Score en acides aminés (AAS).....	48

2.5.3	Digestibilité corrigée des protéines (PDCAAS).....	48
<b>2.6</b>	<b>Hydrolyse enzymatique des protéines .....</b>	<b>49</b>
2.6.1	Rappels sur l'hydrolyse enzymatique.....	49
2.6.2	Degré d'hydrolyse.....	50
<b>2.7</b>	<b>Utilisations des protéines de céréales.....</b>	<b>52</b>
<b>2.8</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>55</b>
	<b>PARTIE EXPERIMENTALE</b>	<b>56</b>
<b>Chapitre 3</b>	<b>CARACTERISATION ET EXTRACTABILITE DES PROTEINES DE GRAINES DE SORGHO ET DE MIL PERLE.....</b>	<b>57</b>
<b>3.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2</b>	<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>58</b>
3.2.1	Echantillonnage et description des graines des échantillons de sorgho et de mil perlé.....	58
3.2.2	Analyse du taux de protéines et du taux d'humidité.....	60
3.2.3	Extraction séquentielle des protéines de sorgho et de mil perlé.....	60
3.2.4	Electrophorèse (SDS-PAGE).....	61
3.2.5	Chromatographie liquide à haute performance d'exclusion stérique (SE-HPLC).....	62
3.2.6	Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) .....	62
3.2.7	Détermination de la séquence N-terminale des kafirines .....	63
3.2.8	Traitement statistique des données.....	63
<b>3.3</b>	<b>Résultats et interprétations.....</b>	<b>63</b>
3.3.1	Résultats de l'analyse du taux de protéines et d'humidité.....	63
3.3.2	Profils de SDS-page .....	67
3.3.3	Profils de chromatographie liquide à haute performance d'exclusion stérique (SE-HPLC).....	69
3.3.4	Profils de chromatographie à haute performance en phase inverse (RP-HPLC) .....	73
3.3.5	Purification et caractérisation des prolamines de sorgho et première mise en évidence de l'expression de $\delta$ -kafirine.....	78
<b>3.4</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>80</b>
<b>Chapitre 4</b>	<b>QUALITE NUTRITIONNELLE DES PROTEINES DE GRAINES DE SORGHO ET DE MIL PERLE</b>	<b>82</b>
<b>4.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>82</b>
<b>4.2</b>	<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>83</b>
4.2.1	Matériels.....	83
4.2.2	Analyse du taux de protéines et du taux d'humidité.....	84
4.2.3	Analyse du taux d'acides aminés.....	84

4.2.4	Digestibilité <i>in vitro</i> des protéines.....	85
4.2.5	Score en acides aminés (AAS) et digestibilité corrigée des protéines (PDCAAS).....	85
4.2.6	Traitement statistique des données.....	85
<b>4.3</b>	<b>Résultats et interprétations.....</b>	<b>86</b>
4.3.1	Résultats de l'analyse du taux d'acides aminés.....	86
4.3.2	Digestibilité <i>in vitro</i> des protéines.....	90
4.3.2.1	<i>Cas du sorgho</i> .....	90
4.3.2.2	<i>Cas du mil perlé</i> .....	91
4.3.3	Evaluation de la qualité des protéines de sorgho et de mil perlé.....	92
4.3.3.1	<i>Cas du sorgho</i> .....	92
4.3.3.2	<i>Cas du mil perlé</i> .....	93
<b>4.4</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>95</b>
<b>Chapitre 5</b>	<b>HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES PROLAMINES DE GRAINES DE SORGHO ET DE MIL PERLE</b>	<b>97</b>
<b>5.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>97</b>
<b>5.2</b>	<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>98</b>
5.2.1	Matériels.....	98
5.2.2	Extraction de la kafirine du sorgho et de la pennisetine du mil perlé.....	98
5.2.3	Hydrolyse enzymatique de la kafirine de sorgho et de la pennisetine de mil perlé.....	98
5.2.4	Caractérisation des hydrolysats enzymatiques de kafirine et de pennisetine.....	99
5.2.4.1	<i>Détermination du degré d'hydrolyse</i> .....	99
5.2.4.2	<i>chromatographie à haute performance d'exclusion stérique (SE-HPLC)</i> .....	99
5.2.4.3	Electrophorèse (SDS-PAGE).....	100
<b>5.3</b>	<b>Résultats et interprétations.....</b>	<b>100</b>
5.3.1	Taux d'acides aminés et de protéines dans la kafirine et la pennisetine.....	100
5.3.2	Evolution du degré d'hydrolyse.....	101
5.3.3	Profils de chromatographie à haute performance d'exclusion stérique (SE-HPLC).....	103
5.3.4	Profils de SDS-PAGE.....	108
<b>5.4</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>110</b>
<b>Chapitre 6</b>	<b>ISOLATION, PURIFICATION ET CARACTERISATION DE PROTEINES INHIBITRICES DES ENDOXYLANASES</b>	<b>111</b>
<b>6.1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>111</b>
<b>6.2</b>	<b>Matériels et méthodes.....</b>	<b>112</b>

6.2.1	Matériels.....	112
6.2.2	Préparation de la matrice de la colonne d'affinité .....	113
6.2.3	Isolation et purification des protéines inhibitrices d'endoxy lanase	113
6.2.4	Mesure du taux d'inhibition des endoxy lanases par les extraits de sorgho et de mil perlé .....	115
6.2.5	Electrophorèse.....	117
6.2.6	Détermination de la concentration en protéines.....	117
6.2.7	Western Blot .....	117
6.2.8	Détermination de la séquence N-terminale des protéines purifiées	118
6.2.9	DNA et analyse des séquences de protéines.....	118
6.2.10	Traitement statistique des données.....	118
<b>6.3</b>	<b>Résultats et interprétations.....</b>	<b>119</b>
6.3.1	Investigation sur la présence et la variabilité des inhibiteurs d'endoxy lanase (TAXI, XIP et TLXI) dans différents cultivars algériens de sorgho et de mil perlé.....	119
6.3.1.1	<i>Effet du traitement thermique sur la stabilité de l'inhibiteur d'endoxy lanase</i>	122
6.3.1.2	<i>Inhibition de différentes endoxy lanases par les extraits de sorgho et de mil perlé</i>	123
6.3.2	Détection des inhibiteurs d'endoxy lanase par Western blot.....	124
6.3.3	Purification des inhibiteurs d'endoxy lanases.....	126
6.3.4	Détermination des séquences.....	129
6.3.4.1	<i>Cas du sorgho.....</i>	129
6.3.4.2	<i>Cas du mil perlé.....</i>	135
6.3.5	Influence du pH et de la température sur l'inhibition des endoxy lanases par les XIP pures de sorgho et de mil.....	137
<b>6.4</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>140</b>
	<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>142</b>
	<b>REFERENCES.....</b>	<b>145</b>

## Liste des abréviations

<i>HPLC</i>	(High performance liquid chromatography) Chromatographie liquide à haute performance
<i>SE-HPLC</i>	Size exclusion high performance liquid chromatography (Chromatographie liquide à haute performance d'exclusion stérique)
<i>RP-HPLC</i>	Reversed phase high performance liquid chromatography (Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse)
<i>SDS-PAGE</i>	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Dodécylsulfate de sodium - Polyacrylamide gel électrophorèse)
<i>ADN</i>	Acide DéoxyriboNucléique
<i>MM</i>	Masse moléculaire
<i>TAXI</i>	<i>Triticum aestivum</i> inhibiteur de xylanase
<i>XIP</i>	Protéines inhibitrices de xylanase
<i>TLXI</i>	Thaumatococcus-like inhibiteur de xylanase
<i>pI</i>	Point isoélectrique
<i>GH</i>	Glucohydrolase
<i>FAO</i>	Food Agricultural organisation
<i>AAS</i>	Amino Acid Score (Score en acides aminés)
<i>WHO</i>	World Health Organisation
<i>PDCAAS</i>	Protéin corrected amino acid score (Digestibilité corrigée des protéines)
<i>AA</i>	Acides aminés
<i>UNU</i>	Union des nations unies
<i>D.H</i>	Degré d'hydrolyse
$V_B$	Volume de base
$N_B$	Normalité de la base
$\alpha$	Degré de dissociation
$M_p$	Masse de protéine
$h_{tot}$	Nombre de liaisons peptidiques dans le substrat protéique

$pK_b$	Constante de dissociation de la base
<i>AOAC</i>	Association of official analytical chemists (Organisation américaine d'analyse chimique)
<i>AACC</i>	American association of cereal chemists (Association américaine de chimie de céréale)
<i>IPAD</i>	Integrated pulsed amperometric detection (Détection ampérométrique pulsée intégrée)
<i>A</i>	Albumine
<i>G</i>	Globuline
<i>PNR</i>	Prolamine non réduite
<i>PR1</i>	Prolamine réduite
<i>PR2</i>	protéines réduites hautement polymérisées
<i>SDS</i>	Sodium dodecyl sulfate (Dodécylsulfate de sodium)
<i>DTT</i>	Dithiothreitol
<i>PNR+PR1</i>	PNR et PR1 combinées
<i>ACN</i>	acétonitrile
<i>TFA</i>	Acide trifluoroacétique
<i>PVPP</i>	Poly vinyl poly pyrrolidone
<i>CCE</i>	Chromatographie d'échange cationique
<i>AFF C</i>	Chromatographie d'affinité
<i>RT</i>	Run throught (Protéines non fixées).
<i>AX</i>	Arabinoxylane
<i>BSA</i>	Bovine sérum albumine
<i>XIU</i>	Unité d'inhibiteur de xylanase
$[I]/[E]_{50}$	Concentration d'inhibiteur requise pour inhiber 50 % de la concentration en xylanase
<i>PAbs</i>	Anticorps poly-clonaux
<i>Anti-TAXI</i>	Anticorps poly-clonaux <i>TAXI</i>
<i>Anti-XIP</i>	Anticorps poly-clonaux <i>XIP</i>
<i>Anti-TLXI</i>	Anticorps poly-clonaux <i>TLXI</i>
<i>PVDF</i>	Polyfluorure de vinylidène
<i>SAS</i>	Système d'analyses statistiques
<i>P</i>	Polymères
<i>T</i>	Trimères

<i>D</i>	Dimères
<i>BLAST</i>	Basic local alignment search tool
<i>BLASTp</i>	Protein-protein BLAST
<i>tBLASTn</i>	Protein query vs. translated database
<i>Abs 214nm</i>	Absorbance à 214 nm

## Liste des figures

<i>Figure</i>	<i>Titre</i>	<i>page</i>
<b>Figure 1.1</b>	Panicules de sorgho ( <i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench).....	7
<b>Figure 1.2</b>	Coupe longitudinale et des couches externes d'un grain de sorgho.....	10
<b>Figure 1.3</b>	(1) Structure moléculaire de l'inhibiteur d'endoxy lanase de type TAXI. (2) Représentation schématique de la forme non-traitée (forme A) et la forme traitée (forme B) d'inhibiteurs d'endoxy lanase de TAXI-type .....	17
<b>Figure 1.4</b>	Structure moléculaire de l'inhibiteur d'endoxy lanase de type de XIP....	18
<b>Figure 1.5</b>	Structure moléculaire de l'inhibiteur d'endoxy lanase de type TLXI.....	19
<b>Figure 1.6</b>	Eléments structuraux présents dans les arabinoxy lanes .....	22
<b>Figure 1.7</b>	Vue d'ensemble de l'hydrolyse enzymatique de l'AX par des enzymes dégradantes de l'AX.....	23
<b>Figure 1.8</b>	Panicules de mil perlé ( <i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. Br).....	28
<b>Figure 1.9</b>	Coupe longitudinale et des couches externes d'un grain de mil perlé...	30
<b>Figure 2.1</b>	Formation d'une liaison peptidique.....	40
<b>Figure 3.1</b>	Carte de l'Algérie avec indications des sites d'échantillonnage de sorgho et de mil perlé (Flèches rouges).....	58
<b>Figure 3.2</b>	Variabilité de la composition en protéines dans les différentes fractions de protéine extraites du sorgho.....	65
<b>Figure 3.3</b>	Variabilité de la composition en protéines dans les différentes fractions de protéine extraites du mil perlé.....	66
<b>Figure 3.4</b>	SDS-PAGE pour le cultivar (AS1) de sorgho et le cultivar de mil perlé (PM3).....	68
<b>Figure 3.5</b>	Profils de chromatogramme d'exclusion stérique (SE-HPLC) pour les cultivars de sorgho.....	71
<b>Figure 3.6</b>	Profils de chromatogramme d'exclusion stérique (SE-HPLC) pour les cultivars de mil perlé.....	72
<b>Figure 3.7</b>	Profils de chromatogrammes en phase inverse (RP-HPLC) des fractions de protéines pour les cultivars de sorgho.....	74
<b>Figure 3.8</b>	Profils de chromatogrammes en phase inverse (RP-HPLC) des fractions de protéines pour les cultivars de mil perlé.....	76
<b>Figure 3.9</b>	SDS-PAGE des prolamins de sorgho (AS1)	79

<b>Figure 3.10</b>	Membrane de PVDF des kafirines transférés avec indication de $\alpha$ 1-, $\alpha$ 2-, $\beta$ -, $\gamma$ - et $\delta$ -kafirins.....	80
<b>Figure 4.1</b>	Variabilité dans la digestibilité <i>in vitro</i> de sept cultivars de sorgho.....	90
<b>Figure 4.2</b>	Variabilité dans la digestibilité <i>in vitro</i> de huit cultivars de mil perlé.,	91
<b>Figure 5.1</b>	Evolution du degré d'hydrolyse au cours de l'hydrolyse enzymatique de la kafirine de sorgho par plusieurs enzymes.....	102
<b>Figure 5.2</b>	Evolution du degré d'hydrolyse au cours de l'hydrolyse enzymatique de la pennisetine de mil perlé par plusieurs enzymes.....	103
<b>Figure 5.3</b>	Profil de chromatographie d'exclusion stérique (SE-HPLC) de la kafirine de sorgho et de ses hydrolysats enzymatiques (Cultivar AS1).....	104
<b>Figure 5.4</b>	Profil de chromatographie d'exclusion stérique (SE-HPLC) de la pennicetine de mil perlé et de ses hydrolysats enzymatiques (Cultivar PM3) .....	105
<b>Figure 5.5</b>	SDS-PAGE de la kafirine de sorgho et de ses hydrolysats.....	109
<b>Figure 5.6</b>	SDS-PAGE de la pennisetine de mil perlé et de ses hydrolysats.....	110
<b>Figure 6.1</b>	Représentation schématique du procédé de purification des XIP de sorgho et de mil perlé.....	115
<b>Figure 6.2</b>	Taux d'inhibition de type XIP des endoxylanases par les extraits des cultivars algériens de sorgho et de mil perlé exprimés en unités de xylanase par gramme de farine (XIU/g).....	121
<b>Figure 6.3</b>	Effet du traitement thermique de l'extrait brut de sorgho (AS1) et de mil perlé (PM3) sur le taux d'inhibition des endoxylanases (XIU). L'extrait brut est chauffé pendant une heure.....	122
<b>Figure 6.4</b>	Taux d'inhibition (XIU/g) de différentes endoxylanases par l'extrait du cultivar PM3 de mil perlé.....	123
<b>Figure 6.5</b>	Taux d'inhibition (XIU/g) de différentes endoxylanases par l'extrait du cultivar AS1 du sorgho. ....	124
<b>Figure 6.6</b>	Analyse au Western blot des extraits bruts de sorgho et de mil perlé....	126
<b>Figure 6.7</b>	Profils de SDS-PAGE des fractions purifiées de protéines de sorgho et de mil perlé. ....	127
<b>Figure 6.8</b>	Gel de détermination du point isoélectrique des fractions AFF C de sorgho et de mil perlé purifiées. ....	128
<b>Figure 6.9</b>	Nucléotide et séquences d'acides aminés de la valine variante de XIP de sorgho. ....	132
<b>Figure 6.10</b>	Arbre phylogénétique donnant les rapports entre les différentes séquences XIP. ....	133
<b>Figure 6.11</b>	Alignement des séquences d'acides aminés de XIP de <i>S. bicolor</i> avec les séquences de XIP des autres céréales. ....	135
<b>Figure 6.12</b>	Influence de la température et du pH sur l'activité de l'endoxylanase de <i>P. purpurogenum</i> et sur les taux relatifs d'inhibition de XIP de sorgho.....	139
<b>Figure 6.13</b>	Influence de la température et du pH sur les taux relatifs d'inhibition de deux endoxylanases par XIP pure de mil perlé .....	140

## Liste des tableaux

<i>Tableau</i>	<i>Titre</i>	<i>page</i>
<b>Tableau 1.1</b>	Composition en protéine [% en matières sèche], distribution relative des fractions protéiques (%) et composition en acides aminés essentiels du sorgho (% de protéines).....	12
<b>Tableau 1.2</b>	Comparaison des propriétés des cinq formes de kafirines.....	13
<b>Tableau 1.3</b>	Composition en glucides du grain de sorgho (%) .....	21
<b>Tableau 1.4</b>	Constituants mineurs du grain de sorgho [% en matières sèches] .....	25
<b>Tableau 1.5</b>	Composition en protéine et en acides aminées [% en matière sèche] du mil perlé .....	32
<b>Tableau 1.6</b>	Composition en glucides dans le mil perlé (% en matière sèche).....	36
<b>Tableau 1.7</b>	Constituants mineurs des grains de mil perlé dans 100 g de farine de graines .....	37
<b>Tableau 2.1</b>	Pourcentages de prolamines dans plusieurs céréales par rapport aux protéines totales .....	44
<b>Tableau 2.2</b>	Exemples de peptidases utilisées pour l'hydrolyse enzymatique des protéines alimentaires.....	51
<b>Tableau 2.3</b>	Activités bio-fonctionnelles des hydrolysats de protéines de céréales.....	54
<b>Tableau 3.1</b>	Description des graines des cultivars de mil perlé et de sorgho échantillonnés .....	60
<b>Tableau 3.2</b>	Pourcentages de protéines et d'humidités dans les grains des différents cultivars de sorgho et de mil perlé (% matières sèches).....	64
<b>Tableau 3.3</b>	Pourcentages de $\gamma$ -kafirine et de $\alpha$ + $\beta$ -kafirine par rapport à la fraction totale de prolamine extraite (PNR+ PR1 +PR2) calculés des aires de RP-HPLC pour les cultivars Algérien de sorgho.....	75
<b>Tableau 3.4</b>	Pourcentages de A-pennisetine et de C-pennisetine par rapport à la fraction totale de prolamine extraite calculés des aires de RP-HPLC pour les cultivars Algérien de mil perlé.....	77
<b>Tableau 4.1</b>	Composition en acides aminés dans sept cultivars de sorgho exprimée en g d'acides aminés dans 100g d'extrait de protéines (%).....	87
<b>Tableau 4.2</b>	Composition en acides aminés dans onze cultivars de mil perlé exprimée en g d'acides aminés dans 100g d'extrait de protéines (%).....	88
<b>Tableau 4.3</b>	Pourcentage en acides aminés de caractères différents dans le sorgho (mg d'acide aminé/g de protéine).....	89
<b>Tableau 4.4</b>	Pourcentage en acides aminés de caractères différents dans le mil perlé (mg d'acide aminé/g de protéine).....	89

<b>Tableau 4.5</b>	Score en acides aminés (AAS) de sept cultivars algérien de sorgho.....	92
<b>Tableau 4.6</b>	Digestibilité corrigée (PDCAAS) de sept cultivars algérien de sorgho.....	93
<b>Tableau 4.7</b>	Score en acides aminés (AAS) de onze cultivars algérien de mil perlé.....	94
<b>Tableau 4.8</b>	Digestibilité corrigée (PDCAAS) de huit cultivars algérien de mil perlé...	94
<b>Tableau 5.1</b>	Composition en protéines et en acides aminés dans la kafirine extraite de sorgho (AS1) et de la pennisetine (PM3).de mil perlé les pourcentages sont calculés sur la base de la matière sèche.....	101
<b>Tableau 6.1</b>	Rendement de purification des XIPs de sorgho et de mil perlé ainsi que les taux spécifiques d'inhibition.....	129
<b>Tableau 6.2</b>	Les séquences ESTs de sorgho utilisées pour déduire la séquence complète du nucléotide et d'acides aminés de XIP du sorgho.....	131
<b>Tableau 6.3</b>	Séquence N-terminale d'acides aminés de XIP de mil perlé ( <i>Pennisetum glaucum</i> (R.) Br) alignée avec les séquences N-terminales de XIPs purifiées ou déduites d'autres céréales .....	136
<b>Tableau 6.4</b>	Valeurs de $[I]/[E]_{50}$ pour l'inhibition de différentes endoxylanases de la famille des GH 10 and 11 par XIP de mil et de sorgho comparée avec celles rapportées de XIP-I de blé.....	138

# Introduction

Dans les régions arides, semi arides et tropicales, le **sorgho** (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) et le **mil perlé** (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br) représentent les principales sources énergétiques et protéiques. Ces deux plantes résistent très bien à la sécheresse et à la salinité des eaux et ne nécessitent pas un sol de très bonne qualité [1]. Dans, **le sud de l'Algérie** une grande **diversité** de cultivars de sorgho et de mil perlé est cultivée dans des sols peu fertiles, sans apport externe d'engrais, sous des climats très arides avec une moyenne mensuelle de température atteignant 45 °C.

Ces deux céréales font partie de la famille des *Poacea* qui inclut le maïs. Dans la production mondiale, ils sont respectivement classés les cinquième et sixième parmi la plupart des céréales, précédés seulement par le blé, le riz, le maïs et l'orge dans cet ordre. Ils diffèrent de beaucoup d'autres céréales dans leur capacité à survivre aux conditions arides. De plus, ils sont parfaitement appropriés aux personnes souffrant d'allergie au gluten (les cœliaques) [2-4]. Le sorgho vient de l'italien sorgo ou surgo qui signifie "je pousse". Le mil est un terme générique qui désigne plusieurs plantes dont les grains servent dans l'alimentation humaine et animale. Le plus souvent, le terme réfère toutefois à une variété particulière, le mil perlé (*Pennisetum glaucum*). C'est la variété la plus répandue à travers le monde. Sur les 30 millions de tonnes de mil perlé produites dans le monde, 90 pour cent environ sont utilisés dans les pays en développement, et seul un volume minime est consommé dans les pays développés, mis à part l'ex-URSS [3, 5].

Le sorgho et le mil perlé sont actuellement sous-utilisés et leurs protéines sont mal connues comparées à celles des céréales utilisées en Europe et en Amérique du nord. Le besoin

croissant d'approvisionnements **alimentaires** en Afrique exige une réévaluation de ces grains pour une exploitation améliorée comme sources d'énergie et de protéines pour le continent. Le sorgho et le mil perlé comme le blé possèdent aussi d'autres applications industrielles **non alimentaires** telles que la production de bioéthanol à partir de la fraction glucidique ou comme substituant énergétique au pétrole, et la production de bioplastiques à partir des films protéiques [6]. Les protéines végétales: albumine, globuline, prolamine et glutéline, offrent une grande variété de propriétés fonctionnelles et de nombreuses modifications chimiques et enzymatiques possibles. Ces modifications permettent d'obtenir des hydrolysats caractérisés par une meilleure solubilité, des propriétés tensioactives, gélifiantes, filmogènes et viscoélastiques améliorées. Les **protéines de céréales** sont aussi utilisées en tant qu'agent d'encapsulation de médicaments, comme tensioactifs biodégradables ou améliorants des propriétés mécaniques.

Les protéines végétales en générale et de céréales en particulier possèdent des activités biologiques intéressantes développées de façon naturelle telles que les **activités antifongiques** et antimicrobiennes. La présence de ces protéines naturelles à activité intéressante est souvent le résultat d'une auto-défense physiologique de la plante aux attaques fongiques [2]. Dans le but de la **préservation de l'environnement**, l'utilisation de ces protéines naturelles, saines et biodégradables, serait souhaitable et indispensable.

Sur **une distance de 2000 km** allant d'est en ouest, un large travail de prospection et d'échantillonnage a été effectué dans certaines régions du **sud de l'Algérie** (Touggourt, Béchar, Tamanrasset, Ain Salah et Adrar). Nous avons sélectionné une vingtaine d'échantillons de différents cultivars de sorgho et de mil perlé, caractérisées par une diversité considérable de couleurs, de formes, de dimensions et de certains éléments anatomiques.

L'Algérie à travers ses programmes nationaux de recherche a retracé une stratégie de **valorisation des ressources génétiques locales** pour développer leurs productions et les potentialités de leur valorisation.

C'est en se basant sur tous ces critères que nous avons choisis de **valoriser la fraction protéique** de plusieurs échantillons de sorgho et de mil perlé locaux et commerciaux.

Les recherches sur la fraction protéique du sorgho sont relativement **très rares** comparées à celles des autres céréales telles que le blé, le riz et le maïs [4]. Bien que le sorgho et le mil

perlé soient cultivés dans les régions frontalières du sud de l'Algérie (Mali, Niger), peu d'études ont été effectuées sur les cultivars Algériens de sorgho et de mil perlé [4, 6].

**Notre travail** s'inscrit dans **la continuité** de la recherche du laboratoire des produits bioactifs et de la valorisation de la biomasse à L'Ecole Normale Supérieure de Kouba qui était au début axée sur la fraction glucidique de ces graines, les difficultés engendrées par la fraction protéique durant les procédés de valorisation des amidons de sorgho et de mil perlé ont incité notre laboratoire à s'intéresser à cette fraction certes présente **en plus faibles concentrations** mais offrant des potentialités d'applications très variées.

**Le but** de la présente étude, est de fournir une base de recherche pouvant mener à une réévaluation de cette céréale sous-utilisée et plus particulièrement sa fraction protéique. **L'approche** adoptée est **la valorisation** des fractions **de protéines** des graines de sorgho et de mil perlé, par la maîtrise des méthodes **d'extractions**, de **purification**, de **caractérisation** et de modification enzymatiques. De nouvelles connaissances dans les domaines de recherches suivants ont été acquises: L'analyse des matières protéiques des graines des deux céréales par **méthodes chromatographiques** et **électrophorétiques**; l'évaluation de la **valeur nutritive** de ces protéines; **l'hydrolyse enzymatique** de la fraction protéique la **plus hydrophobe** dans le but d'améliorer ses propriétés fonctionnelles (solubilité) et bio-fonctionnelles (purification de peptides bioactifs) et enfin la **purification** et **l'isolement** de protéines à propriétés intéressantes (antifongiques).

Cette **thèse** se divise en deux grandes parties **bibliographique** et **expérimentale**.

La **partie bibliographique** de cette thèse se subdivise en deux chapitres.

Le **chapitre 1** présente une description du sorgho et du mil perlé. La production mondiale et les différentes applications y sont décrites. La composition et la structure des graines de sorgho et de mil perlé sont données, avec plus de détails pour la fraction protéique.

Le **chapitre 2** présente des rappels relatifs aux protéines, aux enzymes protéolytiques et à l'hydrolyse enzymatique des protéines de céréales ainsi qu'à la mesure de leur qualité nutritionnelle.

Les considérations développées dans les chapitres précédents sont appliquées dans la **partie expérimentale**. Celle-ci est subdivisée en **quatre chapitres** comme suit:

Le **chapitre 3** décrit les méthodes **d'extraction, de caractérisation et de purification** des différentes fractions protéiques de sorgho et de mil perlé : albumines, globulines, prolamines et glutélines. Les prolamines, la fraction majoritaire des protéines de sorgho et de mil perlé, sont décrites en détail. La forme  **$\delta$ -kafirine** est pour la première fois purifiée et sa séquence N-terminale déterminée.

Dans le **chapitre 4**, la **valeur nutritive** des protéines de sorgho et de mil perlé a été évaluée, d'une part, par l'analyse des taux d'acides aminés essentiels et non essentiels et d'autre part, par la **simulation *in vitro*** de la digestibilité des protéines de sorgho et de mil perlé dans la farine. Des enzymes digestives telles que la pepsine ont été utilisées.

Le **chapitre 5** décrit l'**hydrolyse enzymatique des prolamines** de sorgho et de mil perlé pour produire un concentré peptidique à haute valeur ajoutée, dans le but d'améliorer les propriétés fonctionnelles et bio-fonctionnelles de ces protéines. Plusieurs enzymes ont été testées, l'espérase et l'alcalase ont conduit à la production d'un hydrolysate à degré d'hydrolyse élevé, par contre la papaine, la trypsine ainsi que la flavourzyme ont toutes généré un hydrolysate à faible degré d'hydrolyse. L'hydrolysate enzymatique a été caractérisé par HPLC d'exclusion stérique et par électrophorèse.

Dans le **chapitre 6**, la première mise en évidence **de protéines inhibitrices** des endoxylanases est décrite en détail. Ce type de protéines est produit par la plante (les céréales) pour lutter contre les endoxylanases principale acteur des attaques fongiques. L'isolement et la caractérisation de ces protéines est effectuée par l'utilisation de plusieurs techniques de purifications à partir des fractions **albumines** et **globulines**.

## **PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE**

# Chapitre Un

## Sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) et mil perlé (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br)

### 1.1 LE SORGHO (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)

#### 1.1.1 Introduction

*Sorghum bicolor* (L.) Moench (désigné sous le nom de sorgho), est une céréale appartenant à la famille des *Poacea* trouvant son origine en Afrique il y a 3000 à 5000 ans. Le sorgho est classé cinquième parmi les céréales produites dans le monde entier [4, 8-10]. Cette céréale est cultivée sur 44 millions d'hectares dans 98 pays avec une récolte mondiale de 60 millions de tonnes, dont 20 millions de tonnes sont produites en Afrique. Ceci classe le sorgho en termes d'importance et de production en deuxième position en Afrique après le maïs [4]. En Amérique du nord et plus particulièrement aux Etats-Unis, le sorgho figure parmi les récoltes les plus importantes, il se classe troisième dans la production globale des céréales. Selon des études statistiques récentes [10], les Etats-Unis se placent à la tête des producteurs et des exportateurs de sorgho dans le monde directement suivi par l'Inde et le Nigeria. Le sorgho est nutritionnellement équivalent à la plupart des céréales [1, 10, 11] et constitue un aliment de base pour des millions d'Africains, d'Asiatiques, et de Latino-Américains.

Ce chapitre présente un bref aperçu sur la production et la plupart des applications du sorgho. La structure des grains de sorgho et leur composition générale sont présentées avec une attention plus accrue sur sa fraction protéique.

### 1.1.2 Description de la panicule de sorgho

Le sorgho est une plante vigoureuse dont la hauteur peut varier de 0,5 à 6 m. Elle présente des racines profondes et ramifiées. Les feuilles sont longues (0,3-1,4 m) et larges (1-13 cm) avec des bords plats ou onduleux [5]. La fleur est une panicule (Figure 1.1), habituellement droite, mais recourbée parfois pour former un cou d'oie. L'adaptation élevée du sorgho aux conditions environnementales dures et sa tolérance à la sécheresse font qu'il constitue une céréale appropriée pour les régions semi-arides et arides. Ses racines massives et profondément pénétrantes sont principalement responsables de cette tolérance à la sécheresse, mais la plante présente aussi d'autres mécanismes de résistance à la sécheresse. La plante de sorgho présente la particularité de pouvoir conserver l'humidité en réduisant sa transpiration une fois soumise à un stress hydrique (par le roulement de ses feuilles et probablement en fermant ses interstices pour réduire l'évaporation). Le sorgho peut en outre entrer en phase de dormance, diminuer ses processus métaboliques jusqu'au retour des pluies [5].



**Figure 1.1** Panicules de sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)

### 1.1.3 Production du sorgho et applications

Plus de 55 % de la production mondiale du sorgho est utilisée en alimentation, le grain de sorgho constitue un aliment principal pour plus de 500 millions de personnes dans plus de 30 pays. Il est souvent consommé sous forme de pains ou de plats préparés à base de farine de

sorgho. Le sorgho est une source importante en produits tels que les composés phénoliques antioxydants et les cires ayant le pouvoir d'abaisser le taux de cholestérol [12, 13, 14]. Le sorgho possède la particularité de ne pas contenir de gluten, ce qui le rend approprié aux cœliaques.

Particulièrement en Amérique, le grain de sorgho est une céréale fourragère importante (33%), alors qu'en Asie le sorgho est une source importante d'alimentation du bétail durant les saisons sèches.

Dans les secteurs non alimentaires, le sorgho trouve son application dans plusieurs domaines tels que: la production de bioéthanol, de papier, de film biodégradable [15]. En effet, la demande énergétique ne fait qu'accroître et les sources fossiles telles que le pétrole et le gaz commencent à se faire rares, l'utilisation de ressources renouvelables et non polluantes telles que le bioéthanol pour l'usage direct comme carburant pourrait constituer une alternative sans équivoque [4]. Le sorgho étant riche en amidon, il constitue des ressources renouvelables viables pour la production de bioéthanol [4]. De plus, le sorgho peut constituer une source inestimable de biomasse renouvelable riche en amidon ou en cellulose particulièrement pour les industries de production des substituts de sous produits de pétrole. Le sorgho est en outre employé dans la production du papier et des matériaux de construction [14-16]. Il a été employé comme unité d'extension de contre-plaqué sous la forme d'adhésifs [17] et comme matériau d'emballage peu coûteux [18]. Le sorgho a été aussi converti en charbon actif [19]. Les protéines de sorgho ont été employées pour produire des films biodégradables [14, 20, 21] alors que l'endosperme de sorgho pourrait être source de protéines [22]. Ces applications démontrent que le sorgho offre des possibilités intéressantes comme ressource renouvelable valable pour les produits bio-industriels, particulièrement dans les régions arides où d'autres céréales ne sont pas facilement développées.

#### **1.1.4 Structure du grain de sorgho**

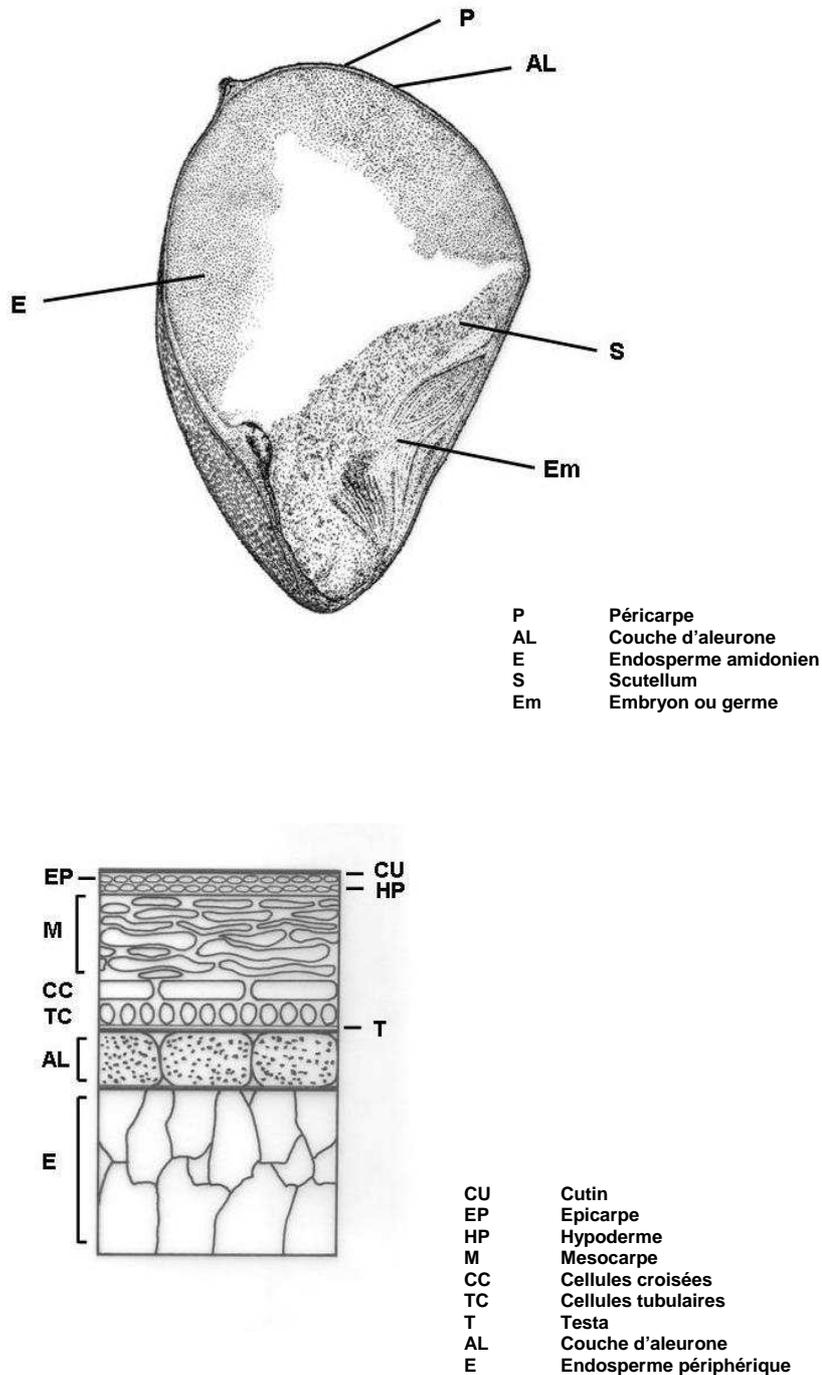
Les grains de sorgho ou caryopse se caractérisent par une diversité considérable de couleurs, de formes et de dimensions. Le grain de sorgho est habituellement couvert de glumes, les bractées florales dans la panicule qui tiennent les graines se développent après pollinisation. Le grain lui-même est arrondi et de diamètre variable (4 à 8 millimètres) (Figure 1.2). La couleur du caryopse est un trait important qui affecte la qualité du grain de sorgho [6, 23].

Le caryopse de sorgho se compose de trois principales parties: péricarpe, endosperme (tissu de stockage) et germe (embryon et scutellum), avec des proportions relatives de grain de 6, 84 et 10 %, respectivement [23].

Le péricarpe de sorgho adhère fortement à l'endosperme et est caractérisé par trois couches distinctes, épicarpe, mésocarpe, et endocarpe [25]. L'épicarpe est la couche la plus externe, et est généralement enduite de cire et contient les colorants. Le mésocarpe est la couche moyenne, qui contient souvent des granules d'amidon. La couche la plus interne du péricarpe est l'endocarpe, elle est composée de couches de cellules croisées (CC) et de cellules tubulaires (CT) comme représenté sur la figure 1.2. La fonction principale de ces couches est le transport de l'eau [25].

L'écorce du grain ou le testa se trouve entre le péricarpe et l'aleurone [23, 25, 26]. Dans certains génotypes de sorgho, le testa est fortement pigmenté. Dans d'autres génotypes il y a un testa partiel, alors que dans certains autres il n'est pas évident ou est complètement absent [25].

Le testa peut contenir les tannins qui affectent la qualité alimentaire du grain. Les tannins sont des polyphénols de grande masse moléculaire (composés phénoliques) trouvés dans les grains avec un péricarpe brun et un testa pigmenté. Certains tannins, connus sous le nom de tannins condensés, forment des complexes avec les protéines et réduisent ainsi leur digestibilité. Ils peuvent également former des complexes avec les protéases de l'appareil digestif, réduisant de fait la digestibilité des protéines de grain. En dépit de cet effet alimentaire négatif, des variétés riches en tannin continuent à être développées à cause de leur résistance naturelle aux oiseaux et aux insectes [27-32].



**Figure 1.2:** Coupe longitudinale et des couches externes d'un grain de sorgho [23].

L'endosperme de sorgho peut être vitreux ou farineux. L'endosperme externe est souvent désigné sous le nom "d'endosperme vitreux", et l'endosperme intérieur "d'endosperme farineux". La proportion des deux endospermes peut changer de cultivar en cultivar. Les proportions de l'endosperme vitreux et farineux déterminent la texture du grain. Dans les

grains de texture douce, il y a plus d'endosperme farineux que d'endosperme vitreux. Dans ceux de texture dure, il y a plus d'endosperme vitreux que d'endosperme farineux [33]. La dureté du grain est un attribut important de sa qualité et joue un rôle dans le traitement des grains de céréales et de leurs usages finaux tels que la confection de pains. La dureté du grain joue également un rôle dans la défense contre les attaques d'insectes [33]. L'axe embryonnaire et le scutellum sont les deux majeures parties du germe. Le scutellum est un tissu de stockage riche en lipides, protéines, enzymes et sels minéraux.

### **1.1.5 Composition du grain de sorgho**

La composition du grain de sorgho est semblable à la plupart des céréales: l'amidon est le composant principal suivi, des protéines, de l'eau, des lipides, et des fibres. Le sorgho contient généralement moins de lipides et plus de cires que les autres céréales [5,6]. Puisque le but principal de cette thèse est l'isolement, la purification et la caractérisation des protéines de mil et de sorgho, la composition en protéines du sorgho va être décrite en détail dans cette section.

#### ***1.1.5.1 Protéines***

La teneur en protéines du sorgho est variable. Dans la littérature, une gamme de niveaux de 7 à 16 % a été rapportée [7]. Cette variabilité élevée est due aux différences dans les conditions climatologiques et agronomiques pendant le développement de la plante de sorgho [4]. En ce qui concerne la nutrition humaine, la fraction protéique du sorgho n'est pas parfaitement équilibrée. Comme dans d'autres céréales, le sorgho est déficient en certains acides aminés, comme la lysine [5, 6]. Le sorgho "standard" fournit environ 45 % de la demande recommandée en lysine. En outre, les protéines de sorgho sont caractérisées par une digestibilité très faible. Souvent, la farine de sorgho est préalablement traitée pour améliorer sa digestibilité. C'est peut-être la raison pour laquelle, en Afrique, le sorgho est soumis à une fermentation avant d'être consommé [34].

Les protéines de sorgho peuvent être classées en plusieurs familles de protéines selon leurs solubilités: les albumines (extractibles dans l'eau), les globulines (extractibles en solution saline diluée), les prolamines (extractibles dans les solutions alcooliques), et les glutélines (extractibles dans les milieux alcalins ou acides) [35]. Le tableau 1.1 montre les niveaux relatifs des différentes classes de protéines et de la composition en acides aminés essentiels du sorgho.

La grande proportion des protéines de sorgho est celle soluble dans les solutions alcooliques "les prolamines" (60 %), les prolamines de sorgho appelées kafirines sont souvent présentes sous une forme fortement réticulée ou polymérisée que les humains ne peuvent pas facilement digérer. Cette polymérisation des prolamines est plus élevée dans le sorgho que dans d'autres céréales principales, elle abaisse considérablement leur valeur nutritive [36]. La digestibilité *in vitro* des protéines de sorgho change considérablement entre les différents cultivars. Une étude sur seulement 9 cultivars a déjà montré une gamme de digestibilité allant de 23 à 68 % [37].

**Tableau 1.1:** Composition en protéines [% en matières sèche], distribution relative des fractions protéiques (%) et composition en acides aminés essentiels du sorgho (% de protéines) [1, 5, 7,12, 38]

	<b>Sorgho</b>
<b>Protéine (%)</b>	<b>7-16</b>
Albumines	5
Globulines	10
Prolamines (Kafirines)	60
Glutélines	25
<b>Acides aminés essentiels</b>	
<b>(% de protéines)</b>	
Cystine	1,3
Isoleucine	4,0
Leucine	13,5
Lysine	2,1
Méthionine	1,3
Phénylalanine	4,9
Threonine	3,3
Tryptophan	1,0
Tyrosine	3,1
Valine	5,0

A long terme, les cultivars de sorgho présentant le moins de prolamines peuvent constituer une source de protéines en alimentation. Quelques uns de ces rares cultivars plus nutritifs ont été déjà trouvés en Ethiopie et au Soudan [5]. Nous pouvons, cependant, supposer que le grain de sorgho devra toujours être préalablement traité si sa pleine valeur de protéines doit être exploitée. Le fait que la digestibilité des protéines diminue de manière significative après chauffage prouve que ce traitement doit être fait avec perspicacité [31, 37]. La diminution de la digestibilité est vraisemblablement due à une polymérisation accrue des protéines accentuée par le traitement thermique durant le procédé de cuisson.

### 1.1.5.1.1. Prolamines et glutélines

Les glutélines de sorgho ont attiré moins d'attention que les prolamines, la plupart des études précédentes se sont uniquement limitées à la composition générale en glutélines, sans aucune autre information sur leurs caractéristiques et fonctionnalités. Les prolamines sont les principales protéines de stockage du sorgho, et sont désignées collectivement sous le nom de kafirines de sorgho [1, 12, 37]. Quatre classes de kafirines peuvent être distinguées:

Les  $\alpha$ -kafirins avec deux formes ( $\alpha$ 1-, et  $\alpha$ 2-kafirine), ce sont des polypeptides avec une masse moléculaire (MM) respectivement de 26 kDa et 23 kDa. Elles constituent 66 à 84% des kafirines totales. Les  $\beta$ -kafirines ont une MM de 20 kDa, 18 kDa ou 16 kDa, elles représentent 7 à 8% des kafirines totales. Les  $\gamma$ -kafirines ont une MM de 28 kDa, elles constituent 9 à 12% des kafirines totales [36, 38, 39]. Une quatrième classe, relative à la  $\delta$ -zéine du maïs et désignée sous le nom de  $\delta$ -kafirine, a été seulement identifiée dans la séquence d'ADN du sorgho. Contrairement à la  $\delta$ -zéine, qui peut être détectée par SDS-page, la  $\delta$ -kafirine n'a pas pu être identifiée ou caractérisée au niveau de protéine. Deux séquences de  $\delta$ -kafirine ont été rapportées, toutes les deux montrent une homologie élevée avec la  $\delta$ -zéine de maïs dont la MM est de 14 kDa [36]. Les deux formes de  $\delta$ -kafirine diffèrent des  $\delta$ -zéines par une plus petite région riche en méthionine. Le tableau 1.2 rassemble les propriétés des cinq formes de kafirines.

**Tableau 1.2:** Comparaison des propriétés des cinq formes de kafirines [4, 36, 40, 41, 42]

	MM (kDa)	Composition des séquences en acides aminés	Pourcentage total de kafirine
$\alpha$ 1-Kafirine	26	Riches en acides aminés non polaires, pas de Lys, un Try	66-84 %
$\alpha$ 2-Kafirine	23		
$\beta$ -Kafirine	20, 18 and 16	Riche en Met et Cys, deux Try	7-8 %
$\gamma$ -Kafirine	28	Riche en Pro, Cys, His, pas de Lys	9-12 %
$\delta$ -Kafirine	14	Riche en Met, pas de Lys, un Try	Pourcentages très faibles

Les kafirines se présentent sous formes d'oligomères et de polymères avec différents modèles de polymérisation [28-31, 44-49]. Le degré de polymérisation a probablement une influence importante sur les propriétés des protéines pendant le traitement en particulier leur digestibilité, et leur valeur biologique. La microscopie électronique des structures internes des

protéines a indiqué que la forme  $\gamma$ -kafirine, et à un moindre degré la forme  $\beta$ -kafirine, encapsulent les  $\alpha$ -kafirines plus digestibles et plus abondantes dans un réseau de polymère et limitent leur exposition à l'action des protéases [50, 51]. Toutes les formes de kafirines montrent une homologie élevée avec les protéines équivalentes de zéine. Parmi les prolamines de céréales, les kafirines sont les protéines les plus hydrophobes [36]. Les kafirines montrent une polymérisation étendue par des liaisons disulfures, et la cuisson des farines de sorgho accentue la formation d'agrégats non digestibles qui ne sont solubilisés que par réduction des liaisons disulfures. Selon plusieurs études, les raisons de la faible digestibilité des kafirines demeurent encore incertaines. D'autres recherches ont prouvé que les kafirines peuvent avoir des utilisations non alimentaires et peuvent être employés pour former des films biodégradables [4, 36, 52]. Il reste beaucoup à comprendre au sujet des kafirines. Très peu de travaux ont été effectués sur la structure de ces protéines et la plupart des informations viennent de l'analogie avec les protéines homologues, notamment celles du maïs. Cependant, il est clair qu'il y a des différences significatives dans le comportement des kafirines et des zéines du maïs beaucoup plus étudiées.

#### 1.1.5.1.2 *Albumines et globulines*

Dans le sorgho, les albumines et les globulines contiennent une proportion significative de protéines physiologiquement actives telles que les enzymes et les inhibiteurs d'enzyme. Dans la présente partie nous nous concentrerons sur les enzymes et les inhibiteurs d'enzyme précédemment découverts, purifiés, et caractérisés à partir des graines du sorgho.

#### Enzymes

La sormatine, la chitinases, les  $\beta$ -1.3-glucanases et les protéines d'inactivation ribosomal (RIP) sont toutes des enzymes hydrolytiques capables de dégrader les composants des parois cellulaires des microbes pathogènes envahissant le sorgho, elles ont toutes pu être extraites du sorgho [53].

La sormatine est une enzyme de la famille des perméatines, qui agit par perméabilisation de la membrane des cellules fongiques. Les protéines d'inactivation ribosomal inactivent aisément les ribosomes étrangers à la graine de sorgho. La synthèse ou l'extractabilité des protéines antifongiques du sorgho augmente jusqu'à la maturité physiologique et puis diminue pendant la dessiccation du grain de sorgho. Des concentrations de sormatine et de chitinases variables allant respectivement de 0,1 à 150  $\mu$ g et de 0,1 à 22  $\mu$ g par gramme de farine de graines ont

pu être détectées dans les graines de sorgho à différents stade de développement et dans différents cultivars [53].

#### *Inhibiteurs d'enzymes*

Chandrasekher et coll. [54] ont examiné les extraits de douze variétés de sorgho (*Sorghum bicolor*) et ont détecté une activité inhibitrice contre l'amylase salivaire humaine. Seulement deux cultivars de sorgho n'ont montré aucune inhibition à l' $\alpha$ -amylases. La purification de cet inhibiteur des extraits de sorgho a montré qu'il n'a aucune action inhibitrice vis-à-vis des amylases pancréatiques bovines et porcines. Ces inhibiteurs sont non-dialisables, et ont été inactivés par traitement à la pepsine et sont relativement thermolabiles, suggérant une nature protéique de ces inhibiteurs [54].

#### *Présence des endoxylanases dans le sorgho*

Des niveaux variables d'endoxylanases endogènes, les hydrolases de glycoside qui peuvent hydrolyser intérieurement le xylane, ont été démontrés dans le blé, l'orge, et le seigle, mais, à notre connaissance, aucun rapport correspondant n'est disponible pour le sorgho. Leur probable présence peut, cependant, être facilement démontrée. En effet, pendant plus d'une vingtaine d'années, les endoxylanases ont été employées dans des processus biotechnologiques tels que la fabrication du pain, la séparation du gluten et de l'amidon, le blanchissement du papier et dans la production d'alimentation des animaux [55-60]. Les informations sur les endoxylanases de céréale sont limitées à l'orge, au seigle et au blé [58-60].

Plus récemment, Chithra et Muralikrishna [61] ont prouvé que d'autres céréales telles que le mil et le maïs ont exhibé une activité relativement élevée d'endoxylanase [61]. À notre connaissance, la présence des endoxylanases dans le sorgho n'a pas été rapportée.

#### *Présence des Inhibiteurs d'endoxylanases dans le sorgho*

L'un des objectifs principaux de cette dissertation est la valorisation des protéines de sorgho et de mil, par la purification et la caractérisation de nouvelles protéines, nous nous concentrerons dans cette section sur ces inhibiteurs protéiques et sur les rapports précédents relatifs à leur présence dans le sorgho. Les inhibiteurs d'endoxylanase empêchent l'action des endoxylanases sur l'arabinoxylane: principal constituant des parois cellulaires des céréales. Depuis la découverte des premiers inhibiteurs protéiques d'endoxylanase en 1997 [62], la recherche s'est concentrée sur leur structure et propriétés biochimiques, mais également sur leur pertinence

dans la physiologie des plantes et leurs applications biotechnologiques. Les inhibiteurs d'endoxy lanase peuvent limiter l'invasion des microbes pathogènes en empêchant les endoxy lanases produites par les micro-organismes phytopathogènes impliqués dans l'infection des graines de céréales. Dans le stockage frigorifique de la pâte, l'addition d'un excès d'inhibiteur d'endoxy lanase réduit la formation de sirop induite par les endoxy lanases. L'interaction réversible entre les endoxy lanases et leurs inhibiteurs protéiques a été utilisée pour épurer les endoxy lanases des préparations microbiennes [57].

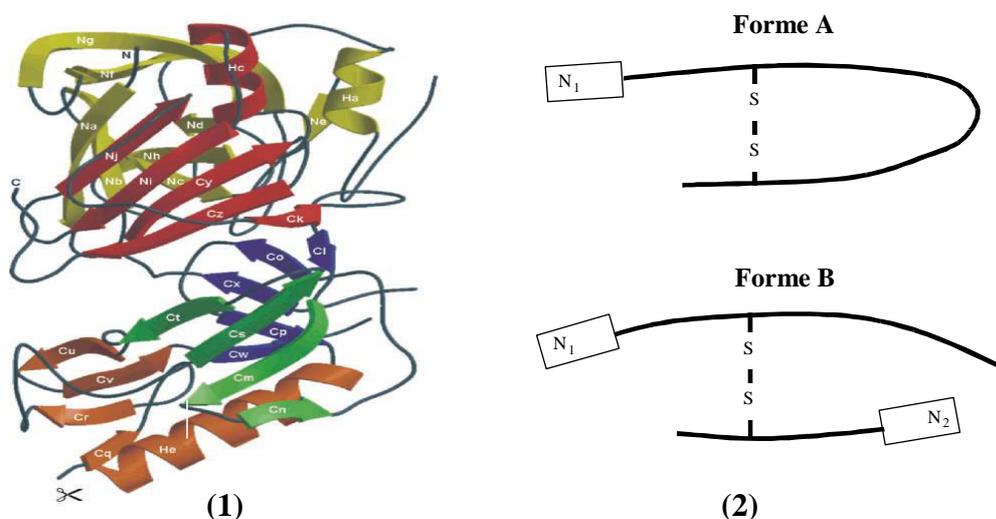
Jusqu'ici, trois types d'inhibiteurs protéiques d'endoxy lanase ont été épurés et caractérisés avec succès de plusieurs céréales: TAXI, XIP et TLXI. Ils ont typiquement des valeurs de pI alcalin [62-65].

D'abord découverte par Debyser et coll. en 1997 [62], les protéines inhibitrices d'endoxy lanase de type *Triticum aestivum* endoxy lanase inhibitor (TAXI) ont été épurées des extraits de blé [64], de blé dur (*Triticum durum* Desf.), de seigle (*Secale cereale* L.) et d'orge (*Hordeum vulgare*) [65]. Elle apparaît sous deux formes, TAXI I et TAXI II, avec différentes spécificités vers les endoxy lanases (Figure 1.3). TAXI I inhibe les endoxy lanases d'*Aspergillus niger* et de *Bacillus subtilis*, alors que TAXI II inhibe seulement *Bacillus subtilis*. TAXI est caractérisée par un niveau de glycosylation bas. TAXI a une MM de 40 kDa, cependant, une fois réduite, elle apparaît sous deux formes. La forme A de MM 40 kDa et la forme B se dissocie en deux polypeptides de MM 30 et 10 kDa. Les deux formes ont la même séquence N-terminale [64]. TAXI inhibe seulement les endoxy lanases appartenant à la famille de glycoside hydrolase 11 (GH 11). Elle est active dans un large intervalle de pH (pH 3 à 12). A 100°C, TAXI a une demi-vie de 3 à 5 minutes. Selon Gebruers [64], les études cinétiques ont montré un type d'inhibition compétitive pour TAXI I vis à vis des endoxy lanases d'*Aspergillus niger*, alors que TAXI I et TAXI II présentent une inhibition non compétitive vis à vis des endoxy lanases de *Bacillus subtilis*.

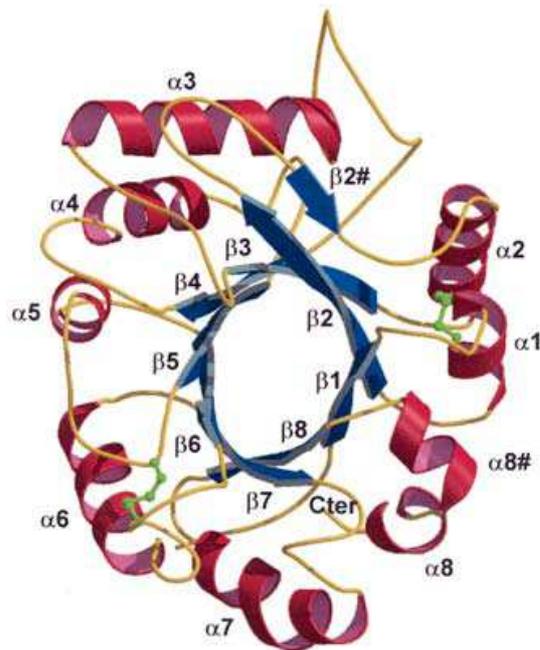
McLauchlan et coll. [67] ont démontré l'occurrence d'une deuxième famille de protéines inhibitrices d'endoxy lanases dans les céréales: endoxy lanase inhibiting proteins (XIPs). Elles ont été épurées du blé [64, 67], du seigle, de l'orge, du riz et du maïs [68]. XIPs (Figure 1.4) ont des MMs de 30 kDa et inhibent typiquement les endoxy lanases d'origine fongique de la famille GH 10 et 11 [69]. Elles possèdent deux différents sites pour inhiber les endoxy lanases

de GH 10 et de GH 11 [67, 70, 71]. Elles sont actives entre pH 3,5 et 9. XIP est très sensible au chauffage: il a une demi-vie de 30 secondes à 100 °C.

Les inhibiteurs d'endoxy lanase de type XIP sont des inhibiteurs compétitifs. Les études cristallographiques des complexes inhibiteur-enzyme [71-73] et l'analyse de l'inhibiteur et des mutants d'enzymes [74, 75] ont démontré que XIP agit directement sur les sites actifs des enzymes.

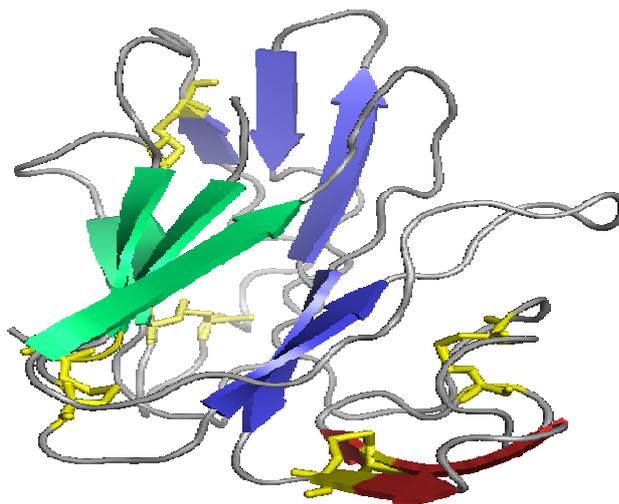


**Figure 1.3:** (1) Structure moléculaire de l'inhibiteur d'endoxy lanase de type TAXI, la structure secondaire est représentée, les flèches représentent les feuillets  $\beta$  (les formes parallèles et anti parallèles sont présentes), les rubans représentent les formes  $\alpha$ .hélices (la structure a été visualisée par Pymol un logiciel libre de visualisation des structures moléculaires en trois dimensions) (2) Représentation schématique de la forme non-réduite (forme A) et la forme réduite (forme B) d'inhibiteurs d'endoxy lanases de type TAXI-. N1 et N2 représentent les séquences N-terminales d'acides aminés. La forme B de TAXI-I résulte d'une attaque protéolytique de la forme A de TAXI, la position de la coupure est marquée avec des ciseaux [73].



**Figure 1.4:** Structure moléculaire de l'inhibiteur d'endoxylyanase de type XIP, les ponts disulfures sont représentés en vert, la structure secondaire est représentée, les flèches représentent les feuillets  $\beta$  (les formes parallèles et anti parallèles sont présentes), les rubans représentent les formes  $\alpha$  hélices (la structure a été visualisée par Pymol) [71].

Le troisième type d'inhibiteurs d'endoxylyanase a été identifié dans le blé en 2001 [63] et est désigné sous le nom de la famille des inhibiteurs d'endoxylyanases de type TLXI ou thaumatine-like endoxylyanase inhibitors (TLXI) (Figure 1.5). Ces protéines ressemblent aux thaumatines et ont une MM approximativement de 18 kDa. TLXI inhibe les endoxylyanases de la famille GH 11 avec un pH optimum de 6.0, cependant elle ne présente aucun effet inhibiteur sur les endoxylyanases de la famille des GH 10. Selon Fierens [63], et en se basant sur des expériences de transfert immunitaire, des homologues de TLXI ont été détectés dans le blé dur et le seigle [76]. TLXI est une protéine monomérique et glycosylée stable à tous les pH (pH 1 à 12). Remarquablement, 50 % de son effet d'inhibition initiale demeure intacte après 2 heures d'ébullition.



**Figure 1.5:** Structure moléculaire de l'inhibiteur d'endoxy lanase de type TLXI, la structure secondaire est représentée, les flèches représentent les feuillets  $\beta$  (les formes parallèles et anti parallèles sont présentes), les cinq ponts disulfures sont représentés en jaunes (la structure a été visualisée par Pymol) [62].

Les endoxy lanases endogènes présentes dans les plantes et appartenant à la famille GH 10, ne sont pas inhibées par les trois types d'inhibiteurs. C'est pour cette raison que plusieurs recherches ont supposé que la présence de ces inhibiteurs dans les plantes est surtout reliée à l'auto-défense des plantes contre les attaques pathogènes fongiques [76]. En 2008, Beliën et coll. [78] ont prouvé que XIP est en général active contre des endoxy lanases produites par les mycètes (aérobies) telles que *Fusarium graminearum* qui est un phytopathogène important. D'autre part, Brutus et coll. [79] ont prouvé que le *Botrytis cinerea* produit une endoxy lanase pendant l'infection du tissu végétal, celle-ci est fortement inhibée par XIP-1 et TAXI-1, deux protéines de blé censées être impliquées dans la défense contre des microbes pathogènes et dont l'expression est induite par les microbes pathogènes fongiques tels que *Erysiphe graminis* et *Fusarium graminearum* aussi bien [77, 80].

Jusqu'à la présente étude, la présence des inhibiteurs protéiques d'endoxy lanase dans le sorgho n'a pas été démontrée et aucune mesure d'effet d'inhibition d'endoxy lanase n'a été rapportée. Elliott et coll. [81] ont cependant suggéré la présence de trois séquences de protéines homologues de XIP dans le sorgho en se basant sur l'analyse de la séquence d'ADN. Basé sur ces observations et dans le cadre de la valorisation des protéines de sorgho, une partie de la recherche dans cette dissertation a été concentrée sur l'isolement et la purification d'inhibiteurs protéiques d'endoxy lanase du sorgho.

### **1.1.5.2 Glucides**

Les glucides constituent approximativement 65 à 80 % du poids sec du grain de sorgho. L'amidon est le constituant principal avec 70 % de poids sec du grain. Les glucides restants sont des polysaccharides en grande partie non amidonien (NSP) et des sucres libres. Dans certaines rares variétés de sorgho sucré, les sucres libres peuvent atteindre des niveaux élevés (60%) [82].

#### **1.1.5.2.1 Amidon**

L'amidon, le polysaccharide de réserve le plus abondant dans la nature, consiste principalement en amylose et amylopectine. L'amylose est une molécule essentiellement linéaire se composant d'unités de  $\alpha$ -(1-4)-D-glucopyranosyl, tandis que l'amylopectine a des chaînes  $\alpha$ -(1-4)-D-glycosidiques courtes couplées entre elles par des liaisons  $\alpha$ -1-6 distribuées de façon aléatoire. Ce dernier type de liaisons constitue 5 à 6% du nombre total de liaisons [83]. La nature semi-cristalline de l'amidon est attribuée à la forme des doubles spiraux constitués par les branches d'amylopectine [84]. Dans la plupart des variétés de sorgho, les granules d'amidon sont sous forme polygonale et/ou sphérique, de diamètre variable s'étendant de 5 $\mu$ m à 25 $\mu$ m, avec une moyenne de 15 $\mu$ m. L'amidon de sorgho se compose en moyenne de 70 à 80 % d'amylopectine et 20 à 30 % d'amylose (Tableau 1.3). Cependant, quelques amidons de sorgho contiennent 100 % d'amylopectine, alors que d'autres contiennent 62 % d'amylose. L'amidon de sorgho possède des propriétés similaires à celles du maïs, et les deux sont employés dans beaucoup d'applications industrielles et alimentaires. Une fois bouilli dans l'eau, l'amidon forme une pâte opaque de viscosité moyenne. Après refroidissement, cette pâte se transforme en un gel rigide d'une manière irréversible. La température de gélatinisation est de 68° à 75°C [7].

**Tableau 1.3:** Composition en glucides du grain de sorgho (%)  
<sup>a</sup>[7], <sup>b</sup>[85].

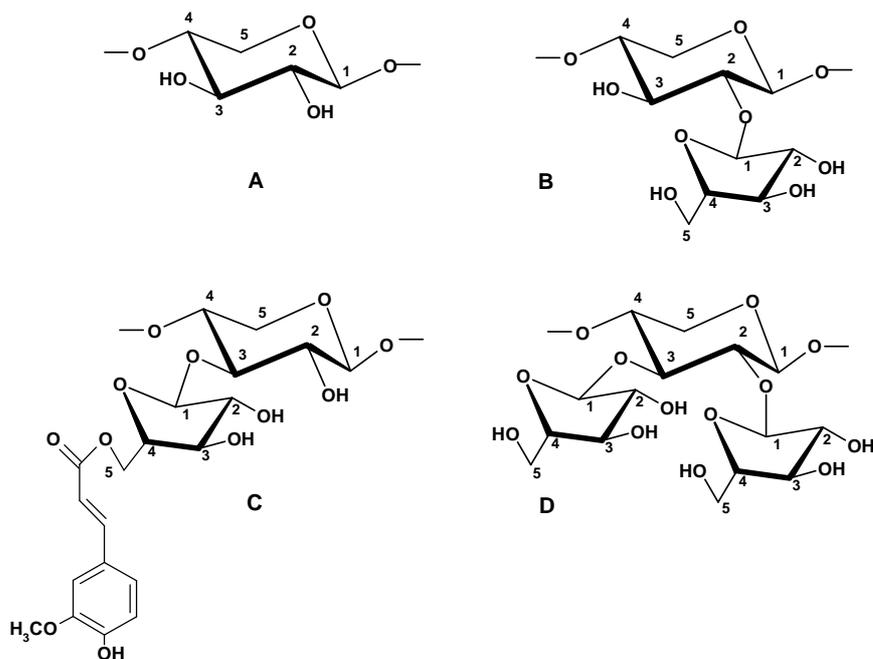
	Sorgho
<b>Glucides totaux</b>	65- 80
<b>Amidon</b>	60-75 <sup>a</sup>
<b>Composition de l'amidon</b>	
Amylose	20-30 <sup>b</sup>
Amylopectine	70-80 <sup>b</sup>
<b>Composition en polysaccharide non amidonien (NSP)</b>	2,0-7,0
Arabinoxylane (AX)	55,0
$\beta$ -glucane	40,0

#### 1.1.5.2.2 Polysaccharide non amidonien (NSP)

Le sorgho contient des polysaccharides non amidoniens (NSP), principalement situés dans les parois des cellules du péricarpe et de l'endosperme, avec des proportions dans le grain de sorgho s'étendant de 2 à 7% selon la variété (Tableau 1.3) [86, 87]. Les NSPs dans le grain de sorgho sont essentiellement constitués d'arabinoxylane (AX) et de  $\beta$ -glucanes, représentant respectivement 55% et 40% de tous les NSP [87, 88].

#### Arabinoxylane

L'arabinoxylane (AX) se compose d'une chaîne linéaire de  $\alpha$ -(1-4)-D-xylopyranose (Xylp) substituée avec des chaînes latérales d'arabinofuranose (Araf) attachées par l'intermédiaire de liaisons  $\alpha$ -(1-3) et/ou de  $\alpha$ -(1-2) (Figure 1.6) [56, 89]. La structure de l'AX dans différentes céréales varie considérablement dans les rapports d'Arabinose/Xylose (A/X). Il y a un degré élevé d'hétérogénéité lié à ces polysaccharides, principalement provoqués par la variation dans le degré de polymérisation (DP) et de distribution des résidus d'Araf le long de la chaîne de xylane et de la proportion des différents types de liaisons des résidus d'Araf à la chaîne de Xylp. Ces différences structurales sont responsables des variations des propriétés physico-chimiques et biologiques des arabinoxylanes des différentes céréales [90].

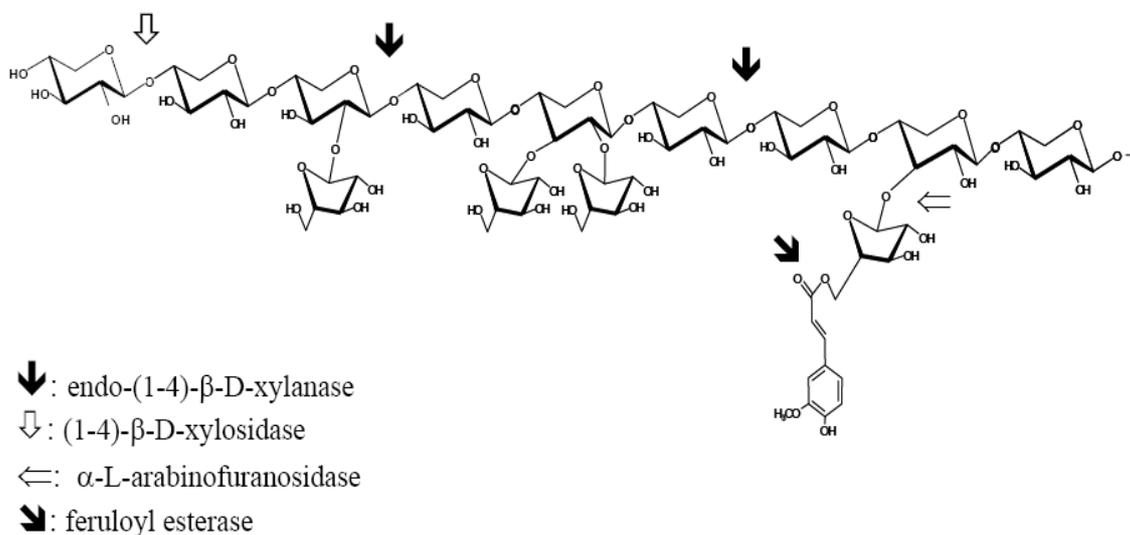


**Figure 1.6:** Eléments structuraux présents dans les arabinoxylyanes: (A) non substitué Xylp; (B) monosubstitué Xylp à O-2; (C) monosubstitué Xylp à O-3 avec un résidu acide férulique estérifié à Araf et (D) Xylp disubstitué à O-2,3 [56].

Les AXs présentent des avantages alimentaires, ils sont riches en fibres solubles et insolubles. Dans le blé, l'AX joue un rôle important en maintenant l'équilibre de l'eau dans la pâte [91] et affecte fortement les propriétés rhéologiques de la pâte [92], et la rétrogradation de l'amidon [93]. Il est aussi impliqué dans la qualité panifiable de la farine [94, 95]. Selon Izydorczyk et Dexter [96], les arabinoxylyanes du riz, du sorgho, du mil, du son et du maïs sont plus complexes que ceux de l'orge et du blé. Leurs branches latérales contiennent, en plus des résidus d'arabinose et de xylopyranose, le galactopyranose, et des résidus d'acide  $\alpha$ -D-glucuronique. Verbruggen et coll. [87] ont trouvé que l'AX de sorgho peut contenir de l'acide férulique et l'acide p-coumarique et est appelé glucuronoarabinoxylane (GAX) à cause de la présence d'un fort pourcentage de  $\beta$ -glucanes. Le GAX de sorgho est en grande partie inextractible dans l'eau [87, 97].

La figure 1.7 donne une vue d'ensemble des enzymes dégradantes des AXs. Les endoxylyanases hydrolysent l'AX intérieurement et produisent des xylo-oligosaccharides non substitués ou substitués, qui pourraient être encore dégradés par les  $\alpha$ -D-xylosidases (EC 3.2.1.37). De l'extrémité non réductrice, des résidus de Xylp sont alors libérés. Des résidus d'Araf sont libérés par  $\alpha$ -L-arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55). Des résidus d'acides

féruliques et p-coumariques estérifiés à O-5 des résidus d'Araf sont libérés par les estérases (EC 3.1.1.6) [98, 99]



**Figure 1.7:** Vue d'ensemble de l'hydrolyse enzymatique de l'AX par des enzymes dégradantes de l'AX [99].

En raison de son degré élevé de substitution, le GAX du sorgho est moins dégradé par les endoxylanases que l'AX du blé (*Triticum aestivum* L.) ou de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) [100, 101]. En outre, le GAX de sorgho peut également occasionner des difficultés de filtration [100]. Il est également suspecté dans la réduction de la digestibilité des protéines de sorgho, en réduisant l'accessibilité des enzymes protéolytiques ou la formation de complexes non digestibles [29]. L'utilisation des endoxylanases appropriées en combinaison avec les enzymes accessoires telles que des arabinofuranosidases, des glucuronidases, et des estérases peut partiellement résoudre ces imperfections technologiques du sorgho.

### Glucanes

Les β-Glucanes sont un groupe divers de molécules de masse moléculaire variable. Les β-Glucanes se trouvent le plus généralement sous forme de cellulose dans les plantes, dans l'écorce des grains de céréale, les parois de cellules des levures, de certains mycètes, des champignons et bactéries. Quelques formes de β-glucanes sont utiles en nutrition humaine en tant qu'agents de texturisation, et en tant que suppléments solubles de fibres. La cellulose n'est la plupart du temps pas soluble dans l'eau et exige des solutions alcalines et acides pour l'extraire. Les β-glucanes de sorgho comportent la cellulose (1,4-β-D-glucanes), les glucanes

de curdlan-type (1,3- $\beta$ -D-glucanes), et les glucanes de lichenan-type (1,3- $\beta$ -D-glucanes et 1,4- $\beta$ -D-glucanes) [86, 87, 101]. Ces  $\beta$ -glucanes sont principalement non extractibles dans l'eau, et forment des solutions visqueuses et collantes.

### ***1.1.5.3 Constituants mineurs***

#### ***1.1.5.3.1 Lipides***

Les lipides libres composent 2 à 4 % de la matière sèche de la graine de sorgho et les lipides reliés 0,1 à 0,5%. La majeure partie des lipides est située dans le germe [1]. Les acides gras dans le sorgho sont fortement insaturés, dont 76% sont sous formes d'acides oléiques et linoléiques [1, 5, 6]. Le sorgho contient des lipides non polaires appelés "cires", ces derniers constituent 0,22 à 0,5 % du grain entier. Les lipides polaires du sorgho sont principalement des glycolipides et des phospholipides constituant 3 à 11 % des lipides totaux [1]. Policosanols (également appelés les alcools gras) sont un mélange d'alcools aliphatiques de masse moléculaire élevée qui font partie des composants de cire du sorgho. Ces cires ont une propriété très intéressante, celle de pouvoir abaisser le cholestérol [13].

#### ***1.1.5.3.2 Vitamines et sels minéraux***

Le sorgho contient des niveaux élevés de vitamines et de sels minéraux. Des niveaux appréciables de carotène (vitamine A), de niacine (vitamine B3), d'acide folique (vitamine B9), et de biotine (vitamine H), de riboflavine (vitamine B2), de pyridoxine (vitamine B6) et d'acide pantothénique (vitamine B5), ont été détectés dans le grain de sorgho [5]. La teneur en cendres dans le sorgho est de 1 à 2 %. Comme dans la plupart des céréales, le potassium et le phosphore sont les sels minéraux principaux. Les niveaux de calcium et de zinc tendent à être bas dans le sorgho [1] (Tableau 1.4).

**Tableau 1.4:** Constituants mineurs du grain de sorgho (% en matières sèches)

[1, 5]

<b>Constituants mineurs dans 100g de grain de sorgho</b>	
Lipides (g)	2,0-4,0
Sels (g)	1,0-2,0
Fibres (g)	2,0
Fibres alimentaires (g)	8,3
Vitamine B6 (RE*)	0,5
Vitamine A (mg)	21
Thiamine (mg)	0,35
Riboflavine (mg)	0,14
Niacine (mg)	2,8
Calcium (mg)	21
Chlorures (mg)	57
Cuivre (mg)	1,8
Fer (mg)	5,7
Magnesium (mg)	140
Manganèse (mg)	n.d
Molybdène (mg)	n.d
Phosphore (mg)	368
Potassium (mg)	220
Sodium (mg)	19
Zinc (mg)	n.d

\*RE = retinol equivalent;

#### 1.1.5.3.3 Polyphénols

Le sorgho est une source riche de polyphénols. Les polyphénols se trouvent sous forme de tannins, d'acides phénoliques et d'anthocyanines. Beaucoup de polyphénols sont colorés et sont responsables de la pigmentation de la graine de sorgho [1]. Les polyphénols sont intimement liés à la protection des graines de sorgho contre les attaques des parasites et des oiseaux. Les polyphénols de sorgho possèdent une activité antioxydante élevée. Ils offrent des possibilités intéressantes de lutte contre les radicaux libres dans la santé humaine [13]. Les tannins du sorgho sont presque exclusivement du type " condensé ", ils sont principalement des produits polymérisés de flavan-3-ols et/ou de flavan-3,4-diols [13].

### 1.1.6 Conclusion

Dans ce chapitre, une courte description des graines de sorgho et de leur composition a été présentée, récapitulant les travaux précédents dans ce domaine. Les protéines de sorgho ont été traitées de façon plus détaillée. La fraction prolamine plus communément connue sous le nom de kafirine a été décrite. Dans la fraction albumines et globulines, un intérêt particulier a été porté sur la description des endoxylanases et des inhibiteurs d'endoxylanases. La fraction de glucides a été décrite plus en détail, se concentrant sur l'amidon et l'arabinoxylane. En conclusion, les constituants mineurs dans le sorgho ont été brièvement mentionnés. Dans le prochain paragraphe, une description similaire sera effectuée sur le mil.

## 1.2 LE MIL PERLE (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br)

### 1.2.1 Introduction

Les mils sont classés avec le maïs, le sorgho, et le coix dans la sous-famille des *Panicoideae* de la famille des *Poaceae* [4]. La FAO a estimé la production globale des mils en 2007 à 32 millions de tonnes, les classant 6èmes parmi les céréales les plus cultivées, juste après le sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). Ces céréales à petites graines sont moissonnées pour l'alimentation humaine et animale. Les espèces de mils les plus largement cultivées en termes de production mondiale sont, par ordre décroissant, le mil perlé (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br), le mil d'Italie (*Setaria italica* L.), le proso mil (*Panicum miliaceum* L.) et le petit mil (*Eleusine coracana* L.) [7, 102]. Le mil perlé est le plus largement développé de tous les mils, il est très adapté aux régions tropicales semi-arides avec des saisons de croissance courtes, il peut être cultivé sur des sols sablonneux et peu fertiles. Le mil peut tolérer des conditions de croissance faibles, telles que la chaleur et la sécheresse intenses [103, 104].

Descendu d'une herbe sauvage d'Afrique occidentale, le mil perlé a été domestiqué il y a plus de 4.000 ans, probablement dans ce qui est maintenant le cœur du désert du Sahara. Il y a bien longtemps, il a été répandu en Afrique de l'Est et puis en Inde [1, 5]. Les deux régions l'ont adopté intensément, actuellement le mil perlé est devenu un aliment principal dans ces régions. Maintenant, des mils peuvent être trouvés dans plusieurs régions d'Asie, d'Afrique, de Chine et de Russie [11, 102]. Le mil perlé est mal soutenu par la science et la politique. En dehors de l'Inde et de certaines régions d'Afrique et d'Asie, cette céréale est mal connue sinon complètement inconnue dans les autres régions du monde. Par conséquent, elle reste derrière le sorgho et loin derrière les autres grains principaux dans son développement génétique. Par

exemple, ses rendements moyens sont à peine de 780 kilogrammes par hectare [105] et c'est presque entièrement une récolte de subsistance. Le mil perlé est une céréale appartenant au genre *Pennisetum* qui contient environ 140 espèces tropicales. Le mil perlé est plus résistant aux maladies que le sorgho, le maïs, ou d'autres grains de céréales. En outre, il est moins sensible aux insectes parasites.

L'idée répandue que le mil perlé est essentiellement une récolte destinée à l'alimentation animale est erronée. Le grain est réellement une matière première supérieure, contenant au moins 9 % de protéines et un taux en acides aminés essentiels équilibré. C'est une céréale de grande énergie et qui ne contient pas de tannins ni les autres composés qui réduisent la digestibilité des protéines dans le sorgho ou d'autres céréales [5]. Dans cette section, la production et l'application du mil perlé seront décrites. Un focus sera mis sur la structure et la composition des grains de mil perlé, en particulier sa fraction protéique.

### **1.2.2 Description de la panicule de mil perlé**

La taille de la plante de mil perlé peut s'étendre de 0,5 à 4 m et le grain peut être bleu presque blanc, jaune pâle, brun, gris, ardoise ou pourpre. La fleur est une panicule (Figure 1.8). Les nombreuses fleurs sont repliées étroitement autour d'un axe cylindrique appelé "rachis" qui peut s'étendre dans la longueur de 15 à 140 centimètres. La panicule est caractérisée par une inflorescence habituellement jaune verdâtre, elle peut être cylindrique dans toute sa longueur ou effilée à une ou aux deux extrémités.

Le nom mil perlé est dû à l'apparence brillante des graines dans la panicule qui rappelle la brillance des perles.



**Figure 1.8:** Panicules de mil perlé (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br)

### 1.2.3 Production et applications du mil perlé

La production globale du grain de mil perlé dépasse 15 millions de tonnes par année, où l'Inde contribue presque à la moitié en termes de surfaces cultivées (9,1 millions de hectares) et de production (7,3 millions de tonnes) [105]. Au moins 500 millions de personnes dépendent du mil perlé pour leurs subsistance [5]. Le mil perlé est très souvent la récolte de céréale la plus productive sur les sols les plus secs et les plus stériles en Inde et en Afrique. D'un point de vue agronomique, il n'y a aucune raison pour laquelle le mil perlé ne pourrait pas (comme le sorgho) devenir utilisé dans le monde entier. En effet, des recherches récentes aux Etats-Unis ont prouvé que ses perspectives d'exploitation sont beaucoup plus prometteuses pour l'avenir. Le mil perlé pourrait également devenir extensivement utilisé dans les parties les plus chaudes et les plus sèches de l'Amérique latine, de l'Asie centrale, et du Moyen-Orient. Cette céréale pourrait avoir un avenir dans les régions à climats secs de l'Australie et d'autres pays aussi bien. En Afrique, le mil est utilisé pour produire du couscous et les différents types de pains traditionnels [102]. En Afrique et en Asie le mil perlé est consommé directement par les populations locales sous forme de pains non fermentés (roti) ou fermentés (kisra et gallettes), de boissons, de gruaux, de nourritures cuites à la vapeur, et de nourritures bouillies. Dans les

pays développés, le mil perlé est employé principalement comme céréale fourragère [102]. L'aliment principal des régions montagneuses au Niger est la farine de mil mélangée aux dattes sèches et au fromage sec de chèvre. Mélangé avec de l'eau il peut être mangé sans besoin de cuisson. Au Nigéria, le grain de mil est fermenté, comme le maïs ou le sorgho, pour produire l'ogi un aliment traditionnel. À l'avenir, le mil perlé peut être employé dans beaucoup plus de types de nourritures. Le fait qu'il peut être transformé en des produits ressemblant à ceux normalement produits à partir du blé ou du riz devrait le rendre acceptable pour beaucoup plus de personnes [4, 6, 102].

#### **1.2.4 Structure du grain de mil perlé**

Les grains de mil perlé sont de forme ovoïde et d'environ 3 à 4 millimètres de long, beaucoup plus grand que ceux d'autres espèces de mils. Le poids de 1000 grains varie de 2,5 à 14 g avec une moyenne de 8 g. La forme du grain de mil perlé ressemble à une larme sur une extrémité. La taille du grain de mil perlé est approximativement le tiers de celle du sorgho. Les grains de mils montrent une diversité considérable de couleurs, de forme et de taille. Les principaux composants anatomiques sont le péricarpe, le germe ou embryon et l'endosperme comme représenté sur la figure 1.9 [7, 23]. L'embryon de la graine apparaît comme une tâche foncée sur le bout de la graine [7, 23]. La distribution en masse dans le mil perlé, est 8,4 % pour le péricarpe, 75 % pour l'endosperme et 16,5% pour le germe [106].

Le péricarpe se divise en trois couches, l'épicarpe, le mésocarpe et l'endocarpe. L'aleurone est une couche épaisse, attachée au péricarpe [1]. Le péricarpe du caryopse de mil perlé se compose de l'épicarpe avec un ou deux couches de cellules, du mésocarpe dont l'épaisseur est variable en raison des facteurs génétiques et de l'endocarpe composée de cellules croisées (CC) et de cellules tubulaires (CT). La couche de mésocarpe du mil perlé ne contient pas de granules d'amidon.

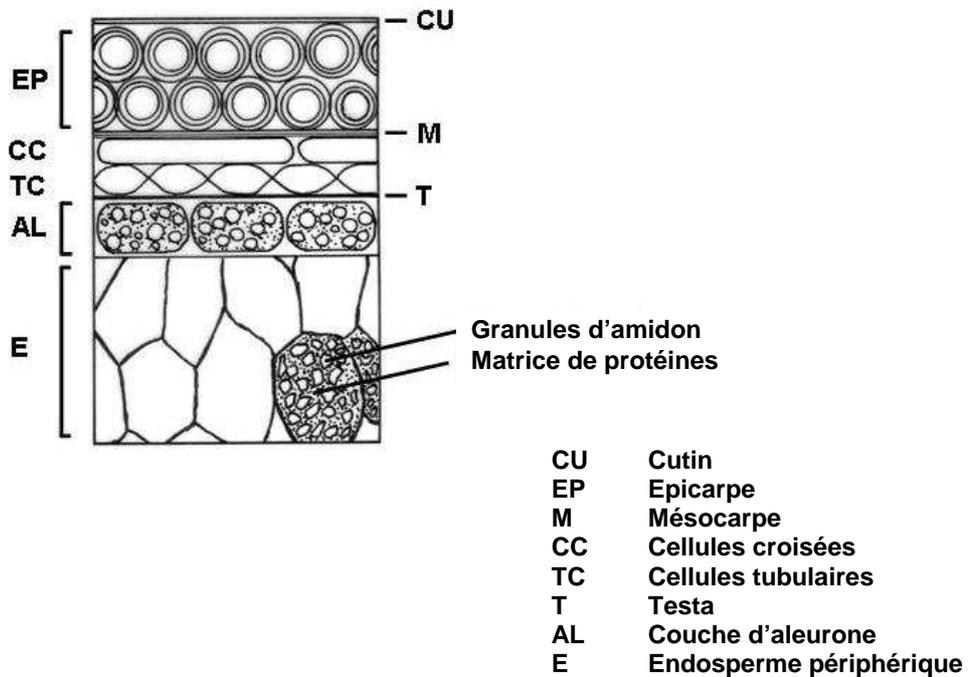
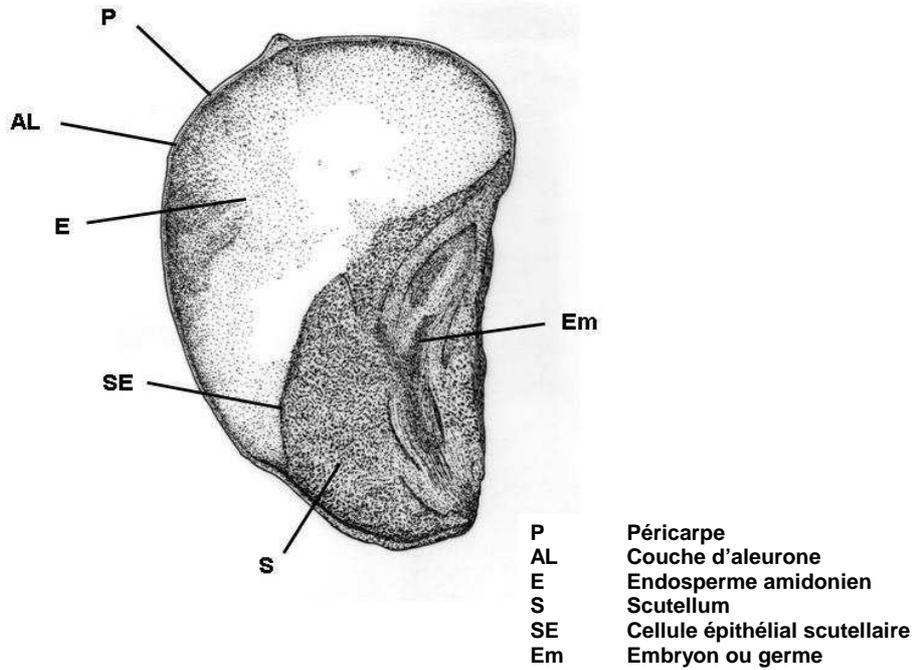


Figure 1.9: Coupe longitudinale et des couches externes d'un grain de mil perlé [23].

## **1.2.5 Composition du grain de mil perlé**

La composition moyenne du mil perlé est comparable à celle des autres céréales. Les points les plus importants sont récapitulés ci-dessous. Les glucides composent habituellement environ 70 pour cent du grain sec dont la majeure partie est exclusivement de l'amidon. En termes d'abondance, les protéines constituent la deuxième fraction dans le mil perlé comme dans les autres céréales. Le mil ne contient pas de tannin, et contient 5 à 7 % de lipides.

### ***1.2.5.1 Protéines***

Les analyses effectuées sur plusieurs centaines de types de mils ont montré que les niveaux de protéines sont plus élevés que dans le sorgho, et peuvent varier de 9 à 21 %, avec une moyenne de 16 %. Cependant, les variétés utilisées et les plus répandues ont une moyenne de 11 à 12 %. La digestibilité des protéines de mil perlé est beaucoup plus élevée que celle du sorgho avec une moyenne de 89 %. Les cultivars de mil perlé ne contiennent pas de gluten, ce qui les rend appropriés aux céliaques [7, 14]. Le profil d'acides aminés essentiels montre que le mil perlé contient plus de lysine, thréonine, méthionine, et cystine que le sorgho ou d'autres mils. Son contenu en tryptophane est également plus élevé [5]. Cependant, une grande variation en teneur de lysine est observée parmi les cultivars de mils, ainsi des valeurs extrêmes de 1,59 à 3,8 g par 100 g de protéine, ont été obtenues en littérature [5, 7]. Ces cultivars à teneur élevée en lysine sont préférés en raison de leurs propriétés alimentaires élevées [1, 8]. D'autre part, la connaissance des mécanismes qui déterminent la synthèse des protéines et les gènes qui les codent sera essentielle pour améliorer la quantité et la qualité des protéines dans des variétés de mil perlé moissonnées [109].

Le tableau 1.5 représente les taux des différentes classes de protéines de mil perlé ainsi que la composition en acides aminés essentiels.

**Tableau 1.5:** Composition en protéines et en acides aminés [% en matière sèche] du mil perlé [1, 5, 7, 12]

<b>Protéine (%)</b>	<b>9-21</b>
Albumines	6-10
Globulines	12-17
Prolamines (Pennisetine)	50
Glutélines	30
<b>Acides aminés essentiels (% de protéine)</b>	
Cystine	1,8
Isoleucine	3,9
Leucine	9,5
Lysine	3,2
Méthionine	1,8
Phénylalanine	4,1
Thréonine	3,3
Tryptophan	1,4
Tyrosine	3,0
Valine	4,9

Les prochains paragraphes fournissent une vue d'ensemble sur les propriétés et la fonctionnalité de ces fractions de protéines, principales objet de cette dissertation.

#### 1.2.5.1.1 Prolamines et glutélines

Dans le mil perlé, comme dans le sorgho, le maïs, et le coix, la fraction principale de protéines est celle soluble dans l'alcool appelée: prolamines [7]. Les prolamines de mil, appelées pennisetines, représentent plus de 50% en moyenne de la fraction de protéines totales (Tableau 1.5). Les protéines solubles dans les solutions alcalines appelées: glutélines représentent 30 à 45%, les protéines solubles dans les solutions salines: globulines représentent 12 à 17%, et les albumines 6 à 10% [5, 7]. La composition en acides aminés des pennisetines est comparable à celle des zéines (prolamines de maïs) et des kafirines (prolamines de sorgho). avec des concentrations élevées de glutamate, de glutamine, d'alanine, de leucine, et des teneurs relativement faibles en cystine, méthionine, et proline [7]. La fraction de glutélines a attiré moins d'attention que les prolamines de mil, les informations se limitent seulement à sa composition générale.

L'électrophorèse unidimensionnelle des prolamines de mil perlé donne lieu à trois bandes distinctes. Ces prolamines de MM 27, 22 et 12 kDa sont appelées A-, B- et C-pennisetines,

respectivement [107, 108]. Une fois analysée sur un gel bidimensionnel, la bande principale de protéine d'A-pennisetine se subdivise en quatre polypeptides principaux tandis que la forme B-pennisetine apparait en trois polypeptides [108]. Les séquences N-terminales de A-, B-, et C-pennisetine ne présentent aucune homologie à celles des autres céréales de la famille des *Poaceae* ou *Gramineae* [108]. Bugs et coll. [109] ont montré que les pennisetines de mil sont cependant plus proches dans leurs structures aux prolamines du maïs (zéine). Certaines de ces pennisetines sont riches en méthionine, et comparables aux zéines de maïs ( $\beta$ - et  $\delta$ -zéine), le choix des géotypes contenant des proportions élevées de ces protéines peut mener à l'amélioration de la qualité alimentaire des mils [107, 109, 110].

Les informations sur la caractérisation des pennisetines sont très limitées, malgré son importance. C'est un domaine qui reste encore vierge, l'objectif de cette étude est d'approfondir ce qui a déjà été fait sur les prolamines de mil et plus particulièrement les cultivars de mil cultivés dans le Sahara Algérien

#### *1.2.5.1.2 Albumines et globulines*

Comme précédemment indiqué les albumines et les globulines sont connues pour être des protéines physiologiquement actives telles que les enzymes ou les inhibiteurs d'enzyme. Dans le cadre de la valorisation des protéines du mil, dans cette section un aperçu est donné sur les enzymes et inhibiteurs d'enzymes qui ont été précédemment purifiés et caractérisés à partir des graines de mil perlé.

#### Enzymes

La phenylalanine ammonia lyase (PAL) est une enzyme impliquée dans la résistance au mildiou "downy mildew", une maladie des plantes ornementales causée par les moisissures *Peronospora* ou *Plasmopara*. PAL a été purifié à partir de différents cultivars du mil perlé. L'activité de la PAL est élevée dans les cultivars résistants à la maladie. De plus, une grande variabilité dans l'activité enzymatique a été constatée entre les cultivars [111].

Une forte activité de la polyphenol oxidase (PPO) a été détectée dans les jeunes plantes de mil perlé résistantes ou sensibles, avec ou sans inoculation du microbe pathogène du mildiou *Sclerosporagraminicola* (Sacc.) Schroet. Les jeunes plantes des variétés résistantes ont présenté une plus grande activité de la PPO que les jeunes plantes sensibles, et les jeunes plantes inoculées ont eu des niveaux sensiblement plus élevés de PPO que les jeunes plantes

non inoculées. Cette enzyme est impliquée dans l'auto-défense du mil contre ces pathogènes [112].

#### Inhibiteurs d'enzymes

Des inhibiteurs d'enzyme avec une activité antifongique ont été également détectés dans plusieurs cultivars de mil perlé. Récemment, un inhibiteur de cystéine protéase (CPI) exhibant une forte activité antifongique dans les graines de mil perlé a été épurée avec succès. Sa masse moléculaire est de 24 kDa et son point isoélectrique est de 9,8. Sa composition en acides aminés montre la présence d'une teneur élevée en sérine et glycine et l'absence du tryptophane. Cet inhibiteur montre une activité antifongique efficace contre *Trichoderma reesei* et contre quelques mycètes phytopathogéniques importants: à savoir, *Claviceps*, *Helminthosporium*, *Curvularia*, *Alternaria* et *Fusarium species* [113].

Quatorze variétés de mil perlé ont été examinées pour l'effet inhibiteur contre l' $\alpha$ -amylase salivaire humaine. Tous les échantillons de mil ont inhibé les  $\alpha$ -amylases excepté une seule variété. Les inhibiteurs étaient non-dialysables et ont été inactivés par traitement à la pepsine, ce qui montre leur caractère protéique [54].

Giri et Kachole [114] ont décrit une méthode pour la détection des inhibiteurs protéiques de l' $\alpha$ -amylase par séparation électrophorétique. Les inhibiteurs de l' $\alpha$ -amylase ont été extraits au moyen du HCl (0,1 M) à partir de la farine de graine du mil perlé. Ils ont été analysés après fractionnement au sulfate d'ammonium, et séparés dans un gel de polyacrylamide contenant 0,5% d'amidon soluble et visualisés par l'incubation du gel dans une solution salivaire d'amylase, la détection de l'effet inhibiteur est effectuée par coloration à l'iode [114].

#### Présence des endoxylanases dans le mil

Chithra et Muralikrishna [61] étaient les premiers à purifier des endoxylanases du malt de mil. La masse moléculaire de l'enzyme purifiée est de 29 kDa sur SDS-PAGE. L'enzyme a montré une stabilité maximale à 35°C dans une gamme de pH de 5,0-6,0. Les ions métalliques tels que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$  augmentent l'activité des endoxylanases purifiées.

### Présence des inhibiteurs d'endoxylanases dans le mil

Comme présenté avec plus de détails dans les sections précédentes, il existe trois types d'inhibiteurs protéiques d'endoxylanases: TAXI, XIP et TLXI. Ces protéines ont été identifiées, purifiées et caractérisées avec succès de plusieurs céréales telles que le blé, le sarrasin, l'orge et le riz [63, 65, 68]. Puisque l'AX est le composant principal des parois cellulaires dans le mil perlé, la présence de protéines inhibitrices des endoxylanases peut être prévue. Cependant aucune étude, jusqu'à présent n'a pu identifier ou purifier ces protéines à partir du mil perlé.

Basé sur ces observations et dans le cadre de la valorisation des protéines de sorgho et de mil perlé, une partie de la recherche dans cette dissertation a été concentrée sur la purification d'inhibiteurs protéiques d'endoxylanases des grains de mil perlé.

#### **1.2.5.2 Glucides**

La principale composante du grain de mil est sous forme de glucides dont la majeure partie est de l'amidon. La teneur en énergie disponible dans la graine de céréale dépend de la digestibilité de l'amidon, déterminée par l'hydrolyse des enzymes salivaires et pancréatiques [7]. Parmi les polysaccharides non amidonien et non cellulose dans le grain de mil perlé, l'AX constitue le plus grand pourcentage. Puisqu'un des objectifs principaux de cette dissertation est la purification et la caractérisation de nouvelles protéines du mil perlé et du sorgho, telles que les inhibiteurs protéiques d'endoxylanases, la composition en AX dans le mil perlé sera décrite avec plus de détail dans cette section.

##### *1.2.5.2.1 Amidon*

L'amidon de mil perlé se compose d'environ deux-tiers d'amylopectine (le composant insoluble qui forme une pâte dans l'eau à la température ambiante) et d'un tiers d'amylose (le composant soluble qui forme un gel dans l'eau) comme montré dans le tableau 1.6 [84].

Les granules d'amidon dans le mil perlé sont sphériques ou polygonaux et de diamètre variable de 4 à 12  $\mu\text{m}$ . La température de gélatinisation de l'amidon du mil perlé est de 60 à 70°C [7]. Plusieurs chercheurs ont remarqué des différences dans les propriétés physico-chimiques des amidons de cinq différents cultivars de mil perlé examinées [7]. La teneur en amylose de ces amidons change dans une marge étroite (22 à 24 %). La variation de la capacité de solubilisation dans l'eau (83,6 à 99,5 %) est due aux différences dans les proportions d'amidon amorphe et cristallin dans le granule; l'amidon amorphe a une plus

grande capacité d'absorption d'eau que l'amidon cristallin. La gélatinisation de l'amidon de mil perlé se produit à une température plus basse que celle de l'amidon de sorgho [7].

**Tableau 1.6:** Composition en glucides dans le mil perlé (% en matière sèche)  
<sup>a</sup>[5], <sup>b</sup>[85]

	<i>Mil</i>
<b>Glucides</b>	71,0 <sup>a</sup>
<i>Amidon</i>	63,1-78,5 <sup>b</sup>
<i>Composition de l'amidon</i>	
Amylose	33,0 <sup>b</sup>
Amylopectine	66,0 <sup>b</sup>
<b><i>Polysaccharide non amidonien (NSP)</i></b>	2,0-7,0

#### 1.2.5.2.2 *Polysaccharide non amidonien (NSP)*

Dans le mil perlé, la principale partie des polysaccharides non amidoniens (NSP) est de l'arabinoxylane (AX). Dans le mil perlé, l'AX est plus embranchée comparé aux AXs du sorgho ou du blé. Cette structure provoque des différences dans la fonctionnalité de la farine de mil telle que: la prise d'eau et la cohésion de la pâte. La substitution en acide férulique peut également être un des principaux facteurs [115, 116]. Le contenu des fibres diététiques change considérablement entre les céréales. Parmi le mil, le blé et le sorgho, le mil perlé est caractérisé par un niveau plus élevé en fibres diététiques. L'AX est l'un des constituants principaux des fibres diététiques dans le mil. [115, 116].

#### 1.2.5.3 *Constituants mineurs*

##### 1.2.5.3.1 *Lipides*

Dans le mil perlé, le taux de lipides varie de 3 à 7.4% [1]. Les acides gras insaturés sont constitués de l'acide oléique (54 %), l'acide linoléique (40-52 %), et l'acide palmitique (11%) [1, 7].

##### 1.2.5.3.2 *Vitamines et sels minéraux*

Le taux de sels minéraux dans le mil perlé est plus élevé que dans les autres céréales (1,5-4%) [1]. Le potassium (418 mg) et le phosphore (339 mg) sont avec le fer les constituants les plus

abondants (9,8 mg). La quantité de calcium (37 mg) est de trois à cinq fois plus grande que dans les autres céréales. Des traces de baryum, de chrome, de cobalt, de cuivre, de manganèse, de molybdène, de nickel, d'argent, de strontium, de titane, de vanadium, de zinc, et d'iode ont été également notées (Tableau 1.7).

Une grande variété de vitamines telles que la vitamine A, la thiamine, la niacine et la riboflavine sont présentes dans le grain de mil perlé [5].

**Tableau 1.7:** Constituants mineurs des grains de mil perlé dans 100 g de farine de graines [5].

<i>Constituants mineurs dans 100g de farine de mil</i>	
Lipides (g)	4,8
Sels (g)	2,3
Fibres (g)	1,9
Fibres alimentaires (g)	n.d
<b><i>Vitamines</i></b>	
Vitamine B6	n.d
Vitamine A (mg)	22
Thiamine (mg)	0,31
Riboflavine (mg)	0,19
Niacine (mg)	2,6
<b><i>Sels minéraux</i></b>	
Calcium (mg)	37
Chlorures (mg)	43
Cuivre (mg)	0,5
Fer (mg)	9,8
Magnesium (mg)	114
Manganèse (mg)	0,8
Molybdene (mg)	190
Phosphore(mg)	339
Potassium (mg)	418
Sodium (mg)	15
Zinc (mg)	2,0

### **1.2.6 Conclusion**

Dans ce chapitre, la structure et la morphologie de la panicule et de la graine de mil perlé ont été décrites. La composition du grain est donnée. Un intérêt particulier est donné à la fraction protéique. Dans la partie expérimentale de cette étude, nous nous concentrerons sur la fraction des protéines du sorgho et du mil perlé. Des protéines nouvelles à partir de ces céréales seront isolées, épurées, et caractérisées.

# Chapitre Deux

## Généralités sur les protéines de céréales

### 2.1 INTRODUCTION

Depuis plus d'une dizaine d'année un intérêt particulier est porté à la valorisation alimentaire et non alimentaire des protéines végétales en générale et des protéines de céréales en particulier. Les céréales sont des plantes appartenant pour la plupart à la famille des graminées, elles sont cultivées pour leurs grains comestibles.

Elles doivent leur nom à *cérés*, déesse romaine des moissons. Ce sont : le blé, le riz, le maïs, l'orge, le seigle, l'avoine, les différentes espèces de mil et millet et de sorgho, d'autre part le sarrasin, qui n'est pas une graminée, est aussi considéré comme une céréale

L'un des objectifs principaux de cette dissertation est la valorisation des protéines de sorgho et de mil perlé, par l'isolement, la purification et la caractérisation de nouvelles protéines et la détermination de leur effets ou bioactivités.

Dans ce chapitre, les principales méthodes de caractérisation des protéines de céréales sous formes natives ou modifiées, ainsi que leurs applications, seront présentées.

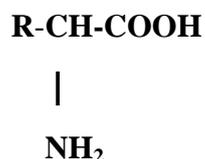
Un intérêt particulier est porté aux propriétés techno-fonctionnelles et bio-fonctionnelles des hydrolysats enzymatiques des protéines de céréales.

### 2.2 STRUCTURES ET CLASSES DES PROTEINES

#### 2.2.1 Les acides aminés

Les acides aminés sont les blocs élémentaires constitutifs des protéines chez toutes les espèces, des bactéries aux humains, les protéines sont composées d'une série de 20 acides aminés standards.

Dix neuf d'entre eux sont des acides aminés comprenant un radical amine (-NH<sub>2</sub>) et un acide carboxylique (-COOH). Les acides aminés sont désignés soit par une abréviation correspondant aux trois premières lettres de leur nom soit par une seule lettre par exemple, la proline sera abrégée en Pro ou P, l'alanine sera abrégée en Ala ou A, l'arginine sera abrégée en Arg ou R [117].



Les 20 acides aminés standards ne diffèrent entre eux que par la structure de leur chaîne latérale ou groupement radical "R". Ils peuvent être regroupés en différentes classes en fonction des propriétés de leur chaîne latérale.

Ils présentent des propriétés physico-chimiques différentes certains sont acides alors que d'autres sont basiques. Certains possèdent des chaînes latérales courtes, d'autres sont polaires. Certains disposent d'une conformation rigide, d'autres peuvent réagir pour former soit une liaison hydrogène soit une liaison covalente, quelques uns ont une importante réactivité chimique [117].

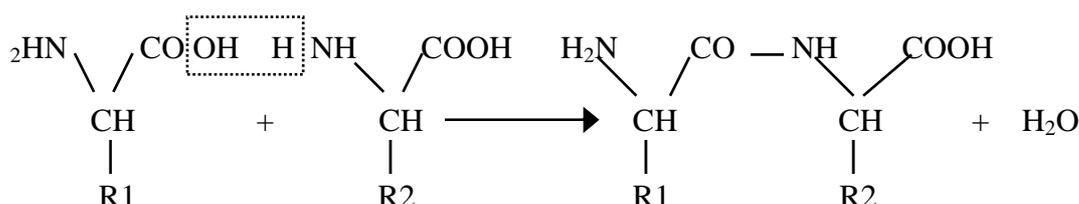
Les acides aminés sont classés en deux familles du point de vue nutritionnel [117]:

- Les acides aminés essentiels: Lysine, Thréonine, Méthionine, Valine, Phénylalanine, Leucine, Isoleucine, Tryptophane, Histidine.
- Les autres acides aminés sont classés non essentiels par les normes de l'O.M.S.

### 2.2.2 Les protéines

Les protéines sont des séquences linéaires d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. La liaison peptidique est une liaison chimique covalente formée entre le groupement amine d'un acide aminé et le groupement carboxyle d'un autre acide (Figure 2.1).

La liaison ainsi formée est dite liaison peptidique



**Figure 2.1:** Formation d'une liaison peptidique

Une fois deux acides aminés unis par une liaison peptidique pour former un peptide, deux groupements restent encore libres. Un groupement aminé à une extrémité et un groupement carboxyle à l'autre extrémité, chacun d'eux pouvant à son tour être lié à d'autres acides aminés.

Ainsi, de longues chaînes linéaires d'acides aminés peuvent se former par des liaisons peptidiques pour constituer des polypeptides. La chaîne polypeptidique se replie pour donner une forme spécifique (conformation) à la protéine, cette conformation est un arrangement tridimensionnel des atomes, déterminé par la séquence des acides aminés, il y'a quatre niveaux de structures dans les protéines: structure primaire, secondaire, tertiaire et parfois quaternaire [117].

### ***2.2.2.1. Structure des protéines***

#### *2.2.2.1.1 Structure primaire*

La structure primaire d'une protéine est la séquence linéaire des acides aminés dans les chaînes protéiques assurée exclusivement par des liaisons peptidiques, covalentes, la détermination de cette structure, donc de l'enchaînement des acides aminés est réalisée au laboratoire comme dans le cas des oligopeptides, par combinaison de méthodes enzymatiques et chimiques [117].

#### *2.2.2.1.2 Structure secondaire*

La structure secondaire désigne un arrangement spatial de la chaîne protéique, qui rend un aspect régulier, ordonné à la protéine, grâce à la formation de liaisons hydrogènes entre les groupes carbonyles – CO et les groupes – NH. Bien qu'un grand nombre de possibilités s'offrent pour la formation des liaisons hydrogènes, seuls quelques types de structures secondaires sont rencontrés chez les protéines types qui correspondent à des configurations préférentielles (hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$ ) [117].

#### *2.2.2.1.3 Structure tertiaire :*

On désigne ainsi la structure spatiale que prend une protéine globulaire par repliement de la chaîne sur elle même, donc elle désigne la façon dont les chaînes polypeptidiques sont courbées dans les trois dimensions pour former les structures compactes et extrémités enroulées des protéines globulaires. Bien que, théoriquement, un grand nombre de structures tertiaires soient possibles, il s'avère en réalité que pour une protéine déterminée, une seule

structure tertiaire est rencontrée à l'état natif. Cette structure permet à la protéine d'assurer de façon efficace son rôle biologique (effet catalytique des enzymes) [117].

#### 2.2.2.1.4 *Structure quaternaire :*

Elle se caractérise par un niveau d'organisation supérieur, par exemple plusieurs chaînes protéiques s'associant pour former un édifice plus complexe. Les protéines sont constituées de sous unités associées pour former des dimères ou oligomères d'ordre supérieur.

L'hémoglobine est ainsi formée de quatre sous unités deux de types  $\alpha$  et deux de types  $\beta$  [117].

#### 2.2.2.2. *Différents types de protéines*

Le nombre de protéines actuellement connu est très grand, seulement une petite partie a été correctement purifiée et séquencée. Certaines protéines comme les albumines et les globulines sont en proportions importantes, elles constituent 60 à 70 % de l'ensemble des protéines. Leur activité biologique est multiple puisqu'elles servent à transporter des substances diverses (acides gras libres, vitamines, hormones...), à maintenir la pression osmotique à la coagulation, à catalyser les réactions biochimiques et à permettre les réactions immunologiques.

Les protéines peuvent être divisées en deux grandes classes en fonction de leur conformation comme suit:

##### 2.2.2.2.1 *Les protéines fibreuses (Scléroprotéines) [117]*

Elles sont constituées de chaînes polypeptidiques rangées parallèlement le long d'un même axe pour former de longues fibres. Elles sont insolubles dans l'eau, de poids moléculaire très élevés, elles constituent les tissus de soutien et de protection (ongles, cheveux).

*Kératine:* Constituant protéique essentiel des cheveux, des poils, des ongles, des sabots des mammifères et des plumes des oiseaux.

Cette protéine est riche en cystéine qui permet la formation de nombreux ponts disulfures. Certaines de ces protéines sont très résistantes aux enzymes protéolytiques, ce qui permet leur emploi comme fibres textiles (soie, laine).

*Fibroïne :* l'exemple type est de la protéine sécrétée par le ver à soie. Elle est particulièrement riche en glycine et alanine, la prédominance de chaînes latérales favorise la structure en feuillets plissés.

Collagène: on donne ce nom au constituant majeur du tissu conjonctif des animaux supérieurs, ses fibres jouent un rôle de soutien essentiel (peau, tendons) et on les rencontre dans la plupart des organes, ou elles contribuent à assurer la solidité des édifices cellulaires.

#### 2.2.2.2 Les protéines globulaires [117]

Parmi lesquelles figurent les protéines douées d'activités biologiques, elles sont souvent solubles en milieu aqueux dans les solutions salines diluées.

Les protéines globulaires sont constituées de chaînes polypeptidiques étroitement repliées, elles sont de forme compacte sphérique ou ovoïde et sont caractérisées par des poids moléculaires variables. Certaines des protéines globulaires possèdent des fonctions de transport comme l'albumine sérique.

### 2.3 LES PROTEINES DE CEREALES

Les graines de céréales sont considérées en agriculture comme matières premières riches en polymères naturels (biopolymères): amidon, protéines, polysaccharides non amidoniens et lipides [1, 2-4]. L'extraction commerciale de ces polymères se fait depuis longtemps par voie sèche, humide et combinaison entre les deux. L'extraction par voie humide permet la séparation de ces biopolymères par tamisage, centrifugation et différence de densité. Cette méthode permet de récupérer l'endosperme qui est constitué principalement de 80% d'amidon [5, 6].

Les céréales ont été cultivées depuis plusieurs millénaires avant notre ère. Le blé est originaire d'Asie mineure, le sarrasin d'Asie centrale, le riz d'Asie et d'Afrique, le maïs est la seule céréale originaire d'Amérique et enfin le mil et le sorgho proviennent principalement d'Asie et d'Afrique [7].

La deuxième composante principale des graines de céréales est la fraction protéique. La teneur en protéines est influencée à la fois par les facteurs génétiques et environnementaux. Selon Osborne, il existe cinq classes de protéines dans les céréales [1, 35, 118]. Les albumines caractérisées par leur solubilité en milieu salin; Les globulines caractérisées par leur solubilité dans l'eau ; les gluténines représentent la fraction soluble dans les solutions alcalines ou acides, les protéines insolubles et enfin les prolamines caractérisées par leur solubilité dans les solvants organiques. Cette dernière famille de protéines est plus abondante dans les céréales. Le tableau 2.1 représente les pourcentages de prolamines dans différentes céréales. Les

prolamines de sorgho sont appelées kafirines et représentent plus de 60 % de la totalité des protéines. Les prolamines du mil sont appelées pennisetines et représentent plus de 40% de la totalité des protéines.

Dans le chapitre précédent 1, les protéines de sorgho et de mil perlé ont été décrites en détail.

**Tableau 2.1** : Pourcentages de prolamines dans plusieurs céréales par rapport aux protéines totales (www.nutramed.com) [118]

<i>Céréale</i>	<i>Prolamine</i>	<i>% de prolamines par rapport aux protéines totales</i>
Froment	$\alpha$ -Gliadine (Gliadin)	69
Seigle	Sécalinine (Secalinin)	30-50
Avoine	Avenine (Avenin)	16
Orge	Hordénine (Hordein)	46-52
Millet	Pennisetine (Pennisetin)	> 40
Mais	Zéine (Zein)	55
Riz	Orzénine (Orzenin)	5
Sorgho	Kafirine (Kafirin)	> 60

Selon Lásztity [119], les protéines de céréales peuvent être classées sur la base de leur solubilité comme précédemment décrit par Osborne, selon la morphologie de la graine, selon leurs propriétés biologiques ou encore selon leurs compositions chimiques.

Sur la base de la morphologie des graines de céréales, les protéines de céréales peuvent être divisées en trois groupes distincts, les protéines de l'endosperme, celles de la couche d'aleurone et enfin les protéines du germe. Dans ces trois parties de la graine, la teneur en protéine est très variable, avec le germe contenant un maximum de 30% des protéines de la graine, directement suivi de la couche d'aleurone avec 20% de protéines. L'endosperme présente la plus faible teneur en protéines. La structure de l'endosperme des différentes graines de céréales est similaire [119], les protéines de stockage (prolamines et glutélines) forment une matrice autour du granule d'amidon, rendant difficile l'extraction de l'amidon. Plusieurs chercheurs ont montrés que la composition en protéines et en acides aminés varie beaucoup de la partie interne à la partie externe de la graine. La richesse en éléments nutritifs est plus accentuée dans les couches externes de la graine.

Selon les propriétés biologiques, les protéines de céréales peuvent être classées en protéines cytoplasmiques à activité métabolique telles que les inhibiteurs d'enzymes, ou en enzymes ou encore en protéines de stockage telles que les prolamines (protéines à faible poids moléculaires) et les glutélines (protéines à poids moléculaires élevés) [119]

La troisième classification est basée sur la composition chimique, les protéines de céréales peuvent être classées en protéines simples ou en protéines complexes (lipoprotéines, glycoprotéines, métalloprotéines, chromoprotéines...etc.). L'existence des complexes protéiques est intéressante, plusieurs chercheurs ont montrés que les protéines complexes d'une part et les interactions protéine-lipide et protéine-glucide, jouent un rôle important dans les propriétés et la valeur technologique des différentes graines de céréales [119].

## **2.4 TECHNIQUES DE SEPARATION ET D'ANALYSE DES PROTEINES DE CEREALES**

Plusieurs techniques ont été utilisées pour caractériser les protéines en général et les protéines de céréales en particulier. L'électrophorèse et la chromatographie sont les principales techniques utilisées pour la séparation et la caractérisation des molécules (protéines, acides nucléiques etc..) [1,120]

### **2.4.1 Techniques électrophorétiques**

En biochimie, l'électrophorèse en gel est utilisée pour séparer les macromolécules biologiques en fonction de leur taille et de leur charge électrique. Le gel est constitué d'une matrice de polymère baignant dans un tampon conducteur. Deux principaux polymères sont utilisés : l'agarose et le polyacrylamide. On peut faire varier la concentration de polymère par rapport à celle du tampon, ainsi que son taux de réticulation. Plus le polymère est concentré et réticulé, et plus la taille des pores du gel est petite. On peut ainsi ajuster les propriétés du gel à la taille des molécules à analyser.

- L'agarose est utilisé à des concentrations de 0,5% à 2% (masse/volume) et permet de séparer des molécules de très grande taille, principalement l'ADN ou l'ARN ;
- Le polyacrylamide est utilisé à des concentrations de 4% à 20% (masse/volume) et permet de séparer des molécules plus petites : protéines, peptides et des fragments d'acides

nucléiques. On peut aussi faire varier sa réticulation (taux de ramification) lors de la polymérisation pour moduler les paramètres de séparation ;

Pour les deux types de polymères, le gel peut être utilisé à l'états natif ou dénaturé. Dans ce second cas, un agent dénaturant est ajouté dans le tampon : un détergent, le sodium dodecyl sulfate (SDS) pour la séparation des protéines (D'où l'appellation: *sodium dodecyl sulfates-poly-acrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE)), et un agent chaotropique: l'urée, pour les acides nucléiques.

On peut aussi faire des électrophorèses en gel d'amidon.

## **2.4.2 Techniques chromatographiques**

La chromatographie en phase liquide à haute performance, connue par l'abréviation anglaise HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). C'est des techniques de séparation analytique ou préparative des molécules d'un composé ou un mélange de composés. Les techniques les plus utilisées pour la séparation des protéines de céréales sont citées ci-dessous.

### **2.4.2.1 La chromatographie d'exclusion stérique (SE-HPLC)**

Les protéines sont séparées selon leur dimension moléculaire. La phase stationnaire est composée d'un matériau poreux (petites particules de silice ou de polymères), les molécules dont le diamètre est supérieur à celui des pores ne peuvent pénétrer et ne sont pas retenues. La durée de séjour dans la colonne augmente lorsque la taille des molécules diminue. Cette technique est souvent utilisée pour séparer les protéines ou les peptides selon leurs masses moléculaires (MM) [120].

### **2.4.2.2 La chromatographie en phase inverse (RP-HPLC)**

En général, la phase stationnaire est majoritairement composée de petites particules de silice sur lesquels on a greffé des fonctions chimiques, le plus souvent de chaînes alkyles à 8 ou 18 atomes de carbones. Les fonctions silanols (Si-OH) qui subsistent engendrent des interactions hydrophiles parasites, qui rendent les résultats non reproductibles surtout pour les molécules basiques. Pour éviter cela, la surface de la silice est généralement recouverte par une fonction méthyle et les fonctions silanols ne sont plus libres mais sous la forme (Si-O-CH<sub>3</sub>), c'est cette étape que l'on appelle "end-capping". Cette phase stationnaire est dite "inverse" car de polaire et hydrophile (sans les "greffes"), la phase devient apolaire et hydrophobe [120].

Cette technique trouve aussi son application dans la séparation des prolamines de céréales en sous unités [121].

### ***2.4.2.3 La chromatographie d'affinité***

Ce mode de chromatographie connaît depuis 1970 un développement sans précédent et est appelé à prendre une place encore plus grande avec l'essor des biotechnologies. Le principe consiste à utiliser une phase stationnaire constituée d'un support (silice, polymère) sur lequel est greffée une molécule organique particulière qui présente une affinité sélective pour certains constituants à isoler d'un mélange. Ceux-ci vont être sélectivement adsorbés ou tout au moins retenus sur la colonne, tandis que les autres composants sont très rapidement élués.

Un changement de la phase mobile (pH, force ionique ou ajout d'un compétiteur) permet ensuite d'éluer les substances intéressantes, avec un facteur de purification pouvant atteindre 1000. La chromatographie d'affinité s'utilise avec des colonnes à basse ou haute pression [120].

### ***2.4.2.4 Electrophorèse capillaire à haute performance et électrophorèse capillaire à zone libre: Free Zone Capillary Electrophoresis (FZCE)***

Les protéines hydrophobes de réserve des céréales peuvent être séparées par FZCE avec la haute résolution en utilisant l'acétonitrile (ACN) comme solvant [122]. Les conditions choisies sont semblables à celles de la RP-HPLC. Les séparations dans les deux systèmes se produisent à bas pH et à concentration élevée en acétonitrile (ACN).

FZCE est actuellement utilisée pour différencier les génotypes de céréales sur la base des profils d'élution uniques des prolamines. La méthodologie peut également être applicable à d'autres protéines hydrophobes qui ont été séparées avec succès par RP-HPLC [122].

Dans toutes les techniques précédemment citées, la séparation des protéines de céréales est effectuée en 10 à 90 min.

## **2.5 QUALITE NUTRITIONNELLE DES PROTEINES**

La qualité nutritionnelle des protéines est définie par plusieurs facteurs connus sous l'appellation "indices de digestibilité", se sont la digestibilité *in vitro* des protéines, le score en acides aminés (AAS) et la digestibilité corrigée des protéines (PDCAAS). Dans cette section les méthodes de détermination de ces indices seront données:

### 2.5.1 Digestibilité *in vitro* des protéines

La valeur nutritive des protéines est souvent déterminée par la simulation *in vitro* de la digestibilité des protéines totales. Des enzymes digestives sont utilisées pour cela, telles que la pepsine ou la trypsine. La digestibilité *in vitro* (Eq. 2.1) est calculée par le pourcentage de l'azote solubilisé sous l'effet de l'action de l'enzyme [123].

$$\% \text{Digestibilité} = \frac{(N_{\text{Echantillon}} - N_{\text{Résidu}}) \times 100}{N_{\text{Echantillon}}} \quad (2.1)$$

### 2.5.2 Score en acides aminés (AAS)

La teneur en acides aminés essentiels dans la fraction protéique donne une idée plus nette sur la valeur nutritionnelle des protéines. Souvent ces deux paramètres (digestibilité *in vitro* et la teneur en acides aminés essentiels) ne sont pas suffisants pour définir la qualité nutritionnelle des protéines. La FAO [124] a défini un autre facteur plus représentatif. Le score en acides aminés (Amino Acid Score (AAS)) représente la mesure des quantités réelles des différents acides aminés dans un aliment, en relation avec le besoin de cet acide aminé. Ce rapport est défini par l'équation 2.2 (Eq. 2.2).

$$\text{AAS} = \frac{\text{AA}(\text{mg} / \text{g} . \text{protéine}) . \text{dans} . \text{la} . \text{protéine}}{\text{AA} . \text{recommandé} . \text{par} . \text{la} . \text{FAO} / \text{WHO} / \text{UNU} (1985) . \text{pour} . \text{les} . \text{enfants} . \text{de} . 2-5 \text{ans}} \quad (2.2)$$

Cependant, AAS n'évalue pas si la protéine est digestible ou pas, et c'est pour palier à cela qu'un autre facteur plus représentatif a été défini "la digestibilité corrigée des protéines" [124].

### 2.5.3 Digestibilité corrigée des protéines (PDCAAS)

Cette nouvelle balance adoptée par la FAO/WHO [124] est appelée digestibilité corrigée des protéines (Protein Digestibility-Corrected Amino Acid Score (PDCAAS)) [125]. Ce facteur est plus représentatif. Le PDCAAS est la concentration de l'acide aminé limite dans la protéine alimentaire, qui est exprimée en la proportion ou le pourcentage de la concentration de l'acide aminé limitant par rapport à l'acide aminé de référence (Eq.2 3):

$$\text{PDCAAS} = \frac{\text{AA}(\text{mg} / \text{g} . \text{protéine}) \times \text{Digestibilité}}{\text{AA} . \text{recommandé} . \text{par} . \text{la} . \text{FAO} / \text{WHO} / \text{UNU} (1985) \text{ pour} . \text{les} . \text{enfants} . \text{de} . 2-5 \text{ans}} \quad (2.3)$$

Ce rapport est lié au besoin en acides aminés pour les enfants en bas âges (2-5 ans) et est employé pour évaluer la qualité alimentaire des protéines pour tous les âges [125].

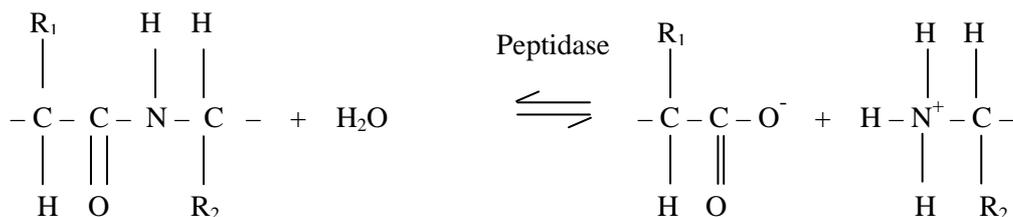
## 2.6 HYDROLYSE ENZYMATIQUE DES PROTEINES

### 2.6.1 Rappels sur l'hydrolyse enzymatique

Toute hydrolyse enzymatique des protéines est influencée par plusieurs facteurs: le substrat protéique, la spécificité de l'enzyme et les conditions de l'hydrolyse.

La structure du substrat protéique est définie par la séquence en acides aminés, le type de protéines globulaires ou fibreuses [126, 127].

La spécificité de l'enzyme protéolytique est aussi un facteur important à prendre en compte durant l'hydrolyse enzymatique. Les enzymes protéolytiques ou peptidases (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) attaquent les liaisons peptidiques tout au long de la chaîne d'acides aminés dans la protéine. L'hydrolyse enzymatique des protéines est catalysée par des peptidases. Deux familles de peptidases peuvent être distinguées: endo et exopeptidases [126-129].



Les exopeptidases attaquent les acides aminés limitrophes dans la protéine. Elles sont dites carboxypeptidases quand elles attaquent l'acide aminé final de la séquence C-terminale, ou aminopeptidases quand elles attaquent l'acide aminé final de la séquence N-terminale.

Les endopeptidases agissent sur les liaisons peptidiques internes dans la séquence de protéines. Les endopeptidases sont encore classées suivant leurs sites catalytiques en: serine endopeptidases (EC 3.4.21.-), thiol ou cystéine endopeptidases (EC 3.4.22.-), aspartique

endopeptidases (EC 3.4.23.-), métallo endopeptidases (EC 3.4.24.-), récemment, un cinquième groupe a été introduit les thréonine-endopeptidases (EC 3.4.25.-).

Le tableau 2.2 rassemble des exemples des quatre classes d'endopeptidases, leurs pH optimum d'activités ainsi que les sites préférentiels d'attaque. Des mélanges techniques d'enzymes sont aussi présentés.

Durant l'hydrolyse enzymatique des protéines un large éventail de peptides est formé. Plusieurs chercheurs ont essayé d'améliorer les propriétés techno-fonctionnelles (solubilité, pouvoir émulsifiant, hydrophobicité) et bio-fonctionnelles (digestibilité, peptides bioactifs) des protéines de céréales, en utilisant plusieurs techniques de modification. L'hydrolyse enzymatique est une technique saine et douce, qui permet de produire des concentrés peptidiques à partir des protéines les plus difficiles à digérer telles que les prolamines de céréales [127-129].

### 2.6.2 Degré d'hydrolyse (D.H)

L'hydrolyse enzymatique des protéines est souvent suivie par la détermination du degré d'hydrolyse (Eq. 2.4) et du taux de peptides formés [126, 127].

.

$$D.H = V_B \cdot N_B \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{1}{M_P} \cdot \frac{1}{h_{tot}} \cdot 100 \quad (2.4)$$

Où  $V_B$  est le volume de base consommée,  $N_B$  est la normalité de la base,  $M_p$  est la masse de protéines en g,  $h_{tot}$  est le nombre de liaisons peptidiques dans le substrat protéique (meq/g),  $\alpha$  est le degré de dissociation moyen des fonctions amines

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK_b}}{1+10^{pH-pK_b}} \quad (2.5)$$

La caractérisation des hydrolysats obtenus par différentes techniques chromatographiques ou électrophorétiques permet l'orientation de leurs applications vers des domaines alimentaires ou industriels [128, 129].

**Tableau 2.2:** Exemples de peptidases utilisées pour l'hydrolyse enzymatique des protéines alimentaires [126- 129].

<i>Type de peptidases</i>	<i>Nom</i>	<i>Source</i>	<i>pH</i>	<i>Spécificité préférentielle</i>
<b>Serine- peptidases</b>				
Animale	Trypsine Chymotrypsine Elastase	Porcine, bovine	7-9 8-9 6-8	P1: Lys, Arg P1: Phe,Tyr,Trp P1: Ala
Bacterienne	Subst. Carlsberg, Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	6-10	Large spécificité, P1 aa hydrophobe
	Substilisine BPN, Substilisine Novo	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	6-10	
<b>Cysteine- peptidases</b>				
Végétale	Papaine Bromelaine Ficine	Papaya latex Pineapple stem Ficus latex	5-8 5-8 5-8	Large spécificité, Généralement P2: aa hydrophobe
<b>Aspartique- peptidases</b>				
Animale	Pepsine	Porcine, bovine	1-4	P1 and P'1: Généralement aa hydrophobe P1 and P'1: Généralement aa hydrophobe
	Chymosine	Calf	4-6	
Champignon	Chymosin-like	<i>Mucor pusillus</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Endothia parasitica</i>	4-6	préférentiellement Glu, Asp, Leu Like pepsin
	Aspergillopeptidase A	<i>Aspergillus saitoi</i>	2-5	
	Newlase	<i>Rhizopus sp</i>	3-6	
<b>Metallo- peptidases</b>				
Animale	Carboxypeptidase A	pancreas	7-8	Terminal a.a. à la fin du peptide, except Pro, Arg, Lys
Bacterienne	Neutral protease Neutrased	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5-7	P'1: Phe, Leu, Val
	Neutral protease, Thermolysin	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	7-9	P'1: Ile, Leu, Val, Phe
<b>Préparations techniques</b>				
Mélange de papaine, chymopapaine, lysozyme	Papaine commerciale	fruit de papaya	5-9	Large spécificité
Mélange de trypsine, chymotrypsine, elastase, carboxypeptidase	Pancreatine	Pancreas (bovine, porcine)	7-9	Très large spécificité
Mélange de endo et exo-protéases, active à pH alcalin et neutre.	Pronase	<i>Streptomyces griseus</i>	7-9	Très large spécificité

## 2.7 UTILISATIONS DES PROTEINES DE CEREALES

Les protéines de céréales trouvent leurs applications dans plusieurs domaines principalement: les domaines alimentaires et industriels. Les céréales sont cultivées pour la farine des graines. Les protéines de réserve des céréales sont valorisées sous forme native ou modifiée. Les propriétés fonctionnelles des protéines de céréales peuvent être exploitées pour produire du pain et des produits alimentaires [2, 4].

Ces protéines ont été également employées pour produire des films biodégradables pour la conservation des fruits [4]. Les prolamines de céréales sont très hydrophobes et peu digestibles, ce qui rend ces films plus stables.

Les céréales constituent aussi une source de protéines à activité physiologique, telles que les enzymes et les inhibiteurs d'enzyme. L'extraction et la purification de ces protéines permet leurs utilisations dans plusieurs domaines alimentaires, pharmaceutiques et industriels. Dans le chapitre 1, de plus amples informations sont données sur les études antérieures dans le domaine et plus particulièrement pour le sorgho et le mil.

L'hydrolyse des protéines de céréales permet l'amélioration de leur solubilité et leur valorisation du fait des propriétés émulsifiantes et stabilisatrices des émulsions qui en résultent. Ces protéines hydrolysées sont donc utilisées dans l'industrie alimentaire et cosmétique. L'hydrolyse est utilisée pour casser la structure des protéines natives et les rendre plus solubles tout en développant leurs propriétés fonctionnelles [130-134].

Pour le blé, l'hydrolyse du gluten entraîne donc des modifications rhéologiques des pâtes, la solubilisation des protéines, le développement de propriétés de stabilisation des mousses ou d'émulsions ainsi que des propriétés émulsifiantes meilleures. L'hydrolyse des protéines du blé peut être obtenue par différents procédés : par hydrolyse acide, basique, enzymatique, isolée ou en combinaison. La taille de peptides obtenus est fonction des paramètres d'hydrolyse utilisés (durée, température, pH, rapport E/S...) donnant des peptides de fonctionnalité différente en fonction du poids moléculaire. Le poids moléculaire des protéines natives s'échelonnant de 25 à 90 kDa, celui des peptides obtenus est donc très variable [130, 132].

En 2007, Guan et coll. [133] se sont intéressés à l'hydrolyse des protéines d'avoine. Ils ont obtenu des hydrolysats avec de meilleures propriétés techno-fonctionnelles (solubilité, pouvoir émulsifiant, pouvoir moussant).

L'hydrolyse enzymatique des protéines d'orge par différentes enzymes permet d'obtenir des hydrolysats avec différents pouvoirs moussants [134].

Les protéines de riz ont été hydrolysées par l'alcalase et la pepsine, les hydrolysats obtenus sont caractérisés par un meilleur pouvoir émulsifiant [135].

En général, les hydrolysats de protéines de céréales trouvent leurs applications dans différents domaines: en diététique infantile et en thérapie nutritionnelle. Souvent les hydrolysats présentent des propriétés meilleures que celles des protéines initiales.

Des peptides bioactifs ont été purifiés de différentes sources d'hydrolysats de protéines de céréales, quelques résultats sont rassemblés dans le tableau 2.3. Les séquences de ces peptides à activité antihypertensive, immunomodulatrice, antioxydante, hypocholestérolique, antibactérienne ainsi que les enzymes utilisées sont répertoriés [136-158].

L' $\alpha$ -kafirine de sorgho a été sujette à une hydrolyse enzymatique en utilisant la chymotrypsine, l'hydrolysats obtenu a exhibé une forte activité anti-hypertensive [156].

Une étude récente sur l'hydrolyse enzymatique des protéines totales de millet a montré que les peptidases et les transglutaminases améliorent la solubilité et les propriétés émulsifiantes des protéines natives [157].

Dans le cadre de la valorisation des prolamines de sorgho et de mil perlé, Nous nous sommes intéressés dans le chapitre 5 à la modification enzymatique de la kafirine de sorgho et de la pennisetine de mil perlé

**Tableau 2.3** Activités bio-fonctionnelles des hydrolysats de protéines de céréales

<i>Source de protéine</i>	<i>Enzyme</i>	<i>Peptide</i>	<i>Activité</i>	<i>Références</i>
Blé: Glutene	Pepsine		Opioïdes	[136]
	Papaine		Antioxydante	[137]
	Mélange d'enzyme		Immunomodulatrice	[138]
	Mélange d'enzyme	GYYP	Opioïde	[139]
	Pepsine, thermolysine	GYYP, GYYP YGGWL,	Opioïde	[140]
	Pepsine, trypsine, chymotrypsine	YPISL	Opioïde	[141]
	Pepsine	LQPGQGQQG AQIPQQ	Antioxydante	[142]
	Alcalase		Opioïde	[143]
	Pepsine		Opioïde	[143]
	Pepsine, pancréatine		Opioïde	[143]
Blé: Protéine de germe	Alcalase		Antioxydante	[144]
Albumine de riz	Trypsine	GYPMYPLPR	Immunomodulatrice	[145], [146]
Prolamine de maïs	Alcalase	FPLEMMPF	Antioxydante	[147]
Zeine de maïs	Alcalase		Antioxydante	[148]
	Papaine		Antioxydante	[148]
	Papaine		Antioxydante	[148]
Blé: gliadine	Pepsine, Protease M	IAP	Antihypertensive	[149]
Germe de blé	peptidase alcaline de <i>B. Licheniformis</i>	IVY	Antihypertensive	[150]
Riz: isolat de protéine	Alcalase	TQVY	Antihypertensive	[151]
Prolamine de maïs	Alcalase	AY	Antihypertensive	[152]
	Pescalase	PSGQYY	Antihypertensive	[153]
Maïs $\alpha$ -zeine	Thermolysine	LRP LSP LQP	Antihypertensive	[154]
Maïs $\gamma$ -zeine	Thermolysine	VHLPPP	Antihypertensive	[155]
Sorgho $\alpha$ -kafirine	chymotrypsine		Antihypertensive	[156]

## **2.8 CONCLUSION**

Dans ce chapitre, nous avons essayé de présenter une revue bibliographique sur les protéines en général et celles des céréales en particulier. Les méthodes les plus connues de caractérisation des protéines de céréales ont été décrites.

Les différentes méthodes de valorisation des protéines de céréales, sous forme native ou modifiée ont été présentées. Les propriétés techno-fonctionnelles et bio-fonctionnelles des hydrolysats de protéines de céréales ont été présentées pour les protéines de blé, de riz, de maïs et autres céréales.



## **PARTIE EXPERIMENTALE**



# Chapitre trois

## Caractérisation et extractabilité des protéines de graines de sorgho et de mil perlé<sup>1</sup>

### 3.1 INTRODUCTION

Les protéines de céréales peuvent être classées selon leurs solubilités en albumines (protéines extractibles dans l'eau), en globulines (protéines extractibles dans les solutions salines), en prolamines (protéines extractibles dans les solutions alcooliques) et en glutélines (protéines solubles en milieux alcalins ou acides) [34].

Les prolamines constituent la majeure partie des protéines de sorgho et de mil perlé. Elles sont appelées kafirines dans le sorgho et pennisetines dans le mil perlé [1, 12, 26, 36, 108, 110]. Comme montré dans la revue bibliographique (Chapitre 1), la composition en kafirines et en pennisetines ont été décrites en détail. Les kafirines sont des polypeptides avec des masses moléculaires (MM) différentes. Les polypeptides de 26 kDa et 23 kDa sont appelés respectivement  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ -kafirines (66-84% des kafirines totales), alors que ceux avec une MM

---

<sup>1</sup> Ce chapitre est basé sur les références suivantes:

**Mokrane, H., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N., Courtin, C. M., Delcour, J. A. & Nadjemi, B. (2010).** Assessment of Algerian sorghum protein quality [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using amino acid analysis and in vitro pepsin digestibility. *Food Chemistry* **121**, 719-723.

**Mokrane, H., Lagrain, B., Gebruers, K., Courtin, C. M., Brijs, K., Proost, P. & Delcour, J. A. (2009a).** Characterization of kafirins in Algerian sorghum cultivars. *Cereal Chemistry* **86**, 487-491.

**Mokrane, H., Brijs, K., Belhaneche-Bensemra, N., Courtin, C. M., Nadjemi, B. & Delcour, J. A. (2008a).** Extractability and characterization of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) proteins from Algerian cultivars. In *Proceeding of AACC International*, Edited by AACC. Honolulu, Hawaii, U.S.A, September, 21-24, 2008, *Cereal Foods World*. pp. A70.

**Mokrane, H., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N. & Nadjemi, B. (2006a).** Extraction of prolamins from sorghum (*Sorghum bicolor*) and effect on in vitro protein digestibility. In *Proceeding of International Congress on Biocatalysis*, Edited by Grote R. & Atranikian G. University of Technology of Hamburg, Hamburg, Germany, September 3 - 7, 2006, pp. 218.

de 20 kDa, 18 kDa ou 16 kDa sont désignés sous le nom de  $\beta$ -kafirine (7-8%) et ceux avec une MM de 28 kDa comme  $\gamma$ -kafirine (9-12%) [36, 40]. Un quatrième groupe,  $\delta$ -kafirine, a été seulement déduit à partir des séquences de DNAs. Deux séquences de  $\delta$ -kafirine ont été rapportées, toutes les deux ont exhibé une homologie élevée avec celle des  $\delta$ -zéïnes de 14 kDa [36]. En revanche, les prolamines de mil perlé, appelées les pennisetines ont attiré moins d'attention. Seulement peu d'études ont déterminé la composition et la caractérisation de ces protéines. Les pennisetines ont été détectées sous trois formes: A-, B- et C-pennisetines [108-110]. Les protéines changent considérablement selon leur l'origine (animale et végétale), leur composition en acides aminés, leur digestibilité.

En Algérie et, en particulier, dans les régions arides du Sahara (Ain Salah, Adrar, Béchar, Touggourt, Timimoun, Tamanrasset et Aoulef Tidikelt), peu d'informations sont disponibles sur les caractéristiques (distribution en fraction protéiques à différentes solubilité, détermination des masses moléculaires, séparation par différence en hydrophobicité, séquence N-terminale) des cultivars algériens de sorgho et de mil perlé en général et sur leurs protéines en particulier. Le but de la présente étude est de fractionner et de caractériser les protéines dans différents cultivars algériens de mil perlé et de sorgho et avec un intérêt particulier pour leurs prolamines. Les méthodes de SE-HPLC, de RP-HPLC et de SDS-PAGE, à l'origine développées pour séparer et analyser les protéines de blé, ont été appliquées avec quelques modifications mineures aux cultivars algériens de sorgho et de mil perlé.

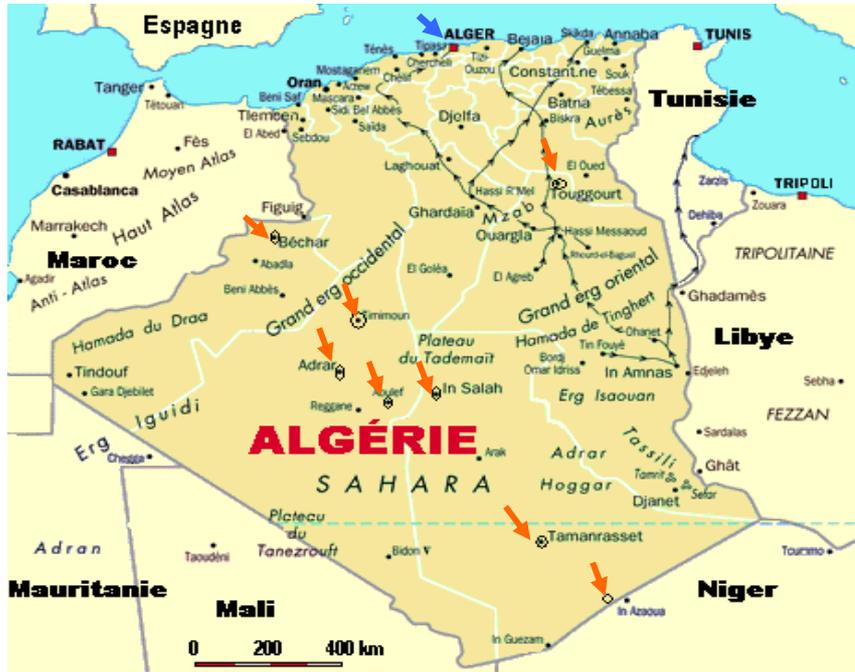
## 3.2 MATERIELS ET METHODES

### 3.2.1 Echantillonnage et description des graines de cultivars de sorgho et de mil perlé

Les graines de sept échantillons de sorgho issus de cinq cultivars locaux (Tafsout el beida, Tafsout el hamra, Tafsout esaouda, Tafsout et Tafsout El Mekhalta) de couleur et de forme différentes ont été échantillonnés en 2005 du Sud de l'Algérie dans des zones à climat très aride: Ain Salah, Aoulef, Béchar et Touggourt (Figure 3.1). Les échantillons ont été désignés par les codes suivants AS1, AS2, AS3, AT1, AT2, SB1 et T1.

Onze échantillons de mil perlé de différentes couleurs et formes issus de différents cultivars (El beldia etwillia, El beldia elksira, Bechnet Essoudan, Elbechna El Mekhelta, Bechnat Touat) ont été prélevés dans des régions arides du Sahara Algérien (Ain Salah, Béchar, Timimoun, Aoulef et Tamanrasset) (Figure 3.1). Les échantillons de mil perlé ont été

désignés par les codes suivants de PM1 à PM11. où PM1, PM2, PM3 et PM6 représentent les échantillons d'origines locales de la région d'Ain Salah. PM4 provient d'Aoulef, PM5 de Timimoun, PM7 de Béchar, PM8 de Tamanrasset et PM9, PM10 et PM11 sont d'origine commerciale et sont connus par l'appellation Elbechna El Mekhelta. Tous les échantillons de mil perlé ont été moissonnés en 2005.



**Figure 3.1:** Carte de l'Algérie avec indications des sites d'échantillonnage de sorgho et de mil perlé (Flèches rouges).

Le tableau 3.1 rassemble une description des graines de cultivars de mil perlé et de sorgho échantillonnés.

**Tableau 3.1:** Description des graines des cultivars de mil perlé et de sorgho échantillonnés

<b>Codes des cultivars de sorgho</b>	<b>Origine</b>	<b>Pigmentation</b>	<b>Codes des cultivars de mil perlé</b>	<b>Origine</b>	<b>Pigmentation</b>
AS1	Ain Salah	Blanc	PM1	Ain Salah	Jaune verdâtre
AS2	Ain Salah	Mélangé	PM2	Ain Salah	Jaune verdâtre
AS3	Ain Salah	Rouge	PM3	Ain Salah	Jaune verdâtre
AT1	Aoulef	Blanc	PM4	Aoulef	Jaune verdâtre
AT2	Aoulef	Blanc	PM5	Timimoun	Jaune
SB1	Béchar	Blanc	PM6	Ain Salah	Jaune verdâtre
T1	Touggourt	Noir	PM7	Béchar	Jaune orange
			PM8	Tamanrasset	Gris
			PM9	Commercial	Jaune
			PM10	Commercial	Jaune
			PM11	Commercial	Jaune

Les grains de mil perlé et de sorgho ont été transformés en farine (mouture) dans un moulin de type Cyclotec 1093 (Tecator, Hogänäs, Suède), les farines obtenues ont été manuellement tamisées à travers un tamis de 400µm. Tous les produits chimiques et réactifs proviennent de Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique) et sont de grade analytique.

### 3.2.2 Analyse du taux de protéines et du taux d'humidité

Les teneurs en protéines dans les différentes moutures des cultivars de sorgho et de mil perlé ainsi que dans les extraits de protéines ont été déterminées en utilisant la méthode de combustion de Dumas, une adaptation de la méthode officielle de l'AOAC [158] dans un système automatisé d'analyse de protéine de Dumas (EAS, VarioMax N/CN, ELT, Gouda, Hollande), en utilisant 6,25 comme facteur de conversion (Johns and Brewster, 1916). L'analyse de l'humidité a été effectuée selon la méthode 44-1 de l'AACC [159].

### 3.2.3 Extraction séquentielle des protéines de sorgho et de mil perlé

Dans le but d'améliorer l'extractabilité des protéines de sorgho et de mil perlé, les lipides contenus dans la farine de mil perlé et de sorgho sont éliminés avec du n-hexane (1:10, m/V) à température ambiante et sous agitation pendant 24 h. La farine est récupérée par filtration et séchée à l'air libre sous une hotte à température ambiante. Les protéines sont ensuite séquentiellement extraites de la farine dégraissée (500 mg) en utilisant différents solvants

(10,0 ml) pendant 30 min, les protéines extraites sont alors récupérées par centrifugation (10 minutes, 8000 g). Les surnageants, chacun contenant une fraction différente de protéines selon le solvant utilisé, ont été rassemblés, alors que les résidus sont ensuite extraits au moyen du prochain solvant. Ainsi, les albumines (A) ont été extraites au moyen de l'eau déminéralisée à température ambiante, les globulines (G) à partir du résidu avec 5,0 % (m/V) de chlorure de sodium aqueux à température ambiante, et les prolamines ont été extraites à l'état non-réduit (PNR) à partir du deuxième résidu avec de l'éthanol aqueux 70% (V/V) à 60°C [160]. Le résidu obtenu après centrifugation est alors extrait avec le même solvant mais en présence d'un agent réducteur, pour solubiliser les prolamines résiduelles et dépolymériser les prolamines en sous unités. Une première fraction réduite de prolamine (PR1) a été extraite au moyen de 1.0% (V/V)  $\beta$ - mercapto-éthanol en présence d'éthanol aqueux 70% (V/V) à 60°C. Une seconde fraction de protéines hautement polymérisées appelées glutélines est réduite et extraite à température ambiante en présence d'urée 6 M contenant 2 % (m/V) SDS, et 1 % (m/V) du dithiothreitol (DTT) [121,161]. Cette dernière fraction désignée sous le nom de PR2 est extraite sous azote pour éviter les réactions d'oxydation et la dépolymérisation des protéines. Pour l'électrophorèse et le transfert des protéines, les albumines et les globulines ont été extraites d'abord en utilisant le chlorure de sodium aqueux à 5 % (m/V), le résidu après la centrifugation est ensuite extrait au moyen de 1 % (V/V) de  $\beta$ -mercaptoéthanol dans de l'éthanol aqueux 70% (V/V) à 60°C donnant lieu à une fraction réduite de prolamines (PNR+PR1), correspondant aux fractions PNR et PR1 combinées. PR2 a été alors extraite à température ambiante avec de l'urée 6 M contenant 2 % (m/V) de sodium dodecyle sulfate (SDS), et 1 % au dithiothreitol (DTT) (m/V). Toutes les étapes d'extraction ont été répétées deux fois pendant 30 minutes. Les fractions extraites ont été désignées selon les conditions d'extraction et le cultivar : par exemple, le code A<sub>AS1</sub> est employé pour la fraction d'albumine du cultivar AS1. Les fractions de protéines extraites sont alors fraîchement analysées.

### 3.2.4 Electrophorèse (SDS-PAGE)

Les cinq fractions de protéines (A, G, PNR, PR1 et PR2) des cultivars de sorgho et de mil perlé sont dispersées dans une solution de Tris-HCl à pH 6,8 contenant du glycérol (125 mM), Tris (30%) (g/ml), du SDS (4,0%) (g/ml), et du bleu de bromophénol (0,002%) (g/ml). Les échantillons sont portés à ébullition pendant 5 minutes, centrifugés à 11.000 g pendant 3 minutes. L'électrophorèse a été effectuée sur un gel de polyacrylamide 17% à haute densité pour le PNR+PR1 en utilisant une unité puissante de Hoeffler (GE Healthcare, Upsal, Suède).

Tous les gels ont été colorés avec du nitrate d'argent ou du bleu de Coomassie Brillant. Les marqueurs à faibles poids moléculaires (GE Healthcare) utilisés lors de l'électrophorèse sont:  $\alpha$ -lactalbumines (14,4 kDa), inhibiteur de trypsine (20,1 kDa), anhydrase carbonique (30 kDa), ovalbumine (43 kDa), albumine de sérum (67 kDa) et phosphorylase (94 kDa).

### 3.2.5 Chromatographie liquide à haute performance d'exclusion stérique (SE-HPLC)

La chromatographie à haute performance d'exclusion stérique (SE-HPLC) des fractions protéiques extraites est effectuée en utilisant un système LC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japon) équipé d'une injection automatique. Les fractions extraites sont injectées (30  $\mu$ l) sur une colonne Biosep-SEC-S4000 (Phenomenex, Torrance, CA, Etats-Unis). La phase mobile est un mélange d'acétonitrile et d'eau (1:1, v/v) (acétonitrile (ACN)/eau déminéralisée), contenant 0,05% (v/v) d'acide trifluoroacétique (TFA) [162]. Le débit est fixé à 1,0 ml/min sous une température de 30°C. La détection des protéines est effectuée à 214 nm. Le taux relatif de chaque fraction de protéine extraite est calculé par le rapport de l'aire du chromatogramme sur la somme des aires des chromatogrammes de toutes les fractions extraites de protéines. La colonne est calibrée avec quatre marqueurs de poids moléculaires différents: catalase (232 kDa), aldolase (158 kDa), ovalbumine (43 kDa) et ribonucléase (13.700 Da) (Sigma-Aldrich). Une courbe d'étalonnage est tracée à partir des poids moléculaires des marqueurs et de leurs temps respectifs d'élution ( $R^2=0,99$ ). Des aliquotes d'échantillons contenant approximativement 0,1% de protéines ont été dissoutes dans la phase mobile, et l'élution est suivie en enregistrant les absorbances à 214 nm.

### 3.2.6 Chromatographie liquide à haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

Pour les cultivars de sorgho, une aliquote de 100  $\mu$ l de chaque fraction PNR, PR1 et PR2 est injectée dans une colonne Vydac C18 5 $\mu$ m, 300Å (Grace, Hesperia, CA, Etats-Unis). La colonne est équilibrée avec 25% de solvant A [ACN contenant 0,1% (V/V) de TFA] et 75% de solvant B [l'eau déminéralisée contenant 0,1% (V/V) de TFA].

Pour les cultivars de mil perlé une aliquote de 100  $\mu$ l de chaque fraction PNR+PR1 et PR2 est injectée dans une colonne Nucleosil 300-5 C8 column (Machery-Nagel, Düren, Germany). La colonne est équilibrée avec (30% A) et (70% B) avec les mêmes solvants utilisés précédemment. Le gradient d'élution utilisé est l'acétonitrile de 30 à 70% A.

Pour les deux céréales, les protéines sont éluées à 50°C, la séparation est suivie en enregistrant des absorbances à 214 nm.

### 3.2.7 Détermination de la séquence N-terminale des kafirines

Les prolamines réduites (PNR+PR1) et les marqueurs de masses moléculaires sont séparés en premier par SDS-PAGE sur un gel de polyacrylamide 17% à haute densité en utilisant une unité puissante de Hoeffler (GE Healthcare) et ensuite électro-transférées sur une membrane de PVDF avec la cellule électrophorétique de transfert Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, Etats-Unis) (différence de potentiel électrique de 15 V) pour 1 h et à température ambiante (20°C). Les protéines de la fraction PNR+PR1 ont été ensuite soumises à la dégradation d'Edman. L'analyse de la séquence N-terminale est effectuée sur un compteur séquentiel de Procise LCC 491 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### 3.2.8 Traitement statistique des données

Toutes les analyses statistiques ont été exécutées en utilisant le logiciel système d'analyse statistique 8.1 (SAS, Cary, Or, USA) en utilisant un procédé multiple de comparaison Tukey avec un niveau de signification de 5% [163].

## 3.3 RESULTATS ET INTERPRETATIONS

### 3.3.1 Résultats de l'analyse du taux de protéines et d'humidité

Un large éventail de teneurs en protéines a été obtenu (10-18%) pour les cultivars de mil perlé et de sorghos étudiés (Tableau 3.2). Les protéines de mil perlé et de sorgho ont été séparées et extraites selon leurs solubilités dans différents solvants en cinq fractions : (1) les albumines (A) qui représentent 4 à 20% de la fraction protéique, (2) les globulines (G), qui représentent 7 à 13%, (3) les prolamines (PNR), qui représentent 30 à 40% pour les mils perlés et de 14 à 28 % pour les sorghos, (4) les prolamines après réduction (PR1) représentent respectivement 10 à 15 % pour le mil perlé et 18 à 28% pour le sorgho, et enfin (5) les glutélines (PR2) 20 à 50% avec des teneurs variables entre les cultivars de sorgho et de mil perlé (Figures 3.2 et 3.3).

Les teneurs en protéines totales dans les cultivars de sorgho s'étendent de 12,1 (cultivar AS3) à 16,4% (cultivar SB1) avec une moyenne de 14,0 % (Tableau 3.2). Ces teneurs en protéines sont calculées sur la base de la matière sèche, pour cela les taux d'humidités ont été déterminés dans tous les échantillons de sorgho et de mil sont rassemblés dans le tableau 3.2. Les taux d'humidités varient de 7 à 10,5 %, ces valeurs sont comprises dans les intervalles de valeurs citées dans la littérature [7].

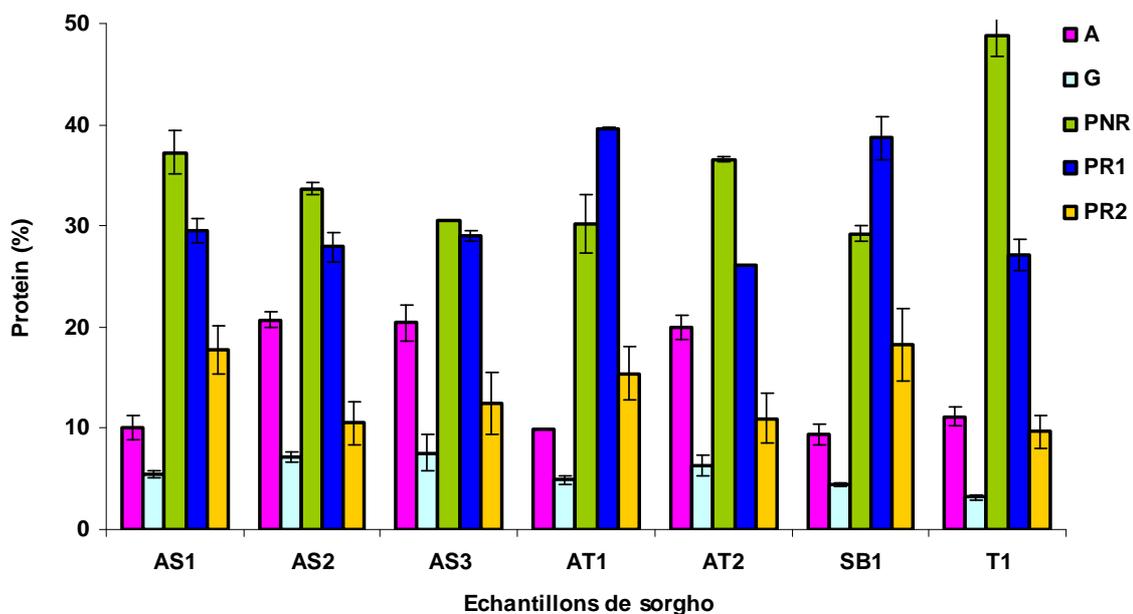
**Tableau 3.2:** Pourcentages de protéines et d'humidités dans les grains des différents cultivars de sorgho et de mil perlé (% matières sèches).

Cultivars de sorgho	Taux de protéines (%)	Humidité (%)	Cultivars de mil perlé	Taux de protéines (%)	Humidité (%)
AS1	13,5 ± 0,3 c,d,e	8,14	PM1	11,8 ± 0,8 c	9,15
AS2	14,8 ± 0,7 b,c	9,92	PM2	12,3 ± 0,3 c	7,99
AS3	12,1 ± 0,3 e	10,49	PM3	18,2 ± 0,8 a	7,72
AT1	13,8 ± 0,4 b,c,d	10,20	PM4	13,1 ± 0,4 b,c	8,11
AT2	12,6 ± 0,4 e,d	9,08	PM5	17,4 ± 0,2 a	8,78
SB1	16,4 ± 0,2 a	7,32	PM6	14,5 ± 0,0 b	9,21
T1	15,1 ± 0,9 a,b	9,13	PM7	17,4 ± 0,2 a	7,02
			PM8	11,1 ± 0,5 c	9,25
			PM9	11,2 ± 0,6 c	9,41
			PM10	12,4 ± 0,5 b,c	8,60
			PM11	12,0 ± 0,7 c	8,72

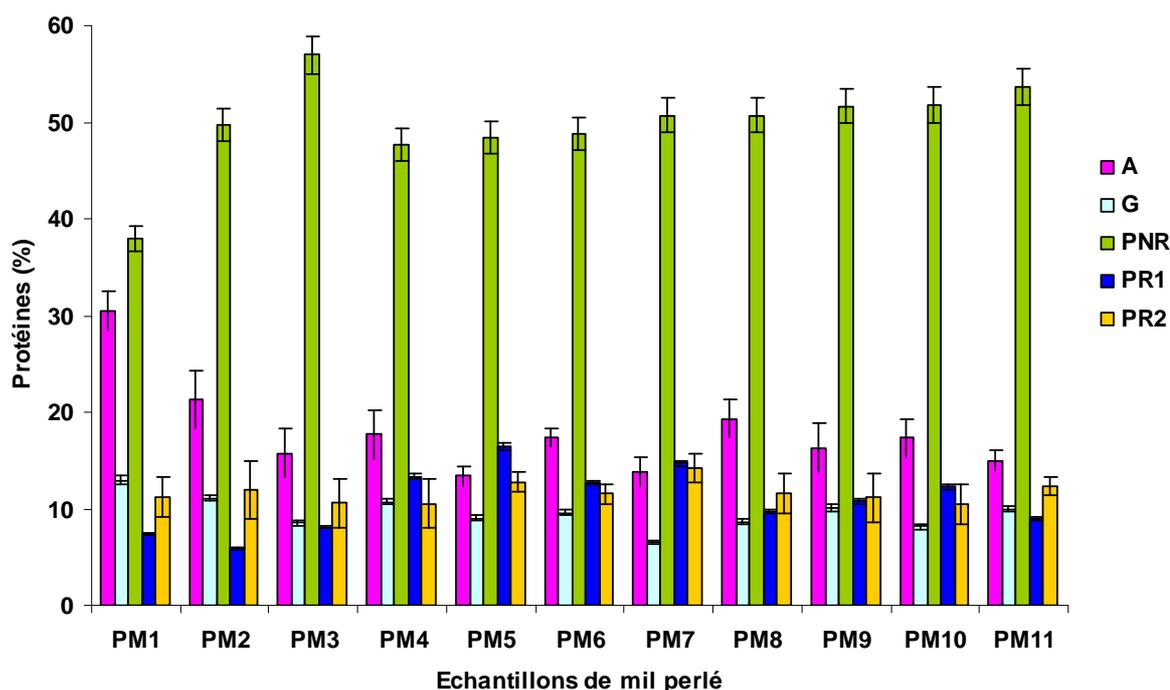
Pour les sept cultivars de sorgho, la figure 3.2 montre la distribution des taux de protéines dans les fractions extraites, comme calculé à partir des aires de SE-HPLC les taux d'albumines et de globulines sont inférieurs à ceux des protéines de stockage pour tous les échantillons de sorgho. Les cultivars de sorgho rouge et mélangés AS2, AS3 et AT2 présentent des proportions plus élevées en albumines et en globulines (approximativement de 26 à 28 % du pourcentage de protéine extractible) les autres cultivars exhibent des niveaux de protéines plus faibles, le sorgho noir T1 provenant de Touggourt donnent le plus bas pourcentage (14,0 %). La somme des fractions de prolamine PNR, PR1 et PR2 pour les cultivars de sorgho s'élèvent respectivement à environ 72 % (AS3) et à 86 % (AS1) de toutes les protéines extraites. La fraction la plus abondante est la fraction de prolamine non réduite PNR. Les prolamines fortement réticulées ont été libérées dans la fraction PR2, avec pour les différents cultivars, des niveaux variables de 10 % dans le génotype noir du Touggourt (T1), à 18 % dans SB1, le sorgho blanc de Béchar (Figure 3.2). L'analyse du taux de protéines totales extraites par la méthode Dumas montrent que les fractions extraites A + G + PNR + PR1 varient de 60 % (T1) à 75 % (AT2) des protéines totales. L'extraction la plus efficace a été obtenue pour les cultivars de Tidikelt [164].

La teneur en protéines dans les grains de mil perlé est comparable à celle du maïs. En bibliographie, des teneurs élevées en protéines allant à 17% ont été détectées dans le grain de mil perlé [7]. Dans les cultivars algériens de mil perlé (Tableau 3.2), un éventail large de teneurs en protéines a été obtenu, des valeurs élevées de 18,2 %, 17,4 % et 17,4% respectivement pour les cultivars provenant d'Ain Salah (PM3), de Timimoune (PM5) et de Béchar (PM7). La figure 3.3 représente la distribution du taux de protéines dans les différentes fractions extraites des onze cultivars de mil perlé.

Comme précédemment observé pour le sorgho, la somme des pourcentages d'albumines et de globulines est inférieure à celle des protéines de réserve pour tous les échantillons de mil perlé. Les taux varient de 21 % (PM7) à 44 % (PM1). Les fractions de protéines PNR, PR1 et PR2 constituent la majeure partie dans tous les cultivars de mil perlé mais avec des niveaux variables de 57 % (PM1) à 78 % (PM5) avec PNR représentant la fraction de prolamines la plus abondante. Les prolamines réticulées, représentées par la fraction PR1, sont très faibles dans les cultivars de mil perlé PM2 (6%) à PM5 (16 %). Ainsi, la fraction principale de prolamine est extraite par l'éthanol 70% sans ajout d'agent réducteur (PNR). Les protéines fortement réticulées ou glutélines (PR2) sont du même ordre que les prolamines réduites (PR1) ou légèrement plus élevées. La fraction de prolamines dans les cultivars de mil perlé semble être plus facilement extractible que la fraction de prolamines du sorgho (Figures 3.2 et 3.3).



**Figure 3.2:** Variabilité de la composition en protéines dans les différentes fractions de protéine extraites du sorgho. A: Albumine, G: Globuline, PNR: Prolamine, PR1: prolamine réduite et PR2: Glutéline.



**Figure 3.3:** Variabilité de la composition en protéines dans les différentes fractions de protéine extraites du mil perlé. A: Albumine, G: Globuline, PNR: Prolamine, PR1: prolamine réduite et PR2: Glutéline.

L'analyse des fractions de protéines dans les cultivars de mil perlé par la méthode Dumas montre que les taux de protéines totales extraites A + G + PNR + PR1 varient de 62 % (PM4) à 77 % (PM11) du taux de protéines totales. L'extraction la plus efficace a été obtenue pour les cultivars commerciaux et ceux provenant de Timimoune (PM5) et de Tamanrasset (PM8) et l'efficacité d'extraction est comparable à celle du sorgho.

Une nette différence dans les taux de prolamines, a été observée entre les fractions protéiques de sorgho et de mil perlé. Comme le montrent les figures 3.2 et 3.3, les prolamines de sorgho (PNR+PR1) sont plus abondantes que dans le mil perlé, représentant une totalité allant jusqu'à 70% contre seulement 50 à 60% pour les cultivars de mil perlé.

En outre, les prolamines de mil perlé sont approximativement totalement extraites par l'éthanol 70% sans ajout d'agents réducteurs, contrairement au sorgho, la fraction extraite après addition d'un agent réducteur (PR1) est très faible dans le mil perlé comparée au sorgho (Figure 3.2 et 3.3).

Ces résultats semblent montrer que les prolamines de sorgho présentent plus de polymérisations à travers des ponts disulfures entre les sous unités de protéines de sorgho que

dans les protéines de mil perlé, pour confirmer cela une analyse plus détaillée par SDS-PAGE et SE-HPLC a été effectuée sur toutes les fractions protéiques.

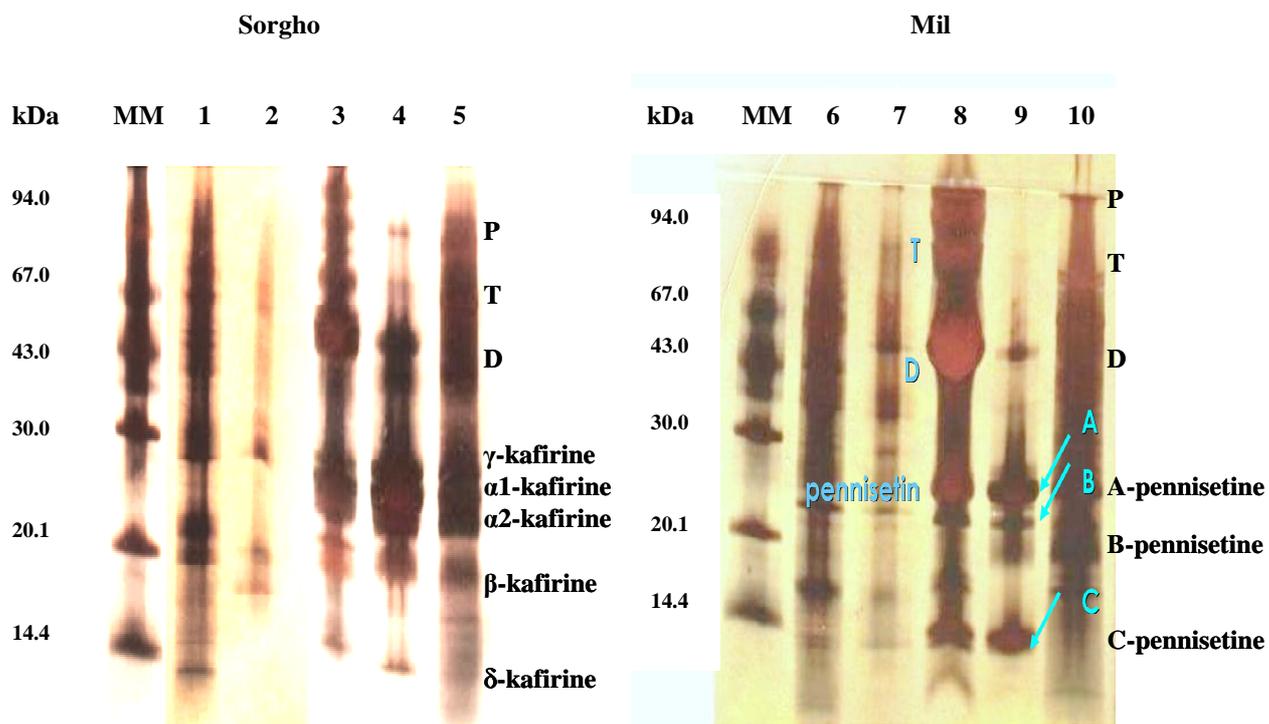
### 3.3.2 Profils de SDS-PAGE

Dans le but de déterminer les masses moléculaires des sous-unités de protéines de sorgho et de mil perlé, les profils de SDS-PAGE de toutes les fractions de protéine extraites: A, albumine; G, globuline; PNR, prolamine non réduite; PR1, prolamine réduite et PR2, protéine résiduelle réduite ont été déterminés pour le sorgho blanc (AS1) et le mil perlé (PM3). Les sous unités de la protéine principale de réserve dans le sorgho (kafirine) et celles du mil perlé (pennisetine) sont distinguées (Figure 3.4).

Les deux fractions albumine dans le sorgho (Figure 3.4, ligne 1) et le mil perlé (Figure 3.4, ligne 6) donnent lieu à un éventail de bandes de protéines avec des masses moléculaires différentes.

Les globulines de sorgho (Figure 3.4, ligne 2) et de mil perlé (Figure 3.4, ligne 6) apparaissent comme une série de bandes de faible intensité par rapport aux albumines.

Les fractions de prolamines de sorgho extraites sans agent réducteur (PNR, Figure 3.4, ligne 3) et avec agent réducteur (PR1, Figure 3.4, ligne 4) exhibent des profils semblables à ceux obtenus par plusieurs chercheurs [41, 165]. Dans la fraction du sorgho PNR, les prolamines apparaissent en tant que bandes monomériques correspondant à  $\gamma$ -,  $\alpha 1$  -,  $\alpha 2$  -, et  $\beta$ -kafirines avec respectivement des MM de 28 kDa; 26 kDa; 23 kDa et 18 kDa. La bande additionnelle à 14 kDa est soupçonnée d'être la  $\delta$ -kafirine, dont l'existence potentielle a été mentionnée pour la première fois par Shewry et Halford [107] et Izquierdo et Godwin [166] et ensuite par Belton et coll. [36] basés sur la comparaison des séquences d'acides aminés des kafirines et des zéines déduites des séquences d'ADN. Comme indiqué par Belton et coll. [36] et à notre connaissance, aucune étude n'a identifié la  $\delta$ -kafirine en tant que protéine (Figure 3.4). Une caractérisation plus détaillée de cette protéine est présentée dans les prochains paragraphes.



**Figure 3.4:** SDS-PAGE pour le cultivar (AS1) de sorgho et le cultivar de mil perlé (PM3). Ligne 1 et 6: Albumine (A), ligne 2 et 7: Globuline (G), ligne 3 et 8: Prolamine extraite sans agents réducteurs (PNR), ligne 4 et 9: Prolamine extraite avec agents réducteurs (PR1), ligne 5 et 10: Glutélines (PR2). Avec indication des sous unités  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ -kafirine pour le sorgho et A, B- et C-pennisetine pour le mil perlé. P: polymers, T: trimers et D: dimers. MM représentent les marqueurs à faibles poids moléculaires

Peu d'études ont caractérisé les protéines de mil perlé. Marcellino et coll. [108] ont signalé que, comme dans presque toutes les céréales, la fraction de protéines de réserve de graine la plus abondante se compose des prolamines, une classe des protéines extractibles dans les solutions alcooliques. Dans le mil perlé, la pennisetine est la fraction principale de prolamine et constitue plus de 40% des protéines de réserve dans la graine de mil perlé. Les prolamines des cultivars algériens de mil perlé donnent des profils comparables à ceux rapportés précédemment par Hadimani et coll. [167] et Marcellino et coll. [108]. Les profils de SDS-PAGE des prolamines de mil perlé (Figure 3.4, lignes 8 et 9) donnent lieu à trois bandes 25, 22 et 10 kDa (Figure 3.4). A-, B- et C-pennisetines ont été clairement distinguées dans les bandes de protéines de 25, 22 et 12 kDa. Dans la fraction PR1 (Figure 3.4, ligne 9), l'ajout de  $\beta$ -mercaptoéthanol a réduit le niveau des dimères, des trimères et des oligomères de A-, B-, et C-pennisetine. Dans la fraction PR2, en plus des formes A-, B- et C-pennisetines, un éventail de nouvelles protéines sont détectées. Ce sont probablement les glutélines fortement réticulées (Figure 3.4, ligne 10). Aucune information sur cette fraction n'a été trouvée sur ces protéines

pour le mil perlé. Il serait intéressant de s'approfondir la caractérisation de cette fraction protéique aussi bien dans le sorgho que dans le mil.

### 3.3.3 Profils de chromatographie liquide à haute performance d'exclusion stérique (SE-HPLC)

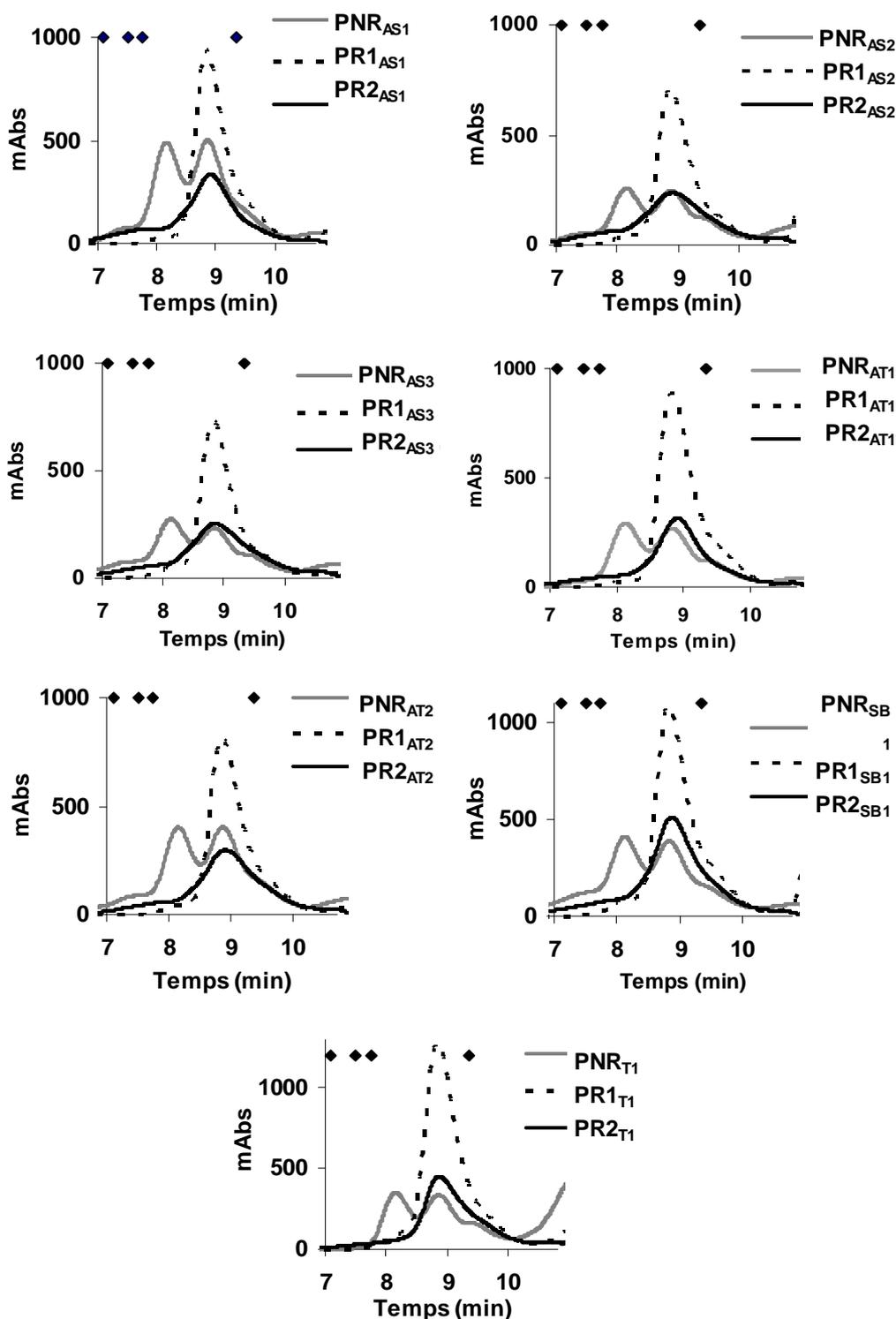
De plus amples informations peuvent être obtenues en éluant les fractions majoritaires PNR, PR1 et PR2 en colonne de chromatographie d'exclusion stérique (SE-HPLC). Les profils de SE-HPLC obtenus pour le sorgho et le mil perlé représentés, respectivement, dans les figures 3.5 et 3.6, permettent la séparation des différentes fractions par ordre décroissant de masses moléculaires.

Pour tous les cultivars de sorgho, les profils de SE-HPLC indiquent que les fractions de PNR apparaissent comme deux principaux pics correspondant à 50,6 kDa et à 21,7 kDa, respectivement. En revanche, les fractions PR1 et PR2 donnent lieu à un grand pic simple correspondant à 22,2 kDa, mais également à un petit pic à environ 51 kDa. Ce dernier représente probablement un dimère de  $\alpha$ -kafirine qui représente 66 à 84% de la totalité des kafirines [164]. Le pic principal à 22,2 kDa représenterait les monomères réduits des kafirines fortement réticulées qui sont seulement devenus extractibles après ajout des agents réducteurs (fraction PR1) et l'utilisation associée du SDS, de l'urée et de conditions réductrices plus sévères (fraction PR2). Le polypeptide avec une MM de 50,6 kDa apparaissant dans toutes les fractions de PNR des différents cultivars de sorgho (Figure 3.5) peut correspondre à un dimère de protéines de MM 21,7 kDa (probablement  $\alpha$ -kafirine) et 28 kDa (probablement  $\gamma$ -kafirine) liés avec des liaisons de covalence. Duodu et coll. [29] ont rapporté que la forme  $\alpha$ -kafirine contient plus de résidus de cystéine que les autres types. Par conséquent, elle est plus sujette à former des liaisons disulfures avec les autres polypeptides. Quand la fraction PNR est réduite après extraction, elle donne lieu seulement à un seul pic avec une MM apparente de 22 kDa (résultats non montrés). Ceci confirme que le pic de MM 50,6 kDa dans le profil d'éluion de la fraction de PNR contient réellement des protéines sous forme polymérisée comme supposé auparavant [168].

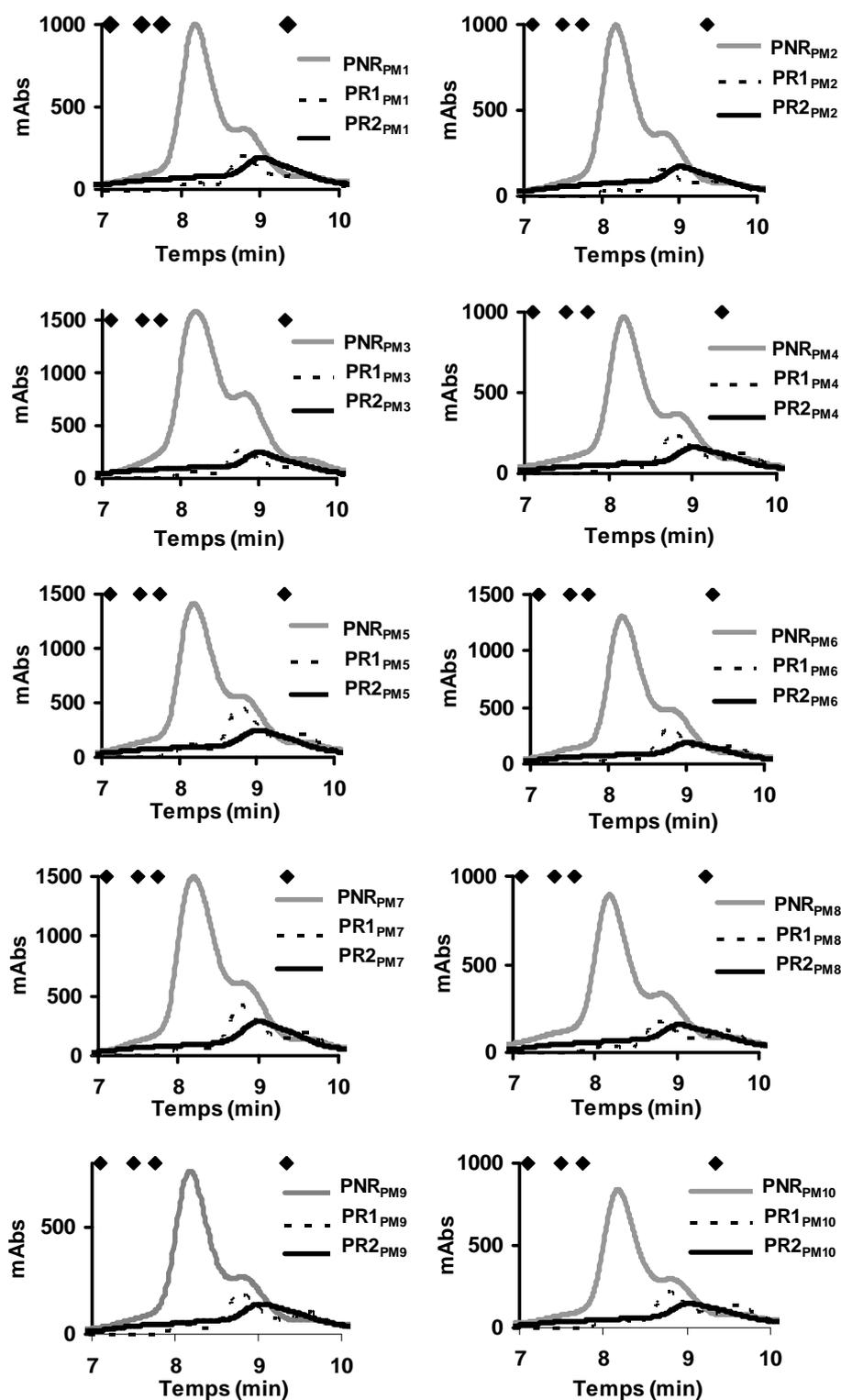
La figure 3.6 représente les profils de SE-HPLC des prolamines dans les cultivars algériens de mil perlé. Comme le sorgho, la fraction PNR est la plus abondante, mais avec des niveaux plus élevés. Cependant, dans tous les cultivars de mil perlé, les fractions de PNR apparaissent sous forme de trois pics, correspondant à 47 kDa, à 21 kDa et à 10 kDa. Ces pics représentent

probablement des trimères, dimères et monomères des trois prolamines principales A-, B- et C-pennisetine.

Les fractions PR1 et PR2 extraites du mil perlé (Figure 3.6) montrent la présence des formes monomériques de A-, B- et C-pennisetines avec des valeurs de masse autour de 25, 22 et 12 kDa, respectivement. Les formes A- et B- pennisetines ne peuvent pas être distinguées l'une de l'autre dans les profils SE-HPLC parce qu'elles ont des MM très proches. Le petit pic à 8 minutes correspondrait à une forme restante de dimère (47 kDa). La dernière fraction (PR2) apparaît dans un seul pic qui représente vraisemblablement les formes de pennisetine fortement liées. Cette dernière nécessite pour être extrait des conditions sévères de réductions telles que le SDS et l'urée en présence d'agent réducteur DTT pour être extractible sous forme monomère [169]. A défaut d'études comparables pour le mil perlé, cette fraction n'a pas été comparée à la littérature. Cette étude pionnière peut constituer une base à la connaissance et à la valorisation des protéines du mil perlé.



**Figure 3.5:** Profil de chromatogramme d'exclusion stérique (SE-HPLC) pour les fractions protéiques des cultivars de sorgho: PNR (—) fraction extraite avec 70% éthanol, PR1 (- - -) fraction extraite avec 70% éthanol en présence de 1%  $\beta$ -mercaptoéthanol et PR2 (—) fraction extraite avec 6M d'urée en présence de 2% SDS et 1% DTT. Les temps de rétention des marqueurs de masses moléculaires sont représentés par les losanges sur le chromatogramme et représentent de gauche à droite 232, 158, 43 et 13,7 kDa. La phase mobile est de l'acétonitrile (ACN)/eau déionisée (1:1, v/v), les deux contiennent 0,05% (V/V) d'acide trifluoroacétique (TFA). Le débit est de 1,0 ml/min. L'élution des protéines est suivie à 214 nm à une température de 30°C.

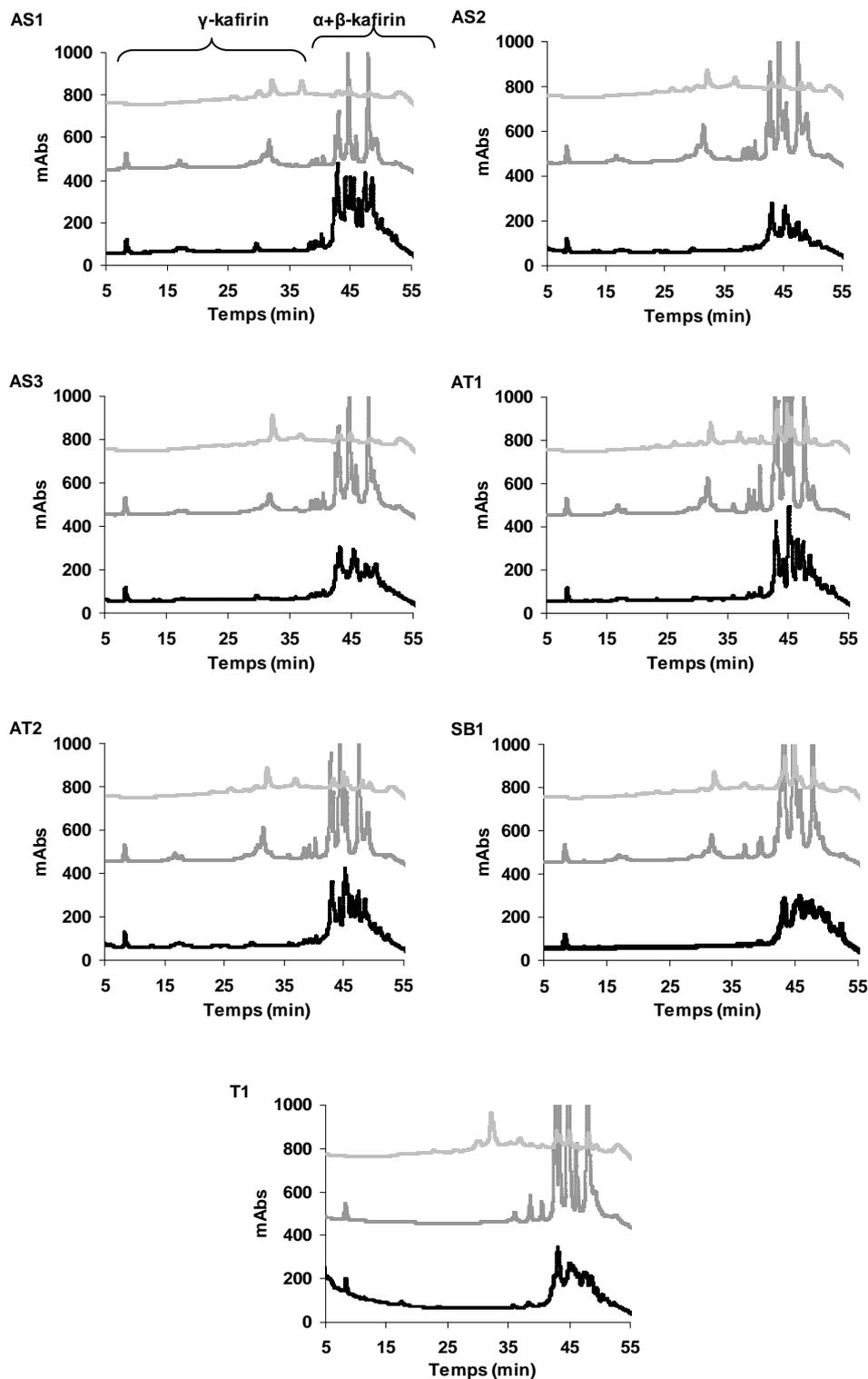


**Figure 3.6:** Profil de chromatogramme d'exclusion stérique (SE-HPLC) pour les fractions protéiques des cultivars de mil perlé: PNR (—) fraction extraite avec 70% éthanol, PR1 (- - -) fraction extraite avec 70% éthanol en présence de 1%  $\beta$ -mercaptoéthanol et PR2 (—) fraction extraite avec 6M d'urée en présence de 2% SDS et 1% DTT. Les temps de rétention des marqueurs de masses moléculaires sont représentés par les losanges sur le chromatogramme et représentent de gauche à droite 232, 158, 43 et 13,7 kDa. La phase mobile est de l'acétonitrile (ACN)/eau déionisée (1:1, V/V), les deux contiennent 0,05% (v/v) acide trifluoroacétique (TFA). Le débit est de 1,0 ml/min. l'éluion des protéines est suivie à 214 nm à une température de 30°C.

### 3.3.4 Profils de chromatographie à haute performance en phase inverse (RP-HPLC)

Les degrés d'hydrophobicités des prolamines de sorgho et de mil sont déterminés par les Profils de chromatographie à haute performance en phase inverse (RP-HPLC). Les figures 3.7 et 3.8 représentent les profils de RP-HPLC des prolamines réticulées extraites en présence d'agents réducteurs: les fractions PR1 et PR2 respectivement pour le sorgho et le mil perlé.

Les chromatogrammes de RP-HPLC pour les prolamines réduites de sorgho ont été arbitrairement divisés en deux zones représentant, les protéines à basse hydrophobicité (zone I, élution jusqu'à 35 minutes), et les protéines à hydrophobicité intermédiaire et élevée (zone II, élution après 35 minutes). Dans la fraction PR1,  $\alpha+\beta$ -kafirines et  $\gamma$ -kafirine pourraient clairement être distinguées à partir des chromatogrammes de RP-HPLC des prolamines de sorgho précédemment identifiés par Bean et coll. [122].  $\gamma$ -kafirine apparaît dans la zone I, tandis que  $\alpha+\beta$ - kafirines apparaissent dans la zone II. Pour les cultivars AS1, AS2, AT1 et SB1, la plupart des  $\gamma$ -kafirines sont élués à 30 minutes et un pic de très basse intensité est visible à 18 minutes, par ailleurs dans les profils des cultivars AT2 et AS3, ce pic est plus significatif à 18 minutes qu'à 30 minutes. Le sorgho noir (T1) de Touggourt, présente un profil différent, la  $\gamma$ -kafirine est détectée dans la fraction PR2 mais pas dans les fractions PNR ou PR1. Pour tous les échantillons de sorgho, les profils de RP-HPLC des fractions PR1 et PR2 sont comparables avec moins d'abondance pour PR2 (Figure 3.7). La sub-fraction apparaissant dans la zone (II) après 35 minutes pour PR2 est très comparable à celle dans la fraction PR1. Pendant l'extraction de la fraction PR2, les prolamines résiduelles fortement réticulées ont été finalement solubilisées sous formes monomériques, ce qui a engendré cette similitude entre les fractions PR2 et PR1 et la détection des formes  $\alpha+\beta$ - kafirines et  $\gamma$ -kafirine dans les deux fractions.



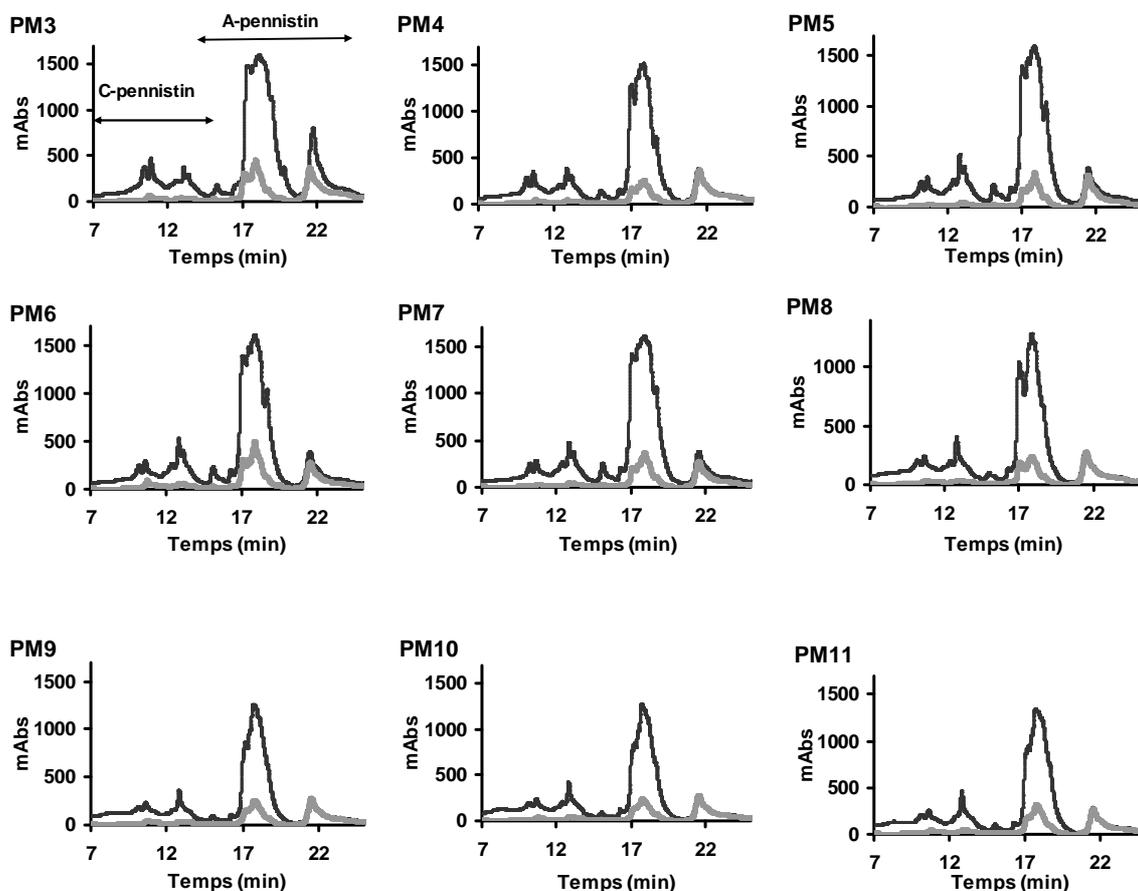
**Figure 3.7:** Profils de chromatogrammes en phase inverse (RP-HPLC) des fractions de protéines pour les cultivars de sorgho. PNR(—) fraction extraite avec 70% éthanol, PR1(—) fraction extraite avec 70% éthanol en présence de 1%  $\beta$ -mercaptoéthanol et PR2 (—) fraction extraite avec 6M d'urée en présence de 2% SDS et 1% DTT. La colonne a été équilibrée avec 25% de solvant A [ACN contenant 0,1% (v/v) TFA] et solvant B [eau déionisée contenant 0,1% (v/v) TFA]. Les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de 25% A à 75% A en 70 min à 50°C la séparation est suivie à 214 nm.

Afin d'illustrer les différences entre les cultivars de sorgho, les pourcentages de  $\gamma$ -kafirine et de  $\alpha+\beta$ -kafirines ont été déduits à partir des aires des pics de RP-HPLC de chaque fraction par rapport à la somme de l'aire totale des fractions PNR, PR1 et PR2 (Tableau 3.3). Ces pourcentages donnent une vue d'ensemble des niveaux de  $\gamma$ -kafirine et de  $\alpha+\beta$ -kafirines extractibles dans les différents cultivars de sorgho. Les pourcentages de  $\gamma$ -kafirine dans tous les cultivars de sorgho sont inférieurs à 16 %. Cependant, des différences pourraient être clairement notées entre les cultivars. Le sorgho noir T1 de Touggourt donne le plus bas pourcentage dans les fractions PNR et PR1 et, en même temps, les plus hautes dans la fraction PR2 (Figure 3.7, Tableau 3.3). Tous les autres cultivars présentent des niveaux comparables de kafirines excepté AS2 qui présente des niveaux élevés de  $\gamma$ -kafirine.

**Tableau 3.3:** Pourcentages de  $\gamma$ -kafirine et de  $\alpha+\beta$ -kafirine par rapport à la fraction totale de prolamine extraite (PNR+ PR1 +PR2) calculés des aires de RP-HPLC pour les cultivars Algérien de sorgho.

Cultivars	$\gamma$ -Kafirine (%)	$\alpha$ - and $\beta$ -Kafirine (%)
AS1	11,0	89,0
AS2	16,0	84,0
AS3	11,3	88,7
AT1	10,2	89,8
AT2	13,9	86,1
SB1	10,9	89,1
T1	7,1	92,9

Hicks et coll. [32] ont prouvé que les niveaux relatifs de  $\gamma$ -,  $\beta$ - et de  $\alpha$ -kafirine peuvent être employés dans la différenciation des cultivars de sorgho. De plus, Taylor et coll. [52] ont suggéré d'améliorer la digestibilité des protéines du sorgho par la multiplication des lignes de sorgho avec un taux réduit ou même nul de  $\gamma$ -kafirine.



**Figure 3.8:** Profils de chromatogrammes en phase inverse (RP-HPLC) des fractions de protéines pour les cultivars de mil perlé. (PNR+PR1 (—) fraction extraite avec 70% éthanol en présence de 1%  $\beta$ -mercaptoéthanol et PR2 (—) fraction extraite avec 6M d'urée en présence de 2% SDS et 1% DTT. La colonne a été équilibrée avec 30% de solvant A [ACN contenant 0.1% (v/v) TFA] et solvant B [eau déionisée contenant 0.1% (v/v) TFA]. Les protéines sont éluées avec un gradient linéaire de 30% A à 70% A en 30 min à 50°C la séparation est suivie à 214 nm.

Afin de caractériser avec plus de précision les prolamines de mil perlé (pennisetines), la RP-HPLC a été exécutée en utilisant des gradients d'acétonitrile s'étendant de 30 à 70%. Cette analyse a permis l'apparition de dix principaux pics (Figure 3.8). Les chromatogrammes de RP-HPLC pour les prolamines réduites de mil perlé ont été arbitrairement divisés en deux zones représentant les protéines à basse hydrophobicité (zone I, élution jusqu'à 15 minutes), et les protéines à hydrophobicité intermédiaire et élevée (zone II, élution après 15 minutes). Dans la fraction PNR+PR1, A-pennisetine (27 kDa) et C-pennisetine (10 kDa) pourraient clairement être distingués en se basant sur les résultats de Marcellino et coll. [108] sur l'identification des pics de RP-HPLC par SDS-PAGE [108]. La C-pennisetine (10 kDa) apparaît dans la zone I tandis que la pennisetine la plus hydrophobe: A-pennisetine (27 kDa) est élue en zone II.

Dans le but de différencier entre les cultivars de mil perlé, les niveaux de A-pennisetine et C-pennisetine ont été déterminés à partir des aires de RP-HPLC (Tableau 3.4). Dans tous les cultivars de mil perlé, les niveaux de A-pennisetine sont plus élevés que ceux de C-pennisetine, dans tous les échantillons. Cependant, une légère différence pourrait être observée entre les cultivars. Le niveau le plus bas de C-pennisetine est obtenu pour le cultivar PM7 de Béchar (12,2 %) [169]. Contrairement au sorgho, aucune étude comparable n'a été trouvée pour le mil perlé dans la littérature.

**Tableau 3.4:** Pourcentages de A-pennisetine et C-pennisetine par rapport à la fraction totale de prolamine extraite calculés des aires de RP-HPLC pour les cultivars Algérien de mil perlé.

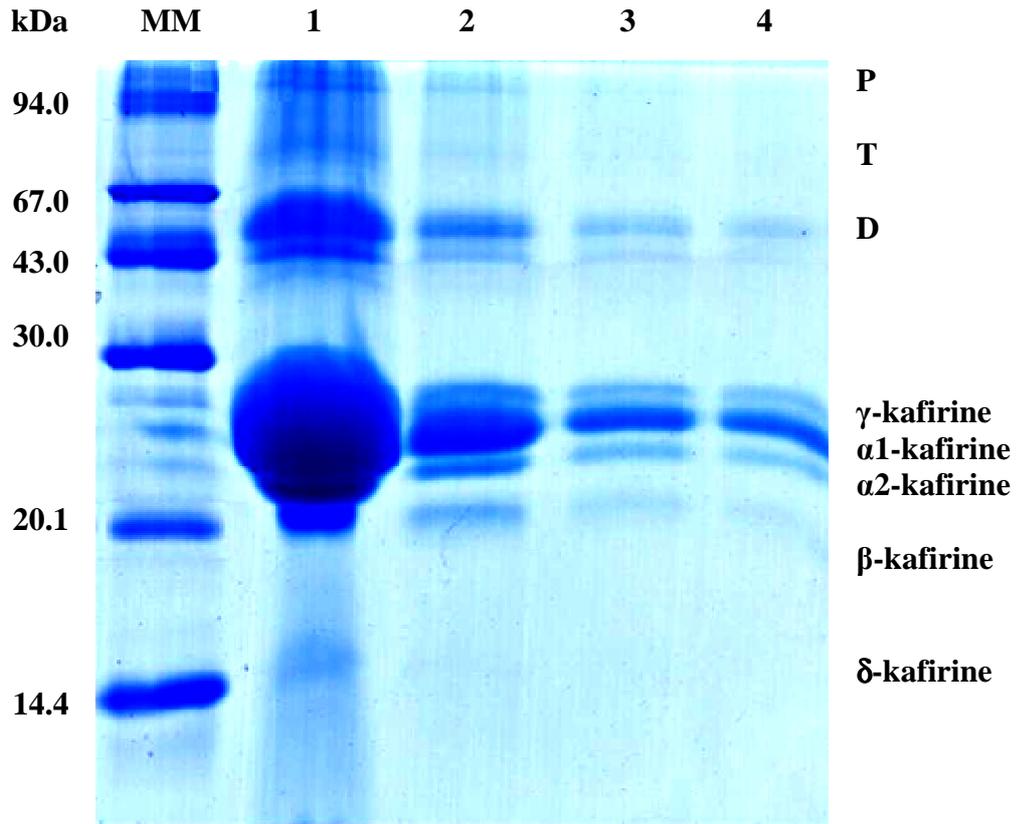
Cultivars	<i>A-pennisetine</i> (%)	<i>C-pennisetine</i> (%)
PM3	84,9	15,1
PM4	82,9	17,1
PM5	82,6	17,4
PM6	84,5	15,5
PM7	87,8	12,2
PM8	81,5	18,5
PM9	82,8	17,2
PM10	82,8	17,2
PM11	81,9	18,1

Marcellino et coll. [108] ont montré que les formes A et B-pennisetines sont intimement liées à la germination de la graine alors que C-pennisetine, reste intacte durant la germination. Beaucoup reste à comprendre en ce qui concerne la structure des prolamines de mil perlé, ainsi que le rôle physiologique de ces protéines de réserve dans la graine de mil perlé.

### **3.3.5 Purification et caractérisation des prolamines de sorgho et première mise en évidence de l'expression de $\delta$ -kafirine**

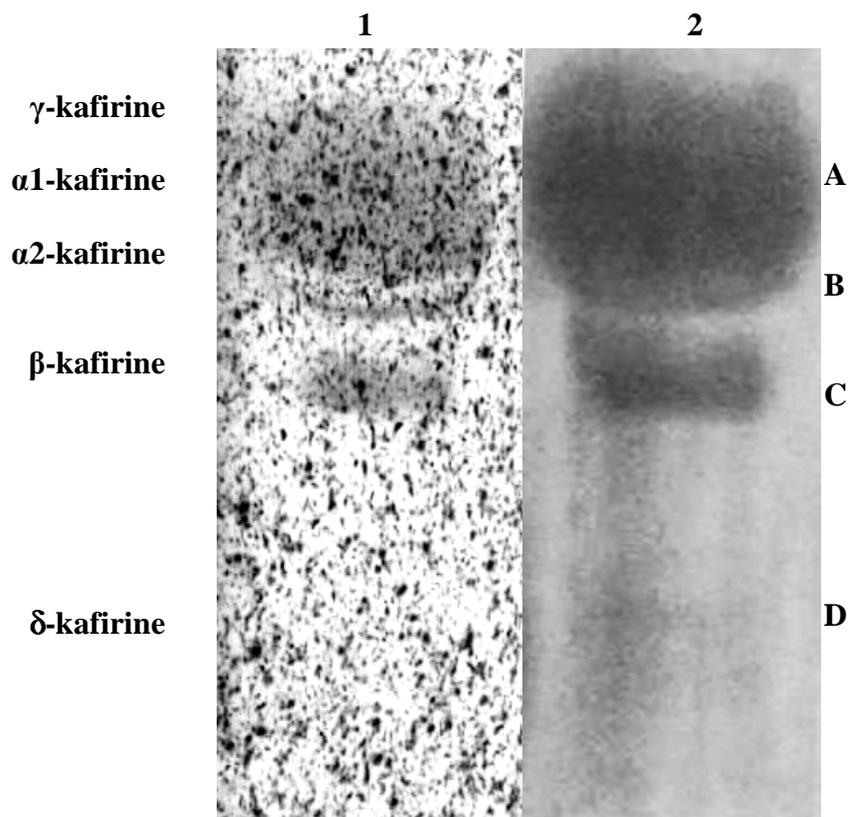
Les travaux de cette partie ont été consacrés à la mise en évidence pour la première fois à l'échelle protéique, de la forme  $\delta$ -kafirine de sorgho et sa caractérisation par voies expérimentale. Les séquences N-terminale des kafirines extraites ont été déterminées. Les profils de SDS-Page des prolamines PNR+PR1 ont été déterminés à partir du sorgho blanc AS1 (Figure 3.9). Les prolamines PNR+PR1 éluées à différentes concentrations ont montré des profils comparables à ceux rapportés par d'autres chercheurs et précédemment au cours de cette étude (Figure 3.4) mais avec une meilleure séparation [41, 165]. Les prolamines apparaissent sous forme de bandes monomériques correspondant à  $\gamma$ -,  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -, et  $\beta$ -kafirines avec respectivement des MM de 28 kDa; 26 kDa; 23 kDa; et 18 kDa (Figure 3.9). Des formes d'oligomères (dimères, trimères et polymères) sont aussi observées. La disparition complète de ces formes réticulées nécessite probablement l'ajout de concentrations plus élevées d'agents réducteurs.

La bande additionnelle apparaissant à 14 kDa dans l'extrait protéique le plus concentré (Figure 3.9, Ligne 1) pourrait être  $\delta$ -kafirine. L'existence potentielle de celle ci a été mentionnée par Shewry et Halford en 2003 [107], Izquierdo et Godwin en 2005 [166] ainsi que par Belton et coll. en 2006 [36] en se basant sur la comparaison des séquences d'acides aminés des différentes formes de kafirine et de zéine et par déduction de ces séquences à partir du DNA.



**Figure 3.9:** SDS-PAGE des prolamines de sorgho (AS1) dont les fractions protéiques ont été extraites avec 70% d'éthanol en présence de 1%  $\beta$ -mercaptoéthanol: (PNR+PR1) avec indication des  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ -kafirine. Ligne 1: 1,25 mg/ml, Ligne 2: 0,62 mg/ml, Ligne 3: 0,06 mg/ml, Ligne 4: 0,04 mg/ml. Ligne MM contient les marqueurs de masses moléculaires. Les monomères  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -kafirine sont indiqués et les polymères (P), trimères (T) et dimères (D).

Dans le but de confirmer ou d'infirmer l'identité de cette protéine monomérique, les bandes obtenues sur SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane de Polyfluorure de vinyldène (PVDF) pour permettre la détermination de leurs séquences N-terminales en acides aminés. Dans le blot des extraits dilués de protéines, trois bandes majeures apparaissent. Pour les bandes A et B (28 kDa-23 kDa), la séquence N-terminale révèle une partie de  $\alpha 1$ -kafirine (VIIPQXSLAPXAXXS, avec X représentant un acide aminé non identifié), et une séquence de huit acides aminés correspondant à  $\gamma$ -kafirine (TLTTGGXGXQ).



**Figure 3.10:** Membrane de PVDF des kafirines transférés avec indication de  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - et  $\delta$ -kafirines. Ligne 1: 0,125 mg de protéine/ml; ligne 2: 1,25 mg/ml.

La séquence N-terminale de la forme  $\alpha 2$ -kafirine n'a pas pu être déterminée, probablement à cause de son abondance relativement faible comparée à  $\alpha 1$ -kafirine. La troisième bande C à 18 kDa apparaissant dans les deux blots donne la même séquence N-terminale LQMPGMGLQDLYGAGALMTM(M)GA(Q)X confirmant la présence de  $\beta$ -kafirine. Afin de confirmer la présence de  $\delta$ -kafirine, l'extrait protéique le plus concentré a été transféré sur une membrane de PVDF. Une faible bande D à 14 kDa a révélé une séquence d'acides aminés identique à celle prédite mais non confirmée par les chercheurs précédents THIPGHLPLVM, confirmant la présence de onze acides aminés. Ces résultats ont révélé la présence et la purification pour la première fois de la forme  $\delta$ -kafirine [168].

### 3.4 CONCLUSION

Les échantillons de sorgho et de mil perlé sélectionnés ont montrés une grande variabilité morphologique et la teneur en protéines. Dans le présent travail, nous avons essayé d'extraire et d'analyser les protéines totales et les fractions de protéines des grains de sorgho et de mil

perlé provenant de différentes régions du sud de l'Algérie. Un intérêt particulier a été porté à la fraction majoritaire: les prolamines.

Des taux élevés de protéines ont été obtenus, respectivement de 12 à 16,4% pour le sorgho et de 11,8 à 18,2% pour le mil perlé. Le sorgho et le mil perlé offrent une source potentielle en protéines nutritionnellement importantes. Les fractions d'albumines, de globulines, de prolamines et de glutélines du sorgho et du mil perlé ont été extraites. Les prolamines constituent la fraction principale de protéines dans tous les cultivars. L'extractabilité des prolamines de mil perlé s'est avérée plus élevée que celles du sorgho, ces dernières exigent l'ajout d'agents réducteurs pour atteindre des rendements appréciables d'extraction.

Les profils de SDS-PAGE, de SE-HPLC et de RP-HPLC ont permis la séparation et l'analyse des différentes formes de kafirine et de pennisetine. Les taux de  $\gamma$ - et  $\alpha+\beta$ -kafirine pour le sorgho et de A- et C-pennisetines pour le mil perlé ont été déduits à partir des aires de RP-HPLC en se basant sur leur différence en hydrophobicité. En outre dans ce chapitre, nous avons démontré la présence de  $\delta$ -kafirine pour la première fois au niveau protéique, sa séquence N-terminale a été déterminée de la bande apparaissant dans le SDS-PAGE à 14 kDa. Cependant, d'autres travaux de recherche sont nécessaires telles que l'application des méthodes expérimentales de traitement, de purification et d'analyses sur différents cultivars. De même que l'étude de l'influence des conditions et étapes de croissance et du génotype sur la composition des kafirines de sorgho et des pennisetines de mil perlé.

Dans le chapitre suivant, un autre aspect de caractérisation des protéines de sorgho et de mil perlé est étudié: la détermination de la valeur et de la qualité nutritionnelle des protéines totales.

# Chapitre quatre

## Qualité nutritionnelle des protéines de graines de sorgho et de mil perlé<sup>3</sup>

### 4.1 INTRODUCTION

En Algérie, les cultivars de sorgho et de mil perlé très bien adaptées aux écosystèmes arides [170], et peuvent constituer une alternative sans équivoque pour l'alimentation humaine et animale dans ces régions. Le sorgho et le mil perlé sont nutritionnellement équivalents à la plupart des céréales, et leurs teneurs en protéines est tout à fait variable. La plupart des auteurs rapportent une grande variabilité de teneurs en protéines s'étendant de 6 à 18 % [1, 4, 12]. Cependant, les protéines de sorgho et de mil perlé sont déficientes en acides aminés essentiels principalement la lysine [6, 7]. Bien que ces céréales constituent des aliments primaires pour des millions d'Africains, d'Asiatiques et de latino- Américains, le sorgho est caractérisé par une faible digestibilité des protéines [171], alors que le mil est caractérisé par une meilleure digestibilité. Mertz et coll. [123] ont employé une méthode de calcul de la digestibilité *in vitro* des protéines de céréales. Plusieurs auteurs ont rapporté que les valeurs de digestibilité diminuent de manière significative après traitement thermique en cuisine,

---

<sup>3</sup> Ce chapitre est basé sur les références suivantes:

**Mokrane, H., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N., Courtin, C. M., Delcour, J. A. & Nadjemi, B. (2010).** Assessment of Algerian sorghum protein quality [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using amino acid analysis and in vitro pepsin digestibility. *Food Chemistry* **121**, 719-723.

**Mokrane, H., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N. & Nadjemi, B. (2006a).** Extraction of prolamins from sorghum (*Sorghum bicolor*) and effect on in vitro protein digestibility. In *Proceeding of International Congress on Biocatalysis*, Edited by Grote R. & Atranikian G. University of Technology of Hamburg, Hamburg, Germany, September 3 - 7, 2006, pp. 218.

**Mokrane, H., Brijs, K., Belhaneche-Bensemra, N., Courtin, C. M., Nadjemi, B. & Delcour, J. A. (2008a).** Extractability and characterization of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) proteins from Algerian cultivars. In *Proceeding of AACC International*, Edited by AACC. Honolulu, Hawaii, U.S.A, September, 21-24, 2008, *Cereal Foods World*. pp. A70.

indiquant que la cuisson peut modifier les protéines de sorgho ou de mil perlé et les rendre moins digestibles [28]. Tandis que Zhao et coll. [37] ont prouvé que la digestibilité *in vitro* varie considérablement entre neuf cultivars différents de sorgho (23 à 68 %). La faible digestibilité des protéines de sorgho est vraisemblablement due à l'enchaînement des protéines de sorgho et aux liaisons intermoléculaires entre les polypeptides monomériques.

Les protéines de bonne qualité pour l'alimentation humaine, sont celles qui sont aisément digestibles et contiennent les acides aminés essentiels dans des quantités qui correspondent aux besoins alimentaires des êtres humains [7]. Les quantités exigées de ces acides aminés changent avec l'âge, les états physiologiques et l'état de santé. FAO/WHO (1991) a recommandé l'utilisation des modèles de teneurs d'acides aminés essentiels pour des enfants en âge préscolaire FAO/WHO/UNU (1985).

Plusieurs chercheurs se sont intéressés à l'évaluation de la qualité des protéines. Zarkadas et coll. [172] ont comparé la qualité des protéines de cinq cultivars de soja par l'analyse du taux d'acides aminés. Dans un autre travail, Tang et coll. [173] ont étudié les propriétés alimentaires des protéines de légumineuse de *phaseolus* en évaluant les indices de digestibilité des protéines (AAS, PCDAAS). A notre connaissance, aucune étude sur la qualité des protéines des cultivars algériens de sorgho et de mil perlé, n'a été trouvée.

Dans le chapitre précédent, la fraction de protéine dans les cultivars algériens de sorgho et de mil perlé a été caractérisée. Le but de la présente étude est d'évaluer la qualité nutritionnelle des protéines de sorgho et de mil perlé dans les cultivars algériens (composition en acides aminés et digestibilité *in vitro*). Les indices de digestibilité (AAS et PCDAAS) ont été calculés selon les besoins en acides aminés pour les enfants âgés de 2 à 5 ans [124, 125, 174]. Les valeurs de ces indices de digestibilité peuvent orienter les cultivateurs dans le choix des cultivars algériens de sorgho et de mil perlé, les mieux appropriés pour la nutrition humaine.

## **4.2 MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **4.2.1 Matériels**

Sept échantillons de graines de sorgho (AS1, AS2, AS3, AT1, AT2, SB1 et T1) et onze échantillons de graines de mil perlé (PM1 à PM11) ont été prélevés dans des régions arides du

Sahara Algérien. Une description détaillée des caractéristiques des cultivars a été effectuée dans le chapitre 3, la section 3.2.1

Les grains de sorgho et de mil perlé ont été réduits en farine dans un moulin de type Cyclotec 1093 (Tecator, Hogänäs, Suède), les farines obtenues ont été manuellement tamisées à travers un tamis de 400 $\mu$ m. Tous les produits chimiques et réactifs proviennent de Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique) et sont de grade analytique.

#### **4.2.2 Analyse du taux de protéines et du taux d'humidité**

Les teneurs en protéines dans les différentes moutures des cultivars de sorgho et de mil perlé ont été déterminées suivant les méthodes précédemment décrites dans le paragraphe 3.2.2 du chapitre 3.

#### **4.2.3 Analyse du taux d'acides aminés**

La composition en acides aminés a été déterminée en effectuant en premier une hydrolyse acide de la farine de sorgho ou de mil perlé contenant approximativement 4,25 mg de protéine dans 1,0 ml d'acide chlorhydrique (HCl 6,0 M) pendant 24h à 110°C. Après vaporisation de la solution liquide, la fraction solide restante est dispersée dans 4,0 ml d'eau et filtrée à travers un filtre en papier (0,22  $\mu$ m). Le filtrat obtenu est alors dilué 50 fois. 25  $\mu$ l de la solution obtenue sont injectés à 30°C et sous une pression de 3000 psi dans une colonne analytique aminoPac (PA 10) (2  $\times$  250 mm) précédée d'une colonne de garde aminoPac (PA 10) (2  $\times$  50mm) (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, Etats-Unis). Les acides aminés ont été élués à un débit de 0,25 ml/min en utilisant un gradient d'éluion de trois solvants: A (18.2 eau MOhm), B (250 mM hydroxyde de sodium) et C (1.0 M acétate de sodium). Le gradient d'éluion suivant a été utilisé 0.0-2.0 min, 24% B; 2.0-8.0 min, 24-36% B; 8.0-11.0 min, 36% B; 11.0-18.0 min, 36-20% B and 0-40% C; 18-21 min, 20-16% B and 40% C; 21-23 min, 16% B and 40-70% C; 23-42 min, 16% B and 70% C; 42-42.1 min, 16-80% B and 70-0% C; 42.1-44.1 min, 80% B; 44.1-44.2 min, 80-24% B; 44.2-74 min, 24% B [176, 177].

La séparation des acides aminés est effectuée par chromatographie d'échange anionique avec une détection de type IPA: Détection ampérométrique pulsée intégrée équipée d'une électrode en or [175]. Les étalons des acides aminés se composent de 17 acides aminés obtenus de Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne) [176, 177].

#### 4.2.4 Digestibilité *in vitro* des protéines

La digestibilité *in vitro* des protéines de certains des échantillons de sorgho et de mil perlé décrits précédemment, est déterminée en utilisant comme enzyme protéolytique la pepsine issue de l'estomac de bovin (E.C 3.4.23.1) (944 unités par mg) Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique). Une légère modification du procédé décrit par Mertz et coll. [123] a été employée. La farine de sorgho ou de mil perlé (500 mg) est mise en suspension dans 25 ml de la solution tampon de monophosphate de potassium de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,1 M) à pH 2,0 contenant la solution de pepsine (2,0 mg/ml). Le mélange réactionnel est incubé à 37°C dans un bain marie pendant 120 minutes. La suspension est ensuite filtrée, le pourcentage de l'azote soluble est déduit du pourcentage des protéines dans la farine initiale et dans le résidu déterminé par la méthode de combustion de Dumas.

La digestibilité *in vitro* (Eq. 2.1) est calculée par le pourcentage de l'azote solubilisé sous l'effet de l'action de l'enzyme comme définie dans la section 2.5.3

#### 4.2.5 Score en acides aminés (AAS) et digestibilité corrigée des protéines (PDCAAS)

Les indices de digestibilités: le PDCAAS avec l'AAS sont actuellement des méthodes approuvées de mesure de la qualité alimentaire d'une protéine. La valeur la plus élevée de PDCAAS que n'importe quelle protéine peut réaliser est 1,0. Ces points signifient qu'après digestion de la protéine alimentaire, ils fournissent par unité de protéine, 100% ou plus des acides aminés indispensables exigés par un enfant de 2 à 5 ans. Les scores au-dessus de 1,0 sont arrondis à 1,0. Si un acide aminé se trouve en quantité plus élevée que celles exigées pour la synthèse des protéines, celui-ci va être stocké comme graisse s'il n'est pas éliminé du corps [125, 174].

Les valeurs de PDCAAS et de AAS sont calculées à partir des équations (2.2) et (2.3) définies dans le chapitre 2, section 2.5.1 et 2.5.2.

#### 4.2.6 Traitement statistique des données

Toutes les analyses statistiques ont été exécutées en utilisant le logiciel système d'analyse statistique 8.1 (SAS, Cary, Or, USA) en utilisant un procédé multiple de comparaison Tukey avec un niveau de signification de 5% [163].

## 4.3 RESULTATS ET INTERPRETATIONS

### 4.3.1 Résultats de l'analyse du taux d'acides aminés

Les graines de cultivars analysées présentent une composition en acides aminés équilibrée avec des niveaux élevés en acides aminés essentiels représentant plus de 40% de la composition totale en acides aminés (Tableaux 4.1 et 4.2). L'hydrolyse acide affecte les niveaux de tryptophane, de l'arginine et de la cystine. L'acide glutamique et la glutamine apparaissent dans le même pic, l'asparagine et l'acide aspartique sont aussi élués au même pic [176, 177].

Des profils comparables de composition en acides aminés dans le sorgho ont été rapportés par Kent et Evers [178] pour le sorgho américain, par Knudsen et coll. [179] pour des cultivars du Burkina Faso, et par Ebadi et coll. [180] pour les cultivars iraniens. Dans les échantillons algériens de sorgho, les pourcentages de lysine, phénylalanine, méthionine, tyrosine, alanine et cystine présentent une variabilité fortement significative ( $p < 0,001$ ) (Tableau 4.1). Cependant, la proline, l'acide glutamique avec la glutamine, la sérine et l'histidine qui représentent tous des acides aminés non essentiels, exhibent une variabilité non significative. Knudsen et coll. [179] et Ebadi et coll. [180] ont rapporté que les taux les plus élevés d'acides aminés sont la leucine, l'acide glutamique et la glutamine directement suivis de la proline et l'alanine. Cependant, la lysine dans le sorgho algérien est légèrement plus élevée que ceux originaires d'Iran et plus faible par rapport aux cultivars du Burkina Faso. Les niveaux de thréonine sont plus élevés dans les cultivars Algériens. La valine et la méthionine sont dans la même gamme des cultivars iraniens. En général, les cultivars algériens de sorgho sont riches en acides aminés essentiels (40 %).

La composition en acides aminés des cultivars algériens de mil perlé est semblable aux valeurs rapportées pour les cultivars de mil perlé Russe et tchèque [181]. Cependant, une légère différence a été observée: Les cultivars algériens sont plus riches en thréonine et moins riches en méthionine et tyrosine. La teneur en lysine est pour quelques cultivars, inférieure aux valeurs rapportées et pour d'autres plus élevée. Ces résultats peuvent orienter notre choix vers l'exploitation des cultivars les plus nutritifs (Tableau 4.2).

**Tableau 4.1:** Composition en acides aminés dans les graines de sept cultivars de sorgho exprimée en g d'acides aminés dans 100g de protéines dans les moutures sèches(%).

	AS1	AS2	AS3	AT1	AT2	SB1	T1
<b>Proteine (%) ***</b>	13,5 ± 0,3 c,d,e	14,8 ± 0,7 b,c	12,1 ± 0,3 e	13,8 ± 0,4 b,c,d	12,6 ± 0,4 e,d	16,4 ± 0,2 a	15,1 ± 0,9 a,b
<b>Acides aminés essentiels (%)</b>							
<b>Lysine ***</b>	2,1 ± 0,1 a,b,c	2,0 ± 0,2 a,b,c	2,2 ± 0,1 a,b	1,6 ± 0,2 d	1,9 ± 0,1 b,c,d	2,1 ± 0,0 a,b	1,7 ± 0,1 c,d
<b>Threonine *</b>	5,1 ± 0,2 a,b	5,0 ± 0,0 a,b	5,1 ± 0,2 a,b	4,5 ± 0,2 c	5,0 ± 0,3 a,b,c	4,7 ± 0,0 a,b,c	5,0 ± 0,3 a,b,c
<b>Phenylalanine ***</b>	4,3 ± 0,4 d	6,2 ± 0,0 a,b	6,3 ± 0,1 a,b	5,0 ± 0,0 c	6,1 ± 0,3 b	6,2 ± 0,0 a,b	6,2 ± 0,3 a,b
<b>Isoleusine*</b>	3,8 ± 0,2 b	4,0 ± 0,0 a,b	3,9 ± 0,0 a,b	4,3 ± 0,3 a	3,8 ± 0,0 b	4,0 ± 0,0 a,b	3,9 ± 0,0 a,b
<b>Leucine*</b>	16,3 ± 0,8 a,b,c	16,0 ± 0,1 b,c	16,4 ± 0,2 a,b,c	17,3 ± 0,0 a	15,8 ± 0,5 b,c	16,0 ± 0,0 b,c	17,0 ± 0,5 a,b
<b>Valine***</b>	4,7 ± 0,3 d,e	5,0 ± 0,0 c,b	5,0 ± 0,1 b,c,d	5,1 ± 0,1 a,b,c	4,8 ± 0,2 c,d,e	4,9 ± 0,0 b,c,d,e	4,6 ± 0,2 e
<b>Methionine ***</b>	1,2 ± 0,0 b,c	1,6 ± 0,1 a	1,1 ± 0,0 b,c	1,1 ± 0,0 c,d	1,3 ± 0,0 b	1,1 ± 0,0 d	1,4 ± 0,0 b,c
<b>Tyrosine ***</b>	2,9 ± 0,1 b,c,d	2,9 ± 0,1 b,c	2,7 ± 0,0 b,c,d	3,2 ± 0,0 a	2,8 ± 0,2 b,c,d	2,8 ± 0,0 b,c,d	3,0 ± 0,1 a,b
<b>Acides aminés essentiels totaux (%)</b>	40,0	42,8	42,8	42,0	41,4	41,9	42,8
<b>Acides aminés non essentiels (%)</b>							
<b>Alanine ***</b>	8,0 ± 0,4 d	8,6 ± 0,1 b,c,d	8,4 ± 0,1 b,c,d	9,4 ± 0,4 a	8,3 ± 0,1 c,d	8,5 ± 0,0 b,c,d	8,2 ± 0,2 c,d
<b>Glycine*</b>	2,9 ± 0,1 a	2,6 ± 0,1 a,b	2,8 ± 0,2 a	1,9 ± 0,4 b	2,7 ± 0,3 a	2,5 ± 0,0 a,b	2,4 ± 0,2 a,b
<b>Cystine ***</b>	0,5 ± 0,0 a	0,4 ± 0,0 b,c	0,3 ± 0,0 b,c	0,2 ± 0,0 c	0,4 ± 0,1 a,b	0,3 ± 0,0 b,c	0,4 ± 0,0 b,c
<b>Proline</b>	7,8 ± 0,4 a	7,9 ± 0,0 a	8,0 ± 0,1 a	8,3 ± 0,4 a	7,9 ± 0,2 a	7,6 ± 0,0 a	7,7 ± 0,3 a
<b>Serine *</b>	4,0 ± 0,3 a	3,5 ± 0,1 a,b	3,7 ± 0,1 a,b	3,1 ± 0,3 b	3,8 ± 0,5 a,b	3,4 ± 0,0 a,b	3,8 ± 0,4 a,b
<b>Acide Glutamique Glutamine</b>	17,2 ± 0,8 a	16,2 ± 0,1 a	16,8 ± 0,4 a	16,6 ± 0,8 a	16,8 ± 1,3 a	16,4 ± 0,0 a	17,2 ± 0,9 a
<b>Acide Aspartique Asparagine *</b>	5,7 ± 0,2 b	5,9 ± 0,0 b	6,1 ± 0,2 a,b	5,8 ± 0,3 b	5,8 ± 0,4 b	5,9 ± 0,0 b	5,9 ± 0,2 b
<b>Histidine</b>	2,2 ± 0,1 a	1,8 ± 0,3 a,b	2,0 ± 0,2 a,b	1,9 ± 0,5 a,b	2,0 ± 0,3 a,b	2,0 ± 0,0 a,b	1,6 ± 0,1 b

Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures ± erreur absolue; Les valeurs avec la même lettre dans une rangé ne sont pas significativement différents l'un de l'autre (p≤0,05).

\* p≤0,05 , \*\*p≤0,01 , \*\*\*p≤0,0001

**Tableau 4.2:** Composition en acides aminés dans les graines de onze cultivars de mil perlé exprimée en g d'acides aminés dans 100g de protéines dans les moutures sèches (%).

	PM1	PM2	PM3	PM4	PM5	PM6	PM7	PM8	PM9	PM10	PM11
<b>Protéines (%) ***</b>	11,8 ± 0,8 c	12,3 ± 0,3 c	18,2 ± 0,8 a	13,1 ± 0,4 b,c	17,4 ± 0,2 a	14,5 ± 0,0 b	17,4 ± 0,2 a	11,1 ± 0,5 c	11,2 ± 0,6 c	12,4 ± 0,5 b,c	12,0 ± 0,7 c
<b>Acides aminés essentiels (%)</b>											
<b>Lysine**</b>	3,0 ± 0,1 a	3,0 ± 0,0 a,b	2,6 ± 0,1 a,b	2,6 ± 0,1 a,b	2,6 ± 0,0 a,b	2,5 ± 0,0 a,b	2,0 ± 0,7 b	3,0 ± 0,0 a	3,2 ± 0,2 a	3,1 ± 0,3 a	3,3 ± 0,0 a
<b>Threonine</b>	6,5 ± 0,1 a	6,3 ± 0,0 a	6,5 ± 0,1 a	6,5 ± 0,0 a	6,3 ± 0,0 a	6,3 ± 0,0 a	6,0 ± 0,7 a	6,6 ± 0,1 a	6,5 ± 0,1 a	6,5 ± 0,2 a	6,6 ± 0,0 a
<b>Phénylalanine**</b>	4,6 ± 0,0 a,b	4,6 ± 0,1 a,b	5,0 ± 0,0 a	4,4 ± 0,1 a,b	4,7 ± 0,1 a,b	4,1 ± 0,0 a	4,5 ± 0,5 a,b	4,3 ± 0,2 a	4,2 ± 0,2 a	4,4 ± 0,0 a,b	4,3 ± 0,1 a
<b>Isoleusine</b>	4,0 ± 0,3 a	3,9 ± 0,0 a	4,3 ± 0,1 a	4,1 ± 0,0 a	4,1 ± 0,1 a	3,9 ± 0,0 a	4,1 ± 0,3 a	4,0 ± 0,2 a	4,1 ± 0,0 a	4,1 ± 0,2 a	4,0 ± 0,1 a
<b>Leucine*</b>	12,7 ± 0,5 a,b	12,2 ± 0,1 b	13,7 ± 0,4 a	13,3 ± 0,1 a,b	13,3 ± 0,1 a,b	12,4 ± 0,0 a,b	13,1 ± 0,9 a,b	12,4 ± 0,4 a,b	12,7 ± 0,1 a,b	12,8 ± 0,4 a,b	12,2 ± 0,5 a,b
<b>Valine</b>	5,3 ± 0,2 a	5,2 ± 0,0 a	5,4 ± 0,1 a	5,4 ± 0,0 a	5,4 ± 0,0 a	5,1 ± 0,0 a	5,1 ± 0,5 a	5,3 ± 0,3 a	5,4 ± 0,1 a	5,5 ± 0,2 a	5,3 ± 0,1 a
<b>Méthionine**</b>	1,4 ± 0,0 a,b	1,5 ± 0,0 a,b	1,4 ± 0,0 a,b	1,3 ± 0,0 a,b	1,4 ± 0,0 a,b	1,1 ± 0,0 a,b	1,4 ± 0,0 a,b	1,6 ± 0,0 a,b	1,5 ± 0,0 a,b	1,7 ± 0,3 a	1,5 ± 0,0 a,b
<b>Tyrosine</b>	1,9 ± 0,1 a	2,1 ± 0,2 a	2,2 ± 0,1 a	1,9 ± 0,0 a	2,1 ± 0,0 a	1,9 ± 0,0 a	2,1 ± 0,0 a	2,0 ± 0,2 a	2,1 ± 0,0 a	2,1 ± 0,2 a	2,1 ± 0,0 a
<b>Acides aminés essentiels totaux (%)</b>	39,5	38,8	41,2	39,6	40,1	37,4	40,9	39,3	39,9	40,3	39,3
<b>Acides aminés non essentiels (%)</b>											
<b>Alanine</b>	7,4 ± 0,2 a	6,9 ± 0,0 a	7,4 ± 0,1 a	7,4 ± 0,1 a	7,5 ± 0,1 a	7,0 ± 0,0 a	7,4 ± 0,2 a	7,1 ± 0,4 a	7,4 ± 0,2 a	7,6 ± 0,4 a	7,1 ± 0,3 a
<b>Glycine***</b>	3,3 ± 0,0 a,b,c	3,1 ± 0,0 abcd	2,8 ± 0,1 c,d	2,9 ± 0,1 b,c,d	3,0 ± 0,0 b,c,d	3,3 ± 0,0 a,b,c	2,5 ± 0,3 d	3,2 ± 0,0 a,b,c	3,4 ± 0,0 a,b,c	3,6 ± 0,4 a	3,5 ± 0,1 a,b
<b>Cystine</b>	0,3 ± 0,0 a	0,4 ± 0,1 a	0,4 ± 0,0 a	0,3 ± 0,0 a	0,4 ± 0,0 a	0,3 ± 0,0 a	0,3 ± 0,1 a	0,4 ± 0,0 a	0,3 ± 0,0 a	0,3 ± 0,1 a	0,2 ± 0,0 a
<b>Proline</b>	6,0 ± 0,4 a	5,8 ± 0,0 a	6,1 ± 0,2 a	6,3 ± 0,0 a	6,2 ± 0,1 a	5,7 ± 0,0 a	5,9 ± 0,4 a	6,1 ± 0,2 a	6,0 ± 0,0 a	6,4 ± 0,1 a	5,9 ± 0,1 a
<b>Sérine***</b>	7,1 ± 0,9 c,d	9,7 ± 0,3 a,b,c,d	12,8 ± 0,1 a	9,5 ± 0,1 a,b,c,d	11,2 ± 0,9 a,b	10,9 ± 0,0 a,b,c	11,2 ± 1,9 a,b	8,0 ± 1,6 b,c,d	7,0 ± 0,3 c,d	6,8 ± 1,5 d	8,7 ± 0,9 b,c,d
<b>Acide Glutamique Glutamine</b>	16,5 ± 0,8 a	15,8 ± 0,1 a	17,2 ± 0,1 a	17,1 ± 0,1 a	17,0 ± 0,1 a	16,1 ± 0,0 a	16,3 ± 1,6 a	15,9 ± 0,2 a	16,0 ± 0,5 a	16,1 ± 0,6 a	15,8 ± 0,3 a
<b>Acide Aspartique Asparagine</b>	7,4 ± 0,1 a	7,1 ± 0,1 a	7,2 ± 0,0 a	6,9 ± 0,0 a	7,6 ± 0,1 a	6,7 ± 0,0 a	7,1 ± 0,6 a	7,0 ± 0,2 a	7,4 ± 0,3 a	7,5 ± 0,5 a	7,3 ± 0,2 a
<b>Histidine*</b>	2,4 ± 0,1 a	2,3 ± 0,1 a	2,3 ± 0,0 a	2,3 ± 0,0 a	2,3 ± 0,0 a	1,9 ± 0,0 a	1,9 ± 0,5 a	2,3 ± 0,0 a	2,5 ± 0,0 a	2,4 ± 0,1 a	2,4 ± 0,1 a

Les valeurs représentent la moyenne de trois mesures ± erreur absolue; Les valeurs avec la même lettre dans une rangée ne sont pas significativement différents l'un de l'autre (p≤0.05).

\* p≤0,05 , \*\*p≤0,01 , \*\*\*p≤0,0001

Les teneurs en acides aminés avec différents caractères (acide, basique, hydrophobe ou apolaire) sont rassemblées dans le tableau 4.3 pour les cultivars de sorgho et dans le tableau 4.4 pour les cultivars de mil perlé. L'alanine, l'isoleucine, la leucine, la méthionine, la phénylalanine, la proline et la valine sont des acides aminés hydrophobes et sont présents en grande abondance 49 % et 42 % en moyenne respectivement pour le sorgho et le mil perlé. Les autres groupes (acide, basique et apolaire) constituent le reste des acides aminés. Les résultats obtenus confirment le caractère hydrophobe prédominant des protéines de sorgho et de mil perlé. Les acides aminés acides viennent en deuxième position avec des niveaux de l'ordre de 23 %, directement suivis des acides aminés basiques 15 % à 18% puis apolaires 14% à 17% [164].

**Tableau 4.3:** Pourcentage en acides aminés de caractères différents dans le sorgho (mg d'acide aminé/g de protéine)

Acides aminés (% de protéines)	AS1	AS2	AS3	AT1	AT2	SB1	T1
Acide*	22,5	22,2	22,9	22,4	22,6	22,4	23,1
Basique**	16,9	14,5	13,3	14,4	15,1	15,8	13,9
Hydrophobe***	45,4	49,3	49,1	50,5	47,9	48,4	49,0
Apolaire****	15,4	14,4	14,7	12,9	14,7	13,8	14,5

\* Acide: Acide Aspartique, Acide glutamique.

\*\* Basique: Lysine, Arginine, Histidine.

\*\*\* Hydrophobe: Alanine, Isoleucine, leucine, Methionine, Phenylalanine, Proline, Valine.

\*\*\*\* Apolaire: Glycine, Serine, Thréonine, Tyrosine, Cystéine.

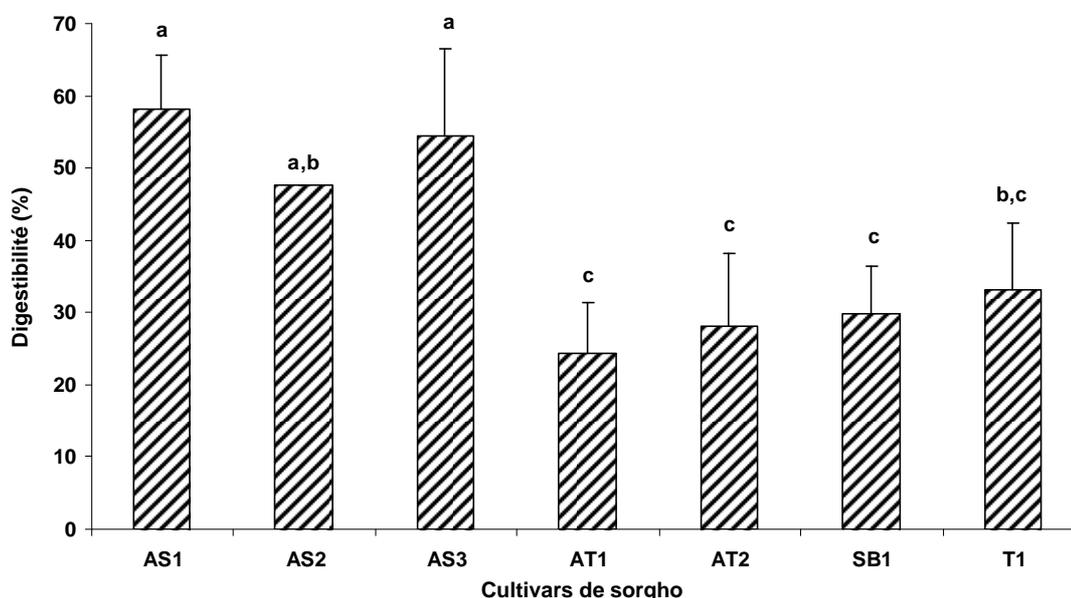
**Tableau 4.4:** Pourcentage en acides aminés de caractères différents dans le mil perlé (mg d'acide aminé/g de protéine)

Acides aminés (% de protéines)	PM1	PM2	PM3	PM4	PM5	PM6	PM7	PM8	PM9	PM10	PM11
Acide	23,8	22,9	24,4	24,0	24,6	22,8	25,0	22,8	23,4	23,5	23,0
Basique	18,6	20,7	15,9	17,7	16,5	21,4	15,2	19,9	18,6	17,3	19,9
Hydrophobe	41,3	40,0	43,3	42,1	42,6	39,4	43,5	40,7	41,3	42,3	40,2
Apolaire	16,3	16,4	16,4	16,2	16,3	16,4	16,4	16,5	16,6	16,8	16,8

### 4.3.2 Digestibilité *in vitro* des protéines

#### 4.3.2.1 Cas du sorgho

La figure 4.1 représente la variabilité en digestibilité *in vitro* exprimée par le pourcentage de l'azote total solubilisé par la pepsine pour les cultivars de sorgho. Tous les cultivars ont montré une variabilité fortement significative ( $p \leq 0,0001$ ), les digestibilités des échantillons de sorgho présentent une moyenne de 36,5 % et sont toutes inférieures à 50 % excepté pour les cultivars locaux AS1 et AS3 d'Ain Salah,. Les principales protéines du sorgho étant des kafirines, ces protéines sont connues pour être peptidase résistantes en raison de leurs liaisons intermoléculaires qui lient ensemble les kafirines monomériques [2, 36, 49]. Dans les cultivars échantillonnés, les digestibilités les plus élevées sont obtenus pour les cultivars d'Ain Salah AS1 (58,2 %) et AS3 (54,2 %). Les autres cultivars ont été caractérisés par des digestibilités très basses, de 20 à 35 %. Cette grande variabilité dans la digestibilité des cultivars de sorgho a été également observée par plusieurs auteurs [28, 34, 37, 48-50]. Avec ces informations, il serait possible de sélectionner les cultivars les plus appropriés pour l'alimentation.

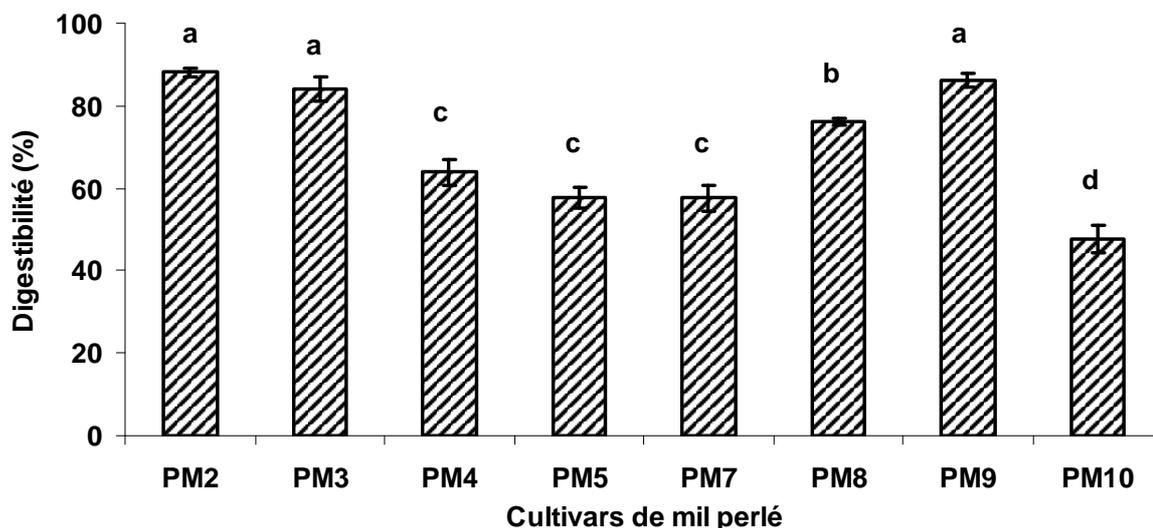


**Figure 4.1:** la variabilité dans la digestibilité *in vitro* de sept cultivars de sorgho, Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différents ( $p \leq 0,0001$ ), a: AS1, AS2, AS3; b: AS2, T1; c: AT1, AT2, SB1, T1.

#### 4.3.2.2 Cas du mil perlé

Les cultivars de mil perlé ont exhibé des valeurs de digestibilité *in vitro* très variables allant de 48 % pour le cultivar PM10 à 88 % pour le cultivar PM2, avec une moyenne de 70,3 % (Figure 4.2). Ces résultats montrent clairement la différence entre les protéines de sorgho et de mil perlé, les protéines de mil perlé sont en moyenne deux fois plus digestibles que celles du sorgho 36,5 %.

Parmi les cultivars algériens de mil perlé, il existe des cultivars très digestibles tels que PM2 (88,1 %), PM9 (86,3 %) et PM3 (84,1 %). Il est à noter que PM2 et PM3 sont des cultivars originaires d'Ain Salah, alors que PM9 est un cultivar commercialisé, importé d'un des pays limitrophes probablement le Niger.



**Figure 4.2:** Variabilité dans la digestibilité *in vitro* de huit cultivars de mil perlé, Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différents ( $p \leq 0,0001$ ), a: PM2, PM3, PM9, b: PM8 et c: PM4, PM5, PM7.

Dans le lot de cultivars de mil perlé échantillonnés, certains cultivars présentent des valeurs de digestibilité plus faibles de l'ordre de 47 % (PM10).

Ces résultats vont permettre de sélectionner les lignes de sorgho ou de mil perlé présentant les meilleures caractéristiques alimentaires, à savoir, les meilleures digestibilités. Cependant la mesure de la digestibilité *in vitro* des protéines ne constitue pas à elle seule un paramètre de sélection des cultivars car la qualité des protéines doit être prise en compte (présence d'acides

aminés essentiels en taux appréciable). Dans le prochain paragraphe, nous allons présenter la qualité des protéines de sorgho et de mil perlé dans tous les cultivars échantillonnés.

### 4.3.3 Evaluation de la qualité des protéines de sorgho et de mil perlé

#### 4.3.3.1 Cas du sorgho

Les tableaux 4.5 et 4.6 présentent respectivement les deux indices de digestibilités; l'AAS et le PDCAAS calculés pour les sept cultivars algériens de sorgho. Les valeurs d'AAS sont toutes de l'ordre de 1,0 ou légèrement plus élevées, excepté pour les acides aminés limitants: la lysine aussi bien que la méthionine et la cystéine. En revanche, les cultivars de sorgho ont exhibé des scores très élevés pour la leucine 2,6, cette valeur est essentiellement due à la teneur élevée en leucine dans tous les cultivars de sorgho.

**Tableau 4.5:** Score en acides aminés (AAS) de sept cultivars algérien de sorgho.

Sorghum cultivars		AS1	AS2	AS3	AT1	AT2	SB1	T1
Taux d'AA pour enfants de 2-5 ans FAO /UNU		<b>AAS</b>						
Phe+Tyr	6,3	1,2	1,4	1,4	1,3	1,4	1,4	1,5
Ile	2,8	1,3	1,4	1,4	1,5	1,3	1,4	1,4
Leu	6,6	2,4	2,4	2,5	2,6	2,4	2,4	2,6
Lys	5,8	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3
Met+Cys	2,5	0,7	0,8	0,5	0,5	0,7	0,6	0,7
Thr	3,4	1,5	1,5	1,5	1,3	1,5	1,4	1,5
Val	3,5	1,3	1,4	1,4	1,5	1,4	1,4	1,3
Hist	1,9	1,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	0,9

Les valeurs des PDCAAS sont représentées dans le tableau 4.6 pour les cultivars de sorgho. Une grande marge de pourcentage de digestibilité corrigée (PDCAAS) a été obtenue pour les cultivars de sorgho. Ceci est probablement dû au fait que les PDCAAS ont été directement liés à la digestibilité *in vitro*. Les cultivars avec une digestibilité élevée comme les cultivars AS1 et AS3 d'Ain Salah ont donné lieu à des PDCAAS élevés, et ceux avec des digestibilités faibles ont donné des valeurs de PDCAAS faibles. Excepté pour le cas de la leucine où les PDCAAS élevés sont essentiellement dus à la richesse du sorgho en leucine approximativement 2,5 fois plus que le niveau exigé de leucine (Tableau 4.5).

**Tableau 4.6:** Digestibilité corrigée (PDCAAS) de sept cultivars algérien de sorgho.

Sorghum cultivars		AS1	AS2	AS3	AT1	AT2	SB1	T1
Digestibilité (%)		58,2	27,6	54,5	24,4	28,1	29,9	33,1
Taux d'AA pour enfants de 2-5 ans FAO /UNU		<b>PDCAAS</b>						
Phe+Tyr	6,3	68,3	40,0	77,4	31,7	39,8	43,0	48,2
Ile	2,8	76,7	39,5	76,7	37,3	37,7	42,2	46,1
Leu	6,6	141,1	67,0	135,6	64,2	67,1	72,6	85,3
Lys	5,8	20,6	9,4	20,5	6,7	9,2	10,6	9,4
Met+Cys	2,5	38,2	21,3	29,2	12,5	18,5	17,3	23,6
Thr	3,4	86,8	40,7	81,1	32,1	41,2	41,7	48,6
Val	3,5	76,8	39,6	77,7	35,7	38,6	42,1	43,8
Hist	1,9	68,6	26,7	56,5	24,4	29,0	31,6	28,4

Le taux d'acides aminés essentiels dans tous les cultivars de sorgho et de mil perlé varie de 39,0 à 42,0 %, comparés aux 33,9 % de protéine de référence exigée pour des enfants de 2 à 5 ans.

Par conséquent, le profil d'acides aminés du sorgho donne un bon équilibre en acides aminés essentiels totaux, limité seulement en lysine, avec une vingtaine d'acides aminés présents en quantités appréciables. Les AAS varient de 1,0 à 2,6, la déficience en lysine, méthionine et cystéine pourrait être complétée par une protéine riche en lysine à savoir les protéines de lait.

#### **4.3.3.2 Cas du mil perlé**

Les tableaux 4.7 et 4.8 représentent respectivement les valeurs des indices de digestibilités AAS et PDCAAS calculés pour les cultivars algériens de mil perlé. Comme précédemment vu pour les cultivars de sorgho, tous les cultivars de mil perlé donnent des valeurs de AAS de l'ordre de 1 ou légèrement supérieure, atteignant 2 et 1,9 respectivement pour la leucine et la thréonine, 1,8 pour le tryptophane et 1,5 pour la valine. La carence en lysine, méthionine et cystéine explique les valeurs faibles de AAS pour ces acides aminés. Cependant, les taux de lysine dans le mil perlé sont plus élevés que ceux des cultivars de sorgho, les AAS pour la lysine dans tous les cultivars de mil perlé sont plus élevés que ceux des cultivars de sorgho (Tableaux 4.7 et 4.8).

**Tableau 4.7:** Score en acides aminés (AAS) de onze cultivars algérien de mil perlé.

Cultivars de mil perlé		PM1	PM2	PM3	PM4	PM5	PM6	PM7	PM8	PM9	PM10	PM11
Taux d'AA pour enfants de 2-5 ans FAO /UNU		<b>AAS</b>										
Phe+Tyr	6,3	1,0	1,1	1,1	1,0	1,1	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0
Ile	2,8	1,4	1,4	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5	1,5	1,4
Leu	6,6	1,9	1,8	2,1	2,0	2,0	1,9	2,0	1,9	1,9	1,9	1,8
Lys	5,8	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,3	0,5	0,6	0,5	0,6
Met+Cys	2,5	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,6	0,7	0,8	0,7	0,8	0,7
Thre	3,4	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8	1,7	1,9	1,9	1,9	1,9
Val	3,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,6	1,6	1,5
Hist	1,9	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	1,0	1,0	1,2	1,3	1,3	1,3
Tryp	1,1	1,8	1,9	2,0	1,7	1,9	1,7	1,9	1,8	1,9	1,9	1,9

**Tableau 4.8:** Digestibilité corrigée (PDCAAS) de huit cultivars algérien de mil perlé.

Cultivars de mil perlé		PM2	PM3	PM4	PM5	PM7	PM8	PM9	PM10	PM11
Digestibilité (%)		88,1	84,2	63,9	57,9	57,6	76,1	86,3	47,8	84,7
Taux d'AA pour enfants de 2-5 ans FAO /UNU		<b>PDCAAS</b>								
Phe+Tyr	6,3	93,9	96,0	63,9	62,7	60,7	76,3	86,7	48,8	85,5
Ile	2,8	122,4	128,5	93,9	84,8	83,7	108,7	126,7	69,6	119,9
Leu	6,6	162,4	175,2	128,6	116,8	114,8	143,0	165,6	93,0	156,4
Lys	5,8	44,8	37,4	28,6	26,2	20,1	39,5	47,8	25,7	48,3
Met+Cys	2,5	65,5	60,8	43,1	42,3	38,9	61,2	62,9	38,2	57,5
Thre	3,4	163,2	160,8	122,3	106,5	100,7	147,2	165,3	92,0	163,5
Val	3,5	130,9	129,9	97,8	89,2	84,1	114,5	134,3	74,9	128,3
Hist	1,9	108,8	102,4	78,2	70,1	56,3	93,9	111,4	61,2	108,5
Tryp	1,1	170,9	166,6	108,0	109,3	109,9	138,4	166,7	89,8	157,7

Les valeurs de digestibilité corrigée (PDCAAS) pour les cultivars de mil perlé sont très élevées et même dépassent dans tous les cultivars, et presque pour tous les acides aminés, les 100 % exceptés les acides aminés limitants: La lysine, la méthionine et la cystéine. Cependant, parmi les cultivars échantillonnés, il existe des cultivars de mil perlé relativement plus riches en lysine. Les PDCAAS varient en effet de 20,1 (PM7) à 48,3 (PM11), alors que

pour le sorgho, les PDCAAS pour la lysine varient de 9,2 (AT2) à 20,6 (AS1). Donc, les taux de lysine dans les cultivars de mil perlé ainsi que les digestibilités élevées placent le mil perlé comme source de protéines alimentaires relativement riche en acides aminés essentiels.

Sur la base de tous ces résultats, il serait intéressant de sélectionner les cultivars de sorgho ou de mil perlé les plus appropriés.

#### 4.4 CONCLUSION

Des pourcentages de protéines élevés, allant jusqu'à 16 % pour le sorgho et jusqu'à 18% pour le mil perlé, ont été trouvés dans les graines des cultivars échantillonnés avec une composition en acides aminés favorable contenant plus de 40% d'acides aminés essentiels.

La mesure de la digestibilité *in vitro* des protéines de sorgho montre que les cultivars locaux d'Ain Salah AS1 et AS3 ont des digestibilités élevées comparées aux autres cultivars. Les cultivars de mil perlé présentent des digestibilités plus élevées que celles du sorgho.

Les indices de digestibilités ont été déterminés à partir de la mesure de la digestibilité *in vitro* des protéines, du calcul des scores en acides aminés (AAS) et des digestibilités corrigées (PDCAAS). A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressé à l'évaluation de ces indices de digestibilités (AAS et PDCAAS) pour déterminer la qualité nutritionnelle des protéines de graines de cultivars algériens de sorgho et de mil perlé.

Relativement à la norme de protéine de l'OMS, la plupart des cultivars de sorgho ont donné des AAS très élevés, avec des valeurs de 0,9 à 2,6 excepté pour la lysine, la méthionine et la cystéine. Les PDCAAS calculés pour les cultivars AS1 et AS3 d'Ain Salah sont très hauts, cependant, tous les autres cultivars ont exhibé des valeurs faibles exceptés pour la leucine.

Tous les cultivars de mil perlé ont donné des valeurs de AAS (1,0 à 2,0) et de PDCAAS (48 à 175) très élevées relativement aux cultivars de sorgho et mil perlé, cependant la carence en lysine, méthionine et cystéine subsiste dans les échantillons de mil perlé mais avec une disponibilité plus grande. Les protéines totales de mil perlé sont plus accessibles aux enzymes digestives que les protéines de sorgho, ce qui explique la différence dans les pourcentages de digestibilité *in vitro*.

Nos résultats démontrent que le sorgho et le mil perlé, qui sont actuellement sous utilisés, constituent certainement une source inestimable de composants protéiques à valoriser aussi bien du point de vu nutritionnel que pour la production de protéines ou peptides bioactifs.

Dans le chapitre suivant, une autre voie de valorisation des protéines de ces deux céréales est utilisée, l'hydrolyse enzymatique. La fraction la plus hydrophobe (les prolamines) est soumise à l'action de certaines peptidases avec différentes spécificités.

# Chapitre Cinq

## Hydrolyse enzymatique des prolamines de sorgho et de mil perlé <sup>3</sup>

### 5.1 INTRODUCTION

Au cours des chapitres précédents, les protéines de sorgho et de mil perlé ont été caractérisées en détail et la fraction majoritaire a été décrite. Cette fraction dite kafirine pour le sorgho et pennisetine pour le mil perlé, est caractérisée par sa faible solubilité dans les solutions aqueuses et sa faible digestibilité. Dans le but d'améliorer ces propriétés, et pour étendre les domaines d'applications des protéines de sorgho et de mil perlé, une hydrolyse enzymatique des prolamines de sorgho et de mil perlé est réalisée. Plusieurs enzymes protéolytiques (peptidases) avec différentes spécificités ont été utilisées pour l'hydrolyse enzymatique des prolamines de sorgho et de mil perlé (l'alcalase, l'espérase, la flavourzyme, la papaine et la trypsine).

L'hydrolyse enzymatique des prolamines de céréales est réalisée pour améliorer les propriétés techno-fonctionnelles et bio-fonctionnelles des protéines initiales. Dans le chapitre 2, des

---

<sup>3</sup> Ce chapitre est basé sur les références suivantes:

**Mokrane, H., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N. & Nadjemi, B. (2006).** Valorisation and recovery of proteins from Algerian varieties of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) by enzymatic hydrolysis. In *Proceeding of Symposium Environmental Biocatalysis: From remediation with enzymes to novel green processes, EnvBC2006*, Edited by Lopez-Cortes, N., Alcade, M., Ferrer, M., Rojas-Cervantes, M.L., Plou, F.J. & Ballestros, A. Cordoba, Spain. April 23-26, 2006, pp. P10 (Poster).

**Mokrane, H., Billel, H., Abdeli, N., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N. & Nadjemi, B. (2005).** Valorisation des protéines de sorgho par hydrolyse enzymatique. In *Proceeding of 1er colloque Euro-méditerranéen en biologie végétale et environnement*. Edited by Université Badji Mokhtar Annaba, Algeria, November 28-30 2005. pp.300. (Poster)

exemples d'applications des hydrolysats de céréales dans plusieurs domaines ont été cités en partie bibliographique.

## 5.2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

### 5.2.1 Matériels

Le cultivar de sorgho (*Sorghum bicolor*) (AS1) utilisé provient de Ain Salah. Le cultivar de mil perlé (*Pennisetum glaucum*) (PM3) utilisé est cultivé à Ain Salah.

Les enzymes utilisées sont: l'alcalase de *Bacillus licheniformis*, la flavourzyme d'*Aspergillus oryzae* proviennent de Novozymes (Bagsvaerd, Danemark). La trypsine du pancréas bovin, est obtenue de Sigma-Aldrich. Le Papaine de *Papaya latex* est obtenue de Biochem-Europe (Mons, Belgique). L'espérase de *Bacillus lentus*: une enzyme de la famille des sérine-endoprotéases provient de Novozymes (Bagsvaerd, Danemark). Elle est active dans une gamme de températures et de pH très large.

### 5.2.2 Extraction de la kafirine du sorgho et de la pennisetine du mil perlé

500 g de farine de sorgho ou de mil perlé sont mis en suspension dans du n-hexane (1:10, m/V) à température ambiante et sous agitation pendant 24 h pour éliminer les lipides. La farine récupérée est séchée. La kafirine et la pennisetine sont extraites dans de l'éthanol aqueux 70% (v/v) à 60°C en présence de 1,0% (v/v) de  $\beta$ -mercaptoéthanol, l'extraction est effectuée en 4 h. Après centrifugation (30 minutes, 8000 g), les surnageants sont récupérés et la fraction de protéines soluble est récupérée en premier par élimination de la majorité du solvant dans un rota-vapeur à 50°C. Les suspensions obtenues de kafirine de sorgho et de pennisetine de mil perlé, sont alors lyophilisées pour un séchage complet.

La pureté des farines de kafirine et de pennisetine est confirmée par SDS-PAGE la méthodologie est la même citée dans le chapitre 3, section 3.2.4. Les taux de protéines déterminées en utilisant la méthode de combustion de Dumas et d'humidité (chapitre 3, section 3.2.2) ainsi que les taux d'acides aminés (chapitre 4, section 4.1) sont déterminés selon les méthodes citées précédemment dans les chapitres 3 et 4.

### 5.2.3 Hydrolyse enzymatique de la kafirine de sorgho et de la pennisetine de mil perlé

3,5 % (m/V) de protéines (kafirine ou pennisetine) sont dispersés dans de l'eau. L'hydrolyse enzymatique est effectuée dans un réacteur pH-stat (Titrimo, Metrohm, Herisau, Suisse) à différents temps, température et pH. En fin de réaction, le pH du mélange réactionnel est

ajusté à 6 et l'enzyme est inactivée par chauffage à 95°C pendant 10 min. Le mélange est alors centrifugé (5000g; 20 min; 4°C). Le surnageant est lyophilisé pour effectuer les analyses de l'hydrolysate enzymatique.

Les enzymes sont utilisées dans leurs conditions optimales d'activité. La concentration en kafirine et en pennisetine est de 3,5 % (m/V), les conditions opératoires pour les enzymes (alcalase, espérase et trypsine) sont une température de 50°C et un pH 9; et celles pour la flavourzyme sont une température de 40°C et un pH 9 et pour la papaine sont une température de 55°C et un pH 9. Le rapport enzyme substrat E/S est de 5% pour toutes les enzymes utilisées.

## 5.2.4 Caractérisation des hydrolysats enzymatiques de kafirine et de pennisetine

### 5.2.4.1 Détermination du degré d'hydrolyse

Le degré d'hydrolyse (DH) (eq. 2.4) est un paramètre qui mesure le pourcentage de liaisons peptidiques clivées dans la séquence de protéine de kafirine ou de pennisetine par rapport au nombre total de liaisons peptidiques. Les DH pour les hydrolysats de kafirine et de pennisetine sont calculés à partir du volume de base consommée au cours de l'hydrolyse comme décrit dans l'équation 2.4 du chapitre 2 section 2.6.2.

Les valeurs de  $h_{\text{tot}}$  pour la kafirine et la pennisetine sont déduites expérimentalement de la teneur en acides aminés totaux dans ces protéines et sont de 7,79 meq/g et de 7,63 meq/g respectivement pour la kafirine et la pennisetine.

$$D.H = V_B \cdot N_B \cdot \frac{1}{\alpha} \cdot \frac{1}{M_P} \cdot \frac{1}{h_{\text{tot}}} \cdot 100$$

### 5.2.4.2 Chromatographie à haute performance d'exclusion stérique (SE-HPLC)

La SE-HPLC est utilisée pour déterminer la distribution en MM des hydrolysats de kafirine et de pennisetine. Cette technique est effectuée avec une colonne de détection des peptides Superdex 10/300 GL-column (13 µm, 300 x 10 mm, GE Healthcare) à 25 °C avec un débit de 0,5 ml/min et un volume d'injection témoin de 100 µl en utilisant un système d'exploitation 100 d'AKTA (GE Healthcare). La phase mobile est de l'acétonitrile à 30 % contenant 0,15 % de TFA dans l'eau Milli-Q. La colonne est calibrée avec 6 marqueurs de MM ribonucléase A (13,7 kDa), aprotinin (6,5 kDa), insuline B à chaînes (3,5 kDa), Ala-Ser-His-Leu-Gly-Leu-Ala-Arg (824 Da), (Ala)<sub>5</sub> (373 Da) et Ala-Gln (217 Da) (Sigma-Aldrich). Une courbe

d'étalonnage logarithmique a été déduite des MMs des marqueurs et de leurs temps respectifs d'élution ( $R^2 = 0,96$ ). Les aliquotes d'échantillons (protéine de 0,1 % (m/V)) sont dissoutes dans la phase mobile et l'élution est suivie à 214 nm.

#### **5.2.4.3 Electrophorèse (SDS-PAGE)**

L'électrophorèse est effectuée sur un gel de polyacrylamide 17% à haute densité pour permettre la détection des peptides de faibles poids moléculaires. Une unité puissante de Hoeffer est utilisée (GE Healthcare, Upsal, Suède). Tous les gels sont colorés avec du bleu de Coomassie Brilliant. Les marqueurs à faible MM (GE Healthcare) utilisés lors de l'électrophorèse sont: l' $\alpha$ -lactalbumines (14,4 kDa), l'inhibiteur de trypsine (20,1 kDa), l'anhydrase carbonique (30 kDa), l'ovalbumine (43 kDa), l'albumine de sérum de bœuf (67 kDa) et la phosphorylase (94 kDa).

### **5.3 RESULTATS ET DISCUSSIONS**

#### **5.3.1 Taux d'acides aminés et de protéines dans la kafirine et la pennisetine**

Le tableau 5.1 représente les taux de protéines et d'acides aminés dans la kafirine et la pennisetine extraites respectivement du sorgho (AS1) et du mil perlé (PM3).

L'efficacité de l'extraction de la kafirine et de la pennisetine des grains de sorgho et de mil perlé est représentée par les taux de protéines totaux élevés respectivement de 69.7 et de 61.4 % déterminées en utilisant la méthode de combustion de Dumas et en utilisant un facteur de 6,25. Les concentrés protéiques obtenus sont caractérisés par des teneurs en acides aminés essentielles élevés 48 et 46,6 %, mais avec une nette absence de la lysine, probablement présent dans les protéines de la fraction non prolamines (Albumines et globulines).

L'analyse des pourcentages d'acides aminés à différents caractères montre que les acides aminés hydrophobes (Alanine, Isoleucine, leucine, Methionine, Phenylalanine, Proline et Valine) constituent la majeure partie des acides aminés de la kafirine et de la pennisetine respectivement avec des pourcentages respectivement de 60 et de 54.9 %, Ces résultats montrent et confirment les propriétés hydrophobes de la kafirine et de la pennisetine.

La présence de fortes teneurs en acides aminés hydrophobes dans les protéines à hydrolyser pourrait orienter l'hydrolyse enzymatique des prolamines de sorgho et de mil perlé vers la production de peptides à activité anti-hypertensive les séquences de ces peptides est riches en acides aminés hydrophobes [150-157].

**Tableau 5.1:** Composition en protéines et en acides aminés dans la kafirine extraite de sorgho (AS1) et de la pennisetine (PM3).de mil perlé les pourcentages sont calculés sur la base de la matière sèche.

	<b>Kafirine</b>	<b>Pennisetine</b>
<b>Taux de protéines totales (%)</b>	69,64	61,39
AA/g de protéines (%)		
<b>Acides aminés essentiels</b>		
Thréonine	4,76 ± 0,07	6,48 ± 0,55
Phénylalanine	6,06 ± 0,21	6,21 ± 0,56
Isoleucine	4,29 ± 0,18	5,22 ± 0,29
Leucine	23,74 ± 0,88	19,01 ± 1,47
Valine	4,49 ± 0,10	5,90 ± 0,44
Méthionine	0,84 ± 0,14	1,30 ± 0,14
Tyrosine	3,85 ± 0,16	2,54 ± 0,27
Acides aminés essentiels totaux	48.01	46.66
<b>Acides aminés non essentiels</b>		
Arginine	4,66 ± 0,51	6,65 ± 0,41
Alanine	10,48 ± 0,63	9,72 ± 0,63
Glycine	1,87 ± 0,03	1,05 ± 0,09
Cystine	0,44 ± 0,05	0,38 ± 0,05
Proline	10,04 ± 0,19	7,52 ± 0,53
Serine	3,94 ± 0,25	4,26 ± 0,53
Acide Glutamique Glutamine	15,31 ± 0,89	16,48 ± 1,99
Acide Aspartiquec Asparagine	3,72 ± 0,13	5,71 ± 0,54
Histidine	1,51 ± 0,10	1,58 ± 0,16
Acides amines non essentiels totaux	51.98	53.36
<b>Pourcentages en acides aminés à différents caractères (%)</b>		
Acides aminés acides	19,04	22,19
Acides aminés basiques	6,17	8,23
Acides aminés hydrophobes	59,93	54,88
Acides aminés apolaire	14,86	14,73

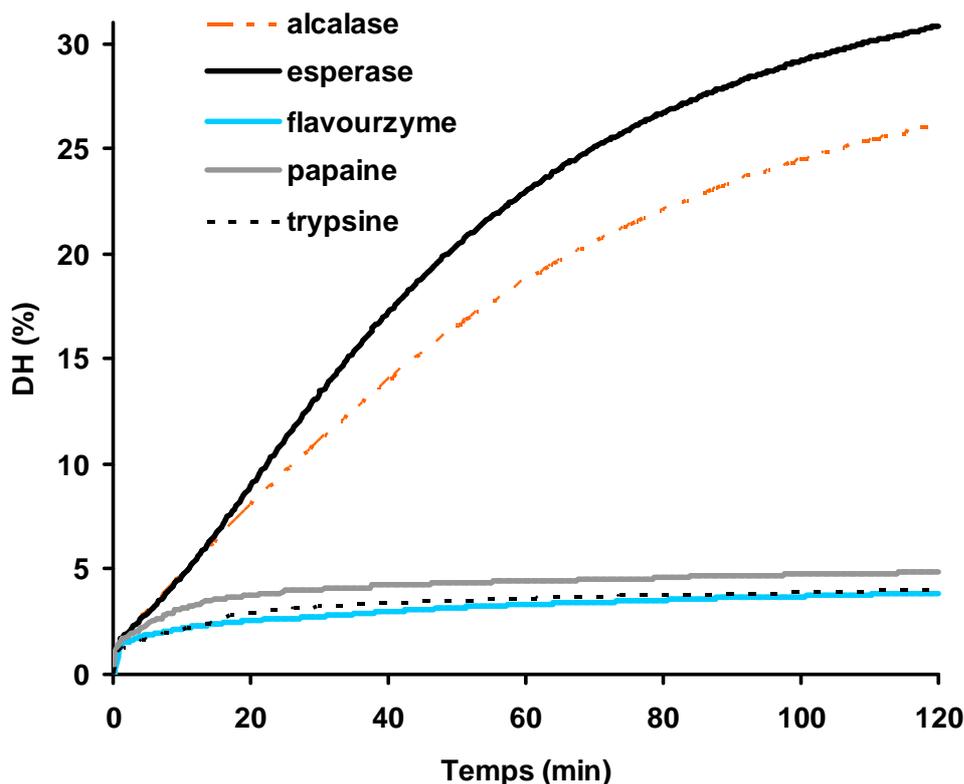
### 5.3.2 Evolution du degré d'hydrolyse

Les figures 5.1 et 5.2 représentent l'évolution des degrés d'hydrolyse au cours du temps pour l'hydrolyse enzymatique respectivement de la kafirine et de la pennisetine.

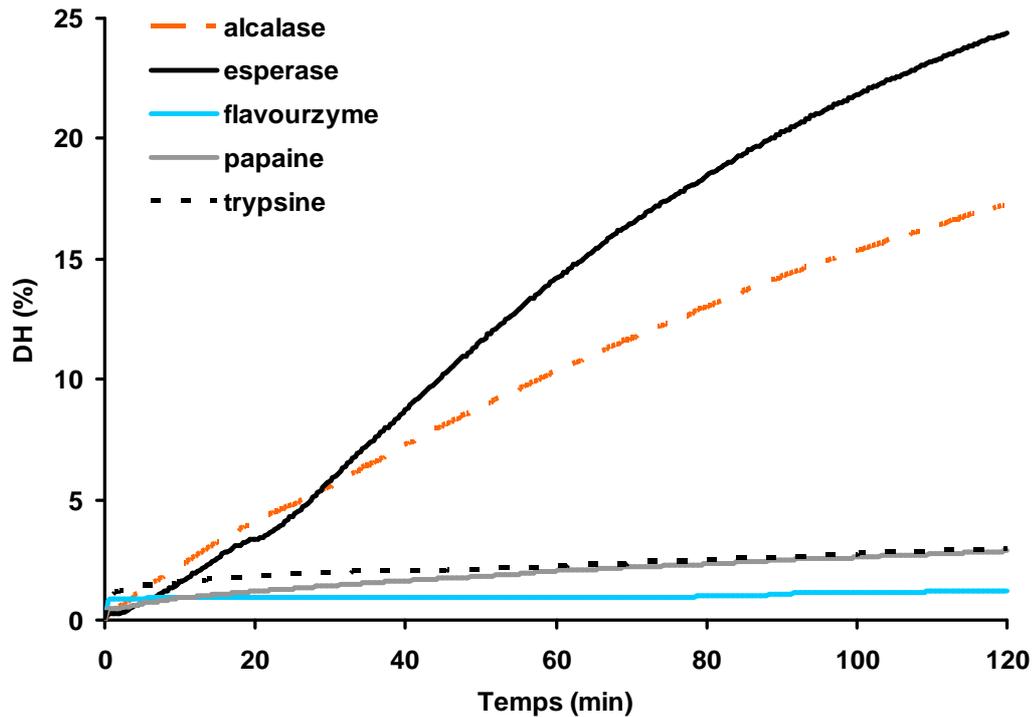
Les résultats obtenus montrent que l'espérase et l'alcalase sont très actives et donnent lieu à des DH élevés de 30 et de 26 % pour la kafirine et de 24,4 et 17,2 % pour la pennisetine. Les autres enzymes donnent lieu à des hydrolysats à très faibles DH, particulièrement, la flavourzyme. La trypsine et la papaine sont aussi peu actives donnant lieu à des DH de 4,9 % pour la kafirine et de seulement 3 % pour la pennisetine. malgré son hydrophobicité plus

prononcée, la kafirine de sorgho donne des degrés d'hydrolyse plus élevés que la pennisetine, pour toutes les enzymes testées

Souvent, des degrés d'hydrolyse faibles sont appréciés quand le but recherché est d'améliorer les propriétés fonctionnelles des protéines (solubilité, pouvoir émulsifiant etc.), cependant quand le but recherché est la purification d'un peptide bioactif donné, une hydrolyse poussée est recherchée [130-157].



**Figure 5.1:** Evolution du degré d'hydrolyse au cours de l'hydrolyse enzymatique de la kafirine de sorgho par plusieurs enzymes. Concentration en kafirine 3,5 % (m/V), les conditions opératoires pour les enzymes (alcalase, esperase, trypsine) sont température 50°C, pH 9; et celles pour la flavourzyme sont température 40°C et pH 9 et la papaine sont température 55°C et pH 9. E/S est de 5%.



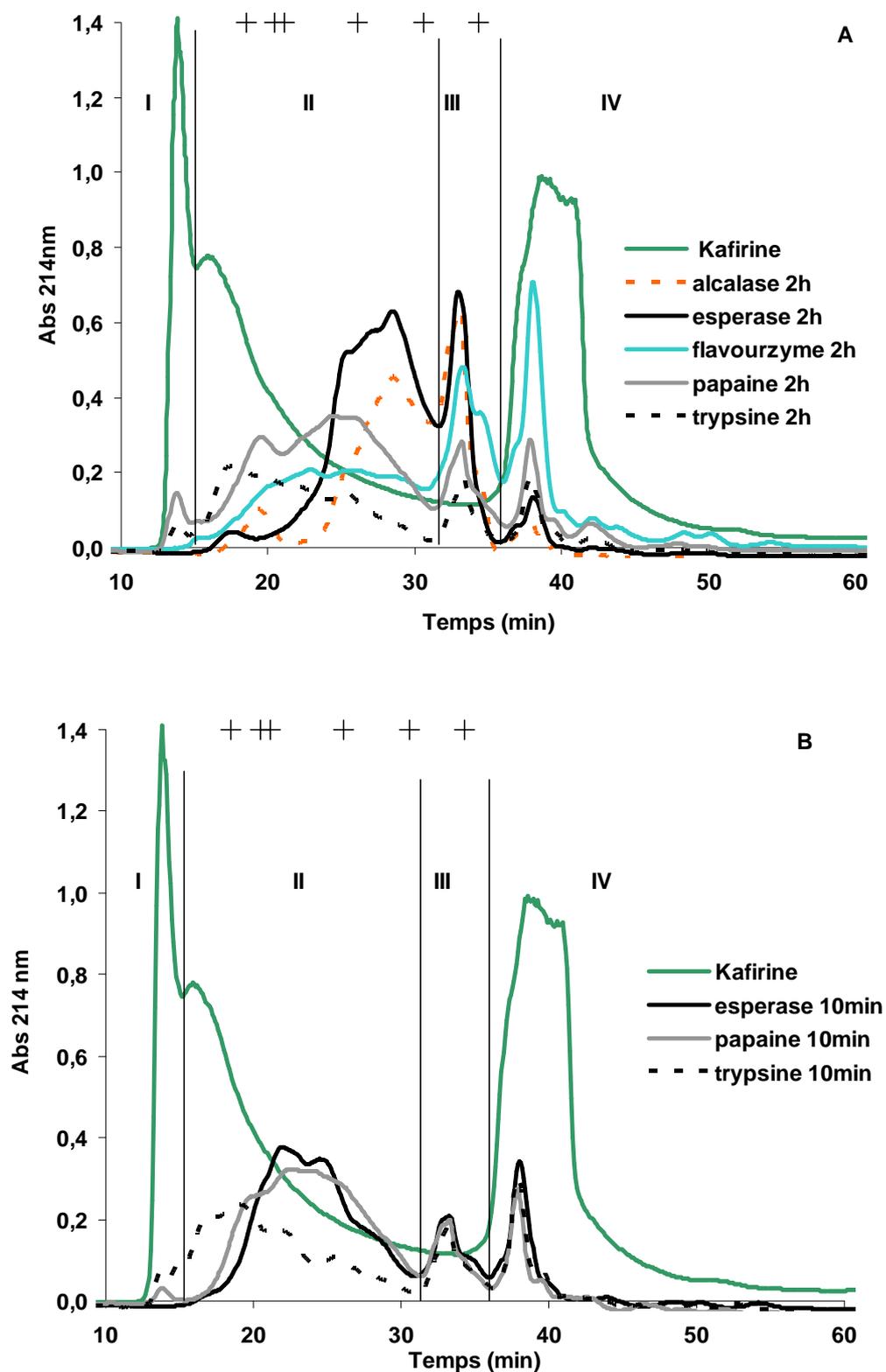
**Figure 5.2:** Evolution du degré d'hydrolyse au cours de l'hydrolyse enzymatique de la pennisetine de mil perlé par plusieurs enzymes. Concentration en pennisetine 3,5 % (m/V), les conditions opératoires pour les enzymes (alcalase, esperase, trypsine) sont température 50°C, pH 9; et celles pour la flavourzyme sont température 40°C et pH 9 et la papaine sont température 55°C et pH 9. E/S est de 5%.

En se basant sur les DH obtenus, l'utilisation d'enzymes telles que l'esperase et l'alcalase favorisent la production et la recherche de peptides à activité bioactives, alors que l'utilisation d'enzyme telles que la flavourzyme, la trypsine et la papaine serait souhaitable pour produire des hydrolysats avec des propriétés fonctionnelles (solubilité et pouvoir émulsifiants...) meilleures.

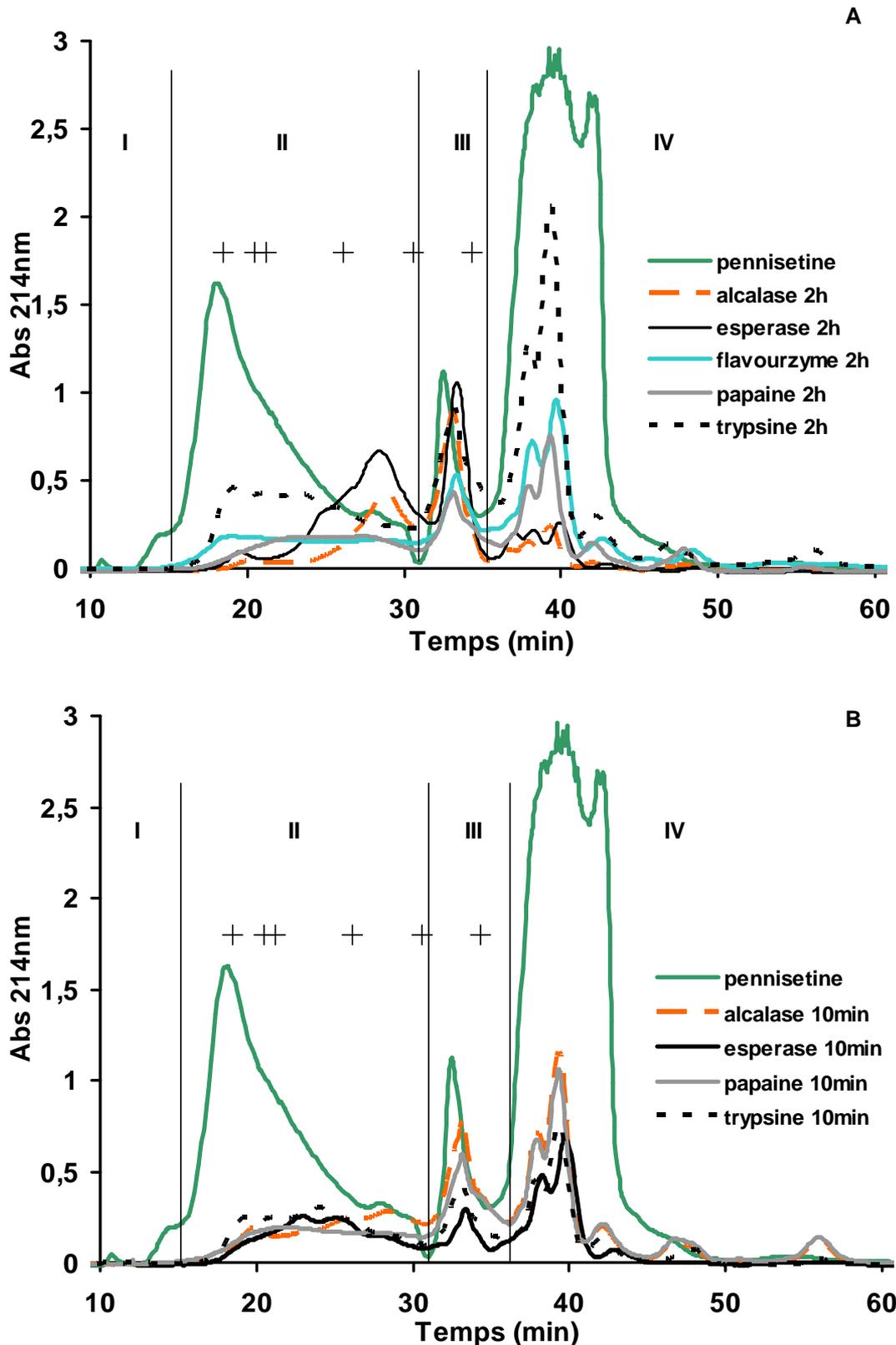
### 5.3.3 Profils de chromatographie à haute performance d'exclusion stérique (SE-HPLC)

Plusieurs enzymes ont été utilisées pour l'hydrolyse enzymatique des prolamines de sorgho et du mil perlé (l'alcalase, l'esperase, la flavourzyme, la papaine et la trypsine). Pour chaque enzyme utilisée, deux hydrolyses enzymatiques ont été réalisées avec des degrés d'hydrolyse extrêmes: faible (10 min) et élevé (2 heures).

Les profils chromatographiques d'exclusion stérique des protéines natives (kafirine et pennisetine) et de leurs hydrolysats enzymatiques sont représentés dans les figures 5.3 et 5.4, respectivement, pour le sorgho et le mil perlé.



**Figure 5.3:** Profil de chromatographie d'exclusion stérique (SE-HPLC) de la kafirine de sorgho et de ses hydrolysats enzymatiques (Cultivar AS1) en utilisant plusieurs enzymes à différents temps d'hydrolyse: (A) 2 heures et (B) 10 min. Avec indication (+) des marqueurs de différentes masses moléculaires respectivement de gauche à droite: Ribonucléase (13700 Da), Aprotinine (6500 Da), Insuline (3500 Da), Octapeptide (824 Da), Alanine5 (373 Da), Alanine-glycine (217 Da).



**Figure 5.4:** Profil de chromatographie d'exclusion stérique (SE-HPLC) de la pennicetine de mil perlé et de ses hydrolysats enzymatique (Cultivar PM3) en utilisant plusieurs enzymes à différents temps d'hydrolyse: (A) 2 heures et (B) 10 min. Avec indication (+) des marqueurs de différentes masses moléculaires respectivement de gauche à droite: Ribonucléase (13700 Da), Aprotinine (6500 Da), Insuline (3500 Da), Octapeptide (824 Da), Alanine5 (373 Da), Alanine-glycine (217 Da).

Les profils de la kafirine et de ses hydrolysats (Figure 5.3) et de la pennisetine et de ses hydrolysats (Figure 5.4) ont été divisés en 4 zones distinctes. La zone I s'étend de 0 à 15,5 min et représente les protéines à poids moléculaires élevés (supérieurs à 20 kDa) La zone II s'étend de 15,5 à 31,9 min et représente les protéines à poids moléculaires moyens entre 20 kDa et 0,3 kDa. La zone III s'étend de 31,9 à 36 min et représente les peptides à faible poids moléculaires inférieures à 0,3 et supérieurs à 0,1 kDa. La zone IV s'étend de 36 à 60 min représente les peptides à très faible poids moléculaires de l'ordre de dipeptides.

### *Cas de la kafirine*

Les différentes formes de kafirine  $\gamma$ ,  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  sont éluées dans la zone I et apparaissent dans la protéine native en un seul grand pic (28-24 kDa), ce pic disparaît complètement dans les hydrolysats de kafirine quand les enzymes utilisées sont l'espérase, l'alcalase et la flavourzyme et quand l'hydrolyse est poursuivie pendant 2 heures. Cependant aussi bien dans les profils des hydrolysats de kafirine utilisant la papaine et la trypsine de 2 h (Figure 5.3, A) et de 10 min (Figure 5.3, B), ce pic persiste mais avec une faible intensité.

Dans la zone II (Figure 5.3, A et B), la forme  $\beta$ -kafirine est éluée à 16 min dans l'extrait protéique natif de kafirine, l'hydrolyse enzymatique pendant 2 h (Figure 5.3, A) par toutes les enzymes utilisées fait disparaître cette forme et donne lieu à des pics à plus faibles MMs élués après 16 min, une très grande gamme de peptides de MMs compris entre 17,5 kDa et 0,3 kDa. Cependant comme constaté précédemment lors de la mesure des DH, les profils des hydrolysats de l'alcalase et de l'espérase donnent lieu à des peptides de plus faibles poids moléculaires que les autres enzymes utilisées.

L'analyse des profils dans la zone III (Figure 5.3, A et B) montrent l'apparition de peptides de faibles MMs inférieurs à 0,3 kDa (pentapeptides et plus faible), cette forme de peptides n'est pas présente dans la fraction de kafirine native mais l'hydrolyse enzymatique provoque l'apparition d'un pic ou de plusieurs pics à intensités variables selon l'enzyme utilisée, dans tous les hydrolysats de 2h et de 10 min.

Les dipeptides ainsi que les acides aminés libres sont élués dans la zone IV (Figure 5.3, A et B), les profils obtenus montrent que durant l'extraction de la fraction de kafirine native certains acides aminés libres sont aussi détectés. D'autre part, l'analyse des profils obtenus dans cette zone montrent que l'hydrolysats de la flavourzyme présente le plus d'acides aminés

libres et de peptides de faibles MMs, ce résultat pourrait être expliqué par la large spécificité de cette enzyme qui est en même temps endo et exo-peptidases (Figure 5.3, A) alors que toutes les autres enzymes sont soit endo-peptidase (alcalase), ou sérine endopeptidase (la trypsine) qui agit sur l'extrémité C-terminale de la protéine quand l'acide aminé est la lysine ou l'arginine, ou cystéine endopeptidase (papaine) ou alors une sérine endopeptidase à large spécificité telles que l'espérase..

### *Cas de la pennisetine*

Les profils de chromatographie d'exclusion stérique (SE-HPLC) de la pennisetine et de ses hydrolysats ont été subdivisés en 4 différentes zones (Figure 5.4, A et B) comme défini précédemment pour la kafirine.

Dans la zone I correspondant aux protéines ou peptides de MMs supérieures à 20 kDa, un petit pic est élué pour la fraction pennisetine native correspondant probablement aux formes A et B-pennisetines, ce pic disparaît complètement après hydrolyse enzymatique pour toutes les enzymes aussi bien pour les hydrolyses poussées de 2h (Figure 5.4, A) et les hydrolyses à faibles DH de 10 min (Figure 5.4, B).

Les profils obtenus dans la zone II correspondant à l'élution des peptides de moyenne MMs (20 kDa à 0.3 kDa) sont caractérisés par l'apparition d'un grand pic à 18 min dans la fraction pennisetine native. Ce dernier est probablement le résultat de l'élution de la forme C-pennisetine de MM 12 kDa, ce pic disparaît complètement suite à l'hydrolyse enzymatique pour toutes les enzymes et toutes les durées d'hydrolyse. Toutefois, une exception est constatée pour la flavourzyme où même après 2 h d'hydrolyse cette protéine persiste mais avec une moindre intensité (Figure 5.4, A). D'autres peptides de plus faible MM que la C-pennisetine sont élués dans cette zone, et sont le résultat de l'hydrolyse enzymatique des formes A-, B- et C-pennisetine.

L'analyse des peptides élués dans la zone III (Figure 5.4, A, B) montre l'apparition d'un pic de MM 0,25 kDa correspondant à un penta peptide dans la fraction pennisetine native seulement. Dans tous les hydrolysats un pic à plus faible MM à 0,19 kDa est présent à 33,5 min, ce pic correspondrait à des peptides de l'ordre du tetra- ou tri-peptide .

De plus petits peptides sont élués dans la zone IV (Figure 5.4, A, B), pour la fraction protéique native (pennisetine) et ses hydrolysats. Les MMs déduites représentent des dipeptides ou certains acides aminés libres.

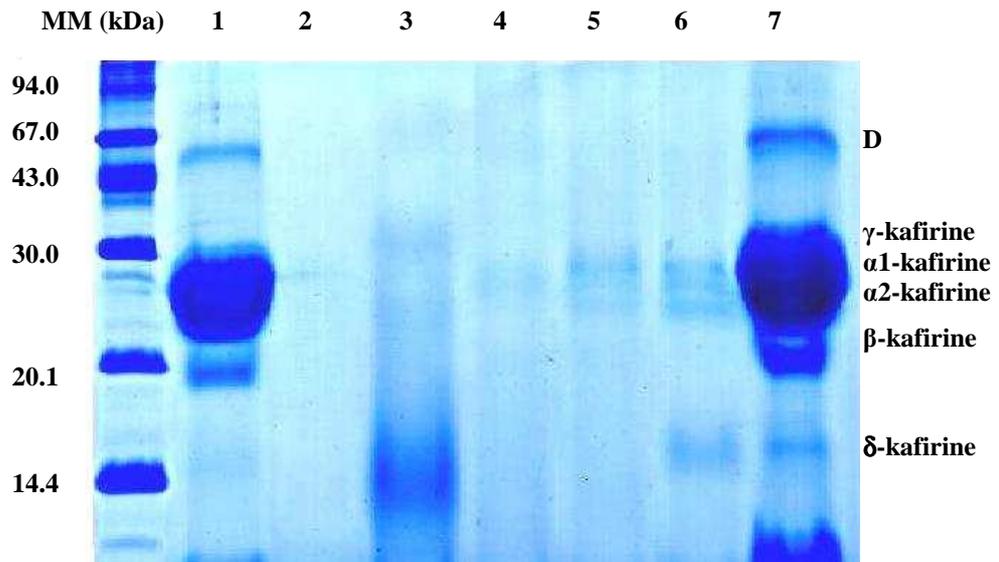
En comparant les différentes enzymes utilisées, il semblerait que l'alcalase ainsi que l'espérase permettent une hydrolyse plus poussée aussi bien pour le sorgho que pour le mil perlé. La flavourzyme, la papaine et la trypsine permettent la formation de peptides à plus haut poids moléculaires que l'espérase et l'alcalase. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment pour les DH.

Selon le type d'utilisation recherché des hydrolysats enzymatiques des prolamines de sorgho ou de mil perlé, il serait plus intéressant de produire des peptides à faible poids moléculaires si le but est la purification de peptides bioactifs, d'autre part si le but recherché est l'amélioration des propriétés fonctionnelles (solubilité, pouvoir émulsifiant, pouvoir moussant), des hydrolyses à faibles degrés d'hydrolyse seraient préférables [182,183].

#### **5.3.4 Profils de SDS-PAGE**

##### ***Cas de la kafirine***

L'éluion de la kafirine et de ses hydrolysats enzymatiques sur SDS-PAGE confirme la pureté de la kafirine extraite. Les sous unités  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ -kafirine pour le sorgho apparaissent clairement comme le montre la figure 5.5, lignes 1 et 7. L'hydrolyse enzymatique de la kafirine effectuée avec l'alcalase pendant 2 h montrent réellement la disparition presque totale des bandes de kafirine, ces résultats confirment le DH élevé observé auparavant pour l'alcalase et la disparition totale des pics dans la zone I et le début de la zone II dans les profils de SE-HPLC. La même remarque pourrait être émise pour l'espérase. Cependant la flavourzyme n'agit que faiblement sur la kafirine puisque les différentes formes de kafirine sont encore détectables (Figure 5.5, ligne 6). La trypsine (Figure 5.5, ligne 4) agit sur les formes  $\alpha_2$ ,  $\beta$  et  $\delta$ -kafirine mais les formes  $\alpha_1$ -et  $\gamma$  kafirine subsistent. La papaine n'a aucune action sur la forme  $\delta$ -kafirine (Figure 5.5, ligne 3).



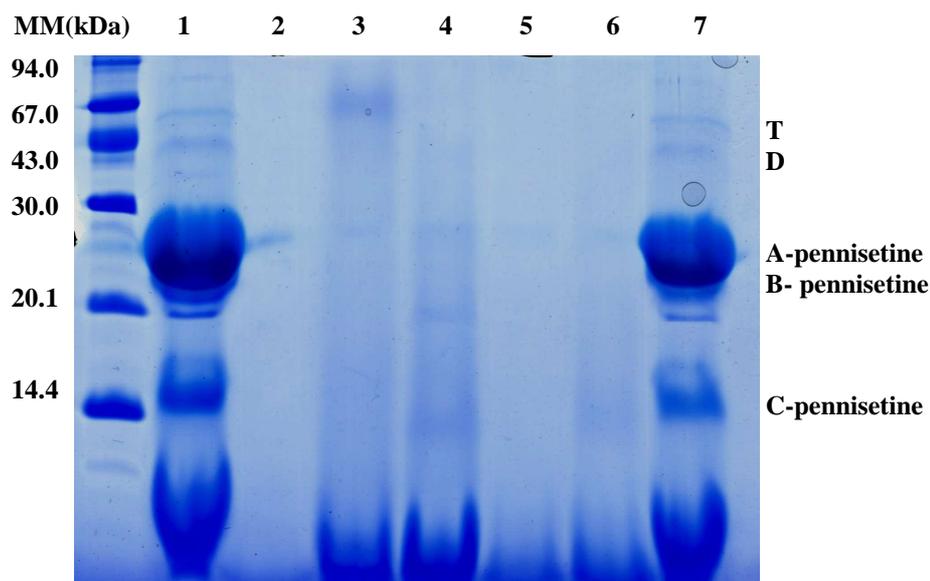
**Figure 5.5:** SDS-PAGE de la kafirine de sorgho et de ses hydrolysats; ligne MM désigne les marqueurs de masses moléculaires; ligne 1 et 7: kafirine; ligne 2: hydrolysats d'alcalase; ligne 3: hydrolysats de papaïne; ligne 4: hydrolysats de trypsine; ligne 5: hydrolysats d'espérase; ligne 6: hydrolysats de flavourzyme. D désigne dimère de kafirine, Avec indication des sous unités  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ -kafirine pour le sorgho.

### *Cas de la pennisetine*

La figure 5.6 représente les profils de SDS-PAGE de la pennisetine et de ses hydrolysats par plusieurs enzymes pendant 2h d'hydrolyse. La pureté de la pennisetine est confirmée sur SDS-PAGE et l'apparition des formes monomérique de la pennisetine A-, B- et C-pennisetine est clairement indiquée (Figure 5.6, lignes 1 et 7).

Comme pour la kafirine, l'alcalase avec l'espérase (Figure 5.6, ligne 2 et 5) hydrolyse presque complètement les trois formes de pennisetine. Les autres enzymes laissent apparaitre des bandes très faibles de monomères de pennisetine.

Ainsi grâce aux profils obtenus sur SDS-PAGE, de plus amples informations sur l'accessibilité des enzymes protéolytiques aux différentes formes de kafirine sont disponibles. Cependant l'utilisation de la chromatographie d'exclusion stérique (SE-HPLC) permet de compléter et combler les lacunes des profils de SDS-PAGE la connaissance de la distribution en MM dans les hydrolysats



**Figure 5.6:** SDS-PAGE de la pennisetine de mil perlé et de ses hydrolysats, ligne MM désigne les marqueurs de masses moléculaires; ligne 1 et 7: pennisetine; ligne 2: hydrolysats d' alcalase; ligne 3: hydrolysats de papaïne; ligne 4: hydrolysats de trypsine; ligne 5: hydrolysats d'espérase; ligne 6: hydrolysats de flavourzyme. D désigne dimère et T trimère de kafirine, Avec indication des sous unités A, B- et C-pennisetine pour le mil perlé.

#### 5.4 CONCLUSION

Grace à cette étude, l'hydrolyse enzymatique des protéines de sorgho et de mil perlé à faibles solubilités et indigestes telles que les prolamines, pourrait constituer une alternative sans équivoque à la production de concentrés peptidiques avec de meilleures propriétés technofonctionnelles et bio-fonctionnelles.

Le choix de l'enzyme et des conditions opératoires adéquates pourrait orienter l'hydrolyse enzymatique vers la production d'un hydrolysats avec des propriétés spécifiques. L'alcalase et l'espérase favorisent la production des hydrolysats à haut DH alors que la trypsine, la papaïne et la flavourzyme sont conseillées pour la production d'hydrolysats à faible DH.

Dans le prochain chapitre, nous nous concentrerons sur les albumines de sorgho et de mil perlé et en particulier la purification et la caractérisation de protéines à effet inhibiteur des endoxylanases.

# Chapitre Six

## Isolation, purification et caractérisation de protéines inhibitrices des endoxylanases <sup>4</sup>

### 6.1 INTRODUCTION

L'arabinoxylane (AX) est le principal composant des parois cellulaires des graines de céréales comme le sorgho ou le mil perlé. L'AX est en grande partie non extractible dans l'eau. Comme montré dans la revue bibliographique (Chapitre 1), les AXs de sorgho et de mil perlé sont plus résistants aux endoxylanases que l'arabinoxylane du blé (*Triticum aestivum* L.) ou celui de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) [101, 115]. Les endoxylanases sont déjà employés dans la confection du pain [56] et dans la séparation du gluten et de l'amidon [184]. Cependant, leur efficacité est souvent limitée par la présence des inhibiteurs protéiques d'endoxylanase dans les céréales [56]. Jusqu'à présent, trois types d'inhibiteurs d'endoxylanase ont été identifiés, TAXI, XIP et TLXI. Les inhibiteurs d'endoxylanase de type TAXI ont une masse moléculaire (MM) de 40 kDa et ont été détectés dans le blé, le blé dur (*Triticum durum* Desf.), l'orge (*Hordeum vulgare* L.) et le seigle (*sécale cereale* L.) [65]. Les protéines de type XIP (30 kDa) ont été détectées dans les céréales citées précédemment en plus du riz (*Oryza sativa* L.) et du maïs (*Zea mais* L.). Plus de détails sur la structure et la fonctionnalité de ces inhibiteurs

<sup>4</sup> Ce chapitre est basé sur les références suivantes:

**Mokrane, H., Gebruers, K., Beaugrand, J., Proost, P., Nadjemi, B., Belhaneche-Bensemra, N., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2009).** Algerian pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) contains XIP but not TAXI and TLXI type xylanase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 5542-5548.

**Mokrane, H., Gebruers, K., Nadjemi, B., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2008).** Variability, purification and characterization of endoxylanase inhibitors in Algerian sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) cultivars. In *Proceeding of 4th International Congress on Biocatalysis*, Edited by Grote R. & Atranikian G. University of Technology of Hamburg, Hamburg, Germany, August 31- September 4, 2008, pp. 314.

**Gebruers, K., Mokrane, H., Nadjemi, B., Beaugrand, J., Fierens, K., Proost, P., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2008).** Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) contains a XIP-type xylanase inhibitor but none of the TAXI- and TLXI-types. *Journal of Cereal Science* 48, 203-212.

d'endoxylanase ont été rapportés dans la partie bibliographique. Jusqu'ici, les gènes de TAXI et de XIP ont été déjà identifiés et caractérisés dans plusieurs des céréales citées ci-dessus [68, 81, 186, 187]. Les trois formes d'inhibiteurs et plus particulièrement la forme XIP sont intimement liées à l'auto-défense de la plante contre les parasites d'origines fongiques ou bactériennes.

Le présent chapitre décrit pour la première fois la détection, l'isolation, la purification et la caractérisation des protéines inhibitrices d'endoxylanases de type XIP à partir des graines de sorgho et de mil perlé. Jusqu'à la présente étude, la présence des inhibiteurs protéiques d'endoxylanase dans le sorgho ou le mil perlé n'a pas été démontrée et aucune mesure de l'effet d'inhibition d'endoxylanase n'a été rapportée. En 2003, Elliott et coll. [81] ont suggéré la présence de trois séquences de protéines homologues de XIP dans le sorgho en se basant sur l'analyse de la séquence d'ADN. Aucun rapport pour le mil perlé n'a été trouvé. Basé sur ces observations et dans le cadre de la valorisation des protéines de sorgho et de mil perlé, une partie de la recherche dans cette dissertation a été consacrée à la mesure des taux d'inhibition dans différents cultivars de sorgho et de mil perlé. Une série de techniques chromatographiques (échange d'ions et affinité) et électrophorétiques a été utilisée pour la purification des inhibiteurs protéiques des endoxylanases des grains de sorgho et de mil perlé.

## **6.2 MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **6.2.1 Matériels**

Sept échantillons de graines de cultivars de sorgho: AS1, AS2, AS3, AT1, AT2, SB1 et T1, et onze échantillons de graines de cultivars de mil perlé (PM1 à PM11) ont été prélevés dans des régions arides du Sahara Algérien. Les cultivars ont été décrits en détail dans le chapitre 3 (Figure 3.1, Tableau 3.1). Les graines d'un cultivar de sorgho commercialisé en Belgique ont été utilisées pour comparaison.

Les grains de mil perlé et de sorgho ont été transformés en farine (mouture) dans un moulin de type Cyclotec 1093 (Tecator, Hogänäs, Suède), les farines obtenues ont été manuellement tamisées à travers un tamis de 400  $\mu\text{m}$ . Tous les produits chimiques et réactifs proviennent de Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique) et sont de grade analytique.

Tous les milieux d'électrophorèse et de chromatographie, et les marqueurs de masses moléculaires (MM) et de pI sont de GE Healthcare (Uppsala, Suède). L'endoxylanase de GH

11 *Bacillus subtilis* (AAA22897) a été fournie par Mr. Filip Arnaut (NV Puratos, Groot-Bijgaarden, Belgique). Les deux endoxylanases de GH 11 *Trichoderma longibrachiatum* (également connu sous le nom de *T. reesei*), l'une de pI de 6,6 (CAA46294) et l'autre de pI de 9,0 (CAA49293), les endoxylanases de GH 11 *Aspergillus niger* (numéro d'accession de NCBI CAA01470) et *Trichoderma viride* (CAB60767), et le substrat Xylazyme-AX sont de Megazyme (Bray, Irlande). Les endoxylanases de GH 10 *Aspergillus oryzae* (BAA76476) et *Penicillium purpurogenum* (AAF71268) ont été fournis par prof. Maija Tenkanen (VTT biotechnologie de l'université de Helsinki, Finlande) et Prof. Jaime Eyzaguirre (Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica De Chili, Chili), respectivement. L'endoxylanase GH 10 d'A. *Niger* a été purifiée d'un filtrat de culture de CBS 110,42 d'A. *Niger* [64]. Les membranes de nitrocellulose activée et de PVDF sont de Schleicher & Schuell (Dassel, Allemagne).

Les anticorps polyclonaux (PABs) ont été produits par réaction immunitaire du lapin contre une injection bimensuelle de faibles concentrations d'inhibiteurs d'endoxylanases du blé de type TAXI, XIP et TLXI. Pour obtenir des PABs spécifique pour chaque inhibiteur [76]. Les PABs obtenus contre TAXI, XIP ou TL-XI ont été séparés par la chromatographie d'affinité en utilisant les inhibiteurs immobilisés. Les PABs épurés permettent l'immuno-détection et l'immuno-quantification de chaque type d'inhibiteur d'endoxylanase de blé en utilisant le western blot. En se basant sur l'analogie de séquence entre les inhibiteurs d'endoxylanases du blé et d'autres céréales, cette technique permet de prédire la présence de ces inhibiteurs avant leur extraction [76]. Tous les autres produits chimiques sont de Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique).

### **6.2.2 Préparation de la matrice de la colonne d'affinité**

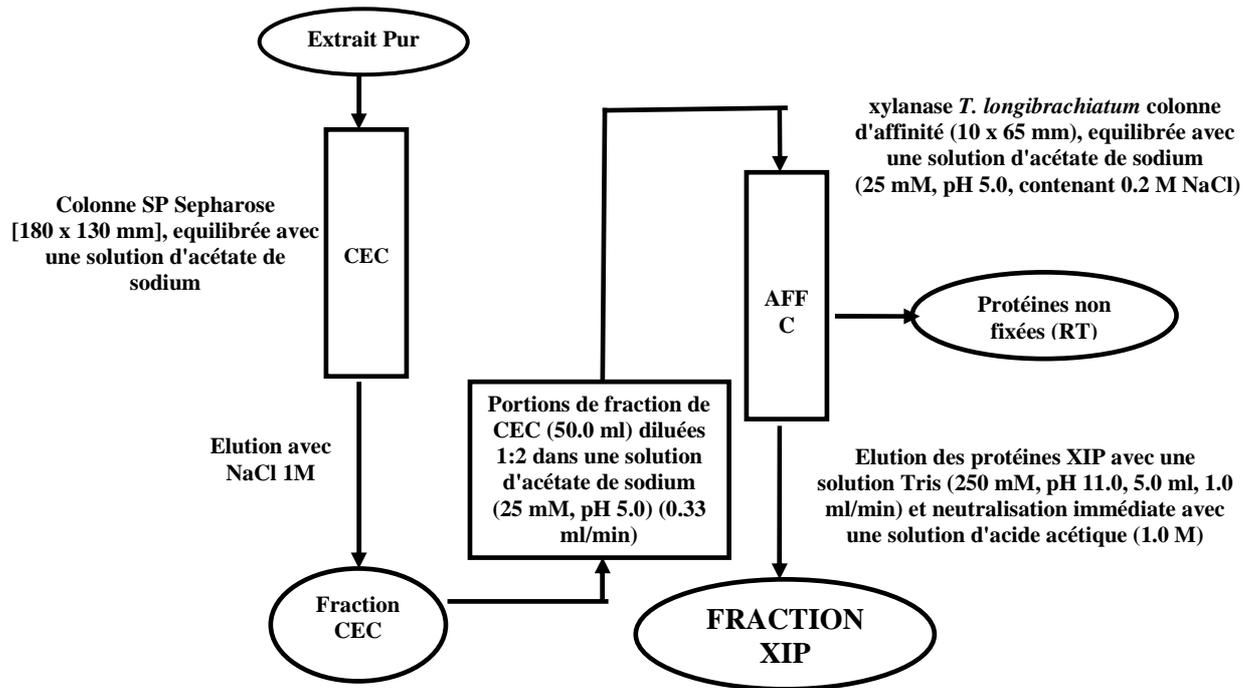
Avant immobilisation de l'enzyme, l'endoxylanase de *T. longibrachiatum* de la famille GH 11 Megazyme (pI 6,6) est dialysée pendant 16 h dans de l'eau déminéralisée. La sépharose est activée par N-hydroxysuccinimide 4. Cette matrice est employée pour la préparation de la matrice d'affinité (6,0 ml) selon Gebruers [64].

### **6.2.3 Isolation et purification des protéines inhibitrices d'endoxylanase**

La farine de sorgho (1,0 kg) est mise en suspension dans une solution aqueuse d'acide L-ascorbique 0,1 % (m/V) (6,0 L), sous agitation durant la nuit à 7°C et centrifugée (10000 g, 30 minutes, 7°C). L'acide L-Ascorbique a été employé pour réduire l'oxydation des composés

phénoliques pendant l'extraction. Dans le cas du mil perlé, la farine (1,0 kg) est mise en suspension sous agitation constante à 7°C dans une solution tampon d'acétate de sodium (26 mM, pH 4,6) en présence de Poly Vinyl Poly Pyrrolidone (PVPP) pour éliminer les polyphénols par adsorption, la suspension est ensuite centrifugée (10000 g, 30 minutes, 7°C). Le pH des deux surnageants de sorgho et de mil perlé est ajusté à 4,6 en ajoutant HCl 2 M.

Les extraits protéiques de mil perlé ou de sorgho présumés présentant un effet d'inhibition vis à vis des endoxylanases ou ne présentant aucun effet antixylanique est concentrée et retenue par chromatographie d'échange cationique (CCE) sur une colonne de Sépharose [180 x 130 millimètres, équilibrés avec une solution tampon d'acétate de sodium (26 mM, pH 4,6)] (Figure 6.1). La fraction retenue de protéine est éluée dans une seconde étape avec une solution de NaCl (1 M, 1 L), la fraction de protéine obtenue est nommée CCE. Des aliquotes de la fraction CCE (60,0 ml) sont diluées 1:2 dans la solution tampon d'acétate de sodium (26 mM, pH 6,0) et injectées sur une colonne d'affinité de xylanase de *T. longibrachiatum* [10 x 66 mm, équilibrés avec une solution tampon d'acétate de sodium (26 mM, pH 6,0, contenant 0,2 M NaCl), débit de 0,33 ml/min]. Cette dernière a été produite avec une immobilisation d'une endoxylanase de *T. longibrachiatum* GH 11 (pI 6,6), en se basant sur l'affinité inhibiteur-substrat, les inhibiteurs sont au début fixés sur les enzymes pour ensuite être libérés en utilisant des pH élevés. Les protéines de XIP sont éluées de la colonne avec une solution de Tris (260 mM, pH 11, 6 ml, débit de 1 ml/min) et immédiatement neutralisées avec la solution d'acide acétique (1,0 M). La fraction de protéine éluée pendant la chromatographie d'affinité (AFF C.) est désignée sous le nom de la fraction XIP épurée (Figure 6.1).



**Figure 6.1:** Représentation schématique du procédé de purification des XIP de sorgho et de mil perlé. CEC: chromatographie d'échange cationique, AFF C: Chromatographie d'affinité, RT: Protéines non fixées.

#### 6.2.4 Mesure du taux d'inhibition des endoxylanases par les extraits de sorgho et de mil perlé

La mesure du taux d'inhibition des endoxylanases par les extraits de sorgho et de mil perlé est effectuée avec la méthode de Xylazyme-AX (Megazyme, Bray, Irlande) [64]. Cette méthode est basée sur la mesure colorimétrique des solutions de fragments colorés solubles d'azurine liés à l'AX de blé [63].

La farine (2,0 g) de sorgho ou de mil perlé est extraite pendant 30 minutes avec une solution tampon d'acétate de sodium (25 mM, pH 5,0; 20,0 ml) et centrifugée (10000 g, 30 minutes, 7 °C). Les supernageants des extraits protéiques de mil perlé ou de sorgho ainsi préparés, sont préalablement dilués 75 fois pour les cultivars de sorgho et 150 fois pour les cultivars de mil perlé.

Toutes les solutions d'endoxylanase ont été préparées dans une solution tampon d'acétate de sodium (25 mM, pH 5,0) avec l'albumine de sérum bovin (BSA, 0,5 mg/ml) et contiennent 2,0 unités de xylanase par ml de solution tampon. Une unité de xylanase est définie par Gebruers [64] par la concentration de xylanase correspondant à une absorbance d'une unité 1,0. Pour *A. Niger* elle est approximativement de 6,1 nM, pour *T. longibrachiatum* (pI 6,6) elle atteint 8,9

nM, pour *T. longibrachiatum* (pI 9,0) 2,1 nM, pour *T. viride* 11,6 nM et pour *B. subtilis* GH 116,8 nM. Les concentrations correspondantes pour les xylanases GH 10 sont respectivement 36,6 nM pour *A. Niger*, 2,9 nM pour *A. oryzae* et 17,7 nM pour *P. purpurogenum*. Ces concentrations de xylanases ont été calculées à partir des données commerciales et confirmées ou déduites expérimentalement par l'utilisation d'une gamme variées de concentrations pour aboutir aux concentrations en enzymes convenables.

Les solutions d'endoxyylanase (0,5 ml) sont préincubées pendant 30 minutes à 30 °C avec un volume égal d'inhibiteur ou d'extrait pour permettre la formation des complexes enzyme-inhibiteur. Après la préincubation, des tablettes de substrat de Xylazyme-AX sont ajoutées, les échantillons sont encore incubés à 30 °C pendant 60 minutes. La réaction est stoppée en ajoutant 1,0 % d'une solution de Tris (10,0 ml) les solutions sont mélangés au vortex. Après 10 minutes à température ambiante, le contenu des tubes est filtré. Les valeurs d'absorbance à 590 nm de la solution de référence et les échantillons d'inhibiteurs sont mesurés. Les pourcentages d'inhibition sont calculés à partir de la différence entre les valeurs corrigées d'absorbance de l'échantillon et la référence.

Les pourcentages d'inhibition vis à vis des endoxyylanases de *P. purpurogenum* et de *T. longibrachiatum* sont alors déterminés. Les pourcentages d'inhibition vis-à-vis de l'endoxyylanase de *B. subtilis* sont très bas sinon nuls, et n'exigent aucune dilution, pour les deux céréales.

La détection d'une inhibition des endoxyylanases de *P. purpurogenum* ou de *T. longibrachiatum* montre la présence éventuelle de XIP ou de TLXI dans la farine de céréale, alors que l'inhibition de l'endoxyylanase de *B. subtilis* pourrait être expliquée par la présence de TAXI.

Toutes les mesures ont été refaites trois fois. L'effet d'inhibition vis à vis des xylanases est souvent exprimé en unités d'inhibiteur de xylanase (XIU), correspondant à la quantité d'inhibiteur requise pour inhiber 50 % de la concentration de xylanase  $[I]/[E]_{50}$ . Pour déterminer les conditions optimales de température et de pH pour une inhibition maximale, la mesure du taux d'inhibition, Xylazyme-AX a été exécutée à différentes températures à pH 5,0 et à différentes conditions de pH à 40 °C, respectivement. Des solutions tampons universelles de pH 3,0 à 8,0 ont été utilisées (30 mM d'acide citrique, 30 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 30 mM de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  et 20 mM d'acide diethyl barbiturique). Des solutions de HCl et NaOH (2,0 M) sont utilisées pour ajuster le pH.

### 6.2.5 Electrophorèse

L'Electrophorèse est effectuée sur gel de polyacrylamide 20% en utilisant une unité de PhastSystem (GE Healthcare). Le 2-mercaptoéthanol (5%) est employé en tant qu'agent réducteur. Les marqueurs à faible poids moléculaire de GE Healthcare ont été employés. Les gels sont Coomassie colorés ou avec une solution de nitrate d'argent comme décrit dans le dossier 200 de technique de développement de GE Healthcare. La valeur de pI de la protéine d'inhibiteur XIP est déterminée en utilisant l'unité de PhastSystem avec des gels de polyacrylamide contenant les ampholytes (pH 3-9). Des marqueurs de la gamme pI (3,6-9,3) ont été employés. Les gels sont colorés avec une solution de nitrate d'argent comme décrit dans le dossier 210 de technique de développement de GE Healthcare.

### 6.2.6 Détermination de la concentration en protéines

La concentration en protéines est déterminée par la méthode de Bradford Coomassie brillant blue avec comme standard la BSA [188]. Les concentrations de protéine pure XIP de sorgho et de mil perlé, sont déterminées par la mesure des absorbances à 280 nm en utilisant comme référence l'absorbance spécifique pour 1 mg/ml de XIP (2,348), cette absorbance est calculée de la séquence complète en acides aminés de XIP de sorgho en utilisant le logiciel ProtParam tool [189].

### 6.2.7 Western Blot

Le transfert de protéines (également appelé *western blot* ou buvardage de western), est une méthode de biologie moléculaire permettant la détection et l'identification de protéines spécifiques dans un échantillon biologique (sérum ou autre extrait ou homogénat tissulaire). C'est un outil de diagnostic complémentaire. ces techniques dérivent leur nom de l'étape de transfert sur membrane, comparée à une empreinte sur buvard (*blot = tache* en anglais). Au cours de la détection, la membrane est sondée pour la protéine d'intérêt avec des anticorps, liés ensuite à une enzyme émettant un signal photométrique ou colorimétrique, ou bien des photons. Pour plusieurs raisons, ceci se produit classiquement en deux étapes, bien que des méthodes en une étape soient disponibles pour certaines applications.

Des anticorps polyclonaux (PABs) sont obtenus du lapin contre des antigènes de blé pour les protéines de TAXI, XIP et TLXI. Le western blot est effectué comme décrit par Beaugrand et coll. [76]. anti-TAXI, anti-TLXI et anti-XIP PABs sont utilisés pour rechercher la présence de protéines inhibitrices de xylanases TAXI, XIP et TLXI. Les extraits purs de sorgho et de mil (60 µg en protéine) présumés contenir des protéines inhibitrices de xylanases ont été testés

avec anti-TAXI, anti-XIP et anti-TLXI PAbs. Les protéines pures de TAXI (0,60 µg), XIP (0,60 µg) et TLXI (0,60 µg), purifiées du blé ont été employées en tant que témoins.

L'électrophorèse pour le western blot est effectuée sur un gel de polyacrylamide à 12 % en présence d'agent réducteur le 2-mercaptoéthanol (6%) dans un système Bio-Rad (Hercules, CA, USA) Mini Protean 2. Les protéines sont électro-transférées à température ambiante pendant 26 min à 16 V sur une membrane de nitrocellulose activée (Protran Schleicher et Schuell, Dassel, Allemagne) une cellule de transfert semi-sèche est utilisée pour le transfert électro-phorétique des protéines (Bio-Rad, Nazareth, Belgique), et sont plus tard testés avec anti-TAXI, anti-XIP et anti-TLXI PAbs comme décrit par Beaugrand et coll. [76]. Des marqueurs de masses moléculaires (MM) colorés MultiMark™ de 6 à 260 kDa (Invitrogen, Carlsbad, CA, Etats-Unis) ont été employées. Ces marqueurs ont été employés pour estimer seulement l'efficacité de l'électro-transfert sur la membrane de nitrocellulose. L'utilisation de ces marqueurs tend à surestimer les MM de TAXI (40 kDa) et de XIP (30 kDa).

### **6.2.8 Détermination de la séquence N-terminale des protéines purifiées**

Les protéines d'inhibitrices (60µg) obtenues à partir des extraits de sorgho et de mil perlé par chromatographie d'affinité et récupérées, sont séparées en présence d'agents réducteurs (6 % de 2-mercaptoéthanol) dans un gel de polyacrylamide 12 %. Une unité puissante de Hoeffer (GE Healthcare) a été utilisée (différence de potentiel électrique de 160 V, 1 h, à température ambiante). Pour récupérer les protéines et déterminer leur compositions N-terminales, une membrane de PVDF est utilisée dans une cellule électrophorétique de transfert demi-sèche de Trans-Blot (Bio-Rad, Hercule, CA, Etats-Unis) (différence de potentiel électrique de 10 V, 1h, à température ambiante) et la bande correspondante est ensuite soumise à la dégradation d'Edman après la visualisation des protéines et coloration au bleu Coomassie. L'analyse de la séquence N-terminale des protéines purifiées est assurée dans un séquenceur Procise LCC 491 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Etats-Unis).

### **6.2.9 DNA et analyse des séquences de protéines**

Pour déterminer la séquence totale des protéines de type XIP extraites du sorgho ou du mil perlé, les séquences N-terminales en acides aminés déterminées expérimentalement sont comparées aux séquences d'ADN du sorgho (*Sorghum bicolor*) et du mil perlé à partir de la base de données de séquences tag (EST) en utilisant le moteur de recherche tBLASTn [190]. La prédiction des séquences complètes des protéines inhibitrices dans le sorgho du mil perlé, est effectuée avec les programmes Signal P 3.0 [191] et Psort [192], respectivement les N- et

O-glycosylations ont été prédites avec les serveurs NetNGlyc 1.0 [193] et NetOGlyc 3.1 [194], respectivement. L'alignement des séquences a été effectué avec le programme ClustalW [195].

#### **6.2.10 Traitement statistique des données**

Toutes les analyses statistiques ont été exécutées en utilisant le logiciel système d'analyse statistique 8.1 (SAS, Cary, OR, Etats-Unis) en utilisant un procédé multiple de comparaison Tukey avec un niveau de signification de 6% [163].

### **6.3 RESULTATS ET INTERPRETATIONS**

#### **6.3.1 Investigation sur la présence et la variabilité des inhibiteurs d'endoxyanase (TAXI, XIP et TLXI) dans différents cultivars algériens de sorgho et de mil perlé**

Ceci est le premier rapport sur la mise en évidence expérimentale des inhibiteurs d'endoxyanase dans le sorgho et le mil perlé. Dans des travaux précédents, Elliot et coll. [81] ont signalé que le sorgho pourrait contenir un inhibiteur protéique d'endoxyanase de type XIP en se basant sur une forte analogie entre la séquence d'ADN du sorgho et celle du maïs, toutefois ils n'ont pu détecter aucune activité d'inhibition dans les cultivars de sorgho testés. Les essais de transfert immunitaires (western blot) n'ont pas été positifs.

Au cours de cette étude, les essais d'inhibition ont été réalisés par un grand nombre d'extraits protéiques de cultivars de sorgho et de mil perlé. La détection et la variabilité des inhibiteurs d'endoxyanase dans le sorgho et le mil perlé ont été étudiées. L'effet inhibiteur de type TAXI est mesuré en employant l'endoxyanase de la famille GH11 *B. subtilis*. Cette endoxyanase d'origine bactérienne est inhibée seulement par TAXI [64] mais pas par XIP ou TLXI [63, 196]. L'effet inhibiteur de type XIP est mesuré en utilisant la solution d'endoxyanase de *P. purpurogenum* de la famille GH 10. Les endoxyanases fongiques de la famille GH 10 sont seulement inhibées par XIP ou TLXI et pas par TAXI [63, 64]. Aucune endoxyanase n'est inhibée uniquement par TLXI et pas par TAXI ou XIP.

L'inhibition de type TAXI a été étudiée dans les extraits protéiques des différents cultivars de sorgho et de mil perlé. Aucun effet d'inhibition de l'endoxyanase de *Bacillus subtilis* n'a été détectée en présence des extraits protéiques de sorgho et de mil perlé (résultats non montrés).

Ceci signifie qu'aucune inhibition de type TAXI n'était détectable dans tous les cultivars de sorgho et de mil perlé.

Les taux d'inhibition de type XIP ont été exprimés en unités d'inhibition d'endoxygénase (XIU), correspondant à la quantité d'inhibiteur requise pour inhiber cette endoxygénase à 60 % suivant la méthode de Xylazyme-AX. Pour obtenir 60 % d'inhibition, des extraits de cultivars de sorgho ont été dilués 75 fois tandis que les cultivars de mil perlé 150 fois. Les niveaux d'inhibition d'endoxygénase dans les échantillons de cultivars de sorgho et de mil perlé sont représentés dans la figure 6.2. Ces résultats montrent la première mise en évidence de l'activité d'inhibition d'endoxygénase dans les extraits des cultivars de sorgho et de mil perlé. Une différence fortement significative a été observée entre les cultivars étudiés de sorgho et de mil perlé ( $p \leq 0.0001$ ).

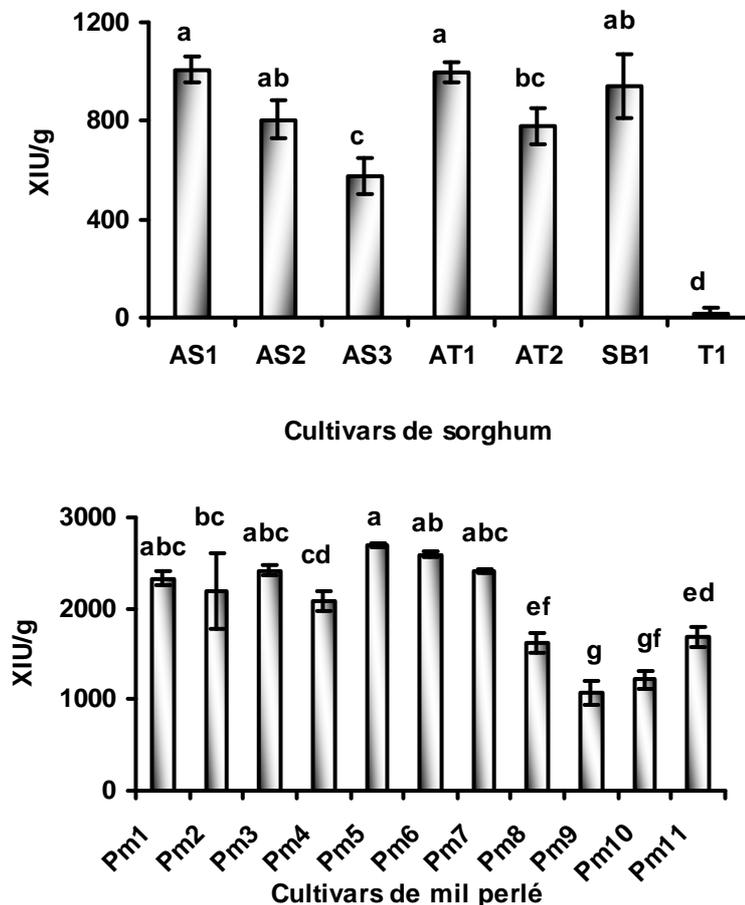
Les niveaux d'inhibition des endoxygénases exprimés en XIU varient considérablement entre les cultivars algériens de sorgho examinés exhibant des valeurs extrêmes de 1186; 670 et 13 respectivement pour le sorgho blanc d'Ain Salah (AS1), le sorgho mélangé d'Ain Salah (AS3) et le sorgho noir du Touggourt (T1). Comme représenté sur la figure 6.2 le taux d'inhibition le plus faible est détecté dans T1 le sorgho noir de Touggourt. En général, il semblerait que les cultivars les moins pigmentés AS1, AT1, SB1 (blanc) présentent un taux d'inhibition de type XIP plus élevé que les cultivars de sorgho plus pigmentés AS2, AS3, AT2 et T1 (mélangé, rouge et noir). Cette différence pourrait être probablement due à la protection naturelle des cultivars de sorgho pigmentés contre les attaques fongiques, et celles des insectes et des oiseaux. Traditionnellement, les grains de sorgho non pigmentés sont connus pour être plus sensibles à ces attaques que les sorghos pigmentés.

Dans les cultivars de mil perlé, une variabilité élevée du taux d'inhibition d'endoxygénase a été observée dans un éventail de valeurs exprimées en XIU de 1070 à 2690 respectivement pour PM9 et PM6. Par ailleurs, les niveaux d'inhibition dans les cultivars de mil perlé sont en moyenne deux fois plus élevés que le sorgho. De plus, les cultivars locaux de mil perlé présentent des niveaux plus élevés d'inhibition de type XIP que les cultivars commerciaux (PM9, PM10 et PM11). Ceci est probablement dû à l'adaptation élevée des cultivars locaux aux attaques fongiques et d'insectes comparés aux cultivars commerciaux.

Comme vu précédemment, aucune endoxygénase n'inhibe spécifiquement les inhibiteurs de type TLXI, aucune information sur la présence possible de TLXI dans des cultivars de mil

perlé et de sorgho n'est disponible. Les résultats décrits ici suggèrent l'absence des inhibiteurs de type TAXI et la présence des inhibiteurs de type XIP ou TLXI. Cependant, un doute subsiste quant à l'origine de ces inhibiteurs: inhibiteurs protéiques ou non protéiques (poly-phénols, ions métalliques, agents phyto-chimiques). Pour confirmer ou infirmer cette question, une étude de la thermo-stabilité des solutions inhibitrices sera effectuée.

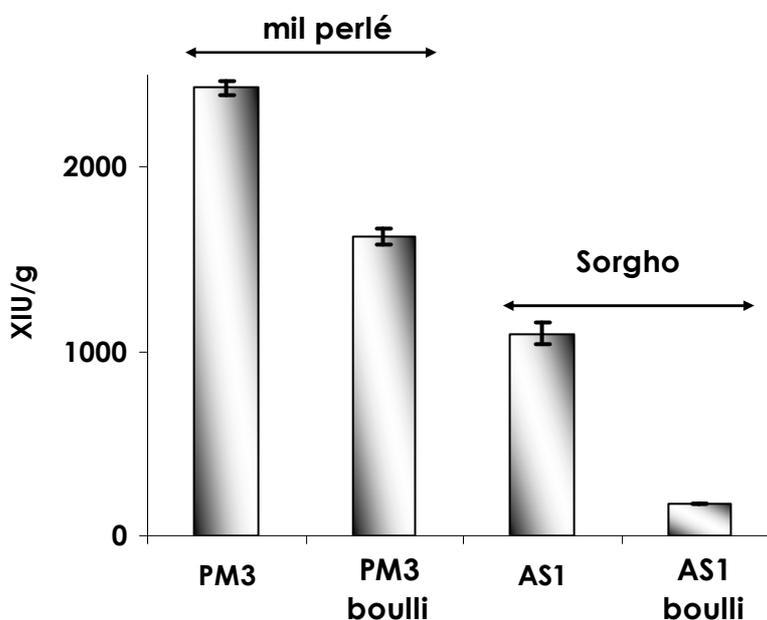
De plus, des techniques plus spécifiques doivent être utilisées telles que le western blot et l'immuno-transfert des extraits bruts de sorgho et de mil perlé, et de TAXI, XIP et TLXI purifiées du blé et testées avec anti-TAXI, anti-XIP, et anti-TLXI PAbs. Cette technique sera utilisée dans les prochains paragraphes, pour confirmer la présence d'inhibiteur protéique de xylanases dans le sorgho et le mil perlé.



**Figure 6.2:** Taux d'inhibition de type XIP des endoxylanases par les extraits des cultivars algériens de sorgho et de mil perlé exprimés en unités d'inhibition d'endoxyanase par gramme de farine (XIU/g). Les valeurs sont la moyenne de trois essais; Les valeurs avec la même lettre ne sont pas significativement différents ( $p \leq 0,05$ ).

### 6.3.1.1 Effet du traitement thermique sur la stabilité de l'inhibiteur d'endoxylyanase

Le traitement thermique des extraits bruts de sorgho et de mil perlé pourrait mener à l'inactivation des inhibiteurs d'endoxylyanase, s'ils sont d'origine protéique ou à une perte élevée d'activité s'ils sont des protéines thermolabiles. Les extraits bruts d'un cultivar de sorgho et d'un cultivar de mil perlé sont par conséquent portés à ébullition pendant une heure. Le taux d'inhibition résiduelle est alors mesuré. La figure 6.3 représente les niveaux d'inhibition des endoxylyanases avant et après traitement thermique. Dans le sorgho, le taux d'inhibition diminue de 84%, ce qui montre que cette inhibition est probablement due à une protéine. Tandis que, dans le mil perlé le taux d'inhibition chute de 33%, ceci pourrait signifier que la majeure partie d'inhibition est due à une protéine thermorésistante, ou alors à d'autres inhibiteurs non protéiques.



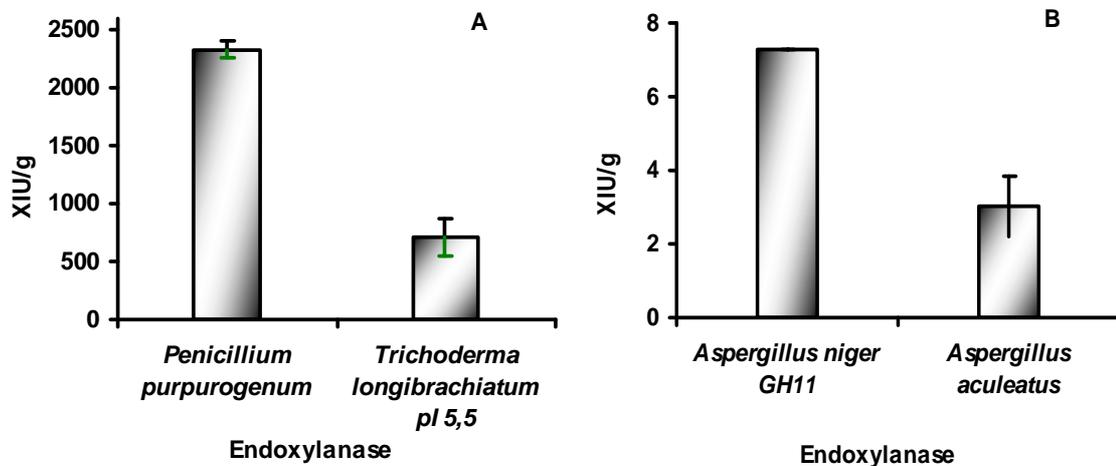
**Figure 6.3:** Effet du traitement thermique de l'extrait brut de sorgho (AS1) et de mil perlé (PM3) sur le taux d'inhibition des endoxylyanases exprimé en unités d'inhibition d'endoxylyanase par gramme de farine (XIU/g). L'extrait brut est chauffé pendant une heure.

En conséquence, la première mise en évidence de deux nouveaux inhibiteurs protéiques d'endoxylyanase dans le sorgho et le mil perlé est maintenant évidente. Cependant, des techniques plus approfondies sont nécessaires pour confirmer définitivement cela. Dans les paragraphes suivants, la purification et la caractérisation de ces inhibiteurs d'endoxylyanase de type XIP dans les extraits protéiques de sorgho et le mil perlé seront décrites.

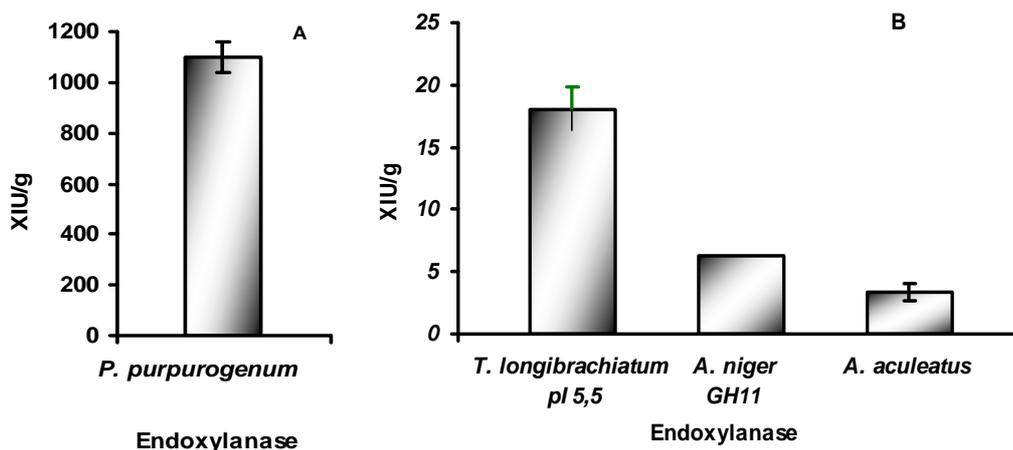
### 6.3.1.2 Inhibition de différentes endoxylanases par les extraits de sorgho et de mil perlé

Les figures 6.4 et 6.5 représentent les taux d'inhibition des xylanases (XIU) respectivement dans les cultivars algériens du mil perlé (PM3) et du sorgho (AS1) vis-à-vis de différentes endoxylanases.

L'inhibition par les extraits bruts de sorgho et de mil perlé de différentes endoxylanases a été examinée. Les endoxylanases de *Penicillium purpurogenum* (AAF71268) et de *Trichoderma longibrachiatum* pI 6,6 (CAA46294) sont les enzymes les plus inhibées par les extraits de sorgho et de mil. Comparé au sorgho, l'extrait de mil perlé est un inhibiteur fort de l'endoxylanase de *Trichoderma longibrachiatum* pI 6,6 ce qui suggère une affinité élevée entre l'inhibiteur et l'enzyme. Dans les conditions expérimentales utilisées, les endoxylanases de la famille GH10 d'*Aspergillus aculeatus* et d'*Aspergillus niger* (Figure 6.4 et 6.5) et de *Trichoderma viride* (résultat non montré) sont faiblement inhibés par les extraits de sorgho et de mil perlé. Cependant, l'endoxylanase de la famille GH11 de *Bacillus subtilis* et celle d'*Aspergillus niger* (GH11) n'ont pas été inhibées.



**Figure 6.4:** Taux d'inhibition (XIU/g) de différentes endoxylanases par l'extrait du cultivar PM3 de mil perlé. A: Extrait brut de mil perlé dilué 200 fois, B: Extrait brut de mil perlé sans dilution.



**Figure 6.5:** Taux d'inhibition (XIU/g) de différentes endoxylanases par l'extrait du cultivar AS1 du sorgho. A: Extrait brut de sorgho diluée 100 fois, B: Extrait brut sorgho de sans dilution

L'endoxylanase de *Bacillus subtilis* n'est pas inhibée par les extraits de sorgho et de mil perlé, qui prouve qu'aucun inhibiteur d'endoxylanase de type TAXI n'est présent ni dans le sorgho ni dans le mil perlé. Comme l'endoxylanase de *Trichoderma longibrachiatum* pI 6,6 (CAA46294) est fortement inhibée par les extraits bruts de sorgho et de mil perlé. Ces résultats nous permettent de construire une stratégie de purification de XIP à partir du sorgho et du mil perlé en utilisant une colonne d'affinité produite par immobilisation des endoxylanases de *Trichoderma longibrachiatum* pI 5,5.

### 6.3.2 Détection des inhibiteurs d'endoxylanases par Western blot

La figure 6.6 représente les profils de transfert immunitaire ou western blot des protéines des extraits bruts de sorgho et de mil perlé. TAXI, XIP et TLXI purifiées du blé sont utilisées en tant que contrôle. Toutes ces protéines sont conjuguées aux anticorps de lapin PABs obtenus par réaction immunitaire vis-à-vis des inhibiteurs épurés d'endoxylanase de blé [76]. L'investigation d'une possible réaction des protéines inhibitrices de sorgho et de mil perlé (60 µg) avec anti-XIP PABs, donne lieu à un triplet de bandes faibles pour le mil perlé (Figure 6.6, ligne 2) et à une bande distincte pour le sorgho (Figure 6.6, ligne 3). Pour le mil perlé, ce triplet de bandes apparaît à une MM légèrement inférieure à celle de XIP de blé (Figure 6.6, ligne 4). Pour le sorgho, la bande apparaît à une MM légèrement plus élevée que le blé.

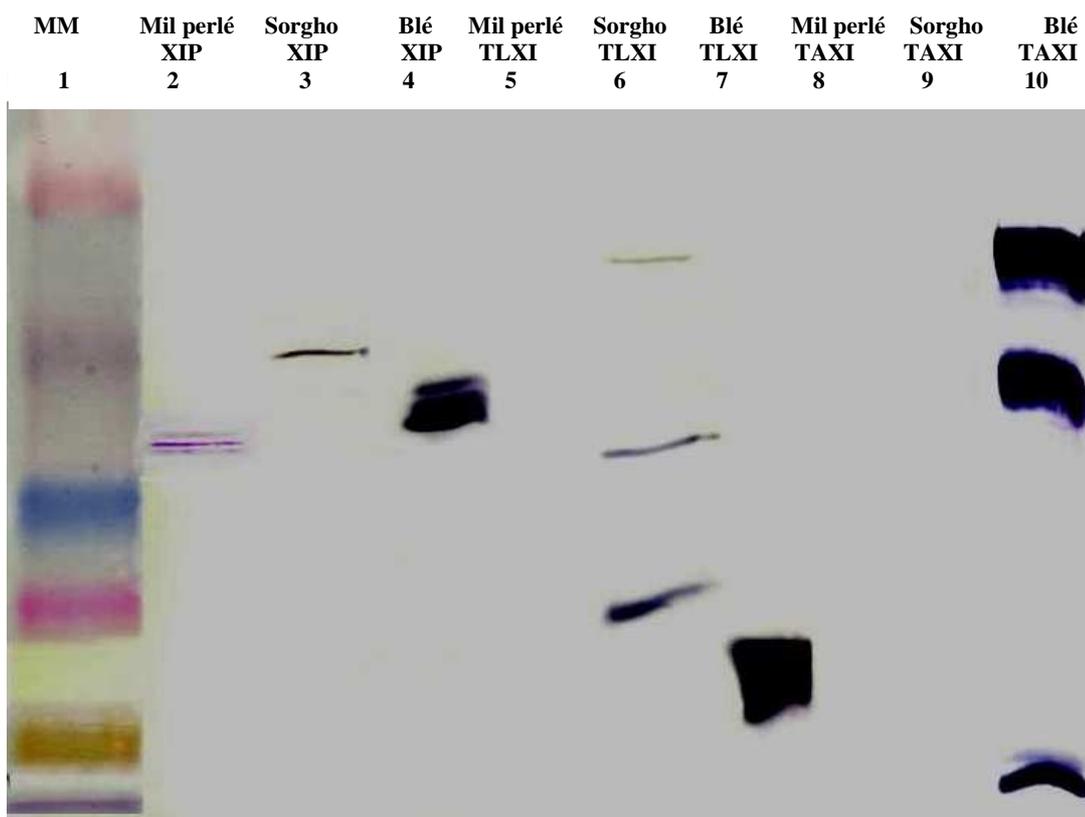
En réaction des anti-TLXI et anti-TAXI PABs, aucune bande n'apparaît pour les extraits de mil perlé (Figure 6.6, lignes 5 et 8, respectivement). Alors que pour les extraits de sorgho, une

réaction interférente avec anti-TLXI PAbs est observée à 33, 26 and 22 kDa (Figure 6.6, ligne 6) à des MM plus élevées que TLXI isolée du blé dont la MM est de 18 kDa (Figure 6.6, ligne 7). Cette réaction inattendue peut être expliquée par la présence de protéines de la famille des thaumatines "thaumatine-like protéines" (TLPs) précédemment purifiées du sorgho [197, 198]. Pour confirmer ou infirmer la nature de ce triplet de bandes obtenues en réaction aux anti-TLXI dans les extraits de sorgho, un second western blot a été réalisé avec les extraits purifiés issus respectivement des colonnes d'échange d'ions et d'affinité, aucune réaction n'a été détectée pour la fraction affinité (résultats non montrés) [199]. Ce résultat semble confirmer que la forme d'inhibiteur de type TLXI, n'existe pas dans le sorgho ou n'est pas présente en quantités détectables avec la colonne et les moyens d'analyse utilisés au cours de cette étude.

Le manque d'interaction avec anti-TAXI PAbs est en parfaite accord avec les résultats précédemment obtenus lors des mesures des taux d'inhibition vis-à-vis des endoxylanases de la famille GH 11 *B. subtilis* aussi bien dans les cultivars de sorgho et de mil perlé. De plus, la détection d'un taux d'inhibition élevé dans les extraits de sorgho et de mil perlé vis-à-vis des endoxylanases de *P. purpurogenum* (GH 10) et de *T. longibrachiatum* (GH 11). Cette inhibition est en accord avec les résultats précédents d'immunotransfert et suggère fortement la présence de protéines inhibitrices des endoxylanases de type XIP.

Les bandes intenses sur l'immunoblot avec XIP, TLXI et TAXI de blé démontrent que les anticorps sont fortement réactifs (Figure 6.6, ligne 4, 7 et 10, respectivement).

Les premiers travaux de Beaugrand et coll. [76] ont prouvé que les anticorps identifient très bien les protéines de XIP, TLXI et TAXI dans les extraits protéiques de céréales.



**Figure 6.6:** Analyse au Western blot des extraits bruts de sorgho et de mil perlé. Ligne 1: MM marqueurs de masses moléculaires (MM); lignes 2, 6 and 8: extraits bruts de mil perlé (40  $\mu$ g protéine) testés avec anti-TAXI, anti-TLXI et anti-XIP PABs, respectivement; lignes 3, 6 and 9: extraits bruts de sorgho (40  $\mu$ g protéine) testés avec anti-TAXI, anti-TLXI et anti-XIP PABs, respectivement ; lignes 4, 7 and 10: Pures XIP, TLXI et TAXI de blé (0,26  $\mu$ g), respectivement, testés avec anti-TAXI, anti-TLXI et anti-XIP PABs

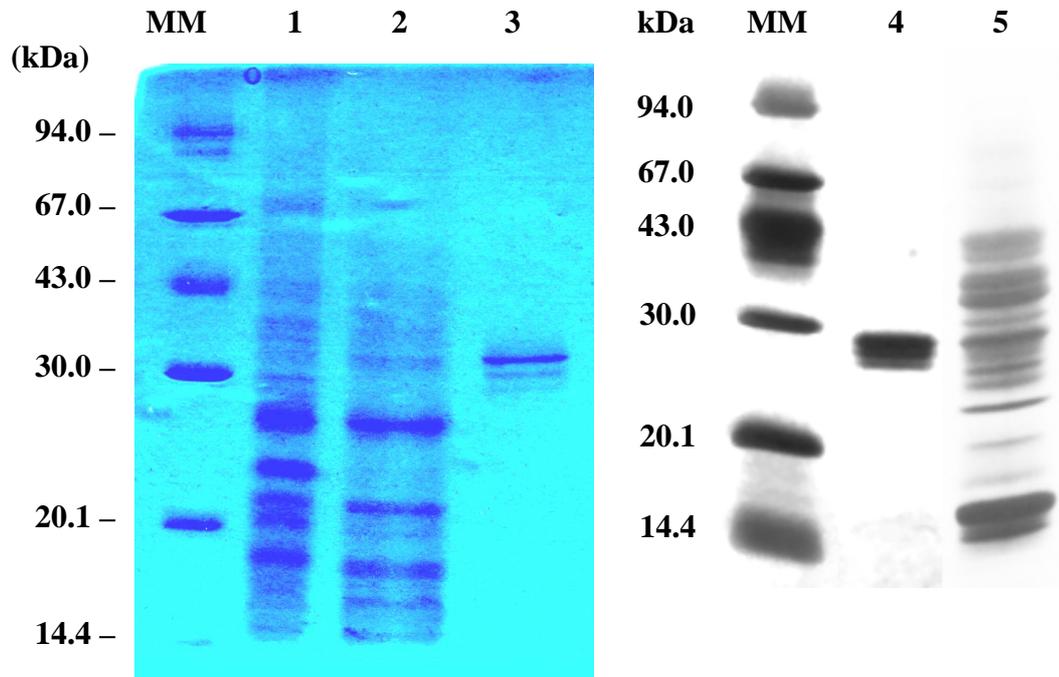
Le Western blot et l'immunoprobings a révélé la présence effective d'inhibiteurs d'endoxyanases de type XIP dans le sorgho et le mil perlé (Figure 6.6, ligne 2 and 3), en même temps aucune protéines de type TLXI ou TAXI n'a pu être détectée (Figure 6.6, lignes 6, 6 et 8, 9). Elliott et coll. [81], avec un protocole similaire n'ont pas pu détecter des protéines de type-XIP dans les échantillons de sorgho testés.

### 6.3.3 Purification des inhibiteurs d'endoxyanases

Dans le présent travail, deux protéines inhibitrices des endoxyanases de type XIP ont été purifiées avec succès des extraits de grains d'un cultivar de sorgho et d'un cultivar de mil perlé. Une série de techniques de purification a été utilisée. Le procédé est basé sur une chromatographie d'échange cationique (CEC) suivie d'une chromatographie d'affinité (AFF C) avec une colonne où l'endoxyanase GH 11 de *T. longibrachiatum* (pI 6,6) a été immobilisée;

Les deux fractions présumées de XIP de sorgho et de mil perlé sont ensuite caractérisées par électrophorèse (Figure 6.7).

La détermination des séquences N-terminales a confirmé la première mise en évidence, la purification et la caractérisation de XIPs du sorgho et du mil perlé. Les XIPs de sorgho et de mil perlé ont été purifiés avec succès (Figure 6.7, lignes 3 et 4).

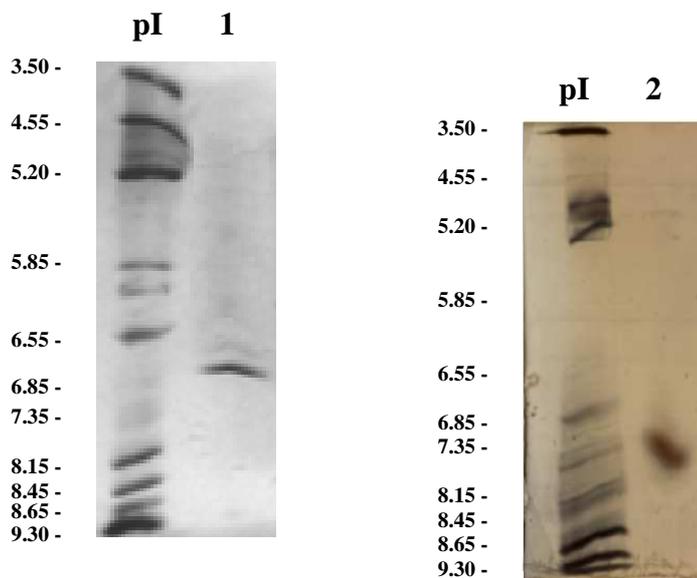


**Figure 6.7:** Profils de SDS-PAGE des fractions purifiées de protéines de sorgho et de mil perlé, Ligne 1: extrait de sorgho, ligne 2: fraction de CEC du sorgho et ligne 3: XIP pure de sorgho (AFF C), ligne 4: XIP pure de mil perlé (AFF C) et ligne 6: fraction de CEC du mil perlé. La ligne MM représente les marqueurs de masses moléculaires.

Dans le gel de SDS-PAGE, la XIP purifiée du sorgho apparaît sous forme de trois bandes distinctes de MM (29,6-32,0 kDa) ce qui montre des sites de glycolisation. Les protéines apparaissant sur western blot dans l'extrait brut de sorgho et réagissant avec anti-TLXI PAbs (Figure 6.6, ligne 6) ne sont pas détectables dans la fraction AFF C du sorgho (Figure 6.7, ligne 3). Comme l'endoxyanase GH 11 de *T. longibrachiatum* (pI 6,6), qui a été employée ici pour préparer la colonne d'affinité est fortement inhibée par TLXI du blé [63], il devrait apparaître dans cette fraction, mais comme le montrent nos résultats les trois bandes apparaissant dans le western blot (Figure 6.6, ligne 6) de l'extrait pur de sorgho ne sont plus détectables dans la fraction AFF C (Figure 6.7, ligne 3), ceci suggère que ces protéines ne sont pas des inhibiteurs d'endoxyanase mais des protéines de la famille des thaumatines "thaumatine-like protéines" (TLP) comme supposé précédemment.

L'analyse de la fraction XIP épurée du mil perlé par SDS-PAGE en présence d'agents réducteurs (Figure 6.7, ligne 4) donne lieu à un triplet de MM 27-29 kDa, qui est légèrement inférieur aux MM des protéines de XIP d'autres céréales (29-32 kDa) [66, 68]. Ces résultats sont en parfaite conformité avec les observations décrites ci-dessus sur l'immunoblot. L'apparition de bandes multiples sur SDS-PAGE est typique pour des protéines de XIP car elles portent souvent des parties glycanes [200, 201].

La détermination du point isoélectrique des XIPs de sorgho et de mil perlé est effectuée par électrophorèse isoélectrique. Une seule bande apparaît respectivement pour le sorgho et le mil perlé correspondant à des valeurs estimées de pI approximativement de 6,7 et 7 (figure 6.8, ligne 1 et 2), ces valeurs sont plus faibles que celles obtenues pour les protéines de XIP des autres céréales mais elles restent dans le même ordre de grandeur que les valeurs de pI des protéines de XIP du maïs, le plus proche des céréales au sorgho et au mil perlé.



**Figure 6.8:** Gel de détermination du point isoélectrique des fractions AFF C de sorgho et de mil perlé purifiées. Sorgho (ligne 1) et mil perlé (ligne 2). Les valeurs de pI des marqueurs sont indiquées.

Le tableau 6.1 donne une vue d'ensemble sur la purification des XIPs à partir d'un kg de farine de sorgho ou de mil perlé. 7 mg de XIP pure a pu être isolée avec un taux spécifique d'inhibition d'endoxygénase de 2670 XIU par mg de farine vis-à-vis de l'endoxygénase de GH 10 *P. purpurogenum*. Seulement 3 % du taux d'inhibition initial dans les graines de sorgho ont été récupérés. Cette perte dans le taux d'inhibition est probablement attribuée à l'inactivation pendant la congélation et le stockage de la fraction de CCE. Une partie des protéines est

précipitée suite à la congélation. Ceci peut être expliqué par le taux élevé d'inhibition qui semble nécessiter plusieurs cycles de purification pour récupérer le maximum d'inhibiteur.

La purification des XIP de mil perlé atteint un pourcentage plus élevé que celui du sorgho 8 % du taux initial d'inhibition vis-à-vis de l'endoxyanase de *P. purpurogenum* GH 10 a pu être récupéré. Dans les travaux précédent, la purification des XIP a atteint 9 % pour l'orge, et 26 %, 21 % et 60 % pour le seigle, le froment dur et le maïs, respectivement [66]. A partir d'un kg de farine de mil perlé approximativement 12 mg de pure XIP a été isolée (Tableau 6.1), Ces résultats sont de même ordre que ceux obtenus pour le blé (16 mg/kg) [64], pour le seigle (18 mg/kg) [68] et le sorgho (7 mg/kg). De plus faibles rendements de purification ont été obtenus pour le froment dur, l'orge et le maïs, i.e. 2,6 mg/kg, 0,6 mg/kg et 0,6 mg/kg, respectivement [68]. Le taux spécifique d'inhibition d'endoxyanase est de 4900 XIU/mg de farine vis-à-vis de l'endoxyanase de GH 10 *P. purpurogenum* (Tableau 6.1).

**Tableau 6.1:** Rendement de purification des XIPs de sorgho et de mil perlé ainsi que les taux spécifiques d'inhibition.

	Protéines totales (mg/kg)		Taux total d'inhibition <sup>a</sup> (× 63 XIU/kg)		Taux d'inhibition spécifique <sup>b</sup> (XIU/mg)		récupération (%)	
	Sorgho	Mil perlé	Sorgho	Mil perlé	Sorgho	Mil perlé	Sorgho	Mil perlé
Extrait pur	800	3160	690	760	860	240	100	100
CEC <sup>c</sup>	470	660	660	340	1170	620	80	46
AFF C <sup>d</sup>	7	12	18	69	2670	4900	3	8

<sup>a</sup> Taux total d'inhibition par kg de farine

<sup>b</sup> Taux d'inhibition spécifique par mg d'enzyme

<sup>c</sup>CEC = Chromatographie d'échange cationique

<sup>d</sup>AFF C = chromatographie d'affinité.

### 6.3.4 Détermination des séquences

#### 6.3.4.1 Cas du sorgho

L'analyse de la séquence N-terminale d'acides aminés des trois isoformes épurées de XIP de sorgho correspondant aux trois bandes sur SDS-PAGE donne lieu à la même séquence, c-à-d. AGXKTGQVTVFWGRNKAEGTLREAXDSGLYT (X est un acide aminé non identifié). Une recherche sur tBLASTn (Un programme d'alignement local d'une séquence protéique confrontée aux séquences protéiques traduites en 6 phases depuis des banques de données nucléiques).sur la base de données de *Sorgho* (*Sorghum bicolor*) a révélé plusieurs séquences

de nucléotides semblables. Le rassemblement de ces séquences a permis de déduire un peu plus que les 2/3 de la séquence complète d'acides aminés de la protéine de type XIP du sorgho. Une deuxième recherche sur tBLASTn employant la séquence précédemment déduite a permis de déterminer la séquence C-terminale et des bribes de séquences correspondant aux régions internes de la protéine XIP de sorgho. Les séquences ESTs (Expressed *Sequence Tag*, aussi appelé EST, est une séquence de nucléotides utilisée par les biologistes pour trouver des gènes dans une séquence d'ADN) avec 100 % d'identité dans leurs régions de recouvrement sont énumérées dans le tableau 6.2. Leur assemblage a permis de déduire la séquence complète d'acide aminé de XIP de sorgho et les séquences correspondants du nucléotide (Figure 6.9).

La protéine XIP de sorgho se compose de 272 acides aminés et est précédée par une séquence de signal de 36 acides aminés. Le début de la protéine a été prévu avec le programme de Signal P 3.0 (Un serveur qui permet de prédire la présence et la localisation d'un site de coupure des peptides dans une séquence d'acides aminés) [191] et correspond aux premiers acides aminés expérimentalement obtenus. Selon l'outil de Psort (un serveur qui permet de prédire la localisation d'une protéine dans la cellule à partir de sa séquence d'acides aminés) [192], quelques séquences ESTs suggèrent la présence de deux variantes, c-à-d. une ayant un résidu de valine à la position 118 et l'autre avec un résidu d'alanine à cette position. La MM calculée est de 30269 Da pour la variante de valine et 30241 pour la variante d'alanine. Les deux variantes ont une valeur calculée de pI de 6,11, alors que, dans le gel pour la détermination expérimentale du point isoélectrique, une valeur de pI de 6,7 a été observée pour le sorgho (Figure 6.8, ligne 1). La bibliothèque de séquences Est de sorgho suggère que XIP de sorgho est exprimée à différentes étapes de développement, dans divers tissus, après le traitement des jeunes plantes avec et dans des conditions de stress abiotiques (Tableau 6.2).

**Tableau 6.2:** Les séquences ESTs de sorgho utilisées pour déduire la séquence complète du nucléotide et d'acides aminés de XIP du sorgho.

GenBank id <sup>a</sup>	Dimension (nt)	étape/tissu	Conditions de croissance	Variant <sup>b</sup>
<b><u>N-terminale</u></b>				
CX614867	672	Jeunes plantes	GA- ou brassinolide-traitée	V
CD207904	668	Jeunes plantes	Thermal-choc	A
CD423209	640	Jeunes plantes	Traité à l'acide salicylique	V
CD227733	483	culture callus / suspension de cellule	n.s. <sup>b</sup>	A
CB926367	631	Jeunes plantes	abscisic acid-treated	A
CD462678	463	Jeunes plantes	Traité à l'éthylène	V
AW747061	460	n.s.	Eau stressée	V
BE696816	372	n.s.	pathogène-induit	V
CN148778	600	Feuilles	wounded	V
CN141616	673	racines	oxydation-stressée	V
CN127196	661	racines	Traité Acide/base	V
<b><u>Internale</u></b>				
AW746639	682	n.s.	Eau stressée	V
BE694070	640	n.s.	Eau stressée	V
<b><u>C-terminale</u></b>				
CF766786	480	sorghum fleurissant	Sécheresse -stressée	A
BG366033	471	embryon	n.s.	V
BE693768	474	n.s.	Eau stressée	V
CD423096	438	Jeunes plantes	Traité à l'acide salicylique	n.d. <sup>c</sup>
CD223474	438	culture callus / suspension de cellule	n.s.	n.d.
CD427896	411	Jeunes plantes	Traité à l'éthylène	n.d.
CN129911	633	racines	Traité Acide/base	V

<sup>a</sup> ESTs de Genbank 168.<sup>b</sup> n.s. = non spécifiée<sup>c</sup> n.d. = non disponible

```

-36 M A A P A F G G R R R P A S A A A L L A -6
-106 atggcggcgcggcggttcggaggacggcggaggccggcgtcagcagcagctctcctagcc-46
-6 V A T L V V V F L A G P A M A A G N K T 6
-46 gtggcgacccttggtgttgccttcctcgccgggcccagccatggccgcggggaacaagacc 16
6 G Q V T V F W G R N K A E G T L R E A C 26
16 ggccaggtgacgggtgttctggggccggaacaaggcggaggggcacgctccgcgaggcctgc 76
26 D S G L Y T M V I M S F L D V Y G P N G 46
76 gactccgggctctacaccatggtcatcatgtcgttcctcgacgtctacggccccaacggc 136
46 K Y H L D L S G H P I A G I G D D I K H 66
136 aagtaccatctggacctgtctggccaccgatcgccggcatcggcgacgacatcaagcac 196
66 C Q F V G V P V S L S I G G F G S G Y S 86
196 tgccagttcgtcggcgtcccgggtgcgctctccatcggcgggttcggctccggctactcg 266
86 L P S K Q A A L D L F D Y L W N A F F G 106
266 ctcccgtccaagcaggcggcgctggacctcttcgactacctctggaacgccttcttcggc 316
106 G S K P G V H R P F G D V W L D G V D L 126
316 gggctctaaaccggcgctccaccgccccttcggcgacgtatggctggacggcgctcgacctc 376
126 F L E H G T N A T D R Y D V L A L E L A 146
376 ttctgggacacgggacgaacgccacggacaggtacgacgtgctggcgctggagctcgcc 436
146 K H N I R G G P G K P L H L T A T P R C 166
436 aagcacaacatccgcggcgggtcccgggaagccgctgcacctgacggcgacgccgcgctgc 496
166 E F P P A G Y L K R A L D T G I F E R V 186
496 gagttcccgcggcggggtacctgaagcggcgctggacacgggcatcttcgagcgcgctc 666
186 H V R I Y D D A D C E A Y W H L A W D R 206
666 cacgtcaggatctacgacgacgccgactgagggcgtactggcacctggcctgggacagg 616
206 W T A A Y P A T R F Y V G M T A S E T T 226
616 tggacggcggcggtacccggccaccaggttctacgtcgggatgacggcgtcggagacgacg 676
226 H G W V H P K N V Y Y D V A P S V Q K A 246
676 cacgggtgggtgcacccaagaacgtctactacgacgtcgcgccgctcgggtgcagaaggcg 736
246 D N Y G G F M I W E R Y A D T L S N Y T 266
736 gacaactacggcgggttcatgatctgggaacgctacgcgacacgctctccaactacacc 796
266 S M V K Y Y A * 272
796 agcatggtcaagtactatgcgtga 819

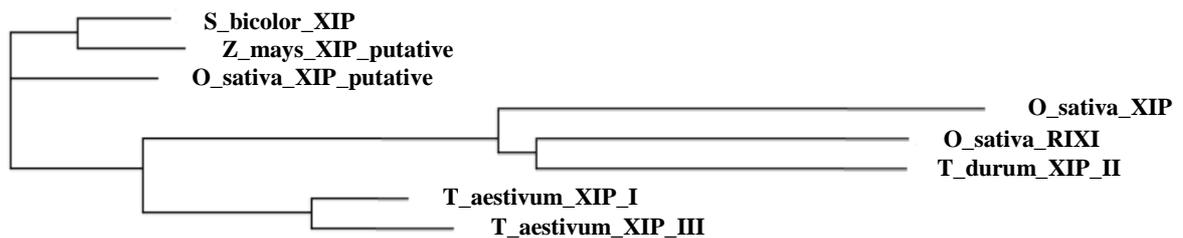
```

**Figure 6.9:** Nucléotide et séquences d'acides aminés de la valine variante de XIP de sorgho. La séquence en gris montre la séquence N-Terminale. Les sites de N-glycosylation potentielle sont présentés en gras.

Selon l'outil de NetNGlyc 1.0 (Un serveur qui permet de prédire les sites de N-glycosylation à partir d'une séquence d'acides aminés) [193], la séquence d'acides aminés de XIP de sorgho contient trois emplacements potentiels de N-glycosylation, c-à-d. aux positions 3, 132 et 263 (Figure 6.9). C'est en conformité avec la présence de différents isoformes d'inhibiteur sur SDS-PAGE, et pourrait expliquer la non détection du troisième résidu d'acide aminé, l'Asn, dans l'analyse de la séquence N-terminale d'acide aminé lors de la dégradation d'Edman.

Au niveau des protéines, XIP de sorgho montre une homologie avec XIP de *Zea mays* (DQ245902, 92 % de similitude), XIP de *Oryza sativa* (CT836240, 92 % de similitude), XIP-I de *T. aestivum* (AJ422119 85 % de similitude) et XIP-III de *T. aestivum* (AB204556, 84 % de similitude) [81], XIP-II de *T. durum* (AJ318884 66 % de similitude) [81], RIXI (Une protéine XIP d'*O. sativa*, AB027415, 65 % de similitude [70]), et une autre protéine XIP d'*O. sativa* (AK064356, 66 % de similitude) [202].

La figure 6.10 montre l'arbre phylogénétique donnant les rapports entre ces séquences.



**Figure 6.10:** Arbre phylogénétique donnant les rapports entre les différentes séquences XIP. Arbre phylogénétique (produit par le programme ClustalW [195]) montre la relation entre XIP de *S. bicolor* et les XIPs de *Z. mays* (DQ246902), d'*O. sativa* [RIXI (AB027416), de riz (AK064366) et (CT836240)], et XIPs de *T. aestivum* [XIP-I (AJ422119) et XIP-III (AB204666)] et *T. durum* [XIP-II (AJ318884)].

L'alignement de la séquence d'acides aminés de ces protéines de XIP dans ClustalW (un programme qui permet de déduire l'arbre phylogénétique des protéines en se basant sur les séquences d'ADN) [195] prouve que dans XIP de sorgho [199], les régions responsables de l'interaction avec des endoxylanases de GH 10 et de GH 11 peuvent être identifiées, elles sont semblables à celles identifiées dans le XIP-I de blé [72, 186] (Figure 6.11). En particulier, les résidus principaux d'acides aminés (Lys232 et Arg160, respectivement) qui agissent l'un sur l'autre avec les résidus catalytiques des enzymes et les résidus les entourant sont identiques. Les plus grandes différences entre le XIP-I de blé et le XIP de sorgho sont présentes dans la

région 4 et la première partie de la région 6 (Figure 6.11), qui participent à l'interaction avec des endoxylanases de GH 10. Cependant, parce que XIP de sorgho a une activité d'inhibition de l'endoxylanase GH 10 d'*A. oryzae* comparable, ces différences n'affectent pas l'activité de XIP. On peut observer de plus grandes différences de séquences d'acides aminés entre XIP de sorgho d'une part et RIXI et XIP de riz et XIP-II du froment dur d'autre part.

```

S_bicolor_XIP          AGNKTGQVTVFWGRNKAEGTLREACDSGLYTMVIMSFLDVYGPNG---KYHLDSLGHPIA 67
Z_mays_XIP_putative   AGNKTGQVTVFWGRNKAEGTLREACDSGLYTMVIMSFLDVYGPQRGGYQYHLDSLGHPTA 60
O_sativa_XIP_putative AVGKTGQVTVFWGRNKDEGTLREACDSGLYTMVIMSFLNVYGHGK----YNLDLSGHPIA 66
T_aestivum_XIP-I      AGGKTGQVTVFWGRNKAEGSLREACDSGMYTMVTMSFLDVFGANG---KYHLDSLGHDLA 67
T_aestivum_XIP-III    -AGKTGQVTVFWGRNKAEGSLREACDSGMYTMVTMSFLDVFGAKG---KYHLDSLGHDLA 66
O_sativa_RIXI         AAGKTGQMTVFWGRNKNEGTLKETCDTGLYTTVVVISFYVSVFGHGR----YWGDLSGHDLR 66
T_durum_XIP-II       --KQTGQLTVFWGRNAGEGTLREACDTGLYSTVVVISFYVSVFGHGR----YWGDLSGHPLA 64
O_sativa_XIP         ---DDPGLAVYWGRHKEEGSLREACDTGRYTTVVIITFYNAFGHGR----YSLDISGHPLA 63

```

. :\*:\*\*\*: \*\*\*:\*\*\*: \* \* : \* . : \* \* \* :\*\*\*

1

```

S_bicolor_XIP          GIGDDI[KHCQFV]GVPVLSIGGFGSGYSLPSKQAALDLFDYLWNAFFGGSKPGVHRPFG- 116
Z_mays_XIP_putative   GIGDDI[KHCQFV]GVPVLSVGGFGSGYSLPSTQAALDLFDYLWNAFLGGSKPGVRRPFG- 119
O_sativa_XIP_putative GIGDDI[KHCQFI]GVPVLSIGGFGNGYSLPSNRSALELFDYLWNAFYGASKAGVYRPFG- 116
T_aestivum_XIP-I      SVGADI[KHCQSK]GVPVLSIGGYGTGYSLPSNRSALDLFDHLWNSYFGGSKPSVPRPFG- 116
T_aestivum_XIP-III    AVGADI[KHCQSK]GVPVLSVGGYGTGYSLPSNRSALDLFDHLWNSYLGGSNPGVPRPFG- 116
O_sativa_RIXI         VIGADI[KHCQSK]IFVFLSIGGAGKDYSLPTSASAADVADNIWNAHMDGRRPGVFRPFG- 116
T_durum_XIP-II       GVGADI[KHCQSR]ILVLLSIGGPRNGYSLPSSASATAVADNLWNAHLGRRNGVYRPFG- 113
O_sativa_XIP         AVGADI[KHCQSR]ITVLLSIGGQGGAYSLPTNASAADVADNLWNAYLGGHRAGVARPFGD 113

```

:\* \*\*\*\*\* .: \* \*\*:\* \* \*\*\*\*\*.: \* : \* :\*:\*. . . . \* \*\*\*\*

2

```

S_bicolor_XIP          DVWLDGVDLFLEHGTNATDRYDVLALELAKHNI[RG]GPGKPLHLTATPRCEFPAGYLKRA 176
Z_mays_XIP_putative   DAWLDGVDLFLEGRS--PADRYDVLALELAKHNI[RG]GPGKPLHLTATPRCGFPAGYLRA 178
O_sativa_XIP_putative DAWLDGVDLFLEHGT--PADRYDVLALELAKHNI[RG]GPGKPLHLTATPRCTFPSSYLGRA 174
T_aestivum_XIP-I      DAWLDGVDLFLEHGT--PADRYDVLALELAKHNI[RG]GPGKPLHLTATVRCGYPPAAHVGRA 176
T_aestivum_XIP-III    DAWLDGIDLFLEHGT--PADRYDVLALELAKHNI[RG]GPGKPLHLTATVRCGYPPAAHVGRA 174
O_sativa_RIXI         DAAVDGIDFFIDQGA--PDHYDDLARNLYA[YN]KMYR[AR]TPVRLTATVRCAFP--DPRMKKA 172
T_durum_XIP-II       DAAVDGIDFYIDQGA--PDHYDELASRLD[GHN]RFYR[GR]KGVRLTATPRCGLP--DPRLGAA 170
O_sativa_XIP         DAAVDGIDFFIDQGG--ADHYDDLARRLD[GYN]KYR[GR]VGVLTLATTRCSYP--DHRLEKA 170

```

\*. :\*:\*\*\*:\*\*\*: \*

3

4

```

S_bicolor_XIP          LDTGIFERVHVRIYD--D[AD]CEAY-----[WHL]AWDRWTAAYPATRFYVGMTAS[E]----- 223

```



Les recherches de base de données de BLASTp et tBLASTn [190] n'ont pas rapporté de séquences de mil perlé avec des similitudes significatives. La séquence N-terminale d'acides aminés de XIP du mil perlé est comparée aux séquences N-terminales rapportées pour les protéines de XIP de différentes céréales et d'autres séquences identifiées lors de la recherche sur la base de données de tBLASTn. Des pourcentages d'identité et de similitude de séquences ont été calculés en utilisant l'algorithme 'Align-needle algorithm' du site web de l'institut européen de bioinformatique (EBI) (<http://www.ebi.ac.be>) (Tableau 6.3).

**Tableau 6.3:** Séquence N-terminale d'acides aminés de XIP de mil perlé (*Pennisetum glaucum* (R.) Br) alignée avec les séquences N-terminales de XIPs purifiées ou déduites d'autres céréales.

	NCBI Accession no.	Séquence d'acides aminés	Identité <sup>a</sup> (%)	Similarité <sup>a</sup> (%)
<i>Pennisetum glaucum</i> <sup>*</sup>	n.d. <sup>i</sup>	AGNKTGQVTVF <del>XGRNKDEXTLREA</del>	--	--
<i>Panicum virgatum</i>	FL886376	AGNKTGQVTVF <del>WGRNKDEGTLREA</del>	91,7	91,7
<i>P. virgatum</i>	FL883377	AGNKTGQVTVF <del>WRRNKDEGTLREA</del>	87,6	87,6
<i>Sorghum bicolor</i> <sup>b,*</sup>	CN138888	AGNKTGQVTVF <del>WGRNKAEGTLREA</del>	87,6	87,6
<i>Zea mays</i> <sup>b</sup>	DQ246902	AGNKTGQVTVF <del>WGRNKAEGTLREA</del>	87,6	87,6
<i>Triticum aestivum</i>	CA486646	AGNKTGQVTVF <del>WGRNKAEGTLREA</del>	87,6	87,6
<i>Saccharum officinarum</i>	CA096764	AGNKTGQVTVF <del>WGRNKAEGTLREA</del>	87,6	87,6
<i>Oryza sativa</i> <sup>b</sup>	CT836240	AVGKTGQVTVF <del>WGRNKDEGTLREA</del>	83,3	83,3
<i>T. aestivum</i> (XIP-I) <sup>c,*</sup>	AJ422119	AGGKTGQVTVF <del>WGRNKAEGSLREA</del>	79,2	83,3
<i>Z. mays</i> <sup>d,*</sup>	n.d.	AGRKTGQVTVF <del>XXR</del>	78,6	86,7
<i>Hordeum vulgare</i> <sup>d,*</sup>	BY846439	AGGKTGQVTVF <del>WGRNKAEGSL</del>	76,1	81,0
<i>T. aestivum</i> (XIP-III) <sup>e,*</sup>	AB204666	AGKTGQVTVF <del>WGRNKAEGSLREA</del>	73,9	78,3
<i>T. aestivum</i> (XIP-R1) <sup>f,*</sup>	AB302972	ATGKTGQVA <del>VFWGRNKNEGSLREA</del>	70,8	79,2
<i>T. aestivum</i> (XIP-R2) <sup>f</sup>	AB302973	ATGKTGQVA <del>VFWGRNKNEGSLREA</del>	70,8	79,2
<i>Triticum durum</i> <sup>d</sup>	n.d.	AGKTGQVTVF <del>WGRNKAEGSL</del>	70,0	76,0
<i>T. durum</i> (XIP-II) <sup>e</sup>	AJ318884	KQTGQLT <del>VFWGRNAGEGTLREA</del>	68,2	77,3
<i>O. sativa</i> (RIXI) <sup>g,*</sup>	AB027416	AAGKTGQMT <del>VFWGRNKNEGTLKET</del>	66,7	79,2
<i>O. sativa</i> <sup>h,*</sup>	AK064366	DDPGLAV <del>YWGRHKEEGSLREA</del>	42,9	66,7

\*Protéines purifiées avec un taux d'inhibition prouvé; <sup>a</sup> Pourcentages d'identité et de similarité des séquences <http://www.ebi.ac.uk>; <sup>b</sup>[199]; <sup>c</sup>[201]; <sup>d</sup>, <sup>e</sup>[68]; <sup>f</sup>[203]; <sup>g</sup>[70]; <sup>h</sup>[202]; <sup>i</sup>n.d. = non disponible

La séquence de mil perlé est de 91,7 % et 87,6 % identiques aux séquences déterminées de la base de données EST de Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) (FL886376 et FL8833777, respectivement) (Tableau 6.3). En outre, 87,6 % d'identité ont été trouvés avec les séquences de XIP de sorgho (CN138888), de XIP du maïs (DQ246902), de XIP du blé (CA486646) et de la canne à sucre (*Saccharum officinarum* L.) (Ca096764) (Tableau 6.3). Moins de 80 % d'identité sont observés avec les séquences N-terminales d'acides aminés du blé XIP-I (AJ422119), XIP-III (AB204666), XIP-R1 (AB302972) et XIP-R2 (AB302973), XIP d'orge (BY846439), XIP-II du froment dur (AJ318884), et RIXI de riz (AB027416) (Tableau 6.3).

Les acides aminés non identifiés dans la séquence N-terminale de XIP de mil perlé expérimentalement déterminé; (X<sub>1</sub>) et (X<sub>2</sub>) sont probablement Trp et Gly, respectivement. Ces deux acides aminés se produisent sur ces positions dans toutes les autres séquences énumérées dans le tableau 6.3. En outre, l'analyse de la séquence N-terminale a indiqué un signal très faible de Gly pour X<sub>2</sub>. Cependant, dans le cas de X<sub>1</sub>, aucun signal n'a pu être noté pour Trp [204].

### **6.3.5 Influence du pH et de la température sur l'inhibition des endoxylanases par les XIP purs de sorgho et de mil**

Comme déjà mentionné ci-dessus, les XIPs de sorgho [199] et de mil perlé [204] inhibent les endoxylanases des familles GH 10 et GH 11, comme XIP-I de blé [69]. Ces résultats sont en accord avec la conservation des deux emplacements actifs de l'inhibiteur responsable de l'inhibition de ces familles d'endoxylanase.

Les valeurs de  $[I]/[E]_{60}$  mesurées avec les endoxylanases de GH 10 varient de 0,9 à 2,2 pour XIP de sorgho et de 0,9 à 1,3 pour XIP de mil perlé (Tableau 6.3). Ces valeurs faibles indiquent une inhibition prononcée [206] et sont dans l'ordre de grandeur de XIP-I pour le blé. Flatman et coll. [69] ont rapporté des valeurs de  $[I]/[E]_{60}$  de 0,6 à 1,6 pour les endoxylanases de GH 10 d'*Aspergillus nidulans* et d'*Aspergillus oryzae*, respectivement.

Les valeurs de  $[I]/[E]_{60}$  pour les endoxylanases de GH 11 pour les XIPs de sorgho et de mil perlé sont comparables, excepté pour l'endoxylanase de *T. longibrachiatum* (pI 6,6), la valeur de  $[I]/[E]_{60}$  est beaucoup plus faible pour XIP de mil perlé (0,8) que celle calculée pour XIP de sorgho (Tableau 6.4). Cependant, aucune inhibition n'a pu être détectée vis-à-vis de l'endoxylanase GH 11 d'*A. Niger* dans les conditions expérimentales pour les deux XIPs de sorgho et de mil perlé, tandis que Flatman et coll. [69] ont obtenu une valeur de  $[I]/[E]_{60}$  de

3,8 pour XIP-I de blé (Tableau 6.4). Les valeurs de  $[I]/[E]_{50}$  sont de 4,2 jusqu'à 289,6 pour TLXI et de 0,6 à 1,1 pour TAXI [63, 66, 187].

**Tableau 6.4:** Valeurs de  $[I]/[E]_{50}$  pour l'inhibition de différentes endoxylanases de la famille des GH 10 and 11 par XIP de mil et de sorgho comparée avec celles rapportées de XIP-I de blé.

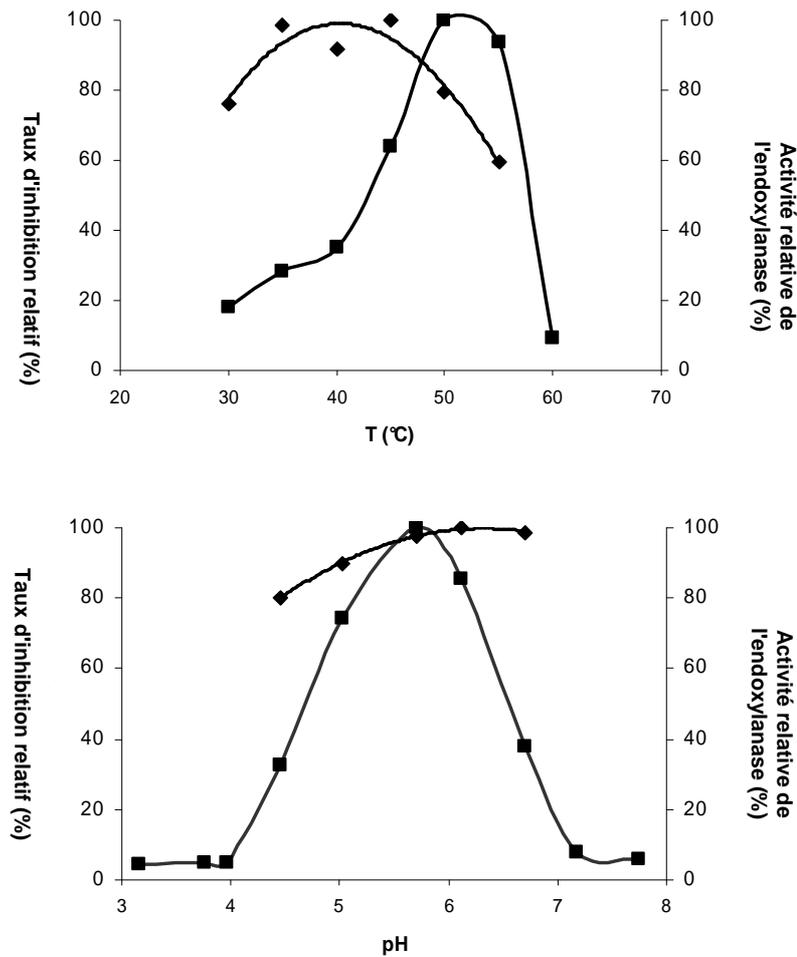
	n° Accession. NBCI	$[I]/[E]_{50}$		
		Pearl millet XIP	Sorghum XIP <sup>a</sup>	Wheat XIP-I <sup>b</sup>
<b><u>GH 10 endoxylanases</u></b>				
<i>Aspergillus niger</i>	CAA03666	1,3	0,9	n.d.
<i>Penicillium purpurogenum</i>	AAF71268	0,9	1,3	n.d.
<i>Aspergillus oryzae</i>	BAA76476	1,1	2,2	1,6
<b><u>GH 11 endoxylanases</u></b>				
<i>A. niger</i>	CAA01470	n.i. <sup>d</sup>	n.i.	3,8
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (pI 6,6)	CAA46294	0,8	104,0	n.d.
<i>T. longibrachiatum</i> (pI 9,0)	CAA49293	3,4	6,1	6,3
<i>Trichoderma viride</i>	CAB60767	49,1	37,0	63,0
<i>Bacillus subtilis</i>	AAA22897	n.i.	n.i.	n.i.
<i>Penicillium funiculosum</i>	CAC16487	n.d.	n.d.	1,0

<sup>b</sup>[69];

<sup>c</sup>n.d. = non déterminée

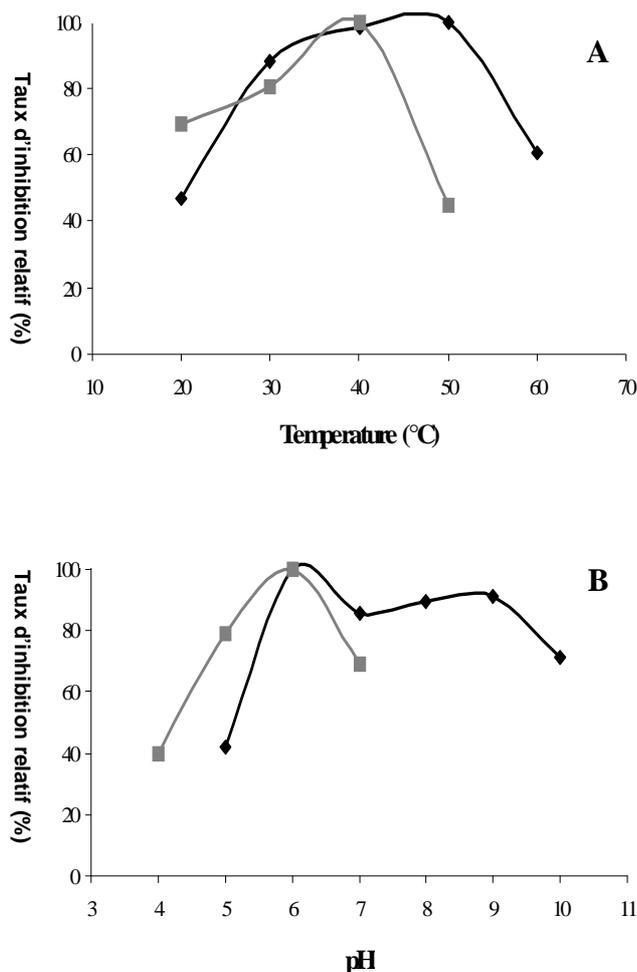
<sup>d</sup>n.i. = non inhibée;

L'endoxylanase GH 10 de *P. purpurogenum* est inhibée au maximum par XIP de sorgho dans une gamme de température et de pH allant de 36-46 °C et pH 6,7-6,7, tandis que les conditions optimales d'activité de l'enzyme sont 60-66 °C et pH 6,7 (Figure 6.12).



**Figure 6.12:** Influence de la température et du pH sur l'activité de l'endoxylyanase de *P. purpurogenum* et sur les taux relatifs d'inhibition de XIP de sorgho (■) Activité relative d'endoxylyanase de *P. purpurogenum* et (◆) Taux d'inhibition relatif de XIP de sorgho à température et pH variables vis-à-vis de *P. purpurogenum*.

Plus de 80 % de l'activité maximale de XIP de mil perlé vis-à-vis de l'endoxylyanase GH 10 de *P. purpurogenum* est dans une gamme large de température 30 à 60 °C (Figure 6.13 A) et aux valeurs de pH de 6 - 9 (Figure 6.13 B). Ces résultats correspondent à ceux obtenus pour XIP de sorgho. L'endoxylyanase GH 11 de *T. longibrachiatum* (pI 6,6) est au maximum inhibée à 40 °C (Figure 6.13 A) et à pH 6,0 (Figure 6.13 B).



**Figure 6.13:** Influence de la température et du pH sur les taux relatifs d'inhibition de deux endoxylanases par XIP pure de mil perlé (◆) endoxylanase de GH 10 *P. purpurogenum* et (■) endoxylanase de GH 11 de *Trichoderma longibrachiatum* (pI 6,6).

#### 6.4 CONCLUSION

Il est maintenant bien établi que les micro-organismes phytopathogéniques sécrètent un certain nombre d'enzymes hydrolytiques capables de dégrader les polymères constituant de la paroi cellulaire pour envahir des tissus végétaux. Les parois cellulaires des céréales, consistent principalement en arabinoxylane (AX). Les enzymes de dégradation de l'AX sont les endoxylanases, soit les composants importants de l'arsenal d'attaque des microbes pathogènes de céréales [207, 208].

Dans ce chapitre, une variabilité fortement significative dans les taux d'inhibition des endoxylanases a été obtenue pour sept cultivars de sorgho et onze cultivars de mil perlé. Ceci, est la première preuve de l'existence et de la détection des inhibiteurs d'endoxylanases dans le sorgho et le mil perlé. Ceci montre la présence d'une forte activité antifongique dans ces

céréales. Le rôle de ces inhibiteurs dans la protection des plantes contre les attaques fongiques a été largement étudié par plusieurs chercheurs pour le blé. Les inhibiteurs d'endoxylanase de type XIP nouvellement isolés du sorgho et du mil perlé peuvent être employés dans plusieurs applications biotechnologiques pour l'industrie. Les inhibiteurs de xylanases trouvent leurs applications dans la limitation de l'activité endoxylanique, et dans la purification des endoxylanases.

Les XIPs de sorgho et de mil perlé ont exhibé une forte analogie avec les XIPs précédemment isolés du blé, du riz, du maïs et d'autres céréales [199, 204, 205]. Une nouvelle propriété intéressante des XIPs de sorgho et de mil perlé est leur thermostabilité peu commune dans la gamme de pH modérément acide, spécifiquement pH 4,6. Cette thermostabilité représente une propriété qui pourrait être utile dans l'isolement de ces inhibiteurs.

XIP de sorgho est une protéine monomérique glycosylée présentant un pI de 6,7 et une MM de 29 kDa. La séquence d'acides aminés et les propriétés biochimiques de la protéine sont similaires à XIP-I du blé et XIP du mil perlé est une protéine monomérique glycosylée présentant un pI de 7 et une MM de 28 kDa.

Les résultats obtenus semblent montrer qu'aucune inhibition de type TAXI ou TLXI n'a pu être détectée dans les graines de sorgho et de mil perlé. L'étude des propriétés des inhibiteurs d'endoxylanases dans le sorgho et le mil perlé pourrait aider à mieux comprendre la fonctionnalité des endoxylanases dans les produits à bases de sorgho ou de mil perlé et les phénomènes physiologiques impliqués pendant la germination ou pendant la défense de la plante contre les attaques bactériennes et fongiques.

## Conclusion générale et perspectives

Les graines de cultivars de sorgho et de mil perlé échantillonnés ont exhibé **une composition en acides aminés équilibrée** avec des niveaux élevés en **acides aminés essentiels** représentant plus de **40%** de la composition totale en acides aminés.

Un large intervalle de teneurs en **protéines** a été obtenu (**10-17%**) pour les échantillons de sorghos et de mils perlé étudiés. Les protéines ont été séparées et extraites selon leurs **solubilités** dans différents solvants en cinq fractions : (1) les albumines, qui représentent 8 à 20% de la fraction protéique, (2) les globulines, qui représentent 7 à 13%, (3) les prolamines, qui représentent 20 à 40%, (4) les prolamines après réduction, qui représentent 10 à 28 %, et enfin (5) les glutélines 15 à 30%.

Chaque fraction a été séparée selon la taille par **chromatographie d'exclusion stérique** (SE-HPLC), tandis que les fractions les plus hydrophobes (les prolamines et les glutélines) ont été séparées et analysées par **chromatographie en phase inverse** (RP-HPLC). Les profils chromatographiques des différentes fractions de mil perlé et de sorgho sont semblables à ceux décrits dans la littérature, mais avec un large éventail de variabilité selon les cultivars étudiés. Les prolamines de sorgho (**kafirine**) ont été purifiées et leurs **séquences N-terminales** ont été déterminées. Les monomères de kafirine et les polymères à faible poids moléculaire ont été extraits avec de **l'éthanol à 70%**, tandis que pour extraire les kafirines fortement **réticulés**, sous forme monomères, il a fallu ajouter un agent réducteur tel que le  **$\beta$ -mercaptoéthanol** à l'éthanol 70%. Les monomères de type de  **$\alpha$ 1-**,  **$\alpha$ 2-**  **$\beta$ -** et  **$\gamma$ -kafirine** ont été extraits et

caractérisés avec succès. Pour **la première fois**, la forme  **$\delta$ -kafirine** a été identifiée et isolée au niveau protéique et sa séquence confirmée.

La chromatographie en phase inverse (RP-HPLC) a permis de fractionner les sous-unités de kafirine en deux fractions principales  $\gamma$  et  $\alpha$ - $\beta$ -kafirine selon leur hydrophobicité. Une analyse détaillée des teneurs en  $\gamma$ -kafirine a indiqué l'existence de différences parmi les cultivars de sorgho.

La fraction protéique de mil perlé a aussi été caractérisée avec succès. Comme pour le sorgho, la **fraction prolamine** est la fraction **majoritaire**, dans **le mil perlé**. Elle est connue sous l'appellation de pennisetine. Les différentes formes de **pennisetines (A-, B- et C-)** ont été séparées par SDS-PAGE et SE-HPLC. Les profils de RP-HPLC des prolamines de mil perlé ont permis la séparation des formes A et C-pennisetines en se basant sur la différence en hydrophobicité

La **qualité nutritionnelle** des protéines totales dans la farine de sorgho et de mil perlé a été évaluée par la détermination de la digestibilité in vitro et des taux d'acides aminés. Les valeurs de Amino Acide score (**AAS**) et de Protein digestibility corrected amino acid score (**PDCAAS**) ont été évaluées montrant qu'aussi bien le sorgho que le mil perlé sont **riches en acides aminés essentiels** et que leur **carence en lysine, méthionine et cystéine** peut être comblée par l'**enrichissement** de ces céréales avec d'autres protéines.

**L'hydrolyse enzymatique** des prolamines de sorgho et de mil perlé a montré que le choix de l'enzyme appropriée pourrait orienter l'hydrolyse vers des applications différentes. L'**alcalase** et l'**espérase** sont préconisées pour des **hydrolyses poussées** alors que la **papaïne**, la **trypsine** et la **flavourzyme** pour des **hydrolyses faibles**. Les hydrolyses poussées sont préconisées pour la **purification de peptides bioactifs** alors que les hydrolyses limitées sont recherchées pour améliorer les **propriétés fonctionnelles** des protéines.

Dans la fraction **albumine et globuline**, aussi bien dans le sorgho que dans le mil perlé, deux **nouvelles protéines à activité antifongique** ont été purifiées et caractérisées avec succès pour **la première fois**. Ces protéines de type **XIP (Xylanase Inhibitor Protein)** présentent une grande similarité avec les XIP déjà purifiés à partir d'autres céréales. Les résultats prouvent aussi qu'il est possible d'employer la fraction protéique à activité antifongique pour

**choisir** les cultivars de mil perlé et de sorgho **les plus résistants** aux attaques bactériennes et fongiques.

Cette étude a confirmé qu'en termes de **quantité** et **qualité**, les **protéines** de sorgho et de mil perlé pourraient servir comme **source d'acides aminés essentiels** et de protéines potentielles à l'avenir. Le sorgho (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) et le mil perlé (*Pennisetum glaucum*) peuvent se développer dans des **conditions très dures** telles que les **sols stériles** et la **chaleur excessive**, des conditions qui sont peu convenables pour la production du maïs ou du blé. Grâce à cette étude, il est prévu de **motiver les populations** locales du **sud de l'Algérie** afin d'investir dans la production massive de ces céréales.

Cette étude pourrait constituer **un point de départ** pour toute une série d'investigations sur les **fractions protéiques** des cultivars **algériens** de sorgho et de mil perlé. Les résultats obtenus au cours de cette thèse montrent que le sorgho et le mil perlé cultivés en Algérie présentent **une originalité** aussi bien dans **la composition en protéines** en générale, que dans les **activités antifongiques** de certaines de ces fractions protéiques. Il serait intéressant de favoriser **la valorisation** de ces cultivars et de **généraliser leur production** aussi bien dans le sud que dans les autres régions de l'Algérie.

## Références

- [1]. **Hoseney, R.C., Varriano-Marston, E., & Dendy, D.A.V. (1994).** Sorghum and millets. In *Advances in Cereal Science and Technology, Volume IV*. Pomeranz, Y. Ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, U.S.A., pp.71-144.
- [2]. **Anglani, C. (1998).** Sorghum carbohydrates - A review. *Plant Foods for Human Nutrition* **52**, 77-83.
- [3]. **Anglani, C. (1998).** Sorghum for human food - A review. *Plant Foods for Human Nutrition* **52**, 85-95.
- [4]. **Afripro. (2003).** Workshop on the proteins of sorghum and millet: Enhancing nutritional and functional properties for Africa, Pretoria, South Africa, 2-4 April 2003, edited by Belton, P.S., Taylor, J.R.N., [www.afripro.org.uk](http://www.afripro.org.uk)
- [5]. **Bostid: Board on Science and Technology for International Development (1996).** *Lost Crops of Africa: Volume 1: Grains*. Edited by Vietmeyer N. D., National academy of science, Washington, D.C., U.S.A. 372 pp.
- [6]. **FAO (2002).** Current production and crops prospects. In *Global information and early warning system on food and agriculture commodities and trade division* (ESC). Edited by Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 5 pp.
- [7]. **FAO (1995).** Le sorgho et le mil dans la nutrition humaine. In *Alimentation et nutrition* **27**, Edited by Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 198 pp.
- [8]. **Belton, P. S. & Taylor, J. R. N. (2004).** Sorghum and millets: protein sources for Africa. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 94-98.
- [9]. **Fliedel, G. & Kobrehel, K. (1985).** Studies on sorghum proteins .1. Solubilization of proteins with soaps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **33**, 303-308
- [10]. **U.S. Grains Council (2009).** <http://www.grains.org/sorghum>.
- [11]. **FAO. FAOSTAT (2008).** Database: archives, <http://faostat.fao.org>,
- [12]. **Youssef, A. M. (1998).** Extractability, fractionation and nutritional value of low and high tannin sorghum proteins. *Food Chemistry* **63**, 325-329.

- [13]. **Awika, J. M. & Rooney, L. W. (2004).** Sorghum phytochemicals and their potential impact on human health. *Phytochemistry* 65, 1199-1221.
- [14]. **Taylor, J. R. N., Schober, T. J. & Bean, S. R. (2006).** Novel food and non-food uses for sorghum and millets. *Journal of Cereal Science* 44, 252-271.
- [15]. **Berenji, J. & Dahlberg, J. (2004).** Perspectives of sorghum in Europe. *Journal of Agronomy and Crop Science* 190, 332-338.
- [16]. **Zhan, X., Wang, D., Tuinstra, M. R., Bean, S., Seib, P. A. & Sun, X. S. (2003).** Ethanol and lactic acid production as affected by sorghum genotype and location. *Industrial Crops and Products* 18, 245-255.
- [17]. **Ramos, J. R., Cabral, R. R. & Chan, F. D. (1984).** Utilization of sorghum flour as extender for plywood adhesive. In *NSDB technology journal*, pp. 29-48.
- [18]. **Rooney, L. W. & Waniska, R. D. (2000).** Sorghum food and industrial utilization. In *Sorghum: Origin, History, Technology, and Production*, Edited by Smith C. W. & Frederiksen R. A., John Wiley & Sons Inc., New York, U.S.A, pp. 689-729.
- [19]. **Diao, Y., Walawender, W. P. & Fan, L. T. (2002).** Activated carbons prepared from phosphoric acid activation of grain sorghum. *Bioresource technology* 81, 45-52.
- [20]. **da Silva, L. S. & Taylor, J. R. N. (2005).** Physical, mechanical, and barrier properties of kafirin films from red and white sorghum milling fractions. *Cereal chemistry* 82, 9-14.
- [21]. **Emmambux, M. N., Stading, M. & Taylor, J. R. N. (2004).** Sorghum kafirin film property modification with hydrolysable and condensed tannins. *Journal of cereal science* 40, 127-135.
- [22]. **da Silva, L. S. & Taylor, J. R. N. (2004).** Sorghum bran as a potential source of kafirin. *Cereal Chemistry* 81, 322-327.
- [23]. **Delcour, J. A. & Hosene, R. C. (2010).** *Principles of cereal science and technology, 3<sup>rd</sup> Edition*. Edited by American Association of Cereal Chemists International (AACC), St. Paul, Minnesota, U.S.A, 288 pp.
- [24]. **Hubbard, J. E., Hall, H. H. & Earle, F. R. (1950).** Composition of the component parts of the sorghum kernel. *Cereal Chemistry* 27, 415-420.
- [25]. **Earp, C. F., McDonough, C. M. & Rooney, L. W. (2004).** Microscopy of pericarp development in the caryopsis of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Journal of cereal science* 39, 21-27.
- [26]. **Serna-Saldivar, S. & Rooney, L. W. (1995).** Structure and chemistry of sorghum and millets. In *Sorghum and Millets: Chemistry and Technology*, Edited by American Association of Cereal Chemists, St Paul, Minnesota, U.S.A, pp. 69-124.
- [27]. **Chantereau, J. & Nicou, R. (1994).** *The tropical agriculturalist series: Sorghum*. Edited by MacMillan Press Ltd. London, U.K., 98 pp.

- [28]. **Duodu, K. G., Nunes, A., Delgadillo, I., Parker, M. L., Mills, E. N. C., Belton, P. S. & Taylor, J. R. N. (2002).** Effect of grain structure and cooking on sorghum and maize in vitro protein digestibility. *Journal of Cereal Science* 35, 161-174.
- [29]. **Duodu, K. G., Taylor, J. R. N., Belton, P. S. & Hamaker, B. R. (2003).** Factors affecting sorghum protein digestibility. *Journal of Cereal Science* 38, 117-131.
- [30]. **Elkin, R. G., Freed, M. B., Hamaker, B. R., Zhang, Y. & Parsons, C. M. (1996).** Condensed tannins are only partially responsible for variations in nutrient digestibilities of sorghum grain cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 848-853.
- [31]. **Hamaker, B. R., Kirleis, A. W., Butler, L. G., Axtell, J. D. & Mertz, E. T. (1987).** Improving the in vitro protein digestibility of sorghum with reducing agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 626-628.
- [32]. **Hicks, C., Bean, S. R., Lookhart, G. L., Pedersen, J. F., Kofoid, K. D. & Tuinstra, M. R. (2001).** Genetic analysis of kafirins and their phenotypic correlations with feed quality traits, in vitro digestibility, and seed weight in grain sorghum. *Cereal Chemistry* 78, 412-416.
- [33]. **Chandrashekar, A. & Mazhar, H. (1999).** The biochemical basis and implications of grain strength in sorghum and maize. *Journal of Cereal Science* 30, 193-207.
- [34]. **Yousif, N. E. & El Tinay, A. H. (2001).** Effect of fermentation on sorghum protein fractions and in vitro protein digestibility. *Plant Foods for Human Nutrition* 56, 175-182.
- [35]. **Osborne, T. B. (1924).** *The vegetable proteins, 2<sup>nd</sup> edition*, Edited by Longmans, Green and Co., London, U.K, pp. 154.
- [36]. **Belton, P. S., Delgadillo, I., Halford, N. G. & Shewry, P. R. (2006).** Kafirin structure and functionality. *Journal of Cereal Science* 44, 272-286.
- [37]. **Zhao, R., Bean, S. R., Ioerger, B. P., Wang, D. & Boyle, D. L. (2008).** Impact of mashing on sorghum proteins and its relationship to ethanol fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 946-953.
- [38]. **Taylor, J., Taylor, J. R. N., Dutton, M. F. & de Kock, S. (2005).** Identification of kafirin film casting solvents. *Food Chemistry* 90, 401-408.
- [39]. **Park, S.-H. & Bean, S. R. (2003).** Investigation and optimization of the factors influencing sorghum protein extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7050-7054.
- [40]. **Shull, J. M., Watterson, J. J. & Kirleis, A. W. (1991).** Proposed nomenclature for the alcohol-soluble proteins (kafirins) of *Sorghum bicolor* (L. Moench) based on molecular weight, solubility, and structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39, 83-87.

- [41]. **El Nour, I. N. A., Peruffo, A. D. & Curioni, A. (1998).** Characterisation of sorghum kafirins in relation to their cross-linking behaviour. *Journal of Cereal Science* 28, 197-207.
- [42]. **Chamba, E. B., Halford, N. G., Forsyth, J., Wilkinson, M. & Shewry, P. R. (2005).** Molecular cloning of  $\beta$ -kafirin,  $\alpha$  methionine-rich protein of sorghum grain. *Journal of Cereal Science* 41, 381–383.
- [43]. **Nunes, A., Correia, I., Barros, A. & Delgadillo, I. (2005).** Characterization of kafirin and zein oligomers by preparative sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 639-643.
- [44]. **Ezeagu, I. E. & Gowda, L. R. (2006).** Protein extractability, fractionation and amino acid composition of some leguminous seeds found in Nigeria. *Journal of Food Biochemistry* 30,1-11.
- [45]. **Mariscal-Landín, G., Avellaneda, J. H., Reis de Souza, T. C., Aguilera, A., Borbolla, G. A. & Mar, B. (2004).** Effect of tannins in sorghum on amino acid ileal digestibility and on trypsin (E.C.2.4.21.4) and chymotrypsin (E.C.2.4.21.1) activity of growing pigs. *Animal Feed Science and Technology* 117, 245-264.
- [46]. **Mawahib, E. A. & El Tinay, A. H. (1997).** Effect of cooking and treatment with sodium bisulphite or ascorbic acid on the in-vitro protein digestibility of two sorghum cultivars. *Food Chemistry*, 59, 339-343.
- [47]. **Miron, J., Zuckerman, E., Sadeh, D., Adin, G., Nikbachat, M., Yosef, E., Ben-Ghedalia, D., Carmi, A., Kipnis, T. & Solomon, R. (2005).** Yield, composition and in vitro digestibility of new forage sorghum varieties and their ensilage characteristics. *Animal Feed Science and Technology* 120, 17-32.
- [48]. **Nunes, A., Correia, I., Barros, A. & Delgadillo, I. (2004).** Sequential in vitro pepsin digestion of uncooked and cooked sorghum and maize samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 2052-2058.
- [49]. **Oria, M. P., Hamaker, B. R. & Schull, J. M. (1995).** In vitro protein digestibility of developing and mature sorghum grain in relation to [alpha]-, [beta]-, and [gamma]-kafirin disulfide crosslinking. *Journal of Cereal Science* 22, 85-93.
- [50]. **Oria, M. P., Hamaker, B. R., Axtell, J. D. & Huang, C.-P. (2000).** A highly digestible sorghum mutant cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 5065-5070.
- [51]. **Shull, J. M., Watterson, J. J. & Kirleis, A. W. (1992).** Purification and immunocytochemical localization of kafirins in *Sorghum bicolor* (L.) Moench) endosperm. *Protoplasma* 171, 64-74.
- [52]. **Taylor, J., Bean, S. R., Ioerger, B. P. & Taylor, J. R. N. (2007).** Preferential binding of sorghum tannins with [gamma]-kafirin and the influence of tannin binding on kafirin digestibility and biodegradation. *Journal of Cereal Science* 46, 22-31.

- [53]. **Bejosano, F. P., Waniska, R. D. & Rooney, W. L. (2003).** Antifungal proteins in commercial hybrids and elite sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 5911-5915.
- [54]. **Chandrasekher, G., Raju, D. S. & Pattabiraman, T. N. (1981).** Natural plant enzyme-inhibitors - alpha-amylase inhibitors in millets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32, 9-16.
- [55]. **Collins, T., Gerday, C. & Feller, G. (2005).** Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *Fems Microbiology Reviews* 29, 3-23.
- [56]. **Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2002).** Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *Journal of Cereal Science* 35, 225-243.
- [57]. **Sørensen, J. F., Kragh, K. M., Sibbesen, O., Delcour, J., Goesaert, H., Svensson, B., Tahir, T. A., Brufau, J., Perez-Vendrell, A. M., Bellincampi, D., D'Ovidio, R., Camardella, L., Giovane, A., Bonnin, E. & Juge, N. (2004).** Potential role of glycosidase inhibitors in industrial biotechnological applications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*. Plant proteinaceous inhibitors of glycosidases 1696, 275-287.
- [58]. **Guillon, F., Tranquet, O., Quillien, L., Utile, J. P., Ordaz Ortiz, J. J. & Saulnier, L. (2004).** Generation of polyclonal and monoclonal antibodies against arabinoxylans and their use for immunocytochemical location of arabinoxylans in cell walls of endosperm of wheat. *Journal of cereal science* 40, 167-182.
- [59]. **Gys, W., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2004).** Reduction of xylanase activity in flour by debranning retards syruing in refrigerated doughs. *Journal of Cereal Science* 39, 371-377.
- [60]. **Rasmussen, C. V., Hansen, H. B., Hansen, Å. & Larsena, L. M. (2001).** pH-, temperature- and time-dependent activities of endogenous endo-D-xylanase, D-xylosidase and L-arabinofuranosidase in extracts from ungerminated rye (*Secale cereale* L.) grain. *Journal of Cereal Science* 34, 49-60.
- [61]. **Chithra, M. & Muralikrishna, G. (2008).** Characterization of purified xylanase from finger millet (*Eleusine coracana*-Indaf 15) malt. *European Food Research and Technology* 227, 587-597.
- [62]. **Debyser, W. G. & Delcour, J. A. (1997).** Arabinoxylan solubilisation and inhibition of the barley malt xylanolytic system by wheat during brewing with wheat wholemeal adjunct: evidence for a new class of enzyme inhibitors. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 55, 153-156.
- [63]. **Fierens, E. (2007).** TLXI, a thaumatin-like xylanase inhibitor: isolation, characterisation and comparison with other wheat (*Triticum aestivum* L.) xylanase inhibiting proteins. In *Bioscience engineering faculty*, pp. 204. Leuven, Belgium: Katholieke Universiteit Leuven.

- [64]. **Gebruers, K. (2002).** Endoxylanase inhibitors in wheat (*Triticum aestivum* L.): Isolation, characterization and use for endoxylanase purification. In *Bioscience engineering faculty*, pp. 178. Leuven, Belgium: Katholieke Universiteit Leuven.
- [65]. **Goesaert, H., Gebruers, K., Brijs, K., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2003).** TAXI type endoxylanase inhibitors in different cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 3770-3775.
- [66]. **Gebruers, K., Brijs, K., Courtin, C. M., Fierens, K., Goesaert, H., Rabijns, A., Raedschelders, G., Robben, J., Sansen, S., Sørensen, J. F., Van Campenhout, S. & Delcour, J. A. (2004).** Properties of TAXI-type endoxylanase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* Plant proteinaceous inhibitors of glycosidases 1696, 213-221.
- [67]. **McLauchlan, W. R., Garcia-Conesa, M. T., Williamson, G., Roza, M., Ravestein, P. & Maat, J. (1999).** A novel class of protein from wheat which inhibits xylanases. *Biochemical Journal* 338, 441-446.
- [68]. **Goesaert, H., Elliott, G., Kroon, P. A., Gebruers, K., Courtin, C. M., Robben, J., Delcour, J. A. & Juge, N. (2004).** Occurrence of proteinaceous endoxylanase inhibitors in cereals. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics* 1696, 193-202.
- [69]. **Flatman, R., McLauchlan, W. R., Juge, N., Furniss, C., Berrin, J.-G., Hughes, R. K., Manzanares, P., Ladbury, J. E., O'Brien, R. & Williamson, G. (2002).** Interactions defining the specificity between fungal xylanases and the xylanase-inhibiting protein XIP-I from wheat. *Biochemical Journal* 365, 773-781.
- [70]. **Durand, A., Hughes, R., Roussel, A., Flatman, R., Henrissat, B. & Juge, N. (2005).** Emergence of a subfamily of xylanase inhibitors within glycoside hydrolase family 18. *FEBS Journal* 272, 1745-1755.
- [71]. **Payan, F. O., Flatman, R., Porciero, S., Williamson, G., Juge, N. & Roussel, A. (2003).** Structural analysis of xylanase inhibitor protein I (XIP-I), a proteinaceous xylanase inhibitor from wheat (*Triticum aestivum*, var. Soisson). *Biochemical Journal* 372, 399-405.
- [72]. **Payan, F. O., Leone, P., Porciero, S., Furniss, C., Tahir, T., Williamson, G., Durand, A., Manzanares, P., Gilbert, H. J., Juge, N. & Roussel, A. (2004).** The dual nature of the wheat xylanase protein inhibitor XIP-I. *Journal of Biological Chemistry* 279, 36029-36037.
- [73]. **Sansen, S., De Ranter, C. J., Gebruers, K., Brijs, K., Courtin, C. M., Delcour, J. A. & Rabijns, A. (2004).** Structural basis for inhibition of *Aspergillus niger* xylanase by *Triticum aestivum* xylanase inhibitor-I. *Journal of Biological Chemistry* 279, 36022-36028.
- [74]. **Tahir, T. A., Berrin, J.-G., Flatman, R., Roussel, A., Roepstorff, P., Williamson, G. & Juge, N. (2002).** Specific characterization of substrate and inhibitor binding sites of a glycosyl hydrolase family 11 xylanase from *Aspergillus niger*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 44035-44043.

- [75]. **Tahir, T. A., Durand, A., Gebruers, K., Roussel, A., Williamson, G. & Juge, N. (2004).** Functional importance of Asp37 from a family 11 xylanase in the binding to two proteinaceous xylanase inhibitors from wheat. *FEMS Microbiology Letters* 239, 9-15.
- [76]. **Beaugrand, J., Gebruers, K., Ververken, C., Fierens, E., Croes, E., Goddeeris, B., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2006).** Antibodies against wheat xylanase inhibitors as tools for the selective identification of their homologues in other cereals. *Journal of Cereal Science* 44, 59-67.
- [77]. **Igawa, T., Tokai, T., Kudo, T., Yamaguchi, I. & Kimura, M. (2005).** A wheat xylanase inhibitor gene, Xip-I, but not Taxi-I, is significantly induced by biotic and abiotic signals that trigger plant defense. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69, 1058-1063.
- [78]. **Belien, T., Verjans, P., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2008).** Phage display based identification of novel stabilizing mutations in glycosyl hydrolase family 11 B. subtilis endoxylanase XynA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368, 74-80.
- [79]. **Brutus, A., Reca, I. B., Herga, S., Mattei, B., Puigserver, A., Chaix, J.-C., Juge, N., Bellincampi, D. & Giardina, T. (2005).** A family 11 xylanase from the pathogen *Botrytis cinerea* is inhibited by plant endoxylanase inhibitors XIP-I and TAXI-I. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337, 160-166.
- [80]. **Igawa, T., Ochiai-Fukuda, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Shibata, T., Yamaguchi, I. & Kimura, M. (2004).** New TAXI-type xylanase inhibitor genes are inducible by pathogens and wounding in hexaploid wheat. *Plant Cell Physiology* 45, 1347-1360.
- [81]. **Elliott, G. O., McLauchlan, W. R., Williamson, G. & Kroon, P. A. (2003).** A wheat xylanase inhibitor protein (XIP-I) accumulates in the grain and has homologues in other cereals. *Journal of Cereal Science* 37, 187-194.
- [82]. **Ntaikou, I., Gavala, H. N., Kornaros, M. & Lyberatos, G. (2008).** Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using *Ruminococcus albus*. *International Journal of Hydrogen Energy* 33, 1153-1163.
- [83]. **Robin, J. P., Mercier, C., Charbonnière, R. & Guilbot, A. (1974).** Lintnerized starches. Gel-filtration and enzymatic studies of insoluble residues from prolonged acid treatment of potato starch. *Cereal Chemistry* 51, 389-405.
- [84]. **Hizukuri, S. (1986).** Polymodal distribution of chain lengths of amylopectins, and its significance. *Carbohydrate Research* 147, 342-347.
- [85]. **Kulp, K. & Ponte, J. G. (2000).** *Handbook of cereal science and technology*, 2<sup>nd</sup> edition. Edited by Marcel Dekker, CRC Press., New York, U.S.A, 790 pp.
- [86]. **Knudsen, K. E. & Munck, L. (1985).** Dietary fibre contents and compositions of sorghum and sorghum-based foods. *Journal of Cereal Science* 3, 153-164.

- [87]. Verbruggen, M. A., Beldman, G., Voragen, A. G. J. & Hollemans, M. (1993). Water-unextractable cell wall material from sorghum: Isolation and characterization. *Journal of Cereal Science* 17, 71-82.
- [88]. Hatfield, R. D., Ralph, J. & Grabber J. H. (1999). Cell wall cross-linking by ferulates and diferulates in grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 403-407.
- [89]. Izydorczyk, M. S. & Biliaderi, C. G. (1995). Cereal arabinoxylans: advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers* 51, 33-48.
- [90]. Maslen, S. L., Goubet, F., Adam, A., Dupree, P. & Stephens, E. (2007). Structure elucidation of arabinoxylan isomers by normal phase HPLC-MALDI-TOF/TOF-MS/MS. *Carbohydrate Research* 342, 724-735.
- [91]. Jelaca, S. L. & Hlynka, I. (1971). Water-binding capacity of wheat flour crude pentosans and their relation to mixing characteristics of dough. *Cereal chemistry* 48, 211-222.
- [92]. Michniewicz, J., Biliaderis, G. G. & Bushuk, W. (1992). Effect of added pentosans on some properties of wheat bread. *Food Chemistry* 43, 251-257.
- [93]. Gudmundsson, M., Eliasson, A. C., Bengtsson, S. & Aman, P. (1991). The effects of water soluble arabinoxylan on gelatinization and retrogradation of starch. *Stärke* 43, 5-10.
- [94]. Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (1998). Physicochemical and bread-making properties of low molecular weight wheat-derived arabinoxylans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4066-4073.
- [95]. Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2001). Relative activity of endoxylanases towards water-extractable and water-unextractable arabinoxylan. *Journal of Cereal Science* 33, 301-312.
- [96]. Izydorczyk, M. S. & Dexter, J. E. (2008). Barley  $\beta$ -glucans and arabinoxylans: Molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products - a Review. *Food Research International* 41, 850-868.
- [97]. Huisman, M. M. H., Schols, H. A. & Voragen, A. G. J. (2000). Glucuronoarabinoxylans from maize kernel cell walls are more complex than those from sorghum kernel cell walls. *Carbohydrate Polymers* 43, 269-279.
- [98]. Biely, P., Markovic, O. & Mislovicova, D. (1985). Sensitive detection of endo-1,4- $\beta$ -glucanases and endo-1,4- $\beta$ -xylanases in gels. *Analytical Biochemistry* 144, 147-151.
- [99]. Biely, P., Vrsanskà, M. & Kucàr, S. (1992). Identification and mode of action of endo-(1-4)-xylanases. In *Xylans and xylanases*, Visser J. *et al.*, Edited by Elsevier, Science & Publishers. Amsterdam, The Netherlands, pp. 81-95.
- [100]. Taylor, J. R. N., Schober, T. J. & Bean, S. R. (2006). Novel food and non-food uses for sorghum and millets. *Journal of Cereal Science* 44, 252-271.

- [101]. Verbruggen, M. A., Beldman, G. & Voragen, A. G. J. (1995). The selective extraction of glucuronoarabinoxylans from sorghum endosperm cell walls using barium and potassium hydroxide solutions. *Journal of Cereal Science* 21, 271-282.
- [102]. Taylor, J. R. N. & Emmambux, M. N. (2008). Gluten-free foods and beverages from millets. In *Gluten-Free Cereal Products and Beverages*, Edited by Arendt E. K. & Bello F. D., Academic Press., San Diego, U.S.A, pp. 119-148.
- [103]. Kusaka, M., Lalusin, A. G. & Fujimura, T. (2005). The maintenance of growth and turgor in pearl millet (*Pennisetum glaucum* [L.] Leeke) cultivars with different root structures and osmo-regulation under drought stress. *Plant Science* 168, 1-14.
- [104]. de Rouw, A. & Rajot, J.-L. (2004). Nutrient availability and pearl millet production in Sahelian farming systems based on manuring or fallowing. *Agriculture, Ecosystems & Environment Soil Interactions: Biology, Erosion and Organic Matter* 104, 249-262
- [105]. CGIAR. Consultative group on international agricultural research (2009). [www.cgiar.org/impact/research/Millet.html](http://www.cgiar.org/impact/research/Millet.html)
- [106]. Abdelrahman, A., Hosene, R. C. & Varriano-Marston, E. (1984). The proportions and chemical compositions of hand-dissected anatomical parts of pearl millet. *Journal of Cereal Science* 2, 127-133.
- [107]. Shewry, P. R. & Halford, N. G. (2003). The prolamin storage proteins of sorghum and millets. In *Proceeding of Afripro. Workshop on the Proteins of Sorghum and Millets: Enhancing Nutritional and Functional Properties for Africa*. Edited by Belton, P.S., Taylor, J.R.N., Pretoria, South Africa 2–4 April 2003. Published online at [http://www.afripro.org.uk/papers/Paper\\_01Taylor.pdf](http://www.afripro.org.uk/papers/Paper_01Taylor.pdf) cited 20/05/03.
- [108]. Marcellino, L. H., Junior, C. B. & Gander, E. S. (2002). Characterization of pearl millet prolamins. *Protein and Peptide Letters* 9, 237-244.
- [109]. Bugs, MR, Forato, L. A., Borteleto-Bugs, R. K., Fischer, H., Mascarenhas, Y., Ward, R. & Colnago, L. (2004). Spectroscopic characterization and structural modeling of prolamin from maize and pearl millet. *European Biophysical Journal* 33, 335-343.
- [110]. Ricks, C. B. (2007). The prolamins of pearl millet. *Master thesis*, Faculty of Brigham Young University, Provo, Utah, U.S.A. pp. 204.
- [111]. Geetha, N. P., Amruthesh, K. N., Sharathchandra, R. G. & Shetty, H. S. (2005). Resistance to downy mildew in pearl millet is associated with increased phenylalanine ammonia lyase activity. *Functional Plant Biology* 32, 267-275.
- [112]. Niranjana, R. S., Sarosh, R. & Shetty, H. S. (2006). Induction and accumulation of polyphenol oxidase activities as implicated in development of resistance against pearl millet downy mildew disease. *Functional Plant Biology* 33, 563-571.

- [113]. **Joshi, B. N., Sainani, M. N., Bastawade, K. B., Deshpande V. V., Gupta V. S. & Ranjekar P.K. (1999).** Pearl millet cysteine protease inhibitor Evidence for the presence of two distinct sites responsible for anti-fungal and anti-feedent activities. *European journal of biochemistry* 265, 556-563.
- [114]. **Giri, A. P. & Kachole, M. S. (1996).** Detection of electrophoretically separated amylase inhibitors in starch-polyacrylamide gels. *Journal of Chromatography A* 752, 261-264.
- [115]. **Revanappa, S. B., Nandini, C. D. & Salimath, P. V. (2010).** Structural characterisation of pentosans from hemicellulose B of wheat varieties with varying chapati-making quality. *Food Chemistry* 119, 27-33.
- [116]. **Nandini, C. D. & Salimath, P. V. (2002).** Structural features of arabinoxylans from bajra (Pearl millet). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6485-6489.
- [117]. **Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M. (1994).** *Principes de biochimie. Deuxième Édition. Traduction française de Biochemistry. Second Edition.* Worth Publishers. New York. 1993. Flammarion Médecine-Sciences. 1994. 1055 pp.
- [118]. [www.nutramed.com](http://www.nutramed.com),
- [119]. **Lasztity R. (1995).** *The chemistry of cereal proteins*, 2 ème Edition CRC Press, Florida, USA, 336 pp.
- [120]. **Bergmeyer A. (1983).** *Methods of proteins analysis* Vol.4, 3ème Édition Verlag Chemie, Weinheim, Allemagne. pp.1015.
- [121]. **Van der Borght, A., Vandeputte, G. E., Derycke, V., Brijs, K., Daenen, G. & Delcour, J. A. (2006).** Extractability and chromatographic separation of rice endosperm proteins. *Journal of Cereal Science* 44, 68-74.
- [122]. **Bean, S. R., Lookhart, G. L. & Bietz, J. A. (2000).** Acetonitrile as a buffer additive for free zone capillary electrophoresis separation and characterization of maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) storage proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 318-327
- [123]. **Mertz, E. T., Hassen, M. M., Cairns-Whittern, C., Kirlies, A. W., Tu, L. & Axtell, J. D. (1984).** Pepsin digestibility of protein in sorghum and other major cereals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, 1-2.
- [124]. **FAO/WHO Expert Consultation. Protein Quality Evaluation (1991).** FAO/WHO Nutrition Meetings, Report Series 51; *Viale delle Terme di Caracalla* Rome, Italy: Food and Agriculture Organization/World Health Organization.
- [125]. **Sarwar, G. (1997).** The protein digestibility–corrected amino acid score method overestimates quality of proteins containing antinutritional factors and of poorly digestible proteins supplemented with limiting amino acids in rats. *Journal of Nutrition*, 127, 758-764.

- [126]. **Adler-Nissen, J. (1993).** Proteases. In *Enzymes in food processing*; Nagodawithana, T., Reed, G., Eds. Academic Press: San Diego, pp. 159-203.
- [127]. **Adler-Nissen, J., (1977).** Enzymatic hydrolysis of food proteins. *Process Biochemistry* 12, 18-23.
- [128]. **Whitaker, J.R. (1994).** *Principles of enzymology for the food sciences*, 2 ed.; Marcel Dekker: New York, Vol. 61.pp. 648.
- [129]. **Uhlig, H. (1998).** *Industrial enzymes and their applications*; Wiley: New York.pp. 450.
- [130]. **Drago, S.R., Gonzalez, R.J. (2001).** Foaming properties of enzymatically hydrolysed wheat gluten. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1, 269-273.
- [131]. **Jung, S., Murphy, P.A., Johnson, L.A. (2005).** Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis. *Journal of Food Science* 70, C180-C187.
- [132]. **Kong, X., Zhou, H. & Qian, H. (2007).** Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry* 101, 615-620.
- [133]. **Guan, X., Yao, H., Chen, Z., Shan, L. & Zhang, M. (2007).** Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. *Food Chemistry* 101, 163-170.
- [134]. **Yalcin, E., Celik, S., Ibanoglu, E., (2008).** Foaming properties of barley protein isolates and hydrolysates. *European Food Research and Technology* 226, 967-974.
- [135]. **Paraman, I., Hettiarachchy, N.S., Schaefer, C., Beck, M.I., (2007).** Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of enzyme-modified rice endosperm protein. *Cereal Chemistry* 84, 343-349.
- [136]. **Zioudrou, C., Streaty, R.A., Klee, W.A. (1979).** Opioid peptides derived from food proteins - Exorphins. *Journal of Biological Chemistry* 254, 2446-2449.
- [137]. **Wang, J., Zhao, M., Zhao, Q., Jiang, Y. (2007).** Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different oxidation systems. *Food Chemistry* 101, 1658-1663.
- [138]. **Horiguchi, N., Horiguchi, H., Suzuki, Y. (2005).** Effect of wheat gluten hydrolysate on the immune system in healthy human subjects. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 69, 2445-2449.
- [139]. **Takahashi, M., Fukunaga, H., Kaneto, H., Fukudome, S., Yoshikawa, M. (2000).** Behavioural and pharmacological studies on gluten exorphin A5, a newly isolated bioactive food protein fragment, in mice. *Japanese Journal of Pharmacology* 84, 259-265
- [140]. **Fukudome, S., Yoshikawa, M. (1992).** Opioid peptides derived from wheat gluten - Their isolation and characterization. *FEBS Letters* 296, 107-111.

- [141]. **Fukudome, S., Yoshikawa, M. (1993).** Gluten exorphin-C - A novel opioid peptide derived from wheat gluten. *FEBS Letters* 316, 17-19.
- [142]. **Suetsuna, K., Chen, J.R. (2002).** Isolation and characterization of peptides with antioxidant activity derived from wheat gluten. *Food Science and Technology Research* 8, 227-230.
- [143]. **Kong, X.Z., Zhou, H.M., Hua, Y.F., Qian, H.F., (2008).** Preparation of wheat gluten hydrolysates with high opioid activity. *European Food Research and Technology* 227, 511-517.
- [144]. **Zhu, K.X., Zhou, H.M., Qian, H.F. (2006).** Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry* 41, 1296-1302.
- [145]. **Takahashi, M., Moriguchi, S., Yoshikawa, M., Sasaki, R. (1994).** Isolation and characterization of oryzatensin - A novel bioactive peptide with ileum-contracting and immunomodulating activities derived from rice albumin. *Biochemistry and Molecular Biology International* 33, 1151-1158.
- [146]. **Takahashi, M., Moriguchi, S., Ikeno, M., Kono, S., Ohata, K., Usui, H., Kurahashi, K., Sasaki, R., Yoshikawa, M. (1996).** Studies on the ileum-contracting mechanisms and identification as a complement C3a receptor agonist of oryzatensin, a bioactive peptide derived from rice albumin. *Peptides* 17, 5-12.
- [147]. **Zheng, X.Q., Li, L.T., Liu, X.L., Wang, X.J., Lin, J., Li, D. (2006).** Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 763-770.
- [148]. **Kong, B.H., Xiong, Y.L.L. (2006).** Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 6059-6068.
- [149]. **Motoi, H., Kodama, T. (2003).** Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from wheat gliadin hydrolysate. *Nahrung-Food* 47, 354-358.
- [150]. **Matsui, T., Li, C.H., Osajima, Y. (1999).** Preparation and characterization of novel bioactive peptides responsible for angiotensin I-converting enzyme inhibition from wheat germ. *Journal of Peptide Science* 5, 289-297.
- [151]. **Li, G.H., Qu, M.R., Wan, J.Z., You, J.M. (2007).** Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 16, 275-280.
- [152]. **Yang, Y., Tao, G., Liu, P., Liu, J. (2007).** Peptide with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from hydrolyzed corn gluten meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7891-7895.

- [153]. **Suh, H.J., Whang, J.H., Lee, H., (1999).** A peptide from corn gluten hydrolysate that is inhibitory toward angiotensin I converting enzyme. *Biotechnology Letters* 21, 1055-1058.
- [154]. **Miyoshi, S., Ishikawa, H., Kaneko, T., Fukui, F., Tanaka, H., Maruyama, S., (1991).** Structures and activity of angiotensin-converting enzyme-inhibitors in an alpha-zein hydrolysate. *Agricultural and Biological Chemistry* 55, 1313-1318.
- [155]. **Maruyama, S., Miyoshi, S., Kaneko, T., Tanaka, H., (1989).** Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of synthetic peptides related to the tandem repeated sequence of a maize endosperm protein. *Agricultural and Biological Chemistry* 53, 1077-1081.
- [156]. **Kamath, V., Niketh, S., Chandrashekar, A. & Rajini, P. S. (2007).** Chymotryptic hydrolysates of [alpha]-kafirin, the storage protein of sorghum (*Sorghum bicolor*) exhibited angiotensin converting enzyme inhibitory activity. *Food Chemistry* 100, 306-311
- [157]. **Hassan, A. B., Osman, G. A. & Babiker, E. E. (2007).** Effect of chymotrypsin digestion followed by polysaccharide conjugation or transglutaminase treatment on functional properties of millet proteins. *Food Chemistry* 102, 257-262.
- [158]. **AOAC. (1995).** *Official methods of analysis, 16th Edition*, Method 990.03. Edited by Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., U.S.A.
- [159]. **AACC (2000).** *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 10th Edition*, Edited by American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, U.S.A.
- [160]. **Mokrane, H., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N. & Nadjemi, B. (2006b).** Extraction of prolamins from sorghum (*Sorghum bicolor*) and effect on in vitro protein digestibility. In *Proceeding of International Congress on Biocatalysis*, Edited by Grote R. & Atranikian G. University of Technology of Hamburg, Hamburg, Germany, September 3 - 7, 2006, pp. 218.
- [161]. **Celus, I., Brijs, K. & Delcour, J. A. (2006).** The effects of malting and mashing on barley protein extractability. *Journal of Cereal Science* 44, 203-211.
- [162]. **Batey, I. L., Gupta, R. B. & Macritchie, F. (1991).** Use of size-exclusion high-performance liquid-chromatography in the study of wheat-flour proteins- an improved chromatographic procedure. *Cereal Chemistry* 68, 207-209.
- [163]. **SAS. (2001).** *Statistical Analysis System, Software Version 8.2*, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- [164]. **Mokrane, H., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N., Courtin, C. M., Delcour, J. A. & Nadjemi, B. (2010).** Assessment of Algerian sorghum protein quality [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using amino acid analysis and in vitro pepsin digestibility. *Food Chemistry* 121, 719-723.

- [165]. Hamaker, B. R., Mohamed, A. A., Habben, J. E., Huang, C. P. & Larkins, B. A. (1995). Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. *Cereal Chemistry* 72, 583-588.
- [166]. Izquierdo, L. & Godwin, I. (2005). Molecular characterization of a novel methionine-rich delta-kafirin seed storage protein gene in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Cereal chemistry* 82, 706-710.
- [167]. Hadimani, N. A., Muralikrishna, G., Tharanathan, R. N. & Malleshi, N. G. (2001). Nature of carbohydrates and proteins in three pearl millet varieties varying in processing characteristics and kernel texture. *Journal of Cereal Science* 33, 17-25.
- [168]. Mokrane, H., Lagrain, B., Gebruers, K., Courtin, C. M., Brijs, K., Proost, P. & Delcour, J. A. (2009a). Characterization of kafirins in Algerian sorghum cultivars. *Cereal Chemistry* 86, 487-491.
- [169]. Mokrane, H., Brijs, K., Belhaneche-Bensemra, N., Courtin, C. M., Nadjemi, B. & Delcour, J. A. (2008a). Extractability and characterization of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) proteins from Algerian cultivars. In *Proceeding of AACC International*, Edited by AACC. Honolulu, Hawaii, U.S.A, September, 21-24, 2008, *Cereal Foods World*. pp. A70.
- [170]. Boudries, N., Belhaneche, N., Nadjemi, B., Deroanne, C., Mathlouthi, M., Roger, B. & Sindic, M. (2009). Physicochemical and functional properties of starches from sorghum cultivated in the Sahara of Algeria. *Carbohydrate Polymers* 78, 475-480.
- [171]. Yousif, N. E. & El Tinay, A. H. (2001). Effect of fermentation on sorghum protein fractions and in vitro protein digestibility. *Plant Foods for Human Nutrition* 56, 175-182.
- [172]. Zarkadas, C. G., Voldeng, H. D., Yu, Z. R. & Choi, V. K. (1997). Determination of the protein quality of three new northern adapted cultivars of common and miso type soybeans by amino acid analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1161-1168.
- [173]. Tang, C.-H., Chen, L. & Ma, C.-Y. (2009). Thermal aggregation, amino acid composition and in vitro digestibility of vicilin-rich protein isolates from three Phaseolus legumes: A comparative study. *Food Chemistry* 113, 957-963.
- [174]. Schaafsma, G. (2000). The protein digestibility-corrected amino acid score. *Journal of Nutrition*, 130, 1865S- 1867S.
- [175]. AAA-Diect. (2005). Dionex Amino Analyser and aminoPac PA10.
- [176]. Rombouts, I., Lamberts, L., Celus, I., Lagrain, B., Brijs, K. & Delcour, J. A. (2009). Wheat gluten amino acid composition analysis by high-performance anion-exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A* 1216, 5557-5562

- [177]. **Lamberts, L., Rombouts, I. & Delcour, J. A. (2008).** Study of nonenzymic browning in [alpha]-amino acid and [gamma]-aminobutyric acid/sugar model systems. *Food Chemistry* 111, 738-744.
- [178]. **Kent, N. L. & Evers, A. D. (1994).** *Technology of cereals: An introduction for students of food science and agriculture, Fourth edition.* Edited by Pergamon/Elsevier Science Ltd., Kidlington, Oxford, U.K., 352 pp.
- [179]. **Knudsen, K. B., Kirleis, A.W., Eggom, B.O. & Munck, L. (1988).** Carbohydrate composition and nutritional quality for rats of sorghum to prepared from decorticated white and whole grain red flour. *Journal of Nutrition*, 118, 588-597.
- [180]. **Ebadi, M.R., Pourreza, J., Jamalian, J., Edriss, M.A., Samie, A.H. & Mirhadi, S.A. (2005).** Amino acid content and availability in low, medium and high tannin sorghum grain for poultry. *International Journal of Poultry Science* 4, 27-31.
- [181]. **Kalinova, J. & Moudry, J. (2006).** Content and quality of protein in proso millet (*Panicum miliaceum* L.) varieties. *Plant Foods for Human Nutrition* 61, 45-49.
- [182]. **Mokrane, H., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N. & Nadjemi, B. (2006a).** Valorization and recovery of proteins from Algerian varieties of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) by enzymatic hydrolysis. In *Proceeding of Symposium Environmental Biocatalysis: From remediation with enzymes to novel green processes, EnvBC2006*, Edited by Lopez-Cortes, N. et al., Cordoba, Spain. April 23-26, 2006, pp. P10 (Poster).
- [183]. **Mokrane, H., Billel, H., Abdeli, N., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N. & Nadjemi, B. (2005).** Valorisation des protéines de sorgho par hydrolyse enzymatique. In *Proceeding of 1er colloque Euro-méditerranéen en biologie végétale et environnement*. Edited by Université Badji Mokhtar Annaba, Algeria, November 28-30 2005. pp.300
- [184]. **Frederix, S. A., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2004).** Substrate selectivity and inhibitor sensitivity affect xylanase functionality in wheat flour gluten-starch separation. *Journal of Cereal Science* 40, 41-49.
- [185]. **Fierens, K., Geudens, N., Brijs, K., Courtin, C. M., Gebruers, K., Robben, J., Van Campenhout, S., Volckaert, G. & Delcour, J. A. (2004).** High-level expression, purification, and characterization of recombinant wheat xylanase inhibitor TAXI-I secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 37, 39-46.
- [186]. **Raedschelders, G., Debefve, C., Goesart, H., Delcour, J. A., Volckaert, G. & Van Campenhout, S. (2004).** Molecular identification and chromosomal localization of genes encoding *Triticum aestivum* xylanase inhibitor I-like proteins in cereals. *Theoretical and Applied Genetics* 109, 112-121.
- [187]. **Raedschelders, G., Fierens, K., Sansen, S., Rombouts, S., Gebruers, K., Robben, J., Rabijns, A., Courtin, C. M., Delcour, J. A., Van Campenhout, S. & Volckaert, G. (2005).** Molecular identification of wheat endoxylanase inhibitor TAXI-II and the determinants of its inhibition specificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 335, 512-522.

- [188]. **Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- [189]. **Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. & Bairoch, A. (2005).** Protein identification and analysis tools on the ExPASy Server. In *The proteomics protocols handbook*. Edited by Walker, J.M., Humana press, Totowe, New Jersey, U.S.A., pp. 571-607.
- [190]. **Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- [191]. **Nielsen, H. & Krogh, A. (1998).** Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. In *Proceedings Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, Edited by Glasgow, J., Littlejohn, T., Major, F., Lathrop, R., Sankoff D. & Sensen, C., AAAI Press, Menlo Park, CA, U.S.A, pp. 122-130.
- [192]. **Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T. & Nakai, K. (2006).** Protein subcellular localization prediction with WOLF PSORT. In *Proceedings of the 4th Asia-Pacific Bioinformatics Conference*, Taipei, Taiwan, pp. 39-48.
- [193]. **Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. & Brunak, S. (2004).** Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 4, 1633-1649.
- [194]. **Julenius, K., Molgaard, A., Gupta, R. & Brunak, S. (2005).** Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15, 153-164.
- [195]. **Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- [196]. **Juge, N., Payan, F. & Williamson, G. (2004).** XIP-I, a xylanase inhibitor protein from wheat: a novel protein function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics Plant proteinaceous inhibitors of glycosidases* 1696, 203-211.
- [197]. **Velazhahan, R., Jayaraj, J., Jeoung, J. M., Liang, G. H. & Muthukrishnan, S. (2002).** Purification and characterization of an antifungal thaumatin-like protein from sorghum (*Sorghum bicolor*) leaves. *Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection* 109, 452-461.
- [198]. **Vigers, A. J., Roberts, W. K. & Selitrennikoff, C. P. (1991).** A new family of plant antifungal proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4, 315-323.

- [199]. Gebruers, K., Mokrane, H., Nadjemi, B., Beaugrand, J., Fierens, K., Proost, P., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2008). Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) contains a XIP-type xylanase inhibitor but none of the TAXI- and TLXI-types. *Journal of Cereal Science* 48, 203-212.
- [200]. Croes, E., Gebruers, K., Robben, J., Noben, J.-P., Samyn, B., Debyser, G., Beeumen, J. V., Delcour, J. A. & Courtin, C. M. (2008). Variability of polymorphic families of three types of xylanase inhibitors in the wheat grain proteome. *Proteomics* 8, 1692-1705.
- [201]. Elliott, G. O., Hughes, R. K., Juge, N., Kroon, P. A. & Williamson, G. (2002). Functional identification of the cDNA coding for a wheat endo-1,4-[beta]-xylanase inhibitor. *FEBS Letters* 519, 66-70.
- [202]. Goesaert, H., Gebruers, K., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2005). Purification and characterization of a XIP-type endoxylanase inhibitor from rice (*Oryza sativa*). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 20, 95-101.
- [203]. Takahashi-Ando, N., Inaba, M., Ohsato, S., Igawa, T., Usami, R. & Kimura, M. (2007). Identification of multiple highly similar XIP-type xylanase inhibitor genes in hexaploid wheat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360, 880-884.
- [204]. Mokrane, H., Gebruers, K., Beaugrand, J., Proost, P., Nadjemi, B., Belhaneche-Bensemra, N., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2009). Algerian pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) contains XIP but not TAXI and TLXI type xylanase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 5542-5548.
- [205]. Mokrane, H., Gebruers, K., Nadjemi, B., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2008). Variability, purification and characterization of endoxylanase inhibitors in Algerian sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) cultivars. In *Proceeding of 4th International Congress on Biocatalysis*, Edited by Grote R. & Atranikian G. University of Technology of Hamburg, Hamburg, Germany, August 31- September 4, 2008, pp. 314.
- [206]. Morrison, J. F. (1982). The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions. *Trends in Biochemical Sciences* 7, 102-105.
- [207]. Juge, N. (2006). Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science* 11, 359-367.
- [208]. Juge, N. & Svensson, B. (2006). Review proteinaceous inhibitors of carbohydrate active enzymes in cereals: implication in agriculture, cereal processing and nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 1573-1586.

# Liste des publications

## PUBLICATIONS INTERNATIONALES

1. Mokrane, H., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N., Courtin, C. M., Delcour, J. A. & Nadjemi, B. (2010). Assessment of Algerian sorghum protein quality [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] using amino acid analysis and in-vitro pepsin digestibility. *Food Chemistry* **121**, 719-723.
2. Mokrane, H., Lagrain, B., Gebruers, K., Courtin, C. M., Brijs, K., Proost, P. & Delcour, J. A. (2009). Characterization of kafirins in Algerian sorghum cultivars. *Cereal Chemistry* **86**, 487-491.
3. Mokrane, H., Gebruers, K., Beaugrand, J., Proost, P., Nadjemi, B., Belhaneche-Bensemra, N., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2009). Algerian pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) contains XIP but not TAXI and TLXI type xylanase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 5542-5548.
4. Gebruers, K., Mokrane, H., Nadjemi, B., Beaugrand, J., Fierens, K., Proost, P., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2008). Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) contains a XIP-type xylanase inhibitor but none of the TAXI- and TLXI-types. *Journal of Cereal Science* **48**, 203-212.

## COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

1. Mokrane, H., Amoura, H., Nadjemi, B., Belhaneche-Bensemra, N., Lagrain, B., Gebruers, K., Courtin, C. M., Brijs, K., Proost, P. & Delcour, J. A. (2009). Characterization of kafirins in Algerian sorghum cultivars. In *Proceeding of Congrès international sur la santé et l'agroalimentaire*. (Université des sciences et technologies Houari Boumediene (USTHB) ed), pp. 170, USTHB, Algiers, Algeria, (December 2-3, 2009, Présentation orale).
2. Mokrane, H., Brijs, K., Belhaneche-Bensemra, N., Courtin, C. M., Nadjemi, B. & Delcour, J. A. (2008). Extractability and characterization of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) proteins from Algerian cultivars. In *Proceeding of AACC International*, (AACC ed.), *Cereal Foods World*, pp. A70, Honolulu, Hawaii, U.S.A, (September, 21-24, 2008, Poster).
3. Mokrane, H., Gebruers, K., Nadjemi, B., Courtin, C. M. & Delcour, J. A. (2008). Variability, purification and characterization of endoxylanase inhibitors in Algerian sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) cultivars. In *Proceeding of 4th International Congress on Biocatalysis*, (Grote R. & Atranikian G. eds.), pp.314, University of Technology of Hamburg, Hamburg, Germany, (August 31-September 4, 2008, Poster).
4. Mokrane, H., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N. & Nadjemi, B. (2006). Extraction of prolamins from sorghum (*Sorghum bicolor*) and effect on in vitro protein digestibility. In *Proceeding of International Congress on Biocatalysis*, (Grote R. & Atranikian G. eds.), pp. 218, University of Technology of Hamburg, Hamburg, Germany, (September 3 - 7, 2006, Poster).
5. Mokrane, H., Gebruers, K., Courtin, C. M., Nadjemi, B. & Delcour, J. A. (2006). Levels and nature of endoxylanases in 11 Algerian varieties of sorghum and pearl millet. In *Proceeding of International*

- 
- Congress on Biocatalysis*, (Grote R. & Atranikian G. eds.), pp. 219, University of Technology of Hamburg, Hamburg, Germany, (September 3 - 7, 2006, Poster).
6. **Mokrane, H., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N. & Nadjemi, B. (2006).** Valorization and recovery of proteins from Algerian varieties of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) by enzymatic hydrolysis. In *Proceeding of Symposium Environmental Biocatalysis: From remediation with enzymes to novel green processes*, EnvBC2006, (Lopez-Cortes, N., Alcade, M., Ferrer, M., Rojas-Cervantes, M.L., Plou, F.J. & Ballestros, A. eds.), pp. P10, Cordoba, Spain, (April 23-26, 2006, Poster).
  7. **Djabali, D., Boudries, N., Lemgharbi, M., Mokrane, H., Nadjemi, B. & Belhaneche-Bensemra, N. (2005).** Les céréales locales du sorgho et du mil. In *Proceeding of séminaire international sur l'amélioration des productions végétales (APV 2005)*, (Institut nationale agronomique (INA).ed.), pp.150, Algiers, Algeria, (December 5-7, 2005, Présentation orale).
  8. **Mokrane, H., Billel, H., Abdeli, N., Amoura, H., Belhaneche-Bensemra, N. & Nadjemi, B. (2005).** Valorisation des protéines de sorgho par hydrolyse enzymatique. In *Proceeding of 1er colloque Euro-méditerranéen en biologie végétale et environnement*. (Université Badji Mokhtar Annaba, ed.), pp.300, Annaba, Algeria, (November 28-30, 2005, Poster).
  9. **Mokrane, H., Boudries, N., Djabali, D., Yousfi, M., Belhaneche-Bensemra, N. & Nadjemi, B. (2005).** Extraction et caractérisation des protéines de plusieurs variétés de céréales Algériennes. In *Proceeding of Xème Congrès de la Société Française de Génie des Procédés*, (Société française de génie des procédés ed.), pp. 325, Toulouse, France, (September 20-22, 2005, Poster).
  10. **Mokrane, H. & Nadjemi, B. (2004).** Recovery of protein from Algerian varieties of sorghum and pearl millet by enzymatic hydrolysis in a continuous membrane bioreactor. In *Proceeding of 6th Network Young Membrains*, (Peinneman, V., ed.), pp. 162-163, Hamburg Germany, (September 22-24 2004, Présentation orale).