

**UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I**

\*\*\*\*\*

**ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE**

\*\*\*\*\*

**DEPARTEMENT DES SCIENCES**

**BIOLOGIQUES**

\*\*\*\*\*

**THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I**

\*\*\*\*\*

**HIGHER TEACHER S' TRAINING**

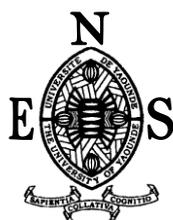
**COLLEGE**

\*\*\*\*\*

**DEPARTMENT OF BIOLOGICAL**

**SCIENCE**

\*\*\*\*\*



**VARIABILITE CLONALE DE LA TENEUR EN  
POLYPHENOLS CHEZ LE CACAOYER (*Theobroma  
cacao* L.) : Cas des clones TIKO31, TIKO32, SNK416,  
SNK608 et SNK467**

Mémoire présenté et soutenu en vue de l'obtention du Diplôme de Professeur de  
l'Enseignement Secondaire, 2<sup>e</sup> Grade (DI.P.E.S II)

Par

**OMONO OMOKO Diane**

**Mle : 11Y112**

*Licencié ès-science*

*Option : Biologie végétale*

*DI.P.E.S I*

Devant

Le jury

Président : **NKENFOU Céline**, *Maitre des Conférences*

Rapporteur : **NIEMENAK Nicolas**, *Maitre des Conférences*

Examineur : **NGO LEMBA TOM Esther**, *Chargé de cours*

Année académique 2015-2016

## **DEDICACE**

Je dédie ce travail à :

Mes chers parents, René et Justine OMOKO

## REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail n'a été possible que grâce au soutien indéfectible de nombreuses personnes que j'ai l'honneur de remercier ici. Je pense notamment :

Au Professeur Gabriel ANDJIGA, Directeur de l'Ecole Normale Supérieure de Yaoundé (ENS) pour tout ce qu'il a mis sur pied pour favoriser une bonne formation au sein de son Etablissement.

Au Professeur Bonaventure SONKE, Chef de Département des Sciences Biologiques, pour le confort académique qu'il nous a assuré durant notre formation.

Au Professeur Dénis OMOKOLO, pour m'avoir ouvert les portes du Laboratoire de Physiologie et Biochimie Végétale.

Au Professeur Nicolas NIEMENAK, pour m'avoir orienté dans le choix de mon thème, pour ses qualités d'enseignant et sa disponibilité ;

A Tous les Enseignants du Département des Sciences Biologiques de l'ENS pour leur professionnalisme;

A mes frères et sœurs, ma belle-sœur Mme EYAMO Delphine Lablonde pour leur soutien, leur réconfort et leurs encouragements ;

A mon fiancé CHOKOGOUE MONGA Guy pour son soutien ;

A feu Mme SAMBANG Angèle, que là où tu te trouves tu vois en ce travail l'aboutissement d'un projet dont tu as été l'initiatrice ;

A M. EYAMO Jos et Mme GODOM Annie, qui ont assuré l'encadrement technique de ce travail.

A tous mes aînés du Laboratoire de Biologie et Physiologie Animales de l'ENS particulièrement : M. BOUTCHOUANG Rodrigue, Mme DJABOU Astrid et Mme AKITIO Olive pour leurs conseils ;

A mes amis Mme KIPOH Mireille, M. MBOUDOU Vincent et Mme MIMBOE ENAMA Thérèse pour tout leur réconfort et encouragement ;

A tous mes camarades de promotion et amis, MBANG MANI Ines, N'TOUMA NYAMSY Ingrid, KENFACK MAFONOU Estelle, PIEUME Serge, KANA Roméo, MILAWE Ange, NYANGONO Marcelle et KETCHIEMO Franklin pour leur fraternité et leur soutien constant à mon égard ;

A tous ceux qui, de près ou de loin m'ont apporté leur soutien afin qu'ils voient à travers cette œuvre la reconnaissance des actes posés par eux, l'expression de ma profonde gratitude.

# TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS .....	ii
TABLE DES MATIERES .....	iii
RESUME.....	iv
ABSTRACT .....	vi
ABREVIATIONS .....	vii
LISTE DES FIGURES .....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE.....	3
I.1. Le Cacaoyer .....	4
I.1.1. Historique et répartition géographique.....	4
I.1.2. Biologie.....	5
I.1.3- Ecologie du cacaoyer .....	7
I.1.4 –Taxonomie du cacaoyer .....	8
I.1.5. Contraintes de la cacaoculture .....	10
I.1.6. Récolte et traitement post récolte du cacao.....	12
I.1.7. Importances du Cacao .....	14
I.2. Généralités sur les antioxydants.....	15
I.2.1. Radicaux libres et stress oxydatif.....	16
I.2.2. Les défenses antioxydantes .....	16
I.2.3. Les polyphénols .....	17
I.2.4. Détermination de l'activité antioxydante .....	19
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	22
II.1. Cadre de travail.....	23
II.2. Matériel végétal .....	23
II.3. Préparation du matériel.....	23
II.4. Analyses physico-chimiques.....	23
II.4.1. Mesure de la masse des fèves .....	23
II.4.2. Cut-Test .....	23
II.4.3. Détermination du pH .....	24
II.4.4. Incubation de la poudre de cacao à l'acétone .....	26

II.4.5. Indice de fermentation .....	26
II.5. Analyses Biochimiques .....	28
II.5.1. Délipidation .....	28
II.5.2. Extraction des Polyphénols totaux.....	29
II.5.3. Dosage des polyphénols totaux.....	30
II.5.4. Dosage des flavonoïdes totaux .....	31
II.5.5. Dosage des flavan-3-ols.....	31
II.5.6. Mesure de l'activité antioxydante des extraits phénoliques : effet piègeur du radical ABTS <sup>+</sup> .....	31
II.6. Analyses Statistiques .....	32
CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION .....	33
III.1. Résultats .....	34
III.1.1. Caractéristiques physico-chimiques .....	34
III.1.2. Caractéristiques biochimiques.....	36
III.2. Discussion .....	40
CHAPITRE IV : IMPLICATION SUR LE SYSTEME EDUCATIF .....	43
CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	50
REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES.....	52
ANNEXES .....	53

## RESUME

Les clones TIKO et SNK ont été comparés à travers l'évaluation des caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des fèves non fermentées. Les masses significativement élevées chez les TIKO, sont dans l'ensemble conformes aux normes exigées sur le marché international. Les pH ( $> 6$ ) correspondent à ceux des fèves non fermentées. Les indices de fermentation, très faibles dans les deux groupes, témoignent de l'abondance de nos fèves en anthocyanines en particulier et en flavonoïdes en général; les ratios flavonoïdes totaux/polyphénols totaux ( $> 50\%$ ) sont indicateurs de cette abondance. Toutefois, il existe une différence significative entre les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des clones TIKO et celles des clones SNK. Les capacités antioxydantes sont révélatrices de la richesse de nos échantillons en flavan-3-ols. Ainsi les résultats de ce travail nous permettent de conclure qu'au-delà des différences morphologiques il existe aussi des différences physico-chimiques et biochimiques entre les clones TIKO et SNK.

**Mots clés :** *Theobroma cacao* L, polyphénols totaux, Flavonoïdes, flavan-3-ols, capacité antioxydante.

## ABSTRACT

The unfermented cocoa beans of TIKO and SNK clones were compared based on physico-chemical and biochemical characteristics. The weights recorded are in accordance with the standards required by international cocoa market, nevertheless TIKO showed highest. The pH (> 6) corresponds to those of unfermented beans. Fermentation index, very low, testify to the abundance of anthocyanins and flavonoids; the total flavonoids / total polyphenols ratios, superior to 50% are well-indicator of this abundance. However there is a significant difference, in the total polyphenols and flavonoids contents between TIKO and SNK clones. Moreover, the values are in accordance of the higher flavan-3-ols found. This results allow us to conclude that beyond the morphological differences it also exist some physico-chemical and biochemical differences between TIKO and SNK clones.

Keys words: *Theobroma cacao* L, total polyphenols, Flavonoids, flavan-3-ols, antioxydant capacities.

## ABREVIATIONS

ABTS	2,2 azinobis (acide 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)
DPPH	N,N-diphenyl-N'-picrylhydrazyl
EAG	Etalon acide gallique
FRAP	Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter
FT	Flavonoïdes totaux
GPO	Glutathion Peroxydase
ICCO	« International Cacao Organization »
IRAD	Institut de Recherche Agricole pour le Développement
PCD	Poudre de cacao délipidée
PPT	Polyphénols totaux
SNK	Selection de NKOEMVONE
SOD	Superoxyde Dismutase
TEAC	« Trolox equivalent antioxidant capacity »
TRAP	« Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter »

## LISTE DES FIGURES

	<b>Pages</b>
Figure 1 : Répartition des zones de production et principaux pays producteurs de cacao .....	5
Figure 2: Plant de cacaoyer Trinitario (SNK 416) .....	6
Figure 3 : Coussinet floral sur un tronc de cacaoyer .....	7
Figure 4 : Cabosse de cacaoyer trinitario : A- fermée, B- ouverte .....	7
Figure 5 : Cabosse de trinitario .....	10
Figure 6 : a- feuille attaquée par le « Balai de sorcière » ; b- Coussinet floral attaqué par le « Balai de sorcière » ; c- Cabosse attaquée par le « Balai de sorcière » ; d- Cabosse attaquée par la moniliose .....	11
Figure 7: Produits chocolatés .....	15
Figure 8 : Mécanisme d'action des radicaux libres .....	16
Figure 9: Structure de base des flavonoïdes .....	19
Figure 10 : Protocole de détermination du pH. ....	25
Figure 11 : Protocole de détermination de l'index de fermentation.....	27
Figure 12 : Protocole de délipidation de la poudre de cacao .....	28
Figure 13: Protocole d'extraction des phénols totaux .....	29
Figure 14 : Droite d'étalonnage des polyphénols.....	30
Figure 15 : Droite d'étalonnage de l'ABTS .....	32
Figure 16 : Différentes couleurs obtenues à l'issue du cut-test : A- Fève blanche (SNK608), B- fève ardoisée (TIKO31 et 32), C- fève violette/ardoisée (SNK416 et 467).....	34
Figure 17: Coloration obtenue après incubation à l'acétone : A- SNK467 ; B- SNK608 ; C- SNK416 ; D- TIKO32 ; E- TIKO31.....	35
Figure 18 : Indice de fermentation des différents génotypes .....	36
Figure 19 : Teneurs en polyphénols totaux en mg d'EAG/g de pcd. ....	37
Figure 20 : Teneurs en flavan3-ols en mg (+)-catéchine/g de pcd. ....	38
Figure 21 : Capacité antioxydante des extraits phénoliques de la poudre de cacao délipidée en mM de trolox/g de pcd. ....	39

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Production mondiale de cacao.....	14
Tableau 2: Les principales classes de composés phénoliques.....	18
Tableau 3 : Masses moyennes des fèves de clone et géotype différents.....	34
Tableau 4 : pH de la poudre de cacao .....	35
Tableau 5 : Teneurs en flavonoïdes totaux et ratio FT/PPT.....	38

## INTRODUCTION

*Theobroma cacao* L. (*Malvaceae*) est une plante pérenne originaire d'Amérique Centrale (Cheesman 1944). Introduite en Afrique au 18<sup>e</sup> siècle, elle arrive au Cameroun en 1892 (Assoumou 1977). Au cours des années 1960, de nouvelles variétés de cacao sont introduites au Cameroun enrichissant ainsi la cacaoculture et boostant simultanément la productivité. Fort de cela, dans les années 1970 le Cameroun a présenté une productivité supérieure à celle de la Côte d'Ivoire (Assoumou 1977).

En effet, le cacao fait partie intégrante de l'économie du Cameroun. C'est l'une des principales cultures de rente et la vente de cette dernière représente 75% des revenus en plantation. Ainsi avec une productivité de 230 000 tonnes en 2015, le Cameroun est le 5<sup>e</sup> pays producteur de cacao dans le monde (ICCO 2016). Cultivé essentiellement pour ses fèves destinées à l'industrie du chocolat, le cacao est également prisé pour sa richesse en composés phénoliques. Ces derniers contribuent activement à la qualité organoleptique du chocolat. En effet, les composés phénoliques font partie des composés majoritaires des fèves fraîches de cacao et représentent 12-18% de leur poids sec (Wollgast & Anklam 2000a). Les polyphénols sont des métabolites secondaires largement distribués chez les végétaux (Sharma & Bhat 2009). Ils suscitent depuis une dizaine d'années un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs du fait de leurs propriétés antioxydantes et de leur implication probable dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydatif. Les flavonoïdes responsables de ces propriétés sont : les flavan-3-ols dont les plus connus sont la (+)-catéchine et l'(-)-épicatéchine et leurs oligomères. Leur teneur dans les fèves de cacao est dépendante de nombreux facteurs dont : la variété, l'origine géographique, le degré de maturité (saison de récolte) et le traitement post-récolte (fermentation, séchage, torréfaction) (Wollgast & Anklam 2000b).

La collection camerounaise est très diversifiée et comprend plus 80 clones de cacaoyer (Blaha & Lotode 1976) qui se distinguent par leurs traits morphologiques et leur résistance aux maladies. Cependant des questions demeurent quant à la variabilité de leurs teneurs en composés bioactifs. Ainsi Niemenak *et al.* (2006) ont réalisé une étude comparative de la teneur en polyphénols et en anthocyanines de quelques clones de cacao avec des résultats intéressants. Cependant, certains clones tels que les TIKO (trinitario locaux) n'ont pas été étudiés.

Aussi, l'objectif général de ce travail est de déterminer si les différences observées chez les clones de cacaoyer sur le plan morphologique s'étendent aussi sur les caractéristiques physico-chimiques et biochimiques.

Il s'agit spécifiquement d' :

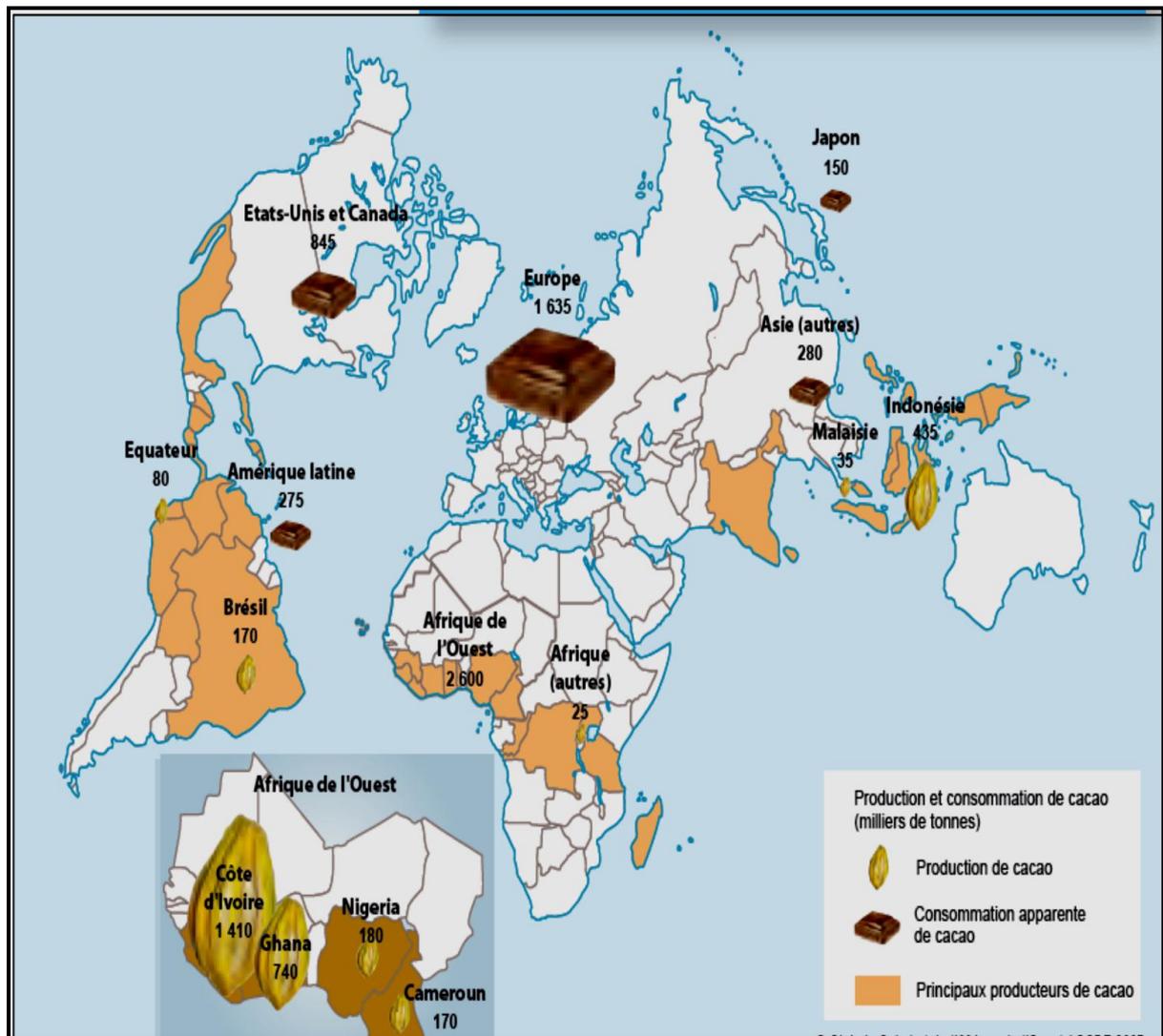
- évaluer les caractéristiques physico-chimiques des fèves : poids, Couleur, pH et l'indice de fermentation ;
- évaluer les teneurs en polyphénols totaux, flavonoïdes et flavan-3-ols ;
- évaluer la capacité antioxydante des composés phénoliques du cacao.

## **CHAPITRE I: REVUE DE LA LITTERATURE**

## **I.1. Le Cacaoyer**

### **I.1.1. Historique et répartition géographique**

Le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) est originaire des forêts tropicales d'Amérique Centrale (cheesman 1944). L'utilisation des fèves de cacao remonte au moins à 1400 ans avant J.-C. (Rössner 1997). Les Aztèques et les Incas utilisaient ces fèves comme monnaie pour le commerce ou pour produire le «xocolalt», une boisson faite à partir de la torréfaction et du broyage des fèves de cacao donnant lieu à une purée qui était ensuite mélangée avec de l'eau à laquelle était souvent ajoutée d'autres ingrédients tels que la vanille, des épices ou du miel (Afoakwa 2010). L'intérêt pour le cacao prend véritablement son envol lorsque les espagnols apprécèrent pour la première fois le goût du mélange «xocolalt» et sucre. Ce fut le point de départ de l'extension de la culture du cacaoyer dans la plupart des régions tropicales du monde. Il est introduit en Afrique plus précisément en Afrique de l'Ouest à partir du Ghana au 18<sup>e</sup> siècle (Bradeau 1969) et au Cameroun en 1892 (Eske & Lanaud 1997). Dans ce dernier la culture du cacaoyer couvre 3 zones agro écologiques soit sept régions (Sud, Centre, Est, Ouest, Nord-ouest, Sud-ouest, Littoral) (Assoumou 1977) (Figure 1).



**Figure 1 :** Répartition des zones de production et principaux pays producteurs de cacao (ICCO 2007)

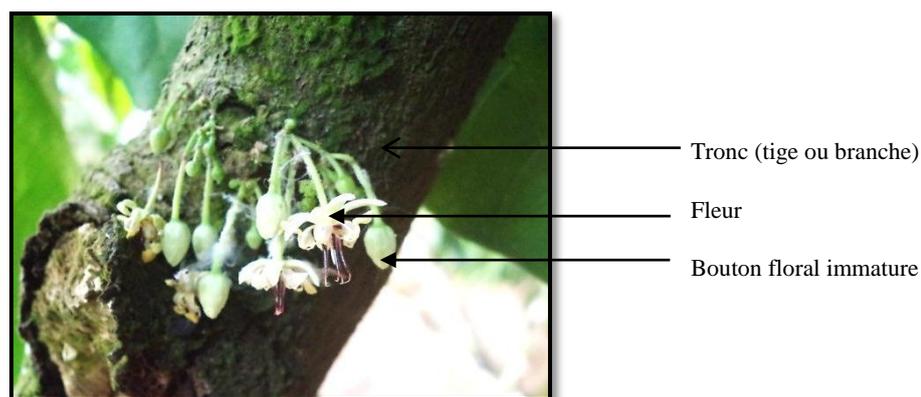
### I.1.2. Biologie

Le cacaoyer est une plante pérenne ne dépassant pas 7 m en plantation (Lachenaud *et al.* 2007) (Figure 2). Il s'agit d'un arbuste dont la tige se développe d'abord en un axe vertical puis il se forme un verticille de cinq rameaux à développement plagiotrope à partir d'environ 18 mois après semis. Les feuilles juvéniles du cacaoyer sont molles et tendres avec une coloration variant du vert très clair à diverses tonalités de rouge selon le génotype et la quantité d'anthocyanes qu'elles contiennent, cependant elles deviennent vertes à l'état adulte (Vera 1987). Leur limbe penninervé est de forme elliptique.



**Figure 2:** Plant de cacaoyer Trinitario (SNK 416) (Photo prise par Omono le 06/11/2015, NKOEMVONE).

Le cacaoyer est une espèce diploïde ( $2n= 20$ ) (Lanaud *et al.* 1992) et essentiellement allogame. La floraison s'effectue par périodes successives qui dépendent des conditions environnementales et de l'état physiologique de la plante. Le cacaoyer est un arbre cauliflore : les inflorescences apparaissent sur des coussinets floraux qui sont des renflements du tronc ou des branches (Swanson *et al.* 2008). Un coussinet peut porter de très nombreuses fleurs en même temps ce qui se caractérise par des inflorescences à cymes bipares et des ramifications très courtes. Les fleurs de petite taille sont hermaphrodites (Mossu 1990), régulières et pentamères formées de cinq sépales, cinq pétales et cinq étamines alternant avec cinq staminodes stériles (Figure 3). Ces fleurs produisent des pollens dont la durée de vie n'excède pas 48 heures (Paulin 1994). Le cacaoyer produit en moyenne 50 000 fleurs par an mais celles-ci ne sont pas toutes pollinisées. La pollinisation est essentiellement entomophile (Paulin & Eskes 1995).



**Figure 3 :** Coussinet floral sur un tronc de cacaoyer (Photo prise par Omono le 22/04/2016, Yaounde).

Le fruit est une baie indéhiscente généralement fusiforme appelé cherelle lorsqu'il est jeune et cabosse à l'âge adulte. La cabosse mesure en moyenne 15 à 20 cm de long et 10 à 15 cm de large pour une masse moyenne comprise entre 400 et 500 g. Elle comprend une seule cavité dans laquelle les graines ou fèves enveloppées d'une pulpe mucilagineuse sont disposées en 5 rangées longitudinales (Figure 4). On dénombre 30 à 60 graines par cabosse (Eskes & Lanaud 1997, Santos *et al.* 2012). Les cacaoyers cultivés produisent en moyenne quatre-vingts cabosses par an. Il faut environ 5 à 7 mois pour qu'elles soient mûres (Lachenaud 1991) et leur couleur varie en fonction des variétés et du degré de maturité.



**Figure 4 :** Cabosse de cacaoyer trinitario : A- fermée, B- ouverte (Photo prise par Omono le 06/11/2015, NKOEMVONE).

Le système racinaire est composé d'une racine principale ou pivot dans sa partie supérieure et d'un réseau de racines latérales (Eskes & Lanaud 1997).

### I.1.3- Ecologie du cacaoyer

Le cacaoyer est une plante de sous-bois qui occupe dans son habitat naturel les étages inférieurs des forêts humides d'Amérique tropical, entre le 18° de latitude Nord et le 15° de latitude Sud (Demol 2002) ; à des altitudes allant du niveau de la mer jusqu'à 1250 m et dont l'optimum de température se situe à une moyenne de 25°C (Mossu 1992). Le cacaoyer est très

sensible au déficit hydrique (Cilas & Després 2004), aussi une pluviosité de 1250 à 3000 mm par an, idéalement située entre 1500 et 2000 mm et qui ne descend pas en dessous de 1000 mm par mois est la plus favorable (Wright 1999). Selon Braudeau (1969), le cacaoyer demande une humidité relative moyenne annuelle comprise entre 70 et 100% ainsi qu'un couvert végétal le protégeant de l'insolation directe et de l'évaporation.

La connaissance des caractéristiques physico- chimiques d'un sol est nécessaire pour déterminer son aptitude à la culture du cacaoyer. Ainsi les sols favorables à la culture du cacaoyer doivent être : aérés, bien drainés, à structure homogène. Aussi le cacaoyer préfère un sol riche en matières organiques avec un pH légèrement acide (Cilas & Després 2004).

## **I.1.4 –Taxonomie du cacaoyer**

### **I.1.4.1-Position systématique**

Selon Whistlock *et al.* (2001) le cacaoyer obéit à la classification suivante :

- Règne : Végétal
- Embranchement : Angiosperme
- Sous-embranchement : Magnoliophyta
- Classe : Dicotylédones
- Sous-classe : Dilleniidae
- Ordre : Malvales
- Famille : Malvaceae
- Genre : *Theobroma*
- Espèce : *Theobroma cacao*

### **I.1.4.2. Variétés de cacaoyer**

Le genre *Theobroma* comprend 22 espèces dont *Theobroma cacao* L. est l'espèce la plus cultivée (Eskes & Lanaud 1997). Traditionnellement, le cacao est réparti en deux principaux groupes : Criollo et Forastero définis sur la base des traits morphologiques et de l'origine géographique ainsi qu'un groupe hybride issu des deux premiers appelé Trinitario (Motamayor *et al.* 2008). Deux autres cultivars traditionnels ont été décrits : le Nacional et l'Amelonado (Motamayor *et al.* 2003).

#### **I.1.4.2.1. Criollo**

Le Criollo (créole en espagnol) cultivé à l'origine en Amérique centrale, au Mexique et au Venezuela représente la variété de cacaoyer la plus anciennement exploitée. Il se démarque par la saveur de son cacao. Il s'agit en effet d'un cacao très apprécié par les chocolatiers à cause de son goût très peu amer, son arôme fort et sa finesse gustative. Cependant les criollo manquent de vigueur et sont très sensibles aux maladies ce qui justifie leur faible productivité (5% de la production mondiale).

Les Criollo présentent des cabosses de couleur rouge ou verte avant maturité. Elles sont généralement allongées et marquées de sillons profonds; leur péricarpe est verruqueux et mince, le mésocarpe est mince et peu lignifié.

#### **I.1.4.2.2. Forastero**

Le Forastero (signifiant étranger en espagnol) est originaire de la haute Amazonie (Dias *et al* 2003) ; on en trouve en Amérique du Sud et également en Afrique de l'Ouest notamment en Côte d'Ivoire, au Ghana, au Cameroun ainsi que dans le Sud-Est asiatique. Ce groupe renferme des arbres caractérisés par leur vigueur, leur grande résistance aux maladies, leur précocité et leur grande productivité. Toutes ces caractéristiques font de cette variété la plus productrice et elle est de ce fait à l'origine de 80 à 90% de la production mondiale (Demol 2002).

Les cabosses vertes avant maturité sont jaunes rougeâtre à maturité, elles sont plus ou moins allongées ou arrondies, à péricarpe épais et à fèves aplatis.

Selon leur origine géographique on distingue deux types de Forastero :

- les Forastero de basse Amazonie et de la vallée d'Orénoque,
- les Forastero de haute Amazonie.

#### **I.1.4.2.3. Trinitario**

Les Trinitario originaires de l'île de Trinidad sont des cacaoyers hybrides issus d'un croisement naturel entre les deux groupes précédents (Cheesman 1944). Ils sont aujourd'hui cultivés sur les mêmes Terres que les Criollo et également dans l'Océan indien. Hybrides naturels très hétérogènes, ils offrent une bonne résistance aux maladies et représentent actuellement environ 10 à 15% de la production mondiale (Despreaux 2004).

Les caractéristiques de ce groupe sont très diverses et difficiles à lister ; selon les productions, les formes des cabosses et des fèves sont très variables. Entre autre nous pouvons citer comme exemple de Trinitario les clones SNK et TIKO (Figure 5).



**Figure 5 :** Cabosse de trinitario (Photo prise par Nyangono le 22/08/2015, Yaounde).

#### **I.1.4.2.4. Nacional**

Le cacao Nacional est originaire de l'Equateur ; cette variété a été classée de manière différente au fil du temps et plus récemment Lecerteau *et al* (1997) ont démontré en s'appuyant sur de nouvelles technologies moléculaires, que le cacao Nacional est génétiquement plus proche des Forastero que des Criollo. Egalement appelé « ARRIBA », il présente un arôme caractéristique.

#### **I.1.5. Contraintes de la cacaoculture**

La culture du cacao fait face à de nombreuses contraintes notamment les problèmes phytosanitaires et les problèmes d'ordre économique.

##### **I.1.5.1. Les problèmes phytosanitaires**

Ils sont dus aux maladies et aux attaques des ravageurs.

##### **I.1.5.1.1. Les maladies**

Les maladies affectant le cacaoyer peuvent être soit cryptogamiques soit virales.

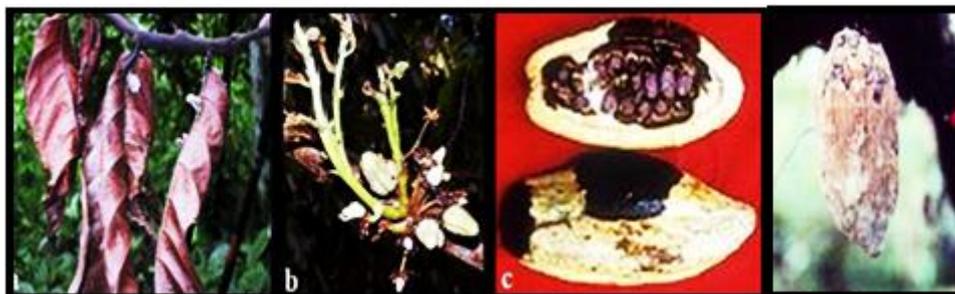
##### **➤ Maladies cryptogamiques**

**La pourriture brune des cabosses** : causée par des Straménopiles ou Hétérokotes du genre *Phytophthora Spp* (Pythiaceae) est la maladie la plus répandue et la plus dévastatrice dans les pays producteurs de cacao. Sept espèces de *Phytophthora* ont été identifiées comme parasite responsable de la pourriture brune mais deux ont une importance majeure (Vos 2003)

il s'agit de *P. palmivor* et de *P. megakarya* ; ce dernier présent uniquement en Afrique, est l'espèce prépondérante au Cameroun (Nyassé 1997). Cette maladie est caractérisée par l'apparition sur le cortex d'une petite tache translucide, qui brunit en 24-48 heures. Cette tâche s'étend plus ou moins rapidement selon la sensibilité du cacaoyer. Après une dizaine de jours, la maladie progresse à l'intérieur de la cabosse et détruit les fèves qui deviennent impropres à la commercialisation. Les moyens de lutte contre la pourriture brune sont l'application de mesures prophylactiques associées à la lutte chimique raisonnée et la sélection de cacaoyers résistants aux parasites responsables (Tahi *et al.* 2006)

**Le Balai de sorcière** : causé par *Moniliophthora perniciosa* est une maladie essentiellement présente en Amérique du Sud où elle provoque d'importantes pertes de production allant de 30 à 100 % (Vos, 2003). Elle affecte les tissus méristématiques de la plante et les organes les plus touchés sont les jeunes fruits. Les symptômes sont les suivants : les jeunes cabosses attaquées restent naines, prennent une forme atrophiée, sèchent et pourrissent sur l'arbre sans jamais atteindre la maturité. La lutte prophylactique contre cette maladie consiste au maintien d'un ombrage sur la plantation, la taille sanitaire, l'incinération des tissus malades (Mossu 1990). La lutte chimique consiste à l'application de l'oxyde cuivreux ou hydroxyde de cuivre qui réduit la maladie de presque 86% et 79% respectivement (Asha *et al.* 2006) (Figure 6).

**La moniliose** : causée par *Moniliophthora roreri* est originaire des pays andins. Elle affecte uniquement les cabosses. Les fruits infectés présentent de fève nécrosées et compactes (Figure 6).



**Figure 6** : a- feuille attaquée par le « Balai de sorcière » ; b- Coussinet floral attaqué par le « Balai de sorcière » ; c- Cabosse attaquée par le « Balai de sorcière » ; d- Cabosse attaquée par la moniliose (Solorzano 2007).

➤ **Maladies virales :**

Le « **Swollen Shoot** » est causé par un virus appelé « Cacao swollen shoot virus » (CSSV). Le CSSV provoque des perturbations physiologiques importantes dans le cacaoyer infecté dont la morphogénèse, la sporogénèse, la nutrition hydrique, la nutrition minérale, la

photosynthèse, la fécondation et la production. Le virus provoque des décolorations plus ou moins intenses du limbe suivant son degré de sévérité et occasionne une faible floraison, un faible taux de nouaison, un dessèchement physiologique très prononcé et une diminution rapide du nombre de cabosses.

#### **I.1.5.1.2. Les ravageurs**

Il s'agit pour l'essentiel d'insectes piqueurs suceurs de la famille des mirides (Lachenaud 1991) répartis en deux principaux groupes : les *Helopeltis* et les *Sahlbergella*.

On distingue également :

- **les punaises pentatomides** (hémiptères) qui provoquent des chancres à la suite de leurs piqûres.
- **les cochenilles** qui infligent des piqûres en suçant la sève et provoquent ainsi l'affaiblissement de la plante. D'autres cochenilles, plus nuisibles sont vectrices de maladies à virus. En Afrique de l'Ouest, elles sont l'agent vecteur du virus du swollen shoot.
- **les cicadelles**, elles sont minuscules de l'ordre 1,5 à 3 mm et se nourrissent de jeunes feuilles. Ces insectes provoquent des nécroses de la partie apicale.
- **les fourmis** nuisibles qui vivent souvent en association avec les cochenilles vectrices du virus du « Swollen shoot ».

#### **I.1.6. Récolte et traitement post récolte du cacao**

##### **I.1.6.1. Récolte**

La récolte est normalement effectuée sur une période de 3 à 4 jours. Cette pratique varie en fonction de la taille du champ et de la production de cabosses (Lopez & Dimick 1995). Les cabosses mures identifiées sur la base de leur couleur, sont détachées de l'écorce de l'arbre à l'aide d'un couteau, d'un sécateur ou d'une machette.

##### **I.1.6.2. Ecabossage**

Cette étape consiste à casser les cabosses après récolte pour en extraire les fèves qui seront ensuite soumises à la fermentation. L'ecabossage est généralement fait à la main, et la meilleure technique consiste à frapper la cabosse de manière à la briser en deux à la hauteur du diamètre maximum; la partie inférieure est retirée, les fèves restant attachées au placenta ;

l'extraction des fèves et leur séparation du placenta se fait facilement en faisant glisser deux doigts le long du placenta.

### **I.1.6.3. La fermentation**

C'est une opération très importante qui se place avant le séchage et dont les objectifs sont les suivants : l'élimination de la pulpe mucilagineuse qui entoure les graines, la mort de l'embryon pour permettre la conservation ultérieure et enfin les modifications biochimiques des cotylédons (la disparition de la couleur pourpre des cotylédons quand elle existe, le gonflement des cotylédons, l'acquisition de la couleur brune caractéristique, la diminution de l'amertume et de l'astringence, le développement des précurseurs d'arôme). La fermentation est donc un enchaînement de processus qui commencent avec la fermentation de la pulpe, provoquée par des micro-organismes, et s'achèvent par les réactions internes des tissus des cotylédons, sous le contrôle de leurs enzymes. Généralement la fermentation implique le confinement en tas des fèves fraîchement extraites des cabosses ou tout autre système de fermentation pendant une durée de 3 à 6 jours en fonction de la variété de cacao (Lopez & Dimick 1995). Pendant et après l'écabossage les fèves de cacao sont inoculées de nombreux microorganismes provenant des mains des planteurs et des outils utilisés (Nielsen 2006). En effet, le processus de fermentation consiste en la dégradation par ces microorganismes des sucres de la pulpe en alcool (éthanol) puis une grande partie de ces alcools est oxydée en acide acétique. La production d'acide et d'alcool entraîne une baisse du pH des fèves de cacao de 7 à 5 (Beihl *et al.* 1985). La fermentation est d'autant importante qu'elle est à l'origine de la formation des précurseurs d'arômes (Lopez & Dimick 1995).

### **I.1.6.4. Séchage et stockage**

Après la fermentation, intervient l'étape de séchage. Il permet d'arrêter la fermentation et de ramener la teneur en humidité des fèves fermentées d'environ 60% à 7 ou 7,5%, afin de garantir une bonne conservation du produit (Cros & Jeanjean 1995). Il existe plusieurs méthodes de séchage notamment :

- ❖ **le séchage naturel** : étalées en couche mince au soleil, les fèves sèchent au bout de 8 à 15 jours
- ❖ **séchage artificiel**: de nombreux modèles de séchoirs artificiels existent. Parmi ces modèles on peut citer la **lyophilisation**.

Le **stockage** consiste à maintenir les fèves de cacao bien sèches. Aussi, elles sont placées dans des sacs en toile jute de manière à éviter tout contact avec le sol, le mur et le plafond. Le stockage doit se faire dans des endroits propres, secs et bien aérés tout ceci pour éviter le développement de moisissures, d'insectes et la formation d'acides gras.

## I.1.7. Importances du Cacao

### I.1.7.1. Importance économique

A l'échelle mondiale la cacaoculture s'est imposée comme un secteur commercial de grande importance, à tel point qu'aujourd'hui le cacao occupe la troisième place après le sucre et le café dans le marché mondial des matières premières (Solorzano 2007). Au Cameroun (Tableau), la production de cacao joue un rôle essentiel dans la constitution du revenu monétaire des populations rurales et son exportation contribue également à l'équilibre de la balance commerciale du pays. Les fèves de cacao constituent la matière première dans les industries de chocolaterie, biscuiterie et pâtisserie. Les sous-produits du cacao tels que les coques, matières grasses extraites des coques et des fèves peuvent être utilisés pour l'alimentation du bétail, la fabrication d'engrais, les produits pharmaceutiques et la savonnerie (Mossu 1990).

**Tableau 1:** Production mondiale de cacao en millier de tonnes (ICCO 2016)

	2013/14		Estimates 2014/15		Forecasts 2015/16	
<b>Africa</b>	<b>3199</b>	<b>73.2%</b>	<b>3068</b>	<b>72.5%</b>	<b>3063</b>	<b>73.7%</b>
Cameroon	211		232		230	
Côte d'Ivoire	1748		1798		1890	
Ghana	897		740		840	
Nigeria	248		195		200	
Others	97		105		103	
<b>America</b>	<b>726</b>	<b>16.6%</b>	<b>760</b>	<b>18.0%</b>	<b>714</b>	<b>17.2%</b>
Brazil	228		230		210	
Ecuador	234		250		230	
Others	264		280		274	
<b>Asia &amp; Oceania</b>	<b>447</b>	<b>10.2%</b>	<b>401</b>	<b>9.5%</b>	<b>377</b>	<b>9.1%</b>
Indonesia	375		325		300	
Papua New Guinea	38		38		38	
Others	38		40		41	
<b>World total</b>	<b>4372</b>	<b>100.0%</b>	<b>4230</b>	<b>100.0%</b>	<b>4154</b>	<b>100.0%</b>

### I.1.7.2. Importances nutritionnelles et pharmaceutiques

Le cacao contribue à l'alimentation humaine à travers ses réserves en lipides, sucres, minéraux (potassium, magnésium, cuivre et fer) et polyphénols (Holland *et al.* 1991) (Figure 7). On distingue trois principaux groupes de polyphénols dans les fèves de Cacao: les flavan-3-ols (37%), les Anthocyanines (4%) et les Proanthocyanidines (58%). Ces composés sont réputés pour leurs propriétés antioxydantes, antiradicalaires et anticancérigènes (Abbe & Amin 2008).



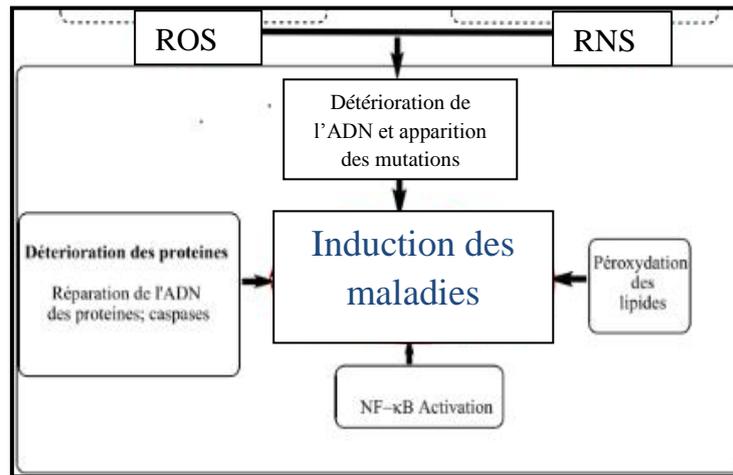
**Figure 7:** Produits chocolâtés (Weber J.)

## I.2. Généralités sur les antioxydants

L'être humain est un organisme aérobie, ce qui signifie qu'il a besoin d'oxygène pour sa subsistance. L'oxydation est à l'origine d'un grand nombre de réactions chimiques qui prennent place dans le corps humain, y compris la transformation des aliments en énergie et en chaleur, et la destruction des pathogènes (microbes responsables de maladies) par les cellules du système immunitaire (McCord 2000). Ce processus génère également des radicaux libres (Sharififar *et al.* 2007). S'il est vrai que certains radicaux libres sont indispensables, notamment pour l'immunité, ils sont également susceptibles d'endommager les membranes cellulaires, les protéines et l'ADN (Halliwell & Gutteridge 2000). Il devient donc nécessaire pour l'organisme de s'en protéger, à cette fin, il a élaboré un système antioxydant complexe qui est constitué d'un large éventail de composés destructeurs de ces radicaux libres.

### I.2.1. Radicaux libres et stress oxydatif

Les radicaux libres sont des atomes ou un groupe d'atomes, avec un nombre impair d'électrons sur la loge extérieure. A une certaine quantité, les radicaux libres protègent notre corps de certaines bactéries, mais leur production en excès provoque des dommages pour l'organisme. Leur principal danger vient des dommages qu'ils peuvent provoquer lorsqu'ils réagissent avec des composants cellulaires importants tels que l'ADN ou la membrane cellulaire.



**Figure 8 :** Mécanisme d'action des radicaux libres (Amin & Razieh 2007).

Les radicaux libres peuvent avoir une origine externe et une origine interne (Halliwell 1999). Les principaux types de radicaux libres sont les espèces réactives de l'oxygène encore appelées « dérivés réactifs de l'oxygène » (DRO) ou pour les Anglo-saxons « reactive oxygen species » (ROS); il s'agit notamment : du radical hydroxyl (OH), du radical superoxyde ( $O_2^-$ ), du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et de l'oxyde nitrique (NO).

Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre de la balance entre les antioxydants et les espèces oxygénées pro-oxydantes en faveur de ces derniers, avec comme conséquences de nombreux impacts sur le fonctionnement cellulaires causant ainsi des maladies chroniques (Amin & Razieh 2007, Bushra *et al.* 2007). Ce déséquilibre est fonction de plusieurs paramètres tels que l'âge, l'alimentation et l'état sanitaire de l'individu (Chun *et al.* 2003).

### I.2.2. Les défenses antioxydantes

Les antioxydants sont considérés comme des substances dont le rôle premier est de prévenir la dégradation induite par la réaction des radicaux libres (Morello *et al.* 2002). Il

existe deux types d'antioxydants : les antioxydants enzymatiques naturellement fabriqués par notre organisme ou antioxydants endogènes à savoir la SOD (Superoxyde Dismutase), la GPO (Glutathion Peroxydase) et la Catalase et les antioxydants d'origine alimentaire ou antioxydants exogènes apportés sous forme de fruits et légumes riches en vitamines C, E, caroténoïdes, ubiquinone, composés phénoliques (flavonoïdes), glutathion ou acide lipoïque.

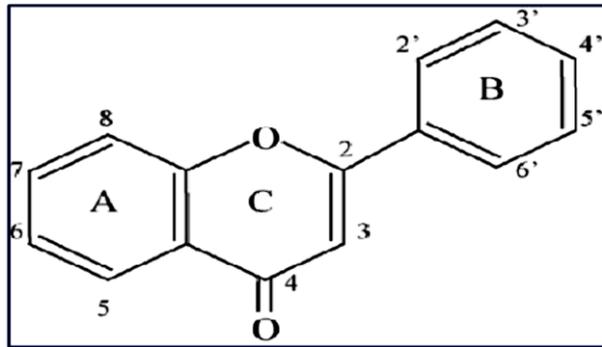
### **I.2.3. Les polyphénols**

Les polyphénols sont des familles de substances chimiques largement distribuées dans les végétaux (Tableau 2). Ils ne sont pas directement impliqués dans un processus métabolique quelconque et sont donc considérés comme des métabolites secondaires (Sharma & Bhat 2009). On les classe parmi les antioxydants naturels. Les polyphénols suscitent depuis une dizaine d'années un intérêt croissant de la part des nutritionnistes, des industriels de l'agro-alimentaire et des consommateurs. Une des raisons principales est la reconnaissance de leurs propriétés antioxydantes et par ricochet leur implication probable dans la prévention des diverses pathologies associées au stress oxydant. Un très grand nombre de données expérimentales plaident aujourd'hui en faveur de leur implication dans la prévention des maladies dégénératives telles que les cancers, les maladies cardio-vasculaires, l'ostéoporose ou les maladies inflammatoires (Duthl & Crozier 2000, Nakatani 2000, Nijveldt *et al.* 2001, Wei *et al.* 2007).

**Tableau 2:** Les principales classes de composés phénoliques (Harborne 1989, Macheix *et al.* 2006)

Squelette carboné	Classe	Exemple	Origine (exemples)
C <sub>6</sub>	Phénols simples	Cathécol	Nombreuses espèces
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Acides hydroxybenzoïques	p-Hydroxybenzoïque	Epices, fraises
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acide hydroxycinnamique Couramines	Acide caféïque Acide férulique Scopolétine	Pomme de Terre Pomme Citrus
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naphtaquinone	Juglone	Noix
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbènes	Resvératrol	Vigne
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoïdes : *Flavonols *Anthocyanes *Flavanols *Flavanones Isoflavanoïdes	Kaempférol, quercétine Cyanidine, Pélargonidine Catéchines, Epicathéchines Naringénine Daidzeine	Fruit, légumes, fleurs Fleurs, fruits rouges Pommes, raisins Citrus Soja, Pois
(C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanes	Pinorésinol	Pin
(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Lignines		Bois, noyaux de fruits
C <sub>15</sub>	Tanins		

Les flavonoïdes constituent le groupe le plus représentatif des composés phénoliques ; il comprend plus de 6000 molécules regroupées en sous-classes (Ribereau-gayon 1968, Macheix *et al.* 2006). Leur structure générale est : C<sub>15</sub> (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) ; la structure de base commune à ce groupe de polyphénols est le diphenylpropane (Figure 9) : c'est la présence de deux cycles aromatiques liés par une chaîne de trois carbones formant un hétérocycle oxygéné (Yao *et al.* 2004, Macheix *et al.* 2006, Yao *et al.* 2010).



**Figure 9:** Structure de base des flavonoïdes (Di Carlo *et al.* 1999)

Les flavonoïdes sont divisés en sous classes selon les variations autour du squelette chimique de base en C<sub>15</sub> portant principalement sur trois points :

- le degré d'hydroxylation des différents cycles ;
- le niveau de méthylation (groupement O-CH<sub>3</sub> à la place des seules fonctions phénoliques) ;
- le niveau de glycosylation ;

On distingue ainsi les 4-oxyflavonoïdes (flavones, isoflavones, flavonols et flavanones), les flavanols, les proanthocyanidines, les anthocyanes ainsi que les composés plus minoritaires, les chalcones et dihydrochalcones (Edenharder et Grunhage 2003, Crozier *et al.* 2009).

#### **I.2.4. Détermination de l'activité antioxydante**

Le potentiel antioxydant peut être évalué par des tests qui sont divisés en deux catégories: ceux qui mesurent les réactions de transfert de l'atome d'hydrogène (la méthode TEAC) et ceux qui mesurent le transfert d'électrons (la méthode ORAC : Oxygen Radical Absorbance Capacity) sont les plus couramment utilisées. Cependant, d'autres méthodes incluent le FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) et le TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter ) (Marc *et al.* 2004, Wu *et al.* 2004) ; ainsi que la méthode utilisant le radical libre DPPH• (diphényl-picrylhydrazyle).

##### **I.2.4.1. La méthode TEAC**

La méthode TEAC est un test de décoloration basé sur la capacité d'un antioxydant à réduire le radical-cation ABTS<sup>+</sup>, le 2,2 azinobis (acide 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Pellegrini *et al.* 2003). Cette méthode détermine l'activité antioxydante des composés

hydrophiles et lipophiles qui peuvent se dissoudre dans une solution aqueuse ou de l'éthanol acidifié (Sánchez-Moreno 2002).

Son principe est le suivant : En réagissant avec le persulfate de potassium ( $K_2S_2O_8$ ), l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis (3éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)) forme le radical ABTS<sup>+</sup>, de couleur bleue à verte. L'ajout d'antioxydants va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. La décoloration du radical mesurée par spectrophotométrie à 734 nm est proportionnelle à la concentration en antioxydants.

#### **I.2.4.2. La méthode FRAP**

La méthode FRAP est un dosage colorimétrique du transfert d'électrons qui évalue la réduction du fer (le passage de la forme ferrique à ferreux) en présence d'un antioxydant (Cao & Prior 1998, Pellegrini *et al.* 2003). Une molécule change de couleur une fois qu'elle est réduite, ce qui permet la quantification par spectrophotométrie. Les avantages de cette méthode sont qu'elle est simple, rapide, peu coûteuse et robuste. En revanche, les désavantages sont qu'elle n'est pas capable de détecter les protéines ou les composés contenant le groupe SH (incluant les thiols), qui peuvent transférer l'hydrogène. Pour cette raison, le test FRAP sous-estime souvent l'activité antioxydante du sérum sanguin (Prior *et al.* 1999, Phipps *et al.* 2007).

#### **I.2.4.3. La méthode ORAC**

La méthode ORAC, une analyse spectrofluorimétrique, mesure la dégradation de la fluorescéine en présence de l'oxydant APPH (2,2'-azo-bis (2-amidinopropane)] dichlorhydrate) (Cao *et al.* 1999). La présence d'un antioxydant ralentit la décomposition de la fluorescéine et ce déclin de l'intensité de la fluorescence est quantifié à l'aide d'un fluorimètre (Cao *et al.* 1998, Prior & Cao. 1999). La méthode ORAC fait intervenir une mesure cinétique afin de déterminer le potentiel antioxydant. Des courbes de décroissance sont tracées, l'intensité de fluorescence en fonction du temps, et la zone située entre les deux courbes de décroissance (en présence d'un antioxydant ou non) est calculée. Le potentiel antioxydant est quantifié par la trolox, un analogue de la vitamine E. La méthode ORAC a pour avantage d'être sensible, standardisée et adaptée aux matrices hydrophiles et lipophiles. Les inconvénients principaux de cette méthode sont qu'elle varie selon la température, elle ne mesure que des radicaux peroxydes, et elle ne tient pas compte d'autres radicaux qui sont physiologiquement réactifs (Phipps *et al.* 2007).

#### **I.2.4.4. La méthode DPPH**

Le pouvoir antioxydant se détermine aussi par la méthode DPPH (N,N-diphényl-N'-picrylhydrazyl) : il s'agit de la capacité d'un antioxydant donné à piéger un radical libre ou à donner un atome d'hydrogène.

Son principe est le suivant : le radical DPPH· (2,2-diphényl-1-picryl-hydrazyl) est stable à température ordinaire et présente une couleur bleue bien caractéristique. Les antioxydants présents dans l'échantillon le réduisent ce qui entraîne une décoloration facilement mesurable par spectrophotométrie à 517 nm.

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

## **II.1. Cadre de travail**

Les différentes étapes de notre travail ont été réalisées au sein du Laboratoire de Physiologie et de Biochimie Végétales de l'Ecole Normale Supérieure de l'Université de Yaoundé I.

## **II.2. Matériel végétal**

Notre expérimentation a été menée sur les fèves issues des cabosses des génotypes de cacao suivants : TIKO 31, TIKO 32, SNK 416, SNK 608, SNK 467 appartenant tous à la variété Trinitario. Les dites cabosses ont été récoltées le 6 novembre 2015 dans un des champs de l'IRAD situé à NKOEMVONE à quelques km d'EBOLOWA dans la région du SUD.

## **II.3. Préparation du matériel**

Les cabosses ainsi récoltées sont ouvertes dans le sens de la longueur à l'aide d'un couteau et les fèves y sont extraites à main nue : c'est l'écabossage. Les fèves sont ensuite emballées dans des sacs de congélation préalablement étiquetés (5 sacs à raison d'un sac pour chaque clone) puis conservées à -20°C.

Les fèves congelées sont lyophilisées dans le but d'en extraire l'eau pour faciliter leur conservation et la suite de l'expérimentation.

## **II.4. Analyses physico-chimiques**

### **II.4.1. Mesure de la masse des fèves**

La masse des fèves est déterminée suivant la méthode décrite par Handlaer (1980) avec quelques modifications.

10 fèves sont prélevées dans chacun des 5 échantillons, chacune de ces fèves est pesée à l'aide d'une balance électronique et la masse moyenne est calculée.

### **II.4.2. Cut-Test**

L'épreuve de la coupe ou cut test est couramment utilisée pour apprécier la convenance des fèves à la fabrication du chocolat (Shamsuddin & Dimick 1986). La

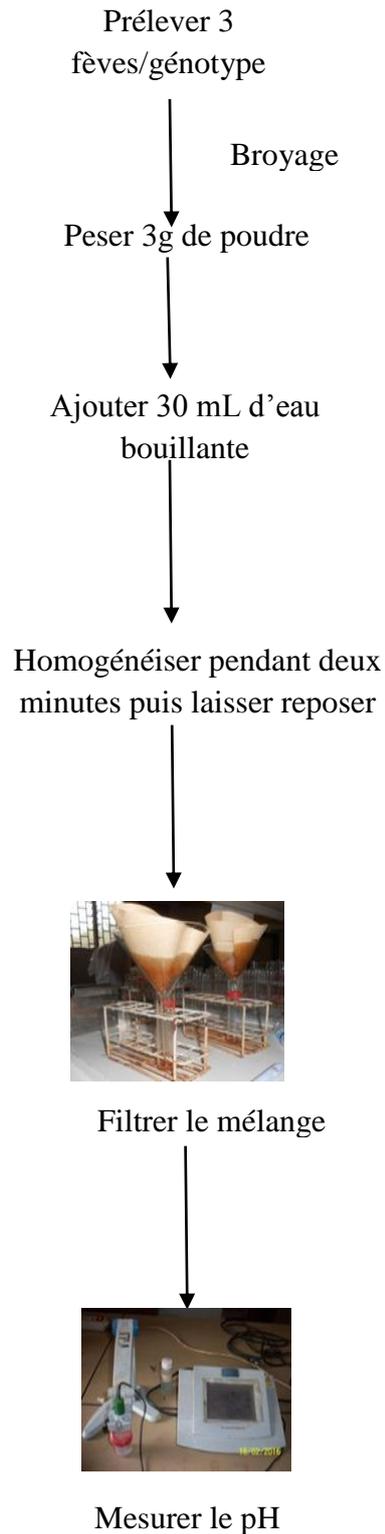
détermination des couleurs des fèves est faite suivant la méthode décrite par Niemenak *et al.* (2014) avec quelques modifications.

Ainsi, 10 fèves sont prélevées au hasard dans chacun des 5 échantillons ; Chaque fève est coupée longitudinalement et placée sur une planche à Cut- test puis la couleur est déterminée à la lumière du jour. La couleur prépondérante est retenue comme couleur du clone considéré.

### **II.4.3. Détermination du pH**

Le pH est déterminé pour chacun des cinq échantillons de poudre de cacao et ceci suivant la méthode décrite par Roche *et al.* (1987) et Rohsius *et al.* (2006) mise au point par la méthode officielle 970.21 de l'AOAC (« Association of Analytical Chemists ») des produits du cacao.

3 à 4 fèves sont prélevées dans chacun des 5 échantillons, elles sont décortiquées puis broyées dans un mixeur (Moulinex). 3g de poudre de cacao sont pesés et mélangés à 30 mL d'eau chaude (100 °C) dans un bécher. La solution obtenue est homogénéisée à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 2 à 3 minutes puis laissée au repos. Nous procédons ensuite à la filtration à l'aide d'un dispositif constitué de papier filtre n°4 et de tube à essai ; la mesure du pH est effectuée sur le filtrat obtenu à l'aide d'un pH-mètre (pH-2006 pHmeter). L'opération est réalisée en duplicata pour chaque échantillon et le pH moyen est calculé (Figure 10).



**Figure 10** : Protocole de détermination du pH. (Roche *et al.* 1987 et Rohsius *et al.* 2006)

#### II.4.4. Incubation de la poudre de cacao à l'acétone

Afin de confirmer les résultats obtenus à l'issue du cut-test, cette étape a été réalisée selon la méthode modifiée de Cakirer *et al.* (2010).

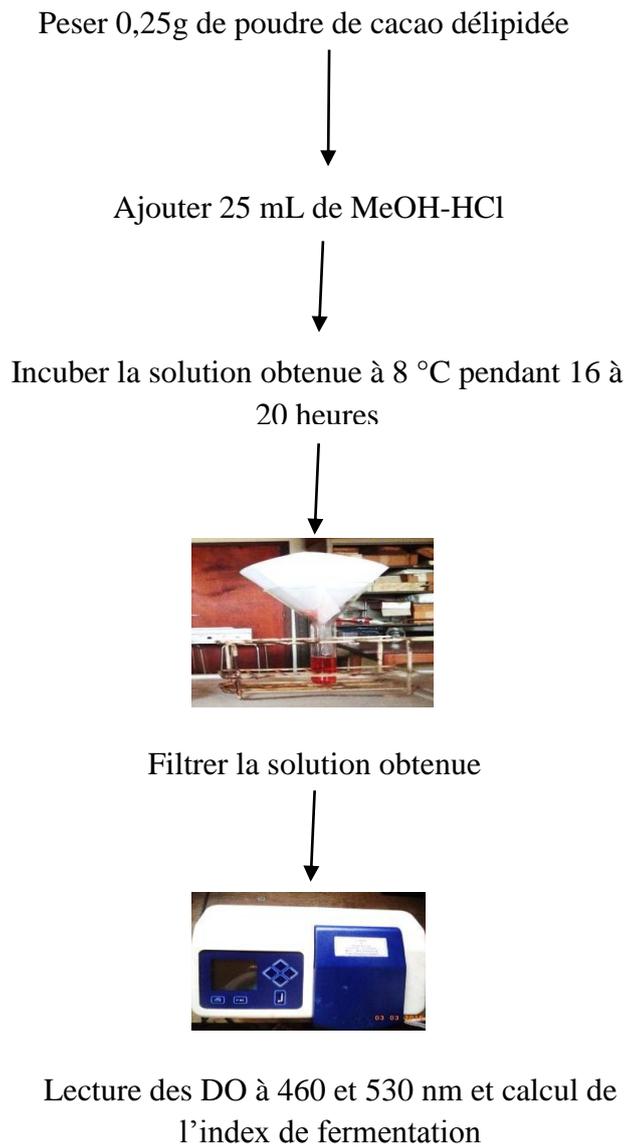
0,2 g de poudre de cacao délipidée sont introduits dans 5 mL d'acétone 80%. Le mélange est laissé à température ambiante pendant 3 à 4 heures ; mais toutes les 15 minutes il est agité. Après décantation, le surnageant est recueilli et introduit dans des piluliers afin d'observer les colorations.

#### II.4.5. Indice de fermentation

L'évaluation de l'indice de fermentation est faite selon la méthode décrite par Gourieva & Tserrivitinov (1979) et modifiée par Eyamo *et al.* (2016). Ces derniers indiquent que l'étude du rapport des densités optiques d'un extrait méthanolique acide de cacao, mesurées respectivement à 460 nm et 530 nm, permet de caractériser la fermentation.

0,25 g de poudre de cacao délipidée sont pesés puis mélangés à 25 mL de MeOH-HCl (97:3); la solution obtenue est homogénéisée puis incubée à une température de 8°C pendant 16 à 20 heures. Par la suite, la solution est filtrée à l'aide de papier filtre n°4 et le filtrat recueilli dans des tubes à essai est utilisé pour la lecture des absorbances respectivement aux longueurs d'ondes suivantes : 460 et 530 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY) et ceci à deux reprises (Figure 11).

La valeur de l'index de fermentation s'obtient du ratio : **R= DO (460nm) /DO (530 nm)**.



**Figure 11** : Protocole de détermination de l'index de fermentation

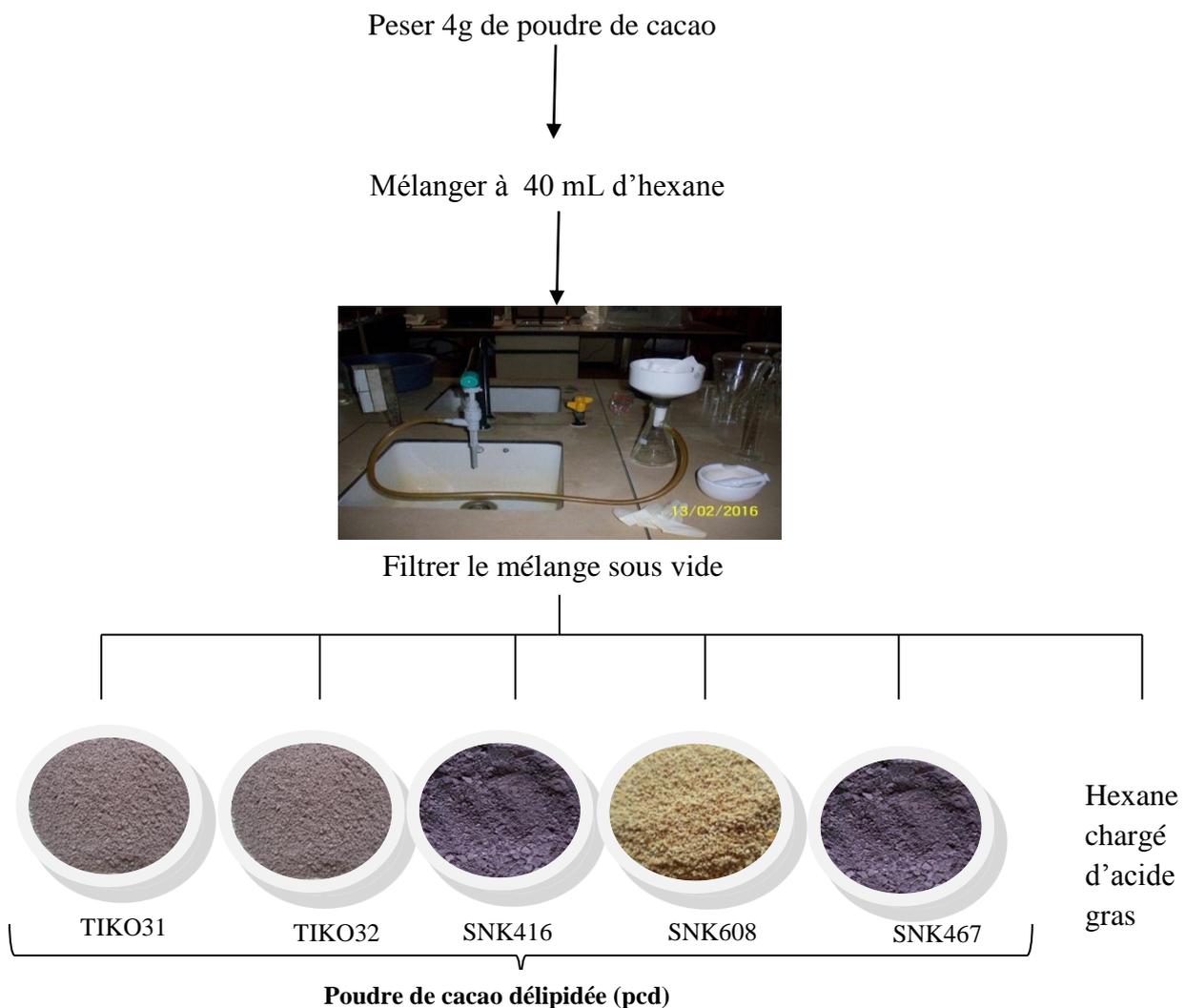
## II.5. Analyses Biochimiques

Ces analyses nécessitent une étape préalable : la délipidation

### II.5.1. Délipidation

La délipidation de la poudre de cacao est faite selon la méthode décrite par Hansen *et al.* (1998) et modifiée par Niemenak *et al.* (2014) afin de débarasser la poudre de cacao des corps gras. Cette étape permet d'éviter toute interaction lors de l'extraction et du dosage des phénols.

4 g de poudre de cacao sont pesés puis mélangés à 40 mL d'hexane ; le mélange est homogénéisé dans un mortier à l'aide d'un pilon puis filtré sous vide. La poudre restant sur le papier filtre correspond à la poudre de cacao délipidée. L'étape suivante consiste à laisser sécher cette poudre à température ambiante pendant 2 à 3 heures ; la poudre sèche est introduite dans des boites noires puis conservée à - 20°C.



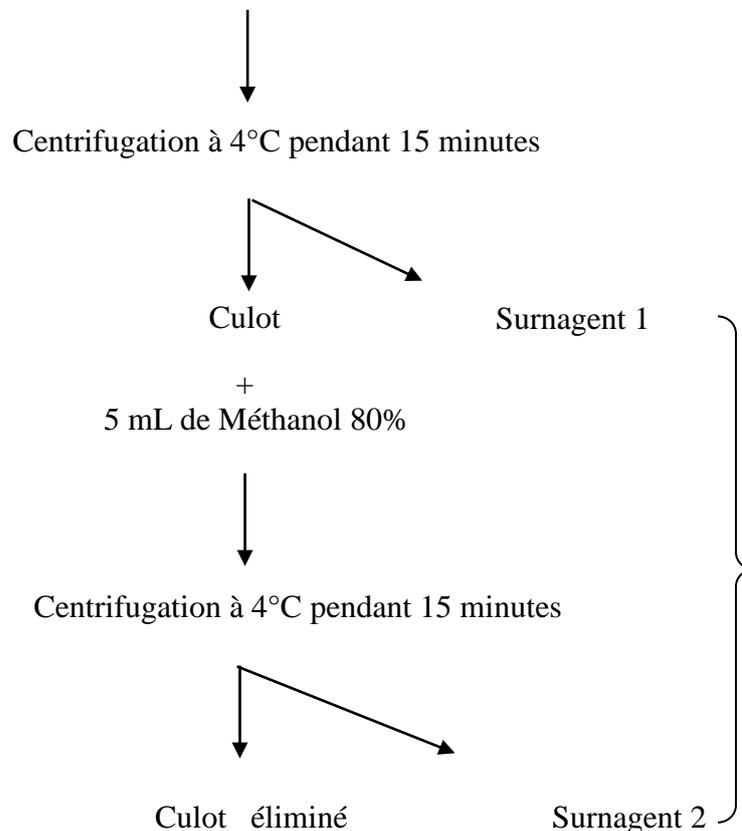
**Figure 12 :** Protocole de délipidation de la poudre de cacao (Niemenak *et al.* 2014)

## II.5.2. Extraction des Polyphénols totaux

L'extraction des polyphénols totaux a été faite selon la méthode de Boizot *et al.* (2006) avec quelques modifications.

100 mg de poudre cacao délipidée sont mélangés à 5 mL de méthanol à 80%, le mélange obtenu est homogénéisé à l'aide d'un vortex puis introduit dans des tubes à centrifuger ; La centrifugation est faite à 4°C pendant 15 minutes. A l'issue de la centrifugation, le surnagent est recueilli dans des tubes ; on procède à une extraction identique sur le culot afin d'obtenir un plus grand volume d'extrait brut. L'extrait brut de polyphénols totaux (surnagent 1 + surnagent 2) est conservé à -20°C (Figure 13).

100 mg de poudre de cacao délipidée + 5 mL de Méthanol 80%



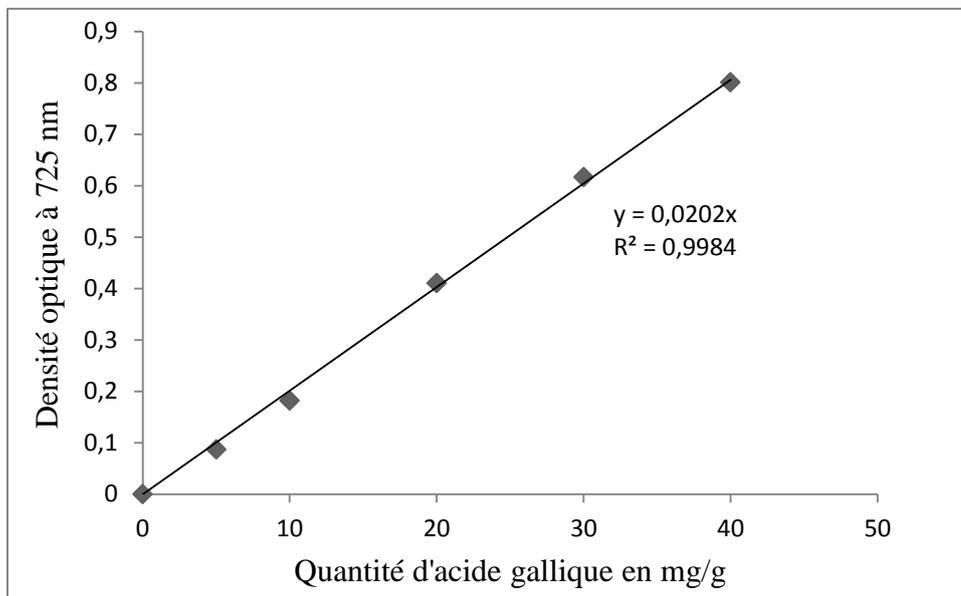
**Extraits phénoliques**

**Figure 13:** Protocole d'extraction des phénols totaux (Boizot *et al.* 2006)

### II.5.3. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols de nos cinq extraits a été réalisé selon la méthode de Singleton *et al.* (1999) qui utilise le réactif de Folin-Ciocalteu. Ce réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolibdique ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) qui est réduit lors de l'oxydation des phénols en un mélange d'oxydes bleus de Tungstène ( $W_8O_{23}$ ) et de Molybdène ( $Mo_8O_{23}$ ). La coloration bleue obtenue dont l'absorbance maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de composés phénoliques présents dans l'extrait.

100  $\mu$ L d'extrait phénolique dilué au  $\frac{1}{4}$  sont prélevés puis mélangés à 3.5 mL d'eau distillée et 0.5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu dans des tubes à essai respectivement pour chacun des cinq extraits. Le mélange obtenu est agité à l'aide d'un vortex ; 3 minutes après 1 mL de carbonate de sodium est ajouté au mélange. Les tubes contenant le mélange final sont incubés à 40°C pendant 20 minutes ; les lectures de l'absorbance du complexe bleu sont effectuées à 725 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc dans lequel l'extrait est remplacé par de l'eau distillée. Les essais sont réalisés en triplicata. Les teneurs en polyphénols totaux sont exprimées en mg d'acide gallique par gramme de poudre de cacao délipidée (mg d'EAG/g de PCD) et sont déterminées à partir d'une droite d'étalonnage de l'acide gallique (Figure 14).



**Figure 14 :** Droite d'étalonnage des polyphénols

#### **II.5.4. Dosage des flavonoïdes totaux**

Le dosage des flavonoïdes totaux a été réalisé suivant la méthode de Kramling & Singleton (1966). Les teneurs en flavonoïdes totaux de nos extraits ont été obtenues de la différence entre les polyphénols totaux et celles des composés non flavonoïdes.

2 ml d'extrait de polyphénols sont mélangés à 2 ml de formaldéhyde : les flavonoïdes présents dans l'extrait précipitent en présence du formaldéhyde et le précipité formé est éliminé par filtration et on recueille le filtrat ; ce dernier constitue l'extrait de composés non flavonoïdes. Le dosage des composés non flavonoïdes est réalisé suivant la méthode modifiée de Singleton *et al.* décrite précédemment. Les dosages sont réalisés en triplicata et les teneurs en flavonoïdes totaux sont exprimées en mg d'EAG/g de PCD.

#### **II.5.5. Dosage des flavan-3-ols**

La détermination des teneurs en flavan-3-ols de nos extraits a été effectuée suivant la méthode décrite par Di Stefano *et al.* (1989). Le principe de cette méthode est basé sur la réaction des groupements hydroxyles latéraux en position C<sub>6</sub> et C<sub>8</sub> avec la vanilline qui conduit à la formation d'un complexe rose dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de flavan-3-ols présents.

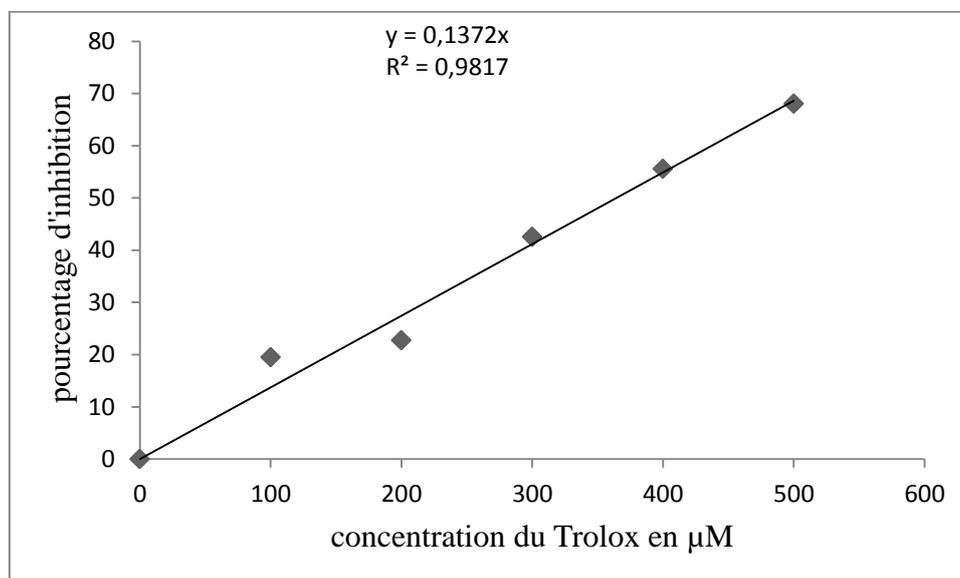
100 µL d'extrait sont ajoutés à 3.5 mL de solution de vanilline 4% ; au bout de 5 minutes, 1.5 mL de solution de HCl (0.1 M) sont ajoutés au milieu réactionnel. Le mélange obtenu est incubé pendant 15 minutes dans un bain d'eau glacée. Ceci étant les lectures des densités optiques du complexe rose formé sont faites à 500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc dans lequel l'extrait est remplacé par du méthanol. Les essais sont réalisés en triplicata et les teneurs en flavan-3-ols sont déterminées par la formule : (+)-catéchine =  $290.8 \times \Delta E$  avec  $\Delta E$  = densité optique du blanc – densité optique de l'extrait (Di Stefano *et al.* 1989).

#### **II.5.6. Mesure de l'activité antioxydante des extraits phénoliques : effet piègeur du radical ABTS<sup>+</sup>**

Elle a été faite selon la méthode de Re *et al.* (1999) modifiée par Godom (2015).

A 2 mL de solution (7 mM) du radical ABTS<sup>+</sup> sont ajoutés 50 µL d'extrait phénolique dilué au 1/10. Après 5 minutes, les lectures d'absorbance sont effectuées à 734 nm contre un blanc dans lequel l'extrait est remplacé par du méthanol. Les résultats obtenus du tripliquet

d'analyse sont exprimés en mM de Trolox/g de pcd et dérive de la droite de calibrage déterminée pour ce standard (Figure 15).



**Figure 15** : Droite d'étalonnage de l'ABTS

## II.6. Analyses Statistiques

Les analyses statistiques sont faites avec le logiciel SPSS (version 20) pour Windows. Les données des différentes variables sont soumises à une analyse des variances (ANOVA) et les moyennes sont comparées par le test de TUKEY.

## **CHAPITRE III: RESULTATS ET DISCUSSION**

### III.1. Résultats

#### III.1.1. Caractéristiques physico-chimiques

##### III.1.1.1 Masse des fèves

Les masses des fèves sont comprises entre  $1,91 \pm 0,27$  et  $1,85 \pm 0,27$  g respectivement pour TIKO31 et TIKO32. Ces valeurs varient de  $1,36 \pm 0,10$  à  $1,49 \pm 0,24$  g chez les clones SNK. Toutefois nous notons que les fèves des clones TIKO ont des masses significativement supérieures à celles des fèves des clones SNK (Tableau 3).

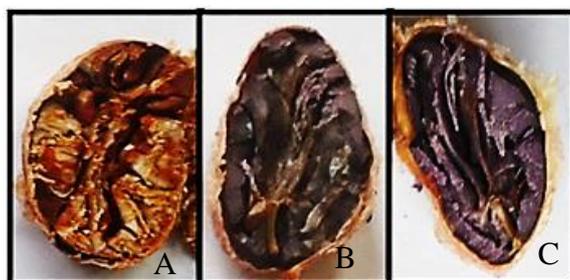
**Tableau 3** : Masses moyennes des fèves de clone et génotype différents

		Génotype	Masse des fèves en g	Nbre de fèves/cabosse
CLONES	TIKO	TIKO31	$1,91 \pm 0,27a$	$36 \pm 8,53$
		TIKO32	$1,85 \pm 0,27a$	$36 \pm 4,03$
	SNK	SNK416	$1,36 \pm 0,10b$	$30 \pm 2,58$
		SNK608	$1,48 \pm 0,08b$	$37 \pm 2,54$
	SNK467	$1,49 \pm 0,24b$	$34 \pm 4,86$	

Les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0,05$ .

##### III.1.1.2. Cut-test

L'épreuve de coupe a permis d'identifier 3 couleurs : blanche, ardoisée, violette/ardoisée (Figure 16).



**Figure 16** : Différentes couleurs obtenues à l'issue du cut-test : A- Fève blanche (SNK608), B- fève ardoisée (TIKO31 et 32), C- fève violette/ardoisée (SNK416 et 467) (Photographie prise par Omono le 15/01/2016).

### III.1.1.3. pH des fèves

La détermination du pH des différents clones a révélé des valeurs de  $6,39 \pm 0,05$  à  $6,62 \pm 0,07$ . Ces valeurs varient peu au sein des génotypes du clone TIKO :  $6,51 \pm 0,07$  pour TIKO31 et  $6,44 \pm 0,06$  pour TIKO32. Chez les clones SNK nous notons une gamme plus large :  $6,39 \pm 0,05$  (SNK467) à  $6,62 \pm 0,07$  (SNK608).

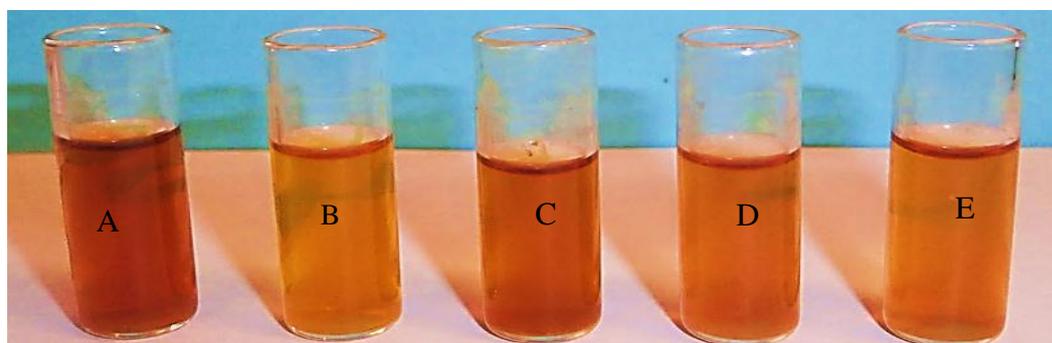
**Tableau 4** : pH de la poudre de cacao

		Génotype	pH de la poudre de cacao
TIKO		TIKO31	$6,51 \pm 0,07$
		TIKO32	$6,44 \pm 0,06$
CLONES	SNK	SNK416	$6,53 \pm 0,03$
		SNK608	$6,62 \pm 0,07$
		SNK467	$6,39 \pm 0,05$

### III.1.1.4. Colorations observées après incubation à l'acétone de la poudre de cacao

L'incubation à l'acétone 80% de la poudre de cacao délipidée de nos échantillons a révélé 3 couleurs (Fig. 17) : jaune, violet et marron clair.

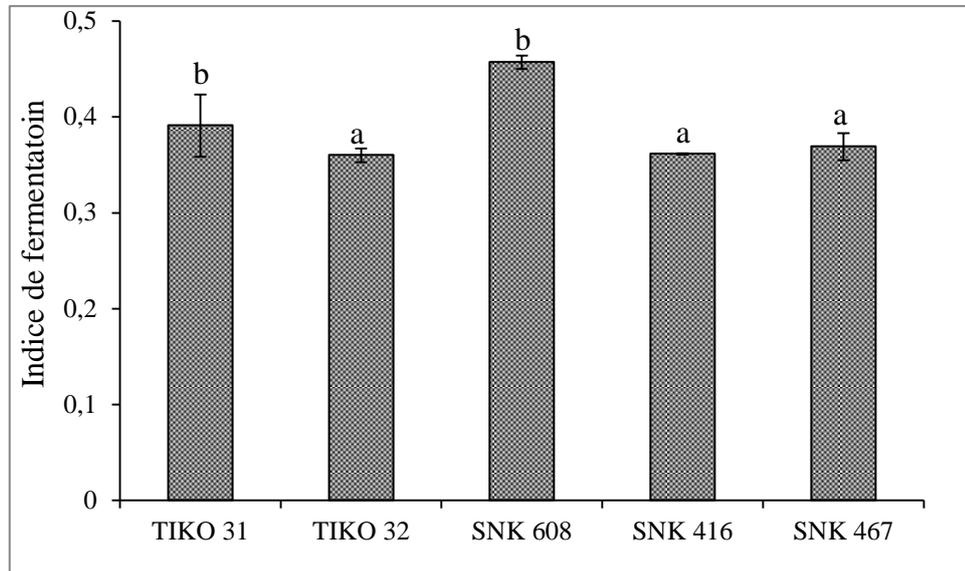
Les colorations jaune et violette sont présentes chez les clones SNK608 (Fig. 17B) et SNK 467(Fig. 17 A) respectivement. La coloration marron quant à elle est dominante et présente chez les clones : SNK416, TIKO32 et TIKO31 (Fig.20 C.D.E).



**Figure 17:** Coloration obtenue après incubation à l'acétone : A- SNK467 ; B- SNK608 ; C- SNK416 ; D- TIKO32 ; E- TIKO31 (Photographie prise par Omono le 10/05/2016).

### III.1.1.5. Indice de fermentation

La détermination de l'indice de fermentation des fèves révèle des valeurs de  $0,36 \pm 0,007$  à  $0,46 \pm 0,007$  ; notons que ces indices sont tous inférieurs à 0,5 (Figure 18).

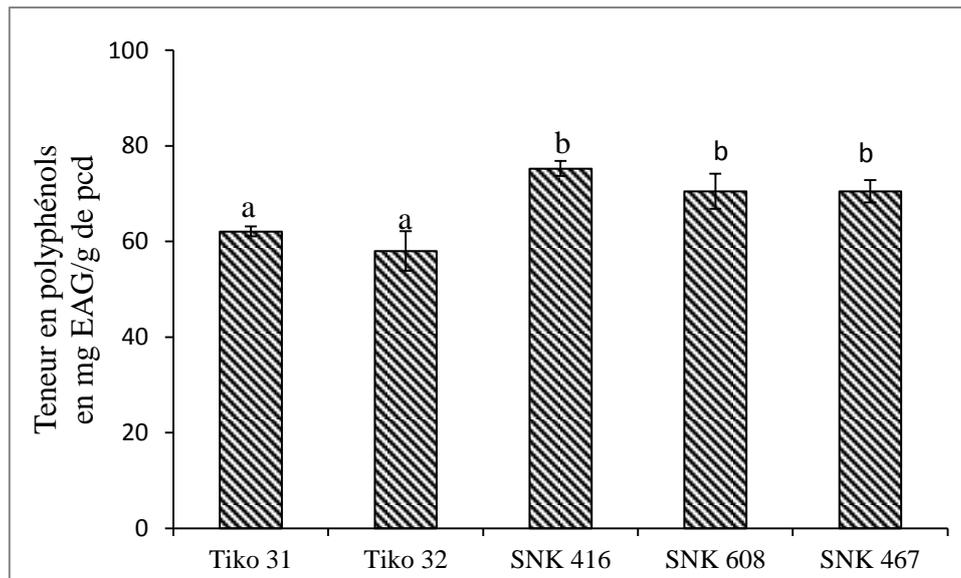


**Figure 18** : Indice de fermentation des différents génotypes. Chaque bande représente une moyenne  $\pm$  SE (n= 3 répétitions). Les bandes portant la même lettre ne sont significativement différentes à  $P < 0,05$ .

### III.1.2. Caractéristiques biochimiques

#### III.1.2.1. Polyphénols totaux

La détermination des teneurs en polyphénols totaux (PPT) des fèves de cacao révèle des valeurs de  $58,01 \pm 4,14$  à  $75,24 \pm 1,57$  mg EAG/g de pcd. Nous observons des teneurs inférieures à 100 mg/g pour tous les clones cependant, ces teneurs sont plus faibles chez les TIKO :  $62,11 \pm 1,01$  et  $58,01 \pm 4,14$  respectivement pour TIKO31 et TIKO32. Par contre chez les SNK la gamme varie de  $70,49 \pm 2,33$  à  $75,24 \pm 1,57$  mg/g (Figure 19).



**Figure 19 :** Teneurs en polyphénols totaux en mg d'EAG/g de pcd. Chaque bande représente une moyenne  $\pm$  SE (n=3répétitions). Les bandes qui portent la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0,05$ .

### III.1.2.2. Flavonoïdes totaux

Les teneurs en flavonoïdes totaux de nos extraits ont été déduites de la différence entre les polyphénols totaux et les non flavonoïdes. L'analyse de ces teneurs révèle des valeurs variant de  $32,73 \pm 4,34$  à  $46,07 \pm 4,11$  mg EAG/g de pcd. Les teneurs les plus faibles sont observées chez les clones TIKO :  $38,81 \pm 1,57$  et  $32,73 \pm 4,34$  mg d'EAG/g de pcd respectivement pour TIKO31 et TIKO32. Chez les clones SNK la gamme varie de  $40,33 \pm 2,73$  à  $46,07 \pm 4,11$  mg EAG/g. Les résultats obtenus à l'issue du calcul des ratios FT/PPT évoluent dans le même sens que ceux obtenus précédemment avec un ratio minimum de  $56,26 \pm 3,93\%$  (TIKO 32) et maximum de  $66,32 \pm 4,09 \%$  (SNK 608) (Tableau 5).

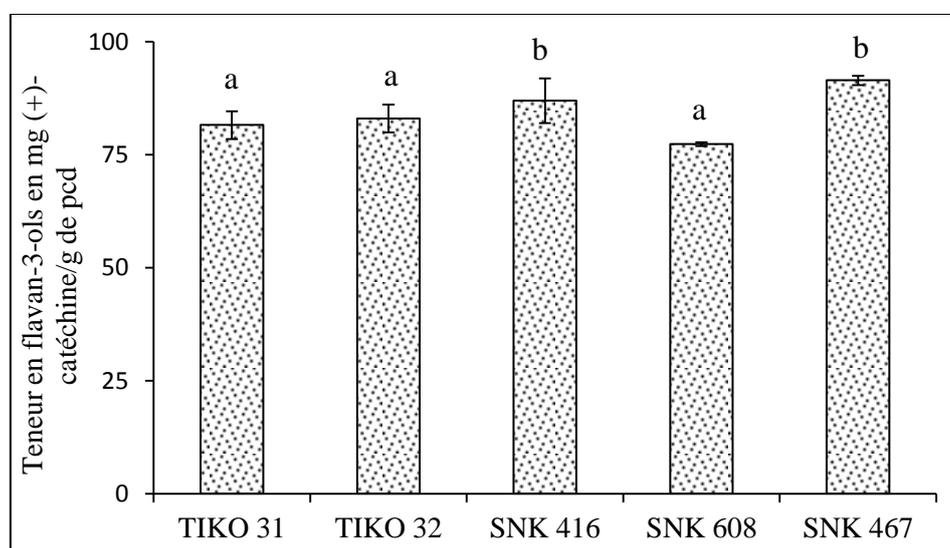
**Tableau 5 :** Teneurs en flavonoïdes totaux et ratio FT/PPT

		Géotype	Teneur en FT en mg EAG/g de pcd	Ratio FT/PPT en %
CLONES	TIKO	TIKO31	38,81 ± 1,57a	62,47 ± 1,53ab
		TIKO 32	32,73 ± 4,34a	56,26 ± 3,93a
	SNK	SNK416	43,03 ± 0,93b	57,21 ± 2,14a
		SNK608	46,01 ± 4,11b	66,32 ± 4,09b
		SNK467	40,33 ± 2,73a	57,16 ± 2,04a

Les valeurs portant la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0,05$ .

### III.1.2.3. Flavan-3-ols

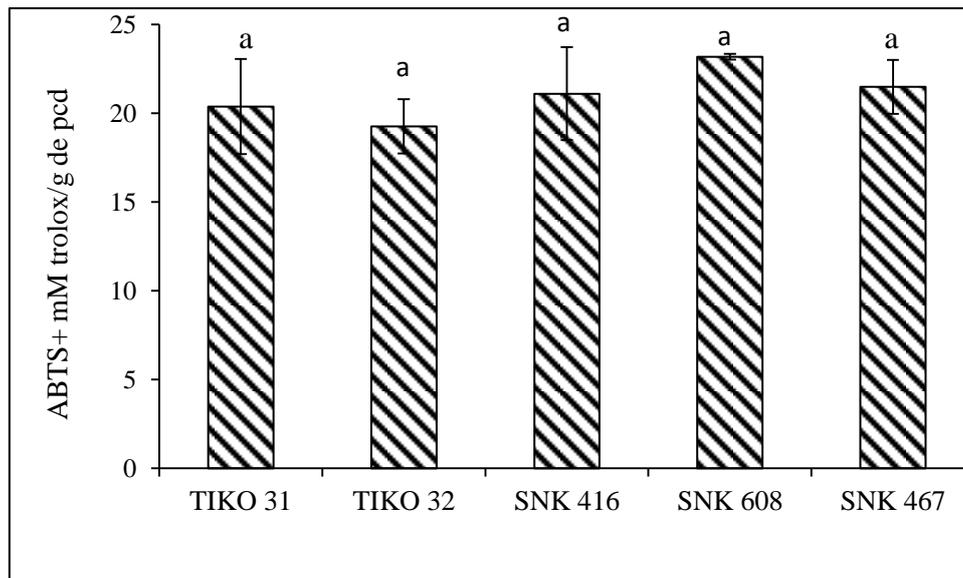
Les teneurs en flavan-3-ols de nos extraits ont été déterminées par le test de la vanilline et exprimées en mg(+)-catéchine/g de pcd. Les valeurs obtenues sont toutes inférieures à 100 mg/g. Chez les clones TIKO ces teneurs sont de  $81,56 \pm 3,08$  et  $83,02 \pm 3,08$  mg/g respectivement pour TIKO31 et TIKO32. Chez les clones SNK ces teneurs varient de  $77,35 \pm 0,41$ (SNK608) à  $91,45 \pm 3,08$  (SNK467) (Figure 20).



**Figure 20 :** Teneurs en flavan3-ols en mg (+)-catéchine/g de pcd. Chaque bande représente une moyenne ± SE (n= 3 répétitions). Les bandes portant la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0,05$ .

### III.1.2.4. Effet piègeur du radical ABTS<sup>+</sup>

La mesure du potentiel antioxydant des extraits de cacao à partir de l'ABTS<sup>+</sup> indique des valeurs comprises entre  $19,26 \pm 1,53$  et  $23,18 \pm 0,15$  mM de trolox/g de pcd. Chez les clones TIKO ce potentiel est de  $20,37 \pm 2,67$  et  $19,26 \pm 1,53$  respectivement pour les clones TIKO31 et 32. Les clones SNK quant à eux présentent un potentiel antioxydant variant de  $21,10 \pm 2,61$  à  $23,18 \pm 0,15$  ABTS<sup>+</sup> mM de trolox/g de pcd (Figure 21).



**Figure 21** : Capacité antioxydante des extraits phénoliques de la poudre de cacao délipidée en mM de trolox/g de pcd. Chaque bande représente une moyenne  $\pm$  SE (n= 3 répétitions). Les bandes portant la même lettre ne sont pas significativement différentes à  $P < 0,05$

### III.2. Discussion

Le cacao marchand utilisé essentiellement par les industries chocolatières est riche en composés phénoliques. La cacaoculture camerounaise est riche en clone trinitario tant introduits que locaux qui se distinguent par leurs traits morphologiques. Aussi une évaluation des caractéristiques physico-chimiques et biochimiques des fèves de deux d'entre eux TIKO et SNK (trinitarios locaux) a été réalisée. Cette évaluation a consisté en la mesure de la masse des fèves, l'épreuve de coupe ou cut-test, la détermination du pH des fèves, l'analyse des phénols totaux et des flavonoïdes.

La masse des fèves est un indicateur majeur pour l'acceptabilité des fèves par les industries chocolatières. Aussi la masse d'une bonne fève doit être supérieure à 1,05g, cette valeur correspond au minimum acceptable pour les fabricants de chocolat (Wood & Lass 1985, Adomako *et al.* 2003). Les valeurs obtenues révèlent que tant pour les clones TIKO que pour les clones SNK la masse des fèves est supérieure à 1,05g. Il est intéressant de noter qu'il existe également une différence significative entre la masse des fèves des clones TIKO et celle des fèves des clones SNK. Ces résultats s'accordent avec ceux de Lachenaud (1991) qui ont montré que le poids moyen d'une graine de cacao dépend du génotype maternel. Le second critère physique déterminant la qualité du cacao marchand est la couleur des fèves identifiable par l'épreuve de coupe ou cut-test. Ce dernier est utilisé pour évaluer les défauts et le degré de fermentation des fèves de cacao. C'est la méthode standard d'évaluation de la qualité telle que définie par les normes de qualité ICCO qui est fortement corrélée à leur intensité de fermentation (Chen 2014). Les fèves peuvent être divisées en 4 catégories en fonction de leur couleur : brune (entièrement fermentée); violette/brune ; violette (mal fermentée) ; et ardoisée (non fermentée) (Kealey *et al.* 2004). Les colorations blanche, ardoisée et violette/ardoisée obtenues traduisent l'état non fermenté de nos fèves. En effet la coloration des fèves de cacao est corrélée à leur teneur en anthocyanines et varie du blanc au violet intense avant fermentation (Afoakwa 2010). L'incubation de la poudre de cacao à l'acétone permettrait d'évaluer la richesse d'un cacao en anthocyanine ; les résultats obtenus montrent que nos extraits sont riches en anthocyanines. Ces résultats corroborent ceux d'Afoakwa 2010. Le degré de fermentation des fèves de cacao peut être déterminé soit par le cut-test soit par l'indice de fermentation (Jinap 2004). Ainsi lorsque l'indice de fermentation est inférieur à 1 les fèves sont considérées comme non ou partiellement fermentées dans le cas contraire elles sont fermentées (Khairul 2014). Les valeurs de l'indice de fermentation des fèves étudiées varient de 0,36 (TIKO32) à 0,46 (SNK608). Ces résultats sont similaires à ceux

d'Eyamo *et al.* (2016) sur les fèves non fermentées d'ICS 40 autre trinitario largement cultivé au Cameroun. De plus la valeur maximale dans l'ensemble de nos échantillons est inférieur à 0,5 ce qui atteste de la richesse des clones étudiés en anthocyanines. Cela est confirmé par le type de coloration observée à l'issue du cut-test (ardoisée et violette). Il est important de relever que le clone ayant la coloration jaune (SNK608) à l'issue de l'incubation à l'acétone possède l'indice de fermentation le plus élevé (0,46) et a présenté des fèves de couleur blanche à l'issue de l'épreuve de coupe.

Le pH est un critère important pour l'évaluation de la qualité du cacao (Ilangatileke *et al.* 1991). Les travaux d'Afoakwa *et al.* (2013) indiquent que le pH des fèves non fermentées est légèrement acide et compris entre 6 et 6,5. Les clones étudiés ont des valeurs de pH incluses dans cet intervalle (variant entre 6,39 (SNK467) et 6,62 (SNK608)). Nos résultats sont similaires à ceux obtenus par de Godom (2015) sur d'autres trinitario du Cameroun.

Il est bien connu que les fèves de cacao sont une source abondante des composés phénoliques : 12-18% de la matière sèche (Abbe & Amin 2008). La qualité des fèves est fortement corrélée à la teneur en ces composés car ils sont responsables de l'astringence et l'amertume des fèves non fermentées (Wollgast & Anklam 2000b). De manière générale, les teneurs en polyphénols totaux des fèves étudiées sont supérieures à 50 mg GAE/g de pcd. Ces valeurs sont légèrement inférieures à celles obtenues par Niemenak *et al.* (2006). Cependant il est bien connu que la teneur en polyphénols dépend de nombreux facteurs parmi lesquels la période de récolte. En effet les fèves utilisées pour nos travaux sont issues de cabosses récoltées en début de saison sèche (Novembre) ce qui pourrait justifier les faibles teneurs obtenues. De plus, les différences observées entre nos résultats et ceux de Niemenak *et al.* (2006) peuvent s'expliquer par le fait que la teneur en polyphénols totaux dépend de la méthode d'extraction et du solvant utilisé (Belscak *et al.* 2009). Cette teneur pourrait également varier en fonction de la méthode d'analyse car Niemenak *et al.* (2006) ont utilisé la méthode HPLC qui est plus précise que la colorimétrie utilisée au cours de nos travaux. Il est cependant intéressant de relever la différence significative entre les teneurs en polyphénols des clones TIKO et celles des clones SNK qui traduit ainsi la spécificité de chacun de ces clones. Les flavonoïdes représentent 60% des polyphénols totaux du cacao (Abbe & Amin 2008). Les ratios flavonoïdes/polyphénols totaux obtenus (FT/PPT) sont conformes à ces prédictions. Ceci indiquerait la richesse des clones étudiés en flavan-3-ols (épicatéchine, catéchines et procyanidines oligomères). Toutefois le clone SNK608 dont les fèves sont de couleur blanche s'est révélé le plus pauvre en flavan3-ols (< 80 mg équivalent catéchine).

Les flavonoïdes ont des effets bénéfiques sur la santé. Ils sont reconnus comme excellents antioxydants possédant des propriétés antiradicalaires et anticancérigènes (Abbe & Amin 2008). L'évaluation du pouvoir antioxydant de nos extraits phénoliques a été faite suivant la méthode TEAC, Celle-ci détermine l'activité antioxydante des composés hydrophiles et lipophiles qui peuvent se dissoudre dans une solution aqueuse ou de l'éthanol acidifié (Sánchez-Moreno 2002). Elle révèle que ces extraits possèdent des propriétés antioxydantes. Par ailleurs, les extraits des clones SNK présentent des pourcentages d'inhibition supérieurs à ceux des clones TIKO. Ceci se justifierait par leur richesse en flavan-3-ols, car les travaux de Wang *et al.* (2000) ainsi que ceux de Counet & Collin (2003) ont montré que les flavan-3-ols sont de puissants antioxydants.

## **CHAPITRE IV : IMPLICATION SUR LE SYSTEME EDUCATIF**

FICHE PEDAGOGIQUE DE PREPARATION D'UNE LECON DE SVT

**Etablissement :** LYCEE DE NSAM-EFOULAN

**stagiaire :** OMONO OMOKO Diane

**Domaine :** SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

**Classe :** 2<sup>nd</sup>e ALL

**Partie V :** ORGANISATION FONCTIONNELLE DES VEGETAUX CHLOROPHYLLIENS

**Effectifs :** 68 G : 24 F : 44

**Chapitre III :** RESULTATS DE L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE : LA PRODUCTION VEGETALE

**Période :** 11h30 – 12h15

**Titre de la leçon :** LES PLANTES PERFORMANTES

**Durée :** 45 mn

**Objectif pédagogique opérationnel :** A la fin de cette leçon, l'apprenant sera capable de :

- Citer les caractéristiques d'une plante performante
- Définir la notion de plante performante
- Décrire les différentes variétés d'une espèce de plante donnée

Etapes	Objectifs Pédagogiques Opérationnels Intermédiaires (O.P.O.I.)	Contenus spécifiques aux O.P.O.I	Matériel didactique	Activités		Evaluation	Durée
				De l'enseignant	De l'apprenant		
INTRODUCTION	1- Etablir le contrat Enseignant – Apprenants	- Titre de la leçon : Les plantes performantes	Livre programme	- Ecrit le titre de la leçon au tableau -Communique les OPO.	- Recopient le titre de la leçon - Recopient les OPO.		10 min
	2 – Déterminer l'intérêt de la séquence d'apprentissage	Connaissance de la diversité végétale et son importance.	Vécu quotidien	Amène les apprenants à déterminer l'intérêt de la séquence d'apprentissage	Déterminent l'intérêt de la séquence d'apprentissage.  <b>R1</b> : Connaitre la diversité végétale et son importance.	Nous sommes en saison des mangues, lorsque nous allons au marché nous retrouvons plusieurs types de mangue : nous parlons de variétés  <b>Q 1</b> : A partir de l'énoncé précédent relever l'apport de cette leçon en	

						terme de connaissance.	
<b>3 – Mobiliser les ressources</b>	<p><b>Prérequis :</b></p> <p>Influence des facteurs génétiques sur la production végétale.</p>	Leçon antérieure	Pose les questions de l'évaluation diagnostique.	<p><b>R2 :</b> Chaque variété de plante possède des caractères qui lui sont propres, ces derniers sont inscrits dans leur programme génétique. Il s'agit par exemple de la taille des graines, la résistance aux maladies et la durée du cycle végétatif.</p>	<p><b>Q2 :</b> Citer quelques caractères qui varient d'une variété à une autre.</p>		
<b>4 – Formuler le problème scientifique</b>	<p><b>- Problème scientifique : Comment nourrir une population sans cesse croissante en termes de quantité et de qualité?</b></p>	Leçon antérieure	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Présente la situation problème</li> <li>- Amène les apprenants à formuler le problème scientifique.</li> </ul>	<p>Analysent la situation -problème</p> <p>- Formulent le problème</p>	<p><b>Situation - problème</b></p> <p>La population mondiale est sans cesse croissante, aussi il faut la nourrir non pas seulement en quantité mais aussi</p>		

					scientifique : <b>R3 : Comment nourrir une population sans cesse croissante en terme de quantité et de qualité?</b>	en qualité. <b>Q3 :</b> Quelle(s) question(s) peut-on se poser ?	
<b>DEVELOPPEMENT</b>	<b>Citer les caractéristiques d'une plante performante</b>	<p><b>6.2.1. Les caractéristiques d'une plante performante</b></p> <p>Les plantes performantes se distinguent par leurs caractéristiques qui sont :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- un cycle végétatif court</li> <li>- une bonne productivité tant en quantité qu'en qualité</li> <li>- la résistance aux facteurs défavorables.</li> </ul>	Vécu quotidien	- Pose la ou les question(s) de l'évaluation formative.	<b>R4:</b> une grande productivité	<b>Q4 :</b> Proposer quelques caractéristiques des plantes performantes	
	<b>Définir la notion de plante performante</b>	<p><b>6.2.2. Notion de plante performante</b></p> <p>Une plante est dite performante lorsque ces caractéristiques permettent une culture économiquement rentable sur un terroir donné.</p>	Leçon du jour	- Pose la ou les question(s) de l'évaluation formative.	<b>R5 :</b> Une plante performante est celle-là qui produit en grande quantité en un laps de temps.	<b>Q5 :</b> Etant données les caractéristiques des plantes performantes, définir la notion de plante performante.	30 min

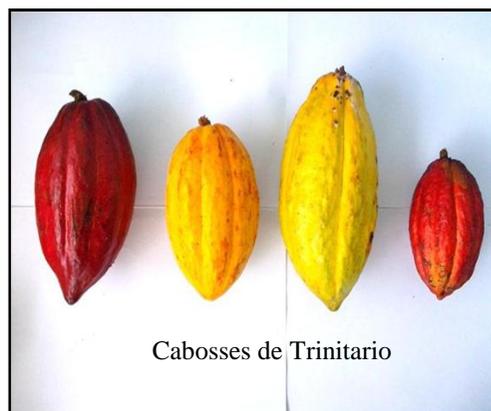
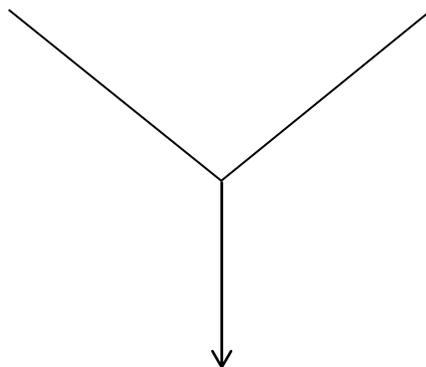
	<p><b>Décrire les différentes variétés d'une espèce de plante donnée</b></p>	<p><b>6.2.3. différentes variété pour une espèce donnée : cas de <i>Theobroma cacao</i></b></p> <p>Le cacaoyer est une plante qui existe sous trois principales variétés :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-les forastéros (cabosses vertes avant maturité et jaune à maturité),</li> <li>-les Criollos (cabosse rouge ou verte avant maturité)</li> <li>-et les Trinitarios, hybrides des deux variétés précédentes possède les caractères commun à ces derniers.</li> </ul>	<p>Planche en annexe</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Guide l'exploitation du document</li> <li>- Pose la ou les question(s) de l'évaluation formative.</li> </ul>	<p>-Analysent le document et répondent aux questions de l'évaluation formative</p> <p><b>R6 :</b> Forastéro, Criollo et Trinitario</p> <p><b>R7:</b> la coloration et la formes des cabosses.</p>	<p><b>Q6 :</b> Relever sur la planche les variétés de cacao</p> <p><b>Q7:</b> Relever les caractères qui les distinguent</p>	
<p><b>CONCLUSION</b></p>		<p><b>Evaluation sommative :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Citer les caractères d'une plante performante</li> <li>- Définir la notion de plante performante</li> </ul>	<p>Réfléchissent et répondent aux questions de l'évaluation sommative</p>	<p>Pose les questions de l'évaluation sommative</p> <p>Procède à des remédiation si cela est nécessaire</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Citer les caractères d'une plante performante</li> <li>- Définir la notion de plante performante</li> </ul>	<p>5 min</p>	



Cabosses de forastero. © C. Lanaud



Cabosses de criollo. © C. Lanaud



Cabosses de Trinitario

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Le cacao est une source abondante de composés phénoliques dont la teneur varie en fonction de nombreux paramètres notamment l'origine géographique, la saison de récolte et le traitement post-récolte (fermentation, séchage, stockage et torréfaction).

La présente étude avait pour objectif général d'évaluer les propriétés physico-chimiques et biochimiques des fèves de cacao de quelques clones TIKO et SNK afin de déterminer si elles pourraient constituer des traits distinctifs de ces derniers. Il en ressort que les fèves de cacao des clones étudiés possèdent des caractéristiques physico-chimiques (masse, couleur, pH) conformes aux normes du marché international. Cependant les fèves des clones TIKO présentent des masses significativement supérieures à celles des clones SNK. En ce qui concerne les propriétés biochimiques, les clones étudiés présentent des teneurs en composés phénoliques comprises entre 58,01 et 75 EAG/g de pcd. Une différence significative est observée entre ces dernières ; en effet les clones SNK présentent des teneurs en polyphénols plus élevées que celles des clones TIKO. Les ratios FT/PPT de ces clones sont conformes aux prédictions et indiqueraient la richesse de ces derniers en flavan-3-ols dont les teneurs varient entre 77,35 et 91,45 mg(+)-catéchine/g de pcd. L'incubation à l'acétone révèle que les fèves de couleur blanche (SNK608) sont les plus pauvres en anthocyanines.

L'évaluation de la capacité antioxydante par la méthode TEAC révèle que les échantillons étudiés possèdent cette propriété ; cette dernière étant fortement corrélée à la richesse en composés bioactifs. Ainsi, nous pouvons conclure que les différences observées sur le plan morphologique chez les clones TIKO et SNK s'étendraient aux caractéristiques physico-chimiques et biochimiques.

Dans le cadre d'un travail futur nous proposons :

- D'étendre l'évaluation physico-chimique et biochimique des fèves de cacao à d'autres clones compte tenu de la diversité du verger camerounais
- De réaliser l'évaluation de la capacité antioxydante des clones étudiés par l'utilisation d'autres méthodes DPPH, FRAP et ORAC.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abbe M.J., Amin I. (2008)** Polyphenols in cocoa and cocoa products: Is there a link between antioxidant properties and health? *Molecules* 13: 2190–2219.
2. **Adamson G.E., Lazarus S.A., Mitchell A.E. (1999)** LC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (10): 4184-4188.
3. **Afoakwa E.O. (2010)**. *Chocolate Science and Technology*. Wiley-Blackwell Publishers Oxford, UK. 22P.
4. **Amin A. Razieh Y. (2007)** Antioxidant and free radical scavenging potential of *Achillea santolina* extracts. *Food Chemistry* 104: 21–29
5. **Asha R., Duval B.F., Joelson V.L., Luis M.B.L., Paul R.V. (2006)** Efficacité des fongicides à base de cuivre dans le contrôle du balai de sorcière et de la pourriture brune en culture de rentes de cacao à Bahia, Brésil. In: 15th Cocoa Research International Conference, 8p.
6. **Assoumou J. (1977)** L'économie du cacao. Paris (France), Jean pierre Delarge edition: 351-380P.
7. **Beecher G.R. (2003)** Role of Flavonoids in the Diet Overview of Dietary; Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake1. *Nutrition. Revue* 3: 3248-3254.
8. **Belščak A., Komes D., Horzic D., Kovacevic' G.K., Karlovic D. (2009)** Comparative study of commercially available cocoa products in terms of their bioactive composition. *Food Research International* 42: 707–716.
9. **Biehl B., Brunner E., Passern D., Quesnel V.C., Adomako D. (1985)** Acidification, proteolysis and flavor potential in fermenting cocoa beans, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36:583-598.
10. **Blaha G., Lotode R. (1976)** Un critère primordial de sélection du cacao au Cameroun : La résistance à la pourriture brune des cabosses (*Phytophthora Palmivora*). *Café cacao thé*. 20 (2): 97-117.
11. **Braudeau J. (1969)** Le cacaoyer. Paris (France), Maisonneuve et Larousse, 304P.
12. **Bushra S., Farooq A., Roman P. (2007)** Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana Lam* trees. *Food Chemistry*, 104: 1106–1114
13. **Boizot N. Charpentier J.P. (2006)** Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier Amélioration, Génétique et

Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques pp: 79-82. Le Cahier des Techniques de l'Inra.

14. **Cao G., Shukitt-Hale B., Bickford P.C., Joseph J.A., McEwen J., Prior R.L. (1999)** Hyperoxia-induced changes in antioxidant capacity and the effect of dietary antioxidants. *Journal of Applied Physiology* 86(6):1817-1822.
15. **Cakirer M.S., Ziegler G.R., Gultinan M.J. (2010)** Seed Color as an Indicator of Flavanol Content in *Theobroma cacao* L. Preprint pp: 1-27.
16. **Cao G., Sofic E., Prior R.L. (1997)** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine* 22(5):749-760.
17. **Cao G., Prior R.L. (1998)** Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, 44: 1309–1315.
18. **Chen Y.S. (2014)**. Analyse morphologique et profils aromatiques, sensoriel du cacao du Sambirano. Mémoire de Master, Université de la Réunion. 19P.
19. **Chun O. K., Kim D.O., Moon H.Y., Kang H.G., Lee C.Y. (2003)** Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7240-7245.
20. **Cilas C., Despréaux D. (2004)** Improvement of cocoa tree resistance to Phytophthora diseases. Repères, CIRAD, ISSN 1251-7224, ISBN 2-87614-562-6,171.
21. **Counet C., Collin S. (2003)** Effect of number of flavonol unit on the antioxidant activity of procyanidins fractions isolated from chocolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 6816-6822.
22. **Cros E., Jeanjean N. (1995)** Qualité du cacao. Influence de la fermentation et du séchage. *Plantation, recherche, développement* 3 : 21-27.
23. **Crozier J., Thomas S.E., Aime M.C., Evans H.C., Holmes K.A. (2006)** Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. *Plant Pathologies* 55: 783-791.
24. **Demol J. (2002)** Amélioration des plantes, application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. Gembloux (Belgique), Les presses agronomiques de Gembloux, A.S.B.L (Ed) 460P.
25. **Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A.A., Capasso F. (1999)** Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sciences* 65 (4): 337-53.

26. **Dias L., Barriga P.J., Kageyama Y.P., Almeida C.V. (2003)** Variation and its distribution in wild cacao populations from the Brazilian Amazon. *Brazilian Archive of biology and technology* 46: 507-514.
27. **Di Stefano R., Cravero M.C., Gentilini N. (1989)** Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L'Enotecnico* 25: 83–89.
28. **Duthie G., Crozier A. (2000)** Plant-derived phenolic antioxidants. *Current Opinion in Clinical Nutrition and metabolic care* 11:43-47.
29. **Edenharder R., Günhage D. (2003)** Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research* 540: 1–18.
30. **Eskes A., Lanaud C. (1997)** L'amélioration des plantes tropicales. Montpellier (France), CIRAD: 170P.
31. **Eyamo E.J.V., De Taeye. C, Niemenak N., Youmbi E., Collin S. (2016)** Influence of acetic and lactic acids on cocoa flavan-3-ol degradation through fermentation-like incubations. *LWT - Food Science and Technology* 68: 514-522
32. **Gutteridge J.M.C., Halliwell B. (2000)** Free radicals and antioxidants in the year 2000: A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences* 899: 136–147.
33. **Godom A. (2015)** Activités antioxydantes de *Theobroma cacao* L. en rapport avec la couleur des cabosses et des fèves. Mémoire de Master, Université de Yaoundé I, Cameroun 82P.
34. **Haendler H. (1980)** The cut-test on kernels and cocoa beans. *Manufacturing confectioner* 79:3-6.
35. **Halliwell B. (1999)** Food- derived antioxidants. Evaluating their importance in wine. *Journal of Food Chemistry* 47 : 1035-1040
36. **Hammerstone J.F., Mitchell A.E. (1999)** Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47 (2): 490-496.
37. **Hansen C.E., Del Olmo M., Burric (1998)** Enzyme activities in cocoa beans during fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77: 273-281.
38. **Harborne J.B. (1989)** General procedures and measurement of total phenolics. Harborne J.B. (Eds) *Methods in plant biochemistry*. London, Academic Press: 28P.

39. **Havsteen B.H. (2002)** The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology Therapeutic* 96: 67– 202.
40. **Hii C.L., Law C.L., Suzannah S., Misnawi, Cloke M. (2009)** Polyphenols in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Asian Journal of Food and Agro-Industry* 2(04): 702-722.
41. **Holland B., Welch A., Unwin J.D., Buss, D.H., Paul A.A. (1991)** *Mc Cance and Widdowson's the composition of foods*. London: RSC/MAFF.
42. **ICCO (2007)** Annual forecasts of production and consumption and estimates of production levels to achieve equilibrium in the world cocoa market: 10P.
43. **ICCO (2016)** Annual forecasts of production and consumption and estimates of production levels to achieve equilibrium in the word cacao market:10p.
44. **Ilangantileke S.G., Wahyudi T., Garcia Bailon M.A. (1991)** Assessment methodology to predict quality of cocoa beans for export. *Journal of Food Quality* 14:481-496.
45. **Kealey K.S., Snyder R.M., Romanczyk L.J., Hammerstone J.F., Buck M.M., Cipolla G.G. (2004)** "Cocoa extracts prepared from cocoa solids having high cocoa polyphenol contents. Incorporated." Patent US 6,737,088 B1.
46. **Kelm M.A., Johnson J.C., Robbins R.J. (2006)** High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (5): 1571-1576.
47. **Kim H., Keeney P.G. (1984)** Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. *Journal of Food Science* 4: 1090–1091.
48. **KramLing T.E., Singleton V.E. (1969)** An estimate of the nonflavonoid phenols in wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 20 (2): 86–92.
49. **Lachenaud P., Paulin D., Ducamp M., Thevenin, J-M. (2007)** Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana. *Journal of Food and horticulture* 113 (4): 313-321.
50. **Lanaud C., Risterucci A.M., Pieretti I., N’Goran J.A.K., Fargeas D. (2004)** Characterization and genetic mapping of resistance and defence gene analogs in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Molecular Breeding* 13: 211-227.
51. **Lachenaud P. (1991)** Facteurs de la fructification chez le cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) Influence sur le nombre de graines par fruit. Thèse de doctorat, Institut national agronomique paris-grignon, France.pp. 7-27.

52. **Lerceteau E., Robert T., Pétiard V., Crouzillat D. (1997).** Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* L. accessions using RAPD and RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 10-19.
53. **Lopez A.S., Dimick P.S. (1995)** Cocoa fermentation In : Reed, G., Nagodawithana, T.W.(Eds.), *Enzymes, Biomass, Food and Feed*. VCH, Weinheim, pp: 561–577.
54. **Loor Solórzano R.G. (2007)** Contribution à l'étude de la domestication de la variété de cacaoyer Nacional d'Équateur : recherche de la variété native et de ses ancêtres sauvages. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur en Sciences Agronomiques. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. 201 p.
55. **Macheix J.J., Fleuriet A.P., Sarni-Manchado (2006)** Composés phénoliques dans la plante - Structure, biosynthèse, répartition et rôles. *Les polyphénols en agroalimentaire*. Lavoisier, Paris, 270P.
56. **Marc F., Davin A., Deglene-Benbrahim L., Ferrand C., Baccaunaud M., Fritsch P. (2004)** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Medical Sciences (Paris)*. 20(4):458-463.
57. **Markham K.R. (1982)** *Technics of flavonoids identification*. Academic Press (London); Chap.1 et 2: 1-113.
58. **McCord J.M. (2000)** The evolution of free radicals and oxidative stress. *American Journal of Medicine* 108:652
59. **Morello Michael J., Shahidi F., Chi-Tang H. (2002)** *Free Radicals in Food: Chemistry Nutrition and Health Effects*; ACS Symposium Series 807. Washington,D.C, American Chemical Society: 356P.
60. **Mossu G. (1990)** Le cacaoyer. *Le technicien d'agriculture tropicale* N°14 pp: 9-109.
61. **Mossu G. (1992)** *Cocoa* London and Basingstoke, Macmillan Press Limited: 103P.
62. **Motamayor J.C., Risterucci A.M., Heath M., Lanaud C. (2003)** Cacao domestication II: progenitor germplasm of the Trinitario cacao cultivar. *Heredity* 91: 322–330.
63. **Motamayor J.C., Risterucci, A.M., Lopez P.A., Ortiz C.F., Moreno A., Lanaud C. (2002)** Cacao domestication. I. The origin of the cacao cultivated by Maya. *Heredity* 38: 380-386.
64. **Motamayor (2008)** Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L.) *PLoS One* 3 (10): e3311. doi: 10.1371/journal.pone.0003311.

65. **Nakatani N. (2000)** Phenolic antioxidants from herbs and spices. *Biofactors* 13: 141–146.
66. **Nielsen D.S. (2006)** The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations. PhD Thesis. Department of Food Science, Food Microbiology The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark. Pp. 5- 7.
67. **Niemenak N., Eyamo J.V., Effa O.P., Youmbi E. (2014)** Physical and chemical assessment quality of cocoa beans in south and center regions of Cameroon. *Syllabus Review, Science Serie 5*: 27 – 33.
68. **Niemenak N., Rohsius C., Elwers S., Omokolo N.D., Lieberei R. (2006)** Comparative study of different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. *Journal of Food Composition and Analysis* 19 (6-7): 612-619.
69. **Nijveldt, R.J., van Nood E., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Norren K., van Leeuwen P.A.M. (2001)** Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74: 418-425.
70. **Nyasse S. (1997)** Etude de la diversité de *phytophthora megakarya* et caractérisation de la résistance du cacaoyer (*T. cacao* L.) à cet agent pathogène. Thèse de doctorat, Institut Nationale Polytechnique. Toulouse, France. 133P.
71. **Paulin D. (1997)** Les méthodes statistiques des essais de sélection, stratégies d'amélioration des plantes pérennes. In: *Biométrie et génétique quantitative*. Montpellier (France), CIRAD : pp. 243-257.
72. **Pellegrini N., Serafini M., Colombi Del Rio D., Salvatore S., Bianchi M., Brighenti F. (2003)** "Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different in Vitro Assays". *Journal of Nutrition* 133: 2812-2819.
73. **Phipps S., Sharaf M., Butterweck V. (2007)** Assessing antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements. *Pharmacopeial Forum* 33:810-814.
74. **Prior R.L., Cao G. (1999)** In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine* 27(11-12):1173-1181.
75. **Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. (1999)** Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231–1237.
76. **Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. (2003)** Flavonoids: Promising anticancer agents. *Medical Research Review* 23: 519–534.

77. **Ribereau-Gayon P. (1968)** Les composés phénoliques des végétaux. Paris, Edition Dunod : 254P.
78. **Rössner S. (1997)** Chocolate-divine food, fattening junk or nutritious supplementation? *European Journal of Clinical Nutrition* 51(6): 341–345.
79. **Roche G., Cuello J., Hiciano V., Cardenas F., Mendez L.A., Dominguez P. (1987)** Amélioration de la qualité du cacao en république Dominicaine. In : *Proceedings 10<sup>e</sup> Conférence internationale sur la recherche cacaoyère*. Nigeria, Cocoa Producers Alliance: pp. 801- 805.
80. **Rohsius C., Anderson M., Niemenak N., Sukha D., Lieberei R. (2006)** Fermentation quality and its dependence on test a structure and transport processes. In: *Proceeding 15th International Conference of Cocoa*. San José. Costa rica, Cocoa Producers Alliance: pp.168-173.
81. **Jinap S. (2004)** “Cocoa-Wonders for chocolate Lovers,” Inaugural lecture note, no.69, UPM.
82. **Shamsuddin S.B., Dimick P.S. (1986)** Qualitative and quantitative measurements of cocoa bean fermentation in P.S. Dimick ed, *Proceedings of cocoa biotechnology*. Department of food science, Penn state university, university park, PA pp :55 - 78
83. **Khairul B.S. (2014)** “Impact of fermentation duration on the quality of malaysian cocoa beans using shallow box.” *KKU Research Journal* vol.19 (Suppl.I.), pp. 74-80.
84. **Sánchez-Moreno C. (2002)** Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science Technology International* 8(3):121-137.
85. **Sharififar F., Moshafi M.H., Mansouri S.H., Khodashenas M., Khoshnoodi M. (2007)** In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 18: 800–805
86. **Sharma Om P., Bhat T.K. (2009)** DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry* 113 (4): 1202.
87. **Singleton V.L., Orthofer R., Lamela-Raventós R.M. (1999)** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152–178
88. **Tserrevitinov, Gourieva (1979)** Recherche d’un indice de fermentation. *Laboratoire de chimie- technologie de l’IFCC* pp.115.

89. **Swanson J.D., Carlson, J.E., Gultinan, M.J. (2008)** Comparative flower development in *Theobroma cacao* based on temporal morphological indicators. International Journal of Plant Science 169 (9): 1187-1199.A
90. **Tahi G.M., Kébé B.I., N’Goran J.A.K, Sangare A., Mondeil F., Cilas C., Eskes A.B. (2006)** Expected selection efficiency for resistance to cacao pod rot (*Phytophthora palmivora*) comparing leaf disc inoculations with field observations. Euphytica 149: 35–44.
91. **Vera B.J. (1987).** Antecedentes históricos. Manual del cultivo de cacao. INIAP, EET-Pichilingue. Quevedo, Ecuador, pp: 6-9.
92. **Vos J.G.M., Ritchie B.J., Flood J. (2003)** A la découverte du cacao : Un guide pour la formation des facilitateurs. Centre for Agricultural Biosciences International 110: 46 P.
93. **Wang, J.N., Chen Y.J., Hano Y., Taro N., Tan R.X. (2000)** Antioxydant activity of polyphenols from seed of *Vitis amurensis* in vitro. Acta Pharmacologyca. Sinica: 21: 633-636.
94. **Weber J., Tarka Jr S.M., Powis T.G., Valdez F., Hester T.R. (2002)** Cacao usage by the earliest Maya civilization. *Journal of Nature* 418: 289-290.
95. **Wei L, Yanxiang G., Jian Z., Qi W. (2007)** Phenolic, Flavonoid, and Lutein Ester Content and Antioxidant Activity of 11 Cultivars of Chinese Marigold. Journal of Agriculture and Food Chemistry 55: 8478–8484.
96. **Whitlock B., Bayer C., Baumd C. (2001)** Phylogenetic relationship and floral evolution of the Byttnerioideae (“Sterculiaceae” or Malvaceae) based on sequences of the chloroplast gene F. Systematic Botany 26: 420-437.
97. **Wollgast J., Anklam E. (2000a)** Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. Food Research International 33 (6): 423-447.
98. **Wollgast J., Anklam E. (2000b)** Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in different cocoa (*Theobroma cacao* L.) clones in terms of their phenolics and anthocyanins contents. Journal of Food Composition and Analyse 19:612-619.
99. **Wood G.A.R., Lass R.A. (1985)** Cocoa. Tropical Agriculture Series (4<sup>th</sup> ed.). England, Longman Scientific and Technical Publishing Limited, Essex: 620P.
100. **Wright H. (1999)** Cocoa or *Theobroma cacao* Its botany, cultivation, chemistry and diseases. Dehli 110035, Edition Biotechnology Books: 249P.

101. **Wu X., Beecher G.R., Holden J.M., Haytowitz D.B., Gebhardt S.E., Prior R.L.** Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2004; 52(12):4026-4037.
102. **Yao L.H., Jiang Y.M., Shi J., Tomas-Barberan F.A., Datta N., Singanusong R., Chen S.S. (2004).** Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition* 59:113-122.
103. **Yao J., Wang J.Y., Liu L. (2010)**"Anti-oxidant effects of resveratrol on mice with DSS-induced ulcerative colitis." *Archive of Medical Research* 41: 288-294.
104. **Zhang. D., Yasumori H. (2004)** Phenolics. ascorbic acid. carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chemistry* 88. 503-509.

## ANNEXES

### Annexe I : Détermination de la gamme d'étalonnage des polyphénols et flavonoïdes totaux

Réactif Folin-Ciocalteu (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Carbonate de Sodium (mL)	1	1	1	1	1	1
DO à 725 nm	0	0,086	0,226	0,278	0,41	0,633
	0	0,087	0,159	0,289	0,432	0,648
	0	0,086	0,159	0,292	0,435	0,616

### Annexe II : Indice de fermentation

Clones	DO 460 nm	DO 530 nm	Ratio
TIKO 31	0,557 ± 0,009	1,428 ± 0,142	0,391 ± 0,032
TIKO 32	0,484 ± 0,009	1,342 ± 0,001	0,360 ± 0,007
SNK 608	0,315 ± 0,013	0,690 ± 0,031	0,457 ± 0,007
SNK 416	0,528 ± 0,062	1,459 ± 0,247	0,361 ± 0,0007
SNK 467	0,638 ± 0,026	1,725 ± 0,032	0,369 ± 0,014

### Annexe III : Tableau récapitulatif des teneurs en PPT, FT et flavan-3-ols

Clones	Génotypes	Teneurs en polyphénols totaux en mg d'EAG/g de pcd	Teneurs en flavonoïdes totaux en mn d'EAG/g de pcd	Teneurs en flavan-3-ols en mg/g de catéchine
TIKO	TIKO 31	62,11 ± 1,01	38,81 ± 1,57	81,56 ± 3,08
	TIKO 32	58,01 ± 4,14	32,73 ± 4,34	83,02 ± 3,08
SNK	SNK 416	75,24 ± 1,57	43,03 ± 0,93	86,94 ± 4,93
	SNK 608	70,49 ± 3,66	46,07 ± 4,11	77,35 ± 0,41
	SNK 467	70,49 ± 2,33	40,33 ± 2,73	91,45 ± 1,02

### Annexe IV: Préparation de la solution d'ABTS

- Peser 67.5 mg de Persulfate ( $K_2S_2O_8$ ) et y ajouter 100 mL d'eau distillée
- A la solution ainsi obtenue ajouter 10 mg d'ABTS
- La solution finale d'ABTS est gardée à l'obscurité pendant 12 à 16h

### Annexe V : Préparation du tampon phosphate $KH_2PO_4/Na_2PO_4$

- Préparation de la solution de  $KH_2PO_4$  (solution A)  
Pour un volume de 250 ml d'eau prélever 2,26 g de  $KH_2PO_4$
- Préparation de la solution de  $Na_2PO_4$  (solution B)  
Pour un volume de 250 ml d'eau prélever 2,96 g de  $Na_2PO_4$

Pour préparer 100 ml de tampon phosphate, prélever 26,2 ml de la solution B et compléter avec A =  $V_B - 100$ .

#### **Annexe VI : Préparation de la solution stock de Trolox**

A partir d'une concentration 1 Mm, dissoudre 0,125g de Trolox dans 500ml de tampon phosphate. Une agitation douce est requise pour dissoudre le cristal. Après la dissolution complète du cristal, préparer différentes concentrations pour la courbe d'étalonnage.

## Annexe VII : Appareils et verrerie

Appareils	Marques	
Agitateur magnétique	Bunsen	
Bain marie	PRECISTHERM S-388	
Balance	KERN 572	
Centrifugeuse	LABOFUGE 400R	
Lyophilisateur		
pH-mètre		
Réfrigérateur	LIEBHERR 001	
Spectrophotomètre	JENWAY Model 6305	
Vortex mixeur	STUART SA7	

**Verrerie :**

-barreaux et baguettes aimantées	-papiers filtre
-bêchers	-pissettes
-dispositif de filtration sous vide	-pipettes
-éprouvettes graduées	-piluliers
-entonnoirs	-portoirs
-erlenmeyers	-spatules
- fioles jaugées	-papiers filtre
-mortiers et pilons	-tubes à essai