



HAL
open science

Méthodologie de quantification des tannins condensés dans les ressources tropicales

Cassandra Letapin

► **To cite this version:**

Cassandra Letapin. Méthodologie de quantification des tannins condensés dans les ressources tropicales. [Stage] France. Université des Antilles - Site de Guadeloupe (UA), FRA. 2016, 26 p. hal-02796410

HAL Id: hal-02796410

<https://hal.inrae.fr/hal-02796410>

Submitted on 5 Jun 2020

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

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



INRA
SCIENCE & IMPACT

Universite
des Antilles

Méthodologie de quantification des tannins condensés dans les ressources tropicales



LÉTAPIN Cassandra
Année 2015/2016

Licence Biologie/Biochimie - Parcours BSS

Maître de stage: Mme MARIE-MAGDELEINE Carine

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont aidé lors de la rédaction de ce rapport.

En premier lieu, j'adresse mes remerciements à Mme MANDONNET Nathalie, directrice de l'Unité de Recherche Zootechnie, pour m'avoir permis d'effectuer mon stage au sein de cette Unité.

Je remercie vivement mon maître de stage, Mme MARIE-MAGDELEINE Carine, pour son accueil, sa disponibilité, son suivi permanent, ses explications, ses judicieux conseils et ses qualités humaines.

Je remercie aussi mon tuteur, Mr FANCHONE Audrey, qui m'a guidé dans mon travail et qui m'a aidé à trouver des solutions pour avancer.

Je désire remercier Mme CALIF Suzitte et Mr PHILIBERT Lucien, pour leur encadrement et leurs précieuses directives.

Je suis très reconnaissante envers Mme FLAINVILLE Mélanie, pour sa gentillesse et son professionnalisme au niveau de la gestion administrative.

Enfin, je tiens à remercier tout le reste de l'équipe, ils font de l'Unité de Recherche Zootechnie, un cadre agréable et propice au travail.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	1
SOMMAIRE.....	2
RÉSUMÉ	4
L'ORGANISME D'ACCEUIL.....	5
• Institut National de Recherches Agronomiques	5
• Unité de Recherches Zootechniques.....	5
<u>INTRODUCTION</u>	6
1) <u>Les parasites gastro-intestinaux des petits ruminants</u>	7
1.1 - Les petits ruminants : caprins et ovins.....	7
1.2 - Le parasite <i>Haemonchus contortus</i>	8
2) <u>Les moyens de lutte contre le parasitisme</u>	9
2.1 - Les principaux moyens de lutte	9
• Les moyens de lutte en phase libre	9
• Les moyens indirects de lutte.....	10
2.2 - La phytothérapie.....	10
• Les métabolites secondaires	10
• Les tanins condensés	11
3) <u>Méthodes biologiques de caractérisation des molécules</u>	12
3.1 - Les méthodes principales	12
3.2 - La Spectroscopie Proche Infra Rouge (SPIR)	12
• Définition	12
• Chimiométrie	13
• Calibration	14
I) <u>MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>	15
I.1 <u>Matériels</u>	15
I.1.1 - Le matériel végétal	15
I.1.2 - Les équipements de laboratoire	16
I.2 <u>Méthodes</u>	17
I.2.1 - L'extraction	17
• But	17
• Principe	17
• Mode opératoire	17

I.2.2 - Le dosage	18
• But	18
• Principe	18
• Mode opératoire.....	18
I.2.3 - La Spectroscopie Proche Infra Rouge	18
• But	18
• Principe	18
• Mode opératoire	19
• Critère d'analyse des résultats	19
II) <u>RÉSULTATS</u>.....	20
• Statistique descriptive des échantillons de références.....	20
• Analyse qualitative	21
• Analyse quantitative.....	21
• Évaluation de la prédiction	22
III) <u>DISCUSSION</u>.....	22
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	24
 ANNEXES.....	 25
RÉFÉRENCE BIBLIOGRAPHIQUE	26

RÉSUMÉ

Les petits ruminants sont souvent victimes du parasitisme gastro-intestinal. Dans l'optique de palier à ce fléau, ces animaux pourraient être nourri avec des aliments ayant des vertus médicamenteuses: les alicaments naturels.

Pour l'industrie alimentaire, la connaissance de la composition physico-chimique de ces alicaments est primordiale. Cependant, les analyses de laboratoire permettant de maîtriser ces données sont difficiles à mettre en oeuvre, c'est pour cela que les scientifiques cherchent d'autres méthodes plus rapides, tout en étant aussi efficaces et fiables.

Depuis quelques années, la Spectroscopie Proche Infra-Rouge (SPIR), est une méthode de plus en plus démocratisée dans le secteur de l'alimentation. En effet, c'est un moyen polyvalent, non destructif, qui ne nécessite pas de préparation d'échantillons et qui permet d'éliminer toute utilisation de produits nocifs. C'est donc une méthode respectueuse de l'environnement. La SPIR utilise des traitements mathématiques afin d'extraire des informations à partir des spectres obtenus après avoir scannés les échantillons. Ainsi, des méthodes de régression permettent par exemple, de construire des modèles de prédictions.

Ici, la SPIR est mise en oeuvre dans une étude visant à obtenir les caractéristiques d'une molécule, les tanins condensés (TC), contenue dans les plantes anthelminthiques données aux animaux, pour lutter contre les parasites gastro-intestinaux.

On cherche, grâce à cela, à obtenir des informations d'un point de vue quantitatif, tel que la teneur en tanins condensés, mais aussi d'un point de vue qualitatif, tel que la nature ou le type de tanins contenu dans les plantes.

L'objectif de ce stage, est d'évaluer la SPIR, pour la mise en place d'un modèle de prédiction de la composition physico-chimique des TC dans les plantes anthelminthiques.

À l'issue de cette analyse on note désormais, que la SPIR ne permet pas de faire de prédiction par rapport à la qualité, ni par rapport à la quantité. Cependant, elle donne la possibilité d'établir des classes de teneur en TC, selon le profil spectrale des plantes scannées.

L'ORGANISME D'ACCEUIL

- Institut National de Recherches Agronomiques

L'Institut National de la Recherche Agronomique, a été créé en 1946. Les recherches entreprises à l'INRA concernent trois domaines extrêmement liés: l'alimentation, l'agriculture et l'environnement. Cette structure a pour but de mettre la science et la technologie au service d'une agriculture compétitive et durable, d'assurer une alimentation saine et de qualité, tout en préservant et en valorisant l'environnement. Le centre Antilles-Guyane se situe à Petit-Bourg en Guadeloupe. Il comprend deux unités expérimentales:

- Le domaine expérimental de coproduction végétal de Duclos/Godet (Petit-Bourg)
- Le domaine expérimental de production et santé animale de Duclos/Gardel (Le Moule)

Ces domaines sont le support des travaux menés dans les trois unités de recherches :

- Unité de Recherches Agro-Système Tropicaux (URASTRO)
- Unité de Recherches Zootechniques (URZ)
- Unité Mixte de Recherches Qualité des Fruits et Légumes Tropicaux (UMR QUALITROP)

- Unité de Recherches Zootechniques

Cette unité de recherche a pour mission principale, l'étude des contraintes majeures d'origines animales, végétales, biologiques, climatiques et techniques qui touchent les productions (bovins, caprins, porcins, ovins, lapins) dans les zones tropicales.

L'objectif de l'URZ est de:

- valoriser les ressources végétales en alimentation et en santé animal
- valoriser les ressources animales
- concevoir et évaluer des systèmes d'élevages économes et durables.

On y trouve des structures diverses permettant de mener à bien ces travaux:

- Un laboratoire de spectrométrie/chromatographie
- Un laboratoire d'immunologie
- Des laboratoires de biologie, biochimie et de biologie moléculaire
- Un laboratoire d'optique, contenant différents types de microscopes
- Un laboratoire de croscopie, pour l'analyse des crottes d'animaux

INTRODUCTION

Les pays situés en zone tropicale voient leur population croître au fil des années. Cela les incite donc, à intensifier et à améliorer les systèmes de productions agricoles.

On constate en effet, une augmentation de la production mondiale de viande.

Les petits ruminants (*Capra hircus* et *Ovis aries*), jouent un rôle important dans les systèmes d'élevages. Ces animaux fournissent de la viande, mais également d'autres produits comme le lait, les fibres, le fumier. L'élevage de ceux-ci se révèle intéressant, car ils présentent de nombreux avantages: ce sont des animaux rustiques, qui s'adaptent facilement aux conditions difficiles et permettent de valoriser les ressources locales. Cependant, les pays tropicaux sont confrontés à de fortes contraintes environnementales, ce qui limitent les productions animales et génèrent un décalage entre l'offre et la demande des populations. La Guadeloupe, par exemple produit seulement environ 14% de sa consommation de viande caprine et ovine.

Parmi ces contraintes, on note principalement l'infection des parasites gastro-intestinaux chez les petits ruminants. Ces parasites sont à l'origine de nombreuses pathologies, mais aussi d'une baisse, tant quantitative que qualitative, de la production de viande et des autres produits (Marie-Magdeleine C. et al., 2009)

Des moyens de luttés contre ce fléau comme les vermifuges sont connus, mais ceux-ci sont tolérés uniquement pour un usage occasionnel, par les cahiers de charge d'agriculture biologique et ne présentent qu'une solution à court terme. En effet, ces méthodes connaissent des limites. Les animaux au pâturage sont constamment exposés aux parasites et se trouvent donc ré-infectés. On note aussi que ces traitements retardent le développement d'une immunité chez les jeunes animaux. De plus, certains parasites développent une résistance aux vermifuges.

L'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), a entrepris d'appliquer et d'évaluer une méthode de traitement ciblé mise au point pour les petits ruminants.

Leur but est de chercher des solutions plus naturelles, soucieuses de l'environnement mais aussi préventives. L'une d'elles consisterait à nourrir les animaux de plantes anthelminthiques à tanins condensés. Les tanins condensés sont les métabolites secondaires de ces plantes et sont utilisés comme principe actif. Les principes actifs sont des molécules utilisés à des fins thérapeutiques.

À l'Unité de Recherches Zootechniques (URZ) de l'INRA, des séries de tests sont réalisées, tout d'abord in vitro, c'est-à-dire directement sur le parasite. Puis in vivo, sur l'hôte. Elles ont pour but de déterminer les doses à administrer aux animaux et les effets

secondaires qui pourraient exister. Pour ce faire, il est primordial de connaître la teneur en tanins condensés des plantes anthelminthiques. Cette teneur est variable en fonction de nombreux paramètres, comme les conditions de récolte, de culture ou encore l'âge des plantes. Les techniques les plus souvent utilisées pour déterminer des concentrations sont les dosages. Cependant, le dosage des tanins condensés est très délicat car ils ont une structure complexe, mais aussi parce que ces méthodes sont diverses et ciblent des sites différents, ce qui les rend alors discutables. C'est pour cela, qu'il est important de d'abord chercher à caractériser les tanins condensés afin de trouver des méthodes de dosages simplifiées.

Ici, la Spectroscopie Proche Infra Rouge (SPIR) sera utilisée dans le but de typer et de classer ces molécules, mais aussi de les quantifier dans les ressources végétales.

À notre connaissance, certaines études ont déjà été menées dans le but d'évaluer le potentiel de la SPIR pour le dosage des tanins condensés (Clark D.H. ; Ralphs M.H. ; Lamb R.C et al., 1987). Cependant, très peu ont été faites en milieu tropical et humide pour les plantes à vertus anthelminthiques.

L'objectif du stage sera donc d'évaluer le potentiel de la SPIR, en premier lieu pour discriminer des familles de tanins condensés, c'est une évaluation qualitative. En deuxième lieu, pour quantifier les tanins condensés dans les matières premières tropicales utilisées dans l'alimentation des animaux.

Tout d'abord, une synthèse bibliographique sera abordée, ensuite le matériel et méthodes qui exposera les différents protocoles utilisés sera présenté. Enfin, une discussion permettra de commenter et de faire une analyse critique des résultats recueillis précédemment.

1) Les parasites gastro-intestinaux des petits ruminants

Les petits ruminants des zones tropicales, sont depuis plusieurs années victimes de parasitisme lié aux strongles digestifs. Ce parasitisme constitue la pathologie majeure des petits ruminants d'élevage. En Guadeloupe par exemple, 80% de la mortalité des caprins avant le sevrage est liée aux strongles gastro-intestinaux et principalement à *Haemonchus contortus*.

1.1 - Les petits ruminants : caprins et ovins

La grande qualité nutritionnelle des caprins et des ovins, fait de ces animaux des espèces très appréciées pour la production de viande.

Les caprins regroupent l'ensemble des animaux communément appelés « cabris ». La principale race de caprins élevée en Guadeloupe, est le « cabri créole ».

Le cabri créole montre une grande facilité d'adaptation aux conditions extrêmes. Il fait face à un environnement hostile, en ajustant son comportement et son métabolisme pour maintenir son bien-être et assurer la pérennité de l'espèce, en garantissant sa survie et celle de sa descendance. De plus, c'est une race résistante aux parasites gastro-intestinaux, elle permet aussi de valoriser les fourrages, feuillages et aliments grossiers. La rusticité de l'animal, la productivité des troupeaux, la qualité de la viande font du cabri créole un choix d'intérêt pour le développement durable de l'élevage.

Les ovins, regroupent l'ensemble des animaux communément appelés « mouton ». La principale race d'ovins élevée en Guadeloupe, est le « mouton Martinik ».

Le mouton Martinik, est une race résistante aux parasites gastro-intestinaux et permet aussi la valorisation des pâturages tropicaux. De plus, sa faible teneur en gras des carcasses et sa finesse gustative en font une viande très appréciée des consommateurs.

Malgré leur résistance et nombreux atouts, ces animaux subissent parfois les conséquences du parasitisme gastro-intestinale.

1.2 - Le parasite *Haemonchus contortus*

Chez les petits ruminants, *H. contortus* est le principal nématode parasite du tractus digestif.

Son cycle biologique comprend deux phases, une phase libre dans le milieu extérieur (ou phase exogène) et une phase parasitaire chez l'hôte (ou phase endogène).

- La phase libre, débute avec l'expulsion des oeufs pondus par les vers femelles dans les fèces de l'hôte. Les oeufs sont ainsi répandus dans les prairies. Lorsque les conditions environnementales sont favorables (température minimale 10°C et taux d'humidité de 60%), les oeufs s'embryonnent et éclosent pour évoluer vers les stades larvaires L1, L2, puis L3.
- La phase parasitaire, commence avec l'ingestion des larves L3 par l'hôte en même temps que les brins d'herbes : c'est le stade infestant. Ces larves muent ensuite vers le stade L4. À ce stade, elles se nourrissent du sang de l'hôte, elles sont hématophages. Les larves L4 continuent ensuite leur mue vers le stade L5, stade pré-adulte ou juvénile. Le passage au stade adulte est caractérisé par l'acquisition de la maturité sexuelle. Après fécondation, les femelles pondent de 5000 à 10000 oeufs.

Ce parasitisme entraîne souvent des pathologies chez l'hôte, tels que l'anémie (due à l'activité hématophage des parasites), l'amaigrissement, le retard de croissance, les épisodes diarrhéiques, le syndrome de la goulotte (enflures molles sous la mâchoire ou l'abdomen), le pelage rêche, les lésions, ulcère et abcès, les hémorragies intestinales, et même la mort.

2) Les moyens de lutte contre le parasitisme

2.1 - Les principaux moyens de lutte

Les moyens utilisés les plus couramment dans la lutte contre les parasites gastro-intestinaux sont les vermifuges, mais ceux-ci présentent de réelles limites et ne sont efficaces que sur de courte durée.

Afin de remédier à cette contrainte, un moyen de lutte plus efficace est mis en place, la lutte intégrée. Celle-ci consiste à prendre tous les moyens qui entourent le problème du parasitisme pour pouvoir mieux le traiter.

Cette lutte concerne soit la phase de vie libre, soit la phase de vie parasitaire. Selon ces critères les moyens qui seront déployés et les objectifs à atteindre seront différents.

- Les moyens de lutte en phase libre.

Les actions menées auront pour but de réduire les sources de parasites, en diminuant le nombre d'oeufs ou de larves infestantes sur la pâture.

Cette réduction est possible en agissant au niveau biologique et au niveau du pâturage.

- Le contrôle biologique, a pour but de limiter la taille des populations d'une espèce en utilisant un autre organisme.

- La gestion des pâturages, est une intervention sur la phase de vie libre. Elle vise à réduire les possibilités de contact entre l'hôte et les larves infestantes (stade L3).

On distingue trois catégories de gestion du pâturage:

- Les méthodes préventives, qui consistent à mettre des animaux sains sur des parcelles ne possédant pas de larves au stade L3.
- Les méthodes évatives, qui consistent à traiter les animaux par anthelminthiques puis à les placer sur une parcelle propre. Deux méthodes principales visent à assainir une parcelle, en accélérant la mort des larves : les épandages de substances chimiques (chaudage, urée) et le retournement des prairies par labour.

- Les méthodes par dilution, qui consiste à réduire la densité d'animaux par surface pâturée.

Ces méthodes doivent être appliquées en amont, celles s'appliquant au parasitisme sont faites uniquement dans un second temps.

- Les moyens indirects de lutte

Ces moyens agissent indirectement sur le parasite en augmentant la résistance de l'hôte.

On retrouve la vaccination, la sélection génétique, qui consiste à faire des recherches génétiques permettant de sélectionner les animaux naturellement résistants.

Enfin l'alimentation, consistant à apporter aux animaux des protéines en faisant attention à la quantité mais aussi à la qualité, afin de permettre aux animaux infestés de couvrir leurs besoins supplémentaires.

D'autres moyens visent la phase de vie parasitaire des nématodes, comme l'oxyde de cuivre ou la phytothérapie.

2.2 La phytothérapie

La phytothérapie est l'un des éléments constitutifs des médecines traditionnelles et ancestrales, elle est basée sur l'utilisation des propriétés pharmacologiques naturelles des molécules (métabolites secondaires) contenues dans les plantes. Les plantes anthelminthiques représentent l'essentiel de la pharmacopée vétérinaire, elles sont reconnues en particulier comme substance anti-parasitaire. La phytothérapie est une doctrine naturelle, à titre préventif ou curatif.

- Les métabolites secondaires

On entend par métabolites secondaires toute substance présente chez un organisme ne participant pas directement aux processus de base de la cellule vivante. Au contraire, les métabolites primaires (acides aminés, lipides, sucres, acides nucléiques), sont directement impliqués dans les grandes voies du métabolisme de base de la cellule (croissance, développement, reproduction). Les métabolites secondaires détiennent un rôle majeur dans l'adaptation des végétaux à leur environnement. Aujourd'hui, ces molécules sont très importantes dans l'agriculture car elles pourraient permettre de substituer l'usage d'intrants chimiques par des mécanismes de défense naturelle des plantes. Les métabolites secondaires se classent en de nombreux groupes, dont trois principaux groupes chez les plantes:

- les types « azotés »: alcaloïdes, bétalaïnes, hétérosides
- les types « terpènes »: monoterpènes, polyterpènes
- les types « phénols »: lignines, flavonoïdes, tanins

- Les tanins condensés (TC)

Selon Bate-Smith en 1973, les TC sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire (PM) compris entre 500 et 3000 Da qui présentent, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines. Ce sont des polyphénols, considérés comme les métabolites secondaires trouvés chez les végétaux. On retrouve souvent deux groupes principaux de tanins:

- les tanins hydrolysables, qui sont des polyester de sucre, en général le glucose
- les tanins condensés, qui sont des polyphénols appartenant à la famille des flavonoïdes. De manière générale, les tanins condensés ont des poids moléculaires plus élevés, sont plus répandus dans le règne végétal et sont plus abondants dans les plantes que les tanins hydrolysables.

La structure chimique des tanins présente de nombreux groupes hydroxyles et phénoliques qui leur confèrent la propriété de former des complexes avec de nombreux macromolécules tels que les protéines, les hydrates de carbones ou encore les ions métalliques.

En raison de cette structure complexe et variée, l'analyse des TC est délicate et leur dosage est souvent difficile.

Ils jouent un rôle majeur dans les mécanismes de défense des plantes face aux agressions, comme les attaques des phytopathogènes, mais aussi contre des agresseurs tels que les insectes et les mammifères herbivores. En effet, ils affectent l'intégrité du tube digestif des insectes phytophages. La synthèse de tanins rend les plantes moins agréables pour les mammifères herbivores car ils leur donnent un goût âcre. Cette sensation entraîne un arrêt de leur consommation et les protège ainsi d'une prédation excessive.

Les études sur les TC nécessitent de maîtriser leur teneur dans les plantes, ce paramètre est difficile à déterminer car leur concentration varie en fonction de nombreux facteurs, on retrouve des facteurs intrinsèques, comme l'espèce et la variété, la partie ou le stade végétal, mais aussi des facteurs extrinsèques comme les conditions climatiques. On note, qu'au sein d'une même famille botanique, les espèces végétales présentent des différences de teneur et de nature des tanins. (Quijada J et al., 2015)

La consommation de plantes riches en TC semble représenter une méthode alternative ou complémentaire aux anthelminthiques de synthèse pour maîtriser les nématodes gastro-intestinaux.

Cette consommation a été associée à une amélioration de la résilience de l'hôte par rapport à des animaux recevant une ration sans tanins condensés. Des effets bénéfiques ont été mesurés au travers d'un meilleur statut clinique des animaux (diarrhée moins sévère, moins de mortalité), mais aussi au niveau de mesures pathophysiologiques (hématocrite moins dégradé), au niveau de la production (gain de poids, meilleure production de lait ou de laine) (Quijida J et al., 2015).

3) Méthodes biologiques de caractérisation des molécules

3.1 - Les méthodes principales

La propriété des TC à se fixer aux protéines permet des méthodes diverses de dosage, on distingue:

- les méthodes chimiques, tel que la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette réaction est spécifique des phénols et se décompose en deux dosages colorimétriques successifs: le dosage des phénols totaux, puis le dosage des phénols non-tanniques grâce à un extrait acétonique.

- les méthodes biologiques, tels que:

- la méthode du Butanol-HCl, basée sur la réaction de dépolymérisation des tanins condensés en milieu acide.
- la méthode de l'acétone-HCl-butanol, avec addition d'acétone et d'ion ferrique.

Cette méthode est plus sensible, répétable et efficace que la précédente.

Ces méthodes sont souvent longues et coûteuses, d'autres techniques plus rapides et économiques sont favorisées.

3.2 - Spectroscopie Proche Infra Rouge

- Définition

La Spectroscopie Proche Infra Rouge ou SPIR, est une technique d'analyse qui permet de connaître la composition chimique des aliments et matières premières. Les développements actuels de cette technique s'orientent vers une prédiction directe de la valeur nutritionnelle des aliments.

Dans l'industrie alimentaire, une grande partie des contrôles de qualités des matières premières et des produits finis repose sur des analyses biochimiques. Cependant, ces méthodes sont souvent longues à mettre au point, nécessitent l'emploi de produit couteux, chimiques et polluants, et ne peuvent être appliquées que par des opérateurs qualifiés. La SPIR, permet de recueillir les mêmes résultats en moins d'une minute, sans utiliser des produits toxiques.

Cette méthode utilise le principe de l'absorption de rayonnement infra-rouge par la matière organique. Elle est donc basée sur l'interaction entre le rayonnement (infrarouge) et les molécules contenues dans l'échantillons. L'absorption de ces rayons vont différer selon la composition chimique des échantillons, ainsi on peut estimer celle-ci par cette simple mesure d'absorption. (Bertrand D. et al., 2002)

- Chimiométrie

Selon Geladi, la chimiométrie est la « science de l'utilisation des méthodes mathématiques, statistiques et informatiques dans le but d'améliorer l'extraction des informations obtenues à partir de données analytiques ».

Les méthodes chimiométriques peuvent être classées, dans un premier lieu, par leur nature:

- linéaire (l'information utile est extraite à partir de la combinaison linéaires des variables prédictives), ou
- non linéaires.

Dans un deuxième lieu, par leur nature:

- non supervisée (descriptives), ici le seul élément dont on dispose est le spectre, il n'existe aucune informations complémentaires sur la nature des données, ou
- supervisée (prédictives), où les données spectrales PIR (Proche Infra-Rouge) sont exploitées dans le but de prédire une variable qualitative ou quantitative.

La majeure partie des applications reposent sur les méthodes linéaires et supervisées.

On utilise souvent dans ces méthodes chimiométriques la régression linéaire pas à pas, et la méthode PLS (Partial Least Squares ou moindre carré partiel).

Le but de celles-ci est d'établir un modèle linéaire liant une variable à prédire Y, avec les données spectrales recueillies dans une matrice X.

Le modèle de régression est donné par: $y = B_0 + \sum x_i B_i$, où:

- y est la valeur à prédire
- x_i l'absorbance à la longueur d'onde i, et
- B_i les coefficients du modèle.

Les facteurs incontrôlés influant sur les données spectrales sont nombreux.

Lors de l'établissement du modèle, il est nécessaire de collecter une série d'échantillons représentatifs assez importante de produits de même nature. Tous doivent être analysés par la méthode de laboratoire de référence. Cette collection est ensuite divisée de manière aléatoire en deux séries, une qui sera utilisée pour la validation du modèle et l'autre pour faire l'étalonnage (ou calibration). (Bertrand D. et al., 2002)

- Calibration

- Échantillonnage

Un minimum d'une cinquantaine d'échantillons sera utilisé pour bâtir la calibration et une vingtaine pour la valider. Les échantillons doivent couvrir toute la gamme de variation de la propriété étudiée.

- Obtention d'une calibration

L'objectif de cette étape est d'établir une équation de prédiction pour qualifier et quantifier le constituant d'intérêt en utilisant uniquement la SPIR, sans passer par les procédés de référence de laboratoire.

L'obtention de la calibration débute une fois que les spectres PIR et les données de la propriété à prédire sont disponibles pour tous les échantillons.

Avant la construction de la calibration, des manipulations spectrales sont parfois nécessaires afin d'uniformiser ou d'améliorer la qualité du signal spectral. Après ce pré-traitement des spectres, des corrélations entre l'absorbance et la propriété à prédire sont calculées pour chaque longueur d'onde. Ainsi, les régions spectrales les mieux corrélées avec la propriété à estimer sont déterminées.

Une fois que les données des spectres et les données de référence laboratoire sont acquises et adaptés, les régions choisies sont utilisées pour la construction d'un modèle multidimensionnel via des procédés mathématiques et statistiques de chimiométrie. Dès que modèle est obtenu les valeurs de la propriété à étudier sont recalculées puis comparées aux valeurs mesurées.

- Validation de la calibration

La validation est effectuée pour évaluer la capacité prédictive de l'équation d'étalonnage. La confrontation des valeurs mesurées et prédites permet de déterminer s'il est possible d'utiliser la calibration sur des échantillons indépendants. L'erreur type de prédiction (SEP) est utilisée pour juger la capacité prédictive d'une équation

d'étalonnage, elle doit être le plus faible que possible. Une validation croisée aléatoire est réalisée, cette étape consiste à enlever de façon aléatoire un certain nombre de spectre de calibration et de prédire ceux-ci avec les spectres restants. Les échantillons supprimés sont donc utilisés comme points de validation.(Stuth J, Jama A, Tolleson D, et al., 2003)

I) MATÉRIELS ET MÉTHODES

I.1 Matériels

I.1.1 - Le matériel végétale

La Guadeloupe a le privilège de disposer d'une flore très diversifiée. C'est un réel avantage pour l'élevage des animaux locaux.

En effet, les plantes et arbres qui y poussent détiennent un vrai apport nutritionnel et permettent ainsi un développement satisfaisant des animaux.

En plus de cette richesse, certaines plantes ont un pouvoir thérapeutique. Ainsi, celles-ci pourraient constituer pour les éleveurs un ensemble de ressource végétale capable de nourrir et de soigner les animaux.

Dans cette optique, des plantes ont été choisies pour les analyses, en fonction de la présence de métabolites secondaires, notamment en TC, et de leurs propriétés médicinales. On dispose donc des échantillons des plantes suivantes:

- Dans la famille botanique *Fabaceae (mimosaceae)* : Leucaena et Pois d'Angole
- Dans la famille botanique *Polygonaceae* : Raisin bord de mer
- Dans la famille botanique *Sargassaceae* : Sargasse
- Dans la famille botanique *Fagaceae* : Châtaignier sec
- Dans la famille botanique *Punicaceae* : Grenade
- Dans la famille botanique *Moringaceae* : Moringa
- Dans la familles botanique *Anacardiaceae* : Pomme cajou et Manguier
- Dans la famille botanique *Myrtaceae* : Goyavier
- Dans la famille botanique *Euphorbiales* : Manioc amer
- Dans la famille botanique *Rosaceae* : Icaquier et Amandier

I.1.2 - Les équipements de laboratoire

- L' « Accelerated Solvant Extraction » ou A.S.E, utilisé lors de l'extraction (cf. annexe photo 1). La machine utilisée ici est l' « ASE 350 », c'est un automate qui permet d'extraire des composés organiques présents dans des échantillons (cf. *annexe photo 1*). Il utilise l'effet combiné de la température et de la pression pour permettre à l'utilisateur d'isoler les composés d'intérêts, tout en conservant l'intégrité de l'échantillon. Il permet d'augmenter l'efficacité du processus d'extraction. L'ASE réduit aussi la consommation de solvant et augmente la vitesse d'extraction pendant le traitement des échantillons.

- Le spectrophotomètre, utilisé lors du dosage (cf. *annexe photo 2*), permet de mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une solution à une longueur d'onde donnée. Il permet d'identifier la présence et la concentrations d'entités moléculaires à l'intérieur de l'échantillon, et est constitué de quatre composants principaux:

- une source lumineuse
- un monochromateur, qui sélectionne la radiation de longueur d'onde désirée
- un photodétecteur, qui convertit l'intensité lumineuse transmise en un signal électrique
- un analyseur, qui traite le signal électrique et affiche la valeur d'absorbance.

- L'évaporateur rotatif, est utilisé lors du dosage et de l'extraction (cf. *annexe photo 3*). Il permet d'éliminer rapidement un solvant volatil par évaporation.

Le principe est basé sur l'abaissement du point d'ébullition par diminution de la pression.

- Le Spectromètre Proche Infra-Rouge (SPIR), pour la Spectroscopie Proche Infra Rouge (cf. *annexe photo 4*) . L'appareil utilisé est le FOSS NIRSystem6500 monochromateur. Les longueurs d'ondes de cet appareil vont de 400 à 2500 nm avec un pas de 2nm.

L'appareil est constitué de quatre parties essentielles:

- une source lumineuse,
- un système de séparation de la lumière polychromatique en fonction des longueurs d'ondes,
- un système permettant de présenter l'échantillon,

- un ou plusieurs capteurs photosensibles.

Il mesure les absorptions lumineuses les unes après les autres, en balayant la région spectrale dans un ordre séquentiel.

I.2 Méthodes

I.2.1 - L'extraction

- But

L'extraction est parmi l'une des méthodes les plus utilisées en analyse pour séparer les mélanges. Elle consiste à retirer une ou plusieurs espèces chimiques d'un milieu solide ou liquide.

- Principe

L'extraction par solvant consiste à dissoudre le composé recherché dans un solvant non miscible avec l'eau, et à séparer la phase organique contenant le composé à extraire de la phase aqueuse.

Cette technique fait intervenir trois étapes principales:

- La mise en contact du solvant avec la substance contenant le composé à extraire.

Elle se fait grâce à l'ASE, vu précédemment .

- La décantation, en fonction de la densité du solvant utilisé par rapport à l'eau, la phase organique à récupérer se situera en dessous ou en dessus.

- Le séchage et la filtration, qui ont pour but d'éliminer l'eau qui a été retenu dans la phase organique. Pour cela, on utilise évaporateur rotatif.

- Mode opératoire

Pour l'extraction, 25 grammes d'un échantillon de plante sont pesés et introduit dans une cellule (*cf. annexe photo 5*)

La cellule est ensuite placée dans l'ASE et le programme est lancé.

On récupère la phase organique, à l'aide d'une ampoule à décanter, et d'un solvant : l'éther diéthylique. Les traces de solvant sont évaporées à l'évaporateur rotatif. L'extrait aqueux de tanins obtenu est récupéré, puis fractionné dans des pots.

Pour la purification, on coule le mélange obtenu sur un creuset filtrant. Ensuite, les tanins encore accrochés à la colonne sont élués, à l'aide d'un mélange acétone/eau. Puis, l'évaporateur rotatif est utilisé pour éliminer l'acétone. Enfin, le mélange eau/tanins est récupéré, fractionné et congelé dans des pots de 100 mL.

I.2.2 - Le dosage

- But

Il s'agit de déterminer la concentration d'une espèce en solution.

- Principe

La vanilline va réagir avec les monomères catéchiques et les unités terminales des proanthocyanidines pour former un complexe chromophore rouge qui absorbe à 500nm.

- Mode opératoire

La solution mère est préparée avec des TC purs (sous forme de poudre) et du méthanol. S'en suit une série de dilution en cascade pour préparer les sept autres points de gamme. On pèse ensuite, 100 mg d'un échantillon de plante auquel on ajoute une solution contenant de l'acétone et de l'acide ascorbique, afin d'extraire les tanins libres.

Puis, on effectue une dépigmentation, avec de l'éther diéthylique. On prélève la phase organique que l'on introduit dans les tubes à « MIVAC », afin d'éliminer les traces de solvant. On effectue les différentes dilution.

Enfin, les absorbances des différentes solutions sont lues à l'aide du spectrophotomètre.

I.2.3 - La spectroscopie Proche Infra Rouge

- But

La SPIR est une méthode utilisée dans l'agro-alimentaire pour évaluer la qualité nutritionnelle des aliments.

- Principe

La SPIR est basée sur le principe d'absorption des rayonnements infrarouges (1100-2500nm) par la matière organique. En effet, chaque liaison inter-atomique vibre à une fréquence qui dépend du groupe chimique impliqué dans la liaison. C'est sur cette règle que sont basées les différences d'absorptions enregistrées. Les échantillons sont scannés par le spectromètre à 2nm d'intervalle aux longueurs d'ondes 700 à 1100 nm (visible) et 1100 à 2500 nm (infrarouge).

- Mode opératoire

Les TC pures (sous forme liquide ou solide) extraits des différentes plantes sont placés dans des cellules (*cf. annexe photo 6*). Celles-ci sont ensuite introduites sur le support et lues par le SPIR. Tous les échantillons sont scannés en double.

Les données détenues sont par la suite exploitées avec le logiciel ISI software(WinISI).

Tout d'abord, les doublons obtenus précédemment sont comparés et moyennés.

Ensuite, des calibrations de la composition chimique des TC ont été développées en utilisant un type de régression statistique. Il s'agit de la régression des moindres carrés

partiels modifiés. Les traitements mathématiques les plus précis sont ensuite retenus, c'est-à-dire : l'écart-type de calibration (ou erreur standard de calibration SEC), l'écart-type et la validation croisée (ou erreur standard de validation croisée SECV), le coefficient de détermination (R^2) et le coefficient de validation croisée (R^2_{cv}).

Enfin, les bases de données issues de dosage en laboratoire permettent d'établir des équations SPIR, les équations sont utilisées pour prédire la valeur de la teneur en TC qui échantillons qui ont été scannés.

Pour valider les prédictions, il est essentiel de procéder à des dosages chimiques classiques sur une partie des échantillons (environ 10% du total) et de tracer un graphique (valeurs prédites en fonction des valeurs de références). C'est l'observation de la droite de régression, et l'utilisation des données de statistique, qui permet de valider ou pas les prédictions.

- Critères d'analyse des résultats

Les résultats obtenus sont analysés en fonction de certains critères:

- Choix des variables

Deux calibrations ont été réalisées, une avec l'ensemble des échantillons (%TC) et l'autre (%TCbis) en ramenant à 0 les valeurs négatives et en éliminant les échantillons considérés comme aberrants ($>$ à moyenne \pm 2 ET).

- Analyse des résultats

Les critères retenus pour analyser les résultats permettent d'apprécier le modèle mais aussi de juger de sa qualité. Ainsi, les équations sont valables et recevables quand:

- ◆ le rapport (SD/SEC) est élevé (>3)
- ◆ le coefficient de corrélation est proche de 1
- ◆ le SECV et le SEC ont des valeurs proches l'une de l'autre

- Prédiction

La prédiction permet à partir d'une équation déjà établie pour un groupe d'échantillon uniforme de prédire la composition chimique d'un groupe d'échantillon.

- Critère de validation pour une prédiction

Pour valider la qualité d'une prédiction on tient compte:

- ◆ RSQ, quand celui-ci est proche de 1 on considère que les données sont fortement corrélées à l'équation.
- ◆ du SEP, quand il est proche de 0 on considère que la prédiction est bonne

- ◆ de la pente qui doit se rapprochée de 1
- ◆ des moyennes des valeurs « labo » et du SD et de la moyenne (Mean) pour les valeurs NIRS. En effet, si c'est dernières sont proches l'une de l'autre on peut espérer une bonne prédiction.

II) RÉSULTATS

- Statistique descriptive des échantillons

Item	N	Moyenne	Écart-type	Minimun	Maximun
%TC	213	8,5	6,3	-0,03	27,4

Tableau 1 : statistique descriptive des échantillons

La moyenne, l'écart-type, l'étendue des échantillons, exprimés en pourcentage, sont utilisés pour faire les prédictions. Ces variables permettent d'apprécier la qualité des données mais aussi de mettre en évidence les erreurs. En moyenne, sur les 213 échantillons dosés, la teneur en TC de l'échantillon est de 8,5%. Il y a une très grande variabilité dans les données comme l'atteste le fort écart-type mesuré (6,3%) au regard de la moyenne et le fort étendue des données. Par ailleurs, des valeurs négatives ont été obtenues lors des dosages.

- Analyse qualitatives

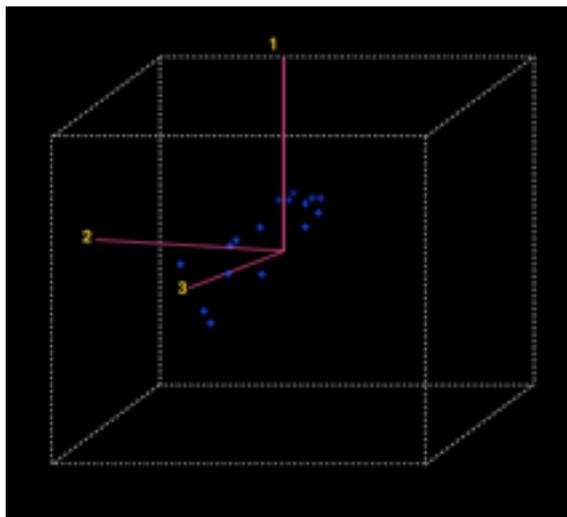


Image 1 : Visualisation 3D

L'image 1 montre une vue en trois dimensions des distances spectrales entre les échantillons. On peut remarquer qu'il n'existe pas de proximité graphique entre deux spectres de la même matière première.

- Analyse quantitative

Variables	n	Moyenne	ET	SEC	R ²	SECV	R ² CV
%TC	200	8,1	5,91	1,62	0,93	2,04	0,88
%TCbis	199	8,2	5,88	1,68	0,92	2,08	0,87

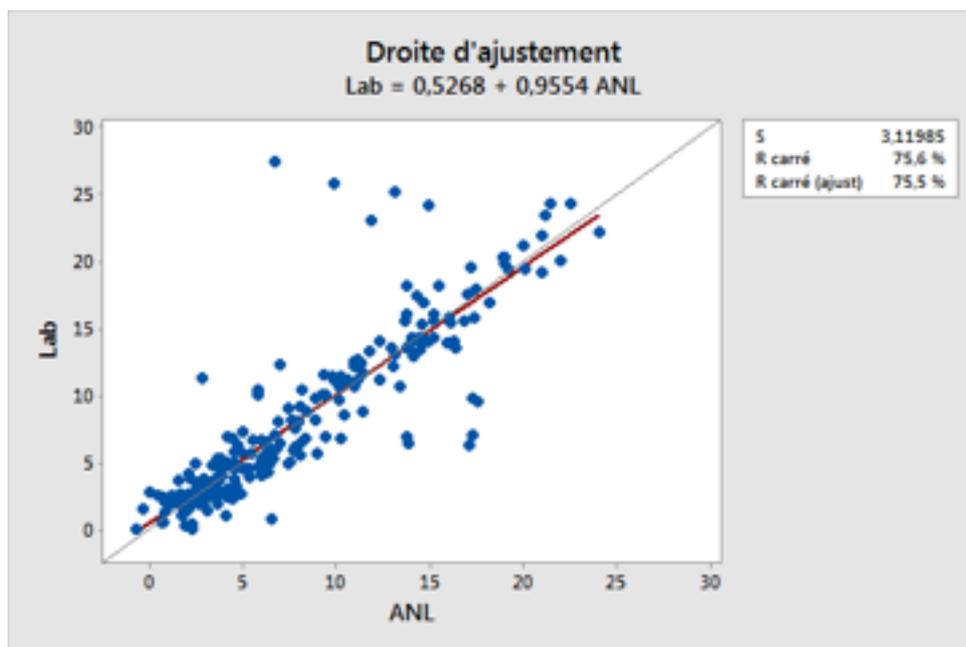
Tableau 2 : moyenne, écart-type (ET), écart-type de calibration (SEC), coefficient de détermination (R²), écart-type de validation croisée (SECV), coefficient de validation croisée (R²CV)

En moyenne, la teneur en TC des échantillons est de 8,1% et de 8,2%.

L'écart-type est de 5,91 et de 5,88, le SEC de 1,62 et 1,68. Le coefficient de corrélation proche de 1, est de 0,93 et 0,92. Le SECV est de 2,04 et de 2,08 et le R²CV est de 0,88 et de 0,87.

Pour %TC: Moy/ ET = 8,1 / 5,91 = 1,37 Pour %TCbis: Moy / ET = 8,2 / 5,88 = 1,395
 SECV / Moy = 2,04 / 8,1 = 0,252 SECV / Moy = 2,08 / 8,2 = 0,254

- Évaluation de la prédiction



Droite d'ajustement représentant les valeurs « labo » en fonction des valeurs NIRS

Ce graphique montre que les valeurs « labo » sont égales à $0,5268 + 0,9554$ des valeurs prédites. L'écart-type est de 3,12 et le coefficient de corrélation est 75,5%

III) DISCUSSION

L'objectif général de cette étude était d'évaluer le potentiel de la SPIR pour une évaluation qualitative (extraits purs) et quantitative (extraits de différentes plantes) des tanins condensés. Ceci avec pour finalité de pouvoir prédire rapidement et à moindre frais le type et la concentration en tanins condensés d'échantillons de plantes brutes. A notre connaissance, aucune étude de ce type n'a été réalisée pour des plantes tropicales. Néanmoins, les résultats obtenus sur des espèces tempérées (Sain-Foin, ...) étaient prometteurs.

Détermination qualitative.

Les résultats obtenus montrent qu'il ne serait pas possible de discriminer les tanins condensés contenus dans la plante à l'aide de la SPIR. En effet, pour une même matière première, des spectres semblables devraient être obtenus et la distance entre deux points de l'analyse en composante principale des spectres devrait être faible. Or, ce n'est pas le cas dans notre étude. La SPIR se base sur les différences d'absorbance au sein des

liaisons chimiques entre atomes. Pour une même matière première, le nombre de liaisons et d'atomes est identiques. L'absence de similitude entre deux tanins identiques dénote donc un effet des autres facteurs de variations du spectre (effet de l'expérimentateur, qualité de l'extraction, ...) qui surpasserait les mesures d'absorbances.

Détermination quantitative.

Nous n'obtenons pas une prédiction précise de la teneur en TC de nos échantillons, compte tenu du grand écart-type de prédiction observé. En effet, on note une erreur de prédiction d'environ 25%. Ainsi, la SPIR permettrait de discriminer des plantes anthelminthiques suivant des gammes de concentration en tanins condensés mais pas de prédire la teneur en TC. L'incertitude sur le dosage de TC (non encore stabilisé comme l'indique les valeurs négatives obtenues), la non prise en compte dans notre analyse des facteurs de variations de la teneur en TC des matières premières (âge de la plante, mode de culture, partie de la plante, ...) expliquerait cette incertitude dans la précision.

Considérations générales.

À notre connaissance, les études qui ont déjà été menées dans le but d'évaluer le potentiel de la SPIR, pour le dosage de molécules chimiques ont donné de meilleurs résultats. Cependant, celles-ci se sont intéressées aux substances phénoliques et alcaloïdes (H. Schulz, U.H. Engelhardt, A. Wegent, H.H. Drews, S. Lapczynski et al., 1999), alors que les tanins condensés sont des flavanols.

La qualité de nos résultats devraient être améliorée en affinant la méthode de dosage faite en laboratoire, pour les échantillons de références.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude exploratoire n'a pas permis de discriminer les TC de manière qualitative. La détermination quantitative reste imprécise. Néanmoins, l'accroissement de la précision sur le dosage des données de référence et la prise en compte des facteurs de variations de la teneur en TC devraient permettre d'affiner la prédiction. A ce stade les équations produites dans le cadre de ce stage, permettent de discriminer des classes de teneur en TC. Ainsi, dans le cadre d'une politique de gestion des ressources (réactifs et temps de travail) et de respect de l'environnement, il serait possible de cibler les plantes à doser car ayant une teneur suffisante en TC pour induire un effet anthelminthique et d'éliminer les plantes ayant une teneur trop faible.

APPORT PERSONNEL DU STAGE

Ce stage a été très enrichissant pour moi car il m'a permis de me procurer un premier contact avec le monde professionnel, dans les domaines de la biologie, la biochimie et l'agronomie. J'ai pu me confronter aux problématiques scientifiques et professionnelles du laboratoire. J'ai eu la chance de pouvoir apprendre, observer, participer aux différentes activités que propose l'INRA, mais aussi approfondir et comparer mes acquis à la réalité du monde du travail.

De plus, l'utilisation de nouvelles techniques, comme la SPIR, m'a permis d'élargir mes connaissances.

L'URZ a été un cadre agréable pour le déroulement de mon stage, les personnes qui y travaillent sont accueillantes, sympathiques et partagent leurs savoirs avec enthousiasme.

ANNEXE

Photo 1:

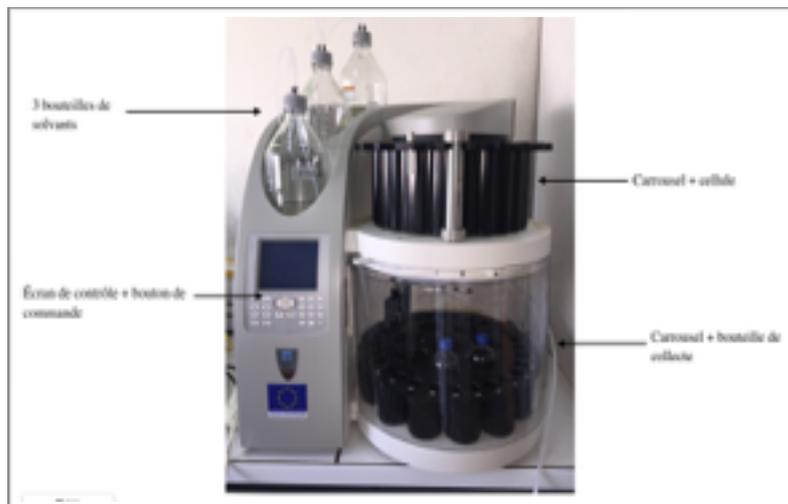


Photo 2:



Photo 3:

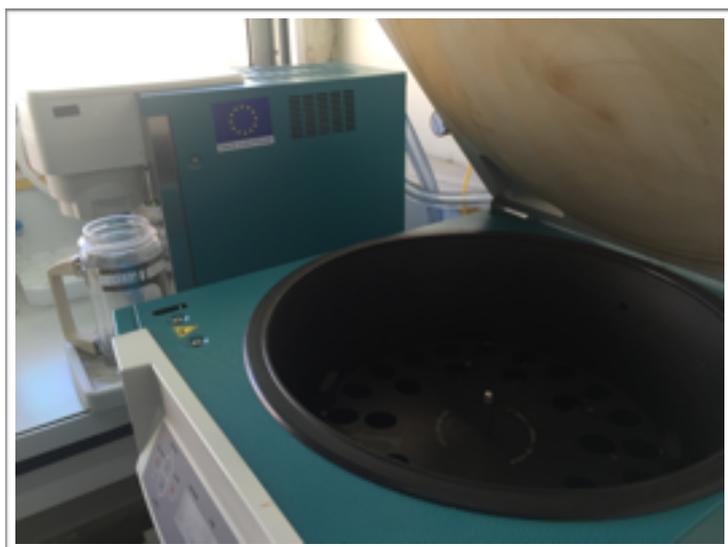


Photo 4:



Photo 5:

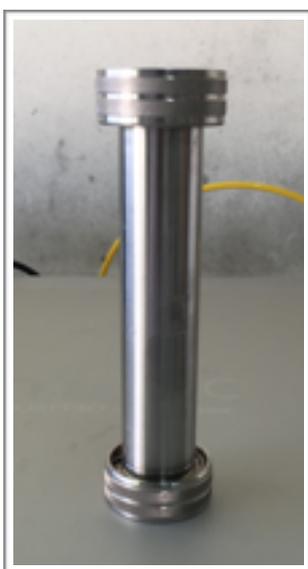


Photo 6:



BIBLIOGRAPHIE

- 1) BERTRAND D., 2002. La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale. INRA Prod. Anim., 15, 209-219
- 2) STUTH J., JAMA A, TOLLESON D. 2003. Direct and indirect means of predicting forage quality through near infrared reflectance spectroscopy. Field Crops Research 84, 46-56
- 3) LU WY., WANG SS., CAI R., MENG Y., XIE X., ZHAO WJ., 2011. Rapid discrimination and quantification of alkaloids in Corydalis Tuber by near-infrared spectroscopy. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 59, 44-49
- 4) LAVIN S.R., SULLIVAN KE., WOOLEY SC., STONE K., RUSSEL S., VALDES EV., 2015. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) analyses of nutrient composition and condensed tannin concentrations in carolina willow (*Salix caroliniana*). Zoo Biology, 34, 576-582.
- 5) SCHULZ H., ENGELHARDT UH., WEGENT A., DREWS HH., LAPCZYNSKI S. 1999. Application of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy to the Simultaneous Prediction of Alkaloids and Phenolic Substances in Green Tea Leaves. Journal of agricultural and food chemistry, 47, 5064-5067
- 6) CLARK DH., RALPHS MH., LAMB RC. 1987. Total alkaloid determinations in larkspur and lupine with near infrared reflectance spectroscopy. Agronomy journal, 79, 481-485.
- 7) Ecological Agriculture Projects, www.eap.mcgill.ca/agrobio/ab370-04.htm, visité le 15/01/2016
- 8) INRA Science & Impact, www.tansfaire.antilles.inra.fr, visité le 15/01/2016
- 9) INRA Science & Impact, www.cote-dor.chambagri.fr, visité le 15/01/2016
- 10) Université de Lorraine, www.docnum.univ-lorraine.fr, visité le 15/01/2016
- 11) Journées3R, www.journee3r.fr, visité le 15/01/2016