



HAL
open science

Contribution au développement d'une méthode de dosage des tanins condensés dans les plantes tropicales

Thomas Malicieux

► **To cite this version:**

Thomas Malicieux. Contribution au développement d'une méthode de dosage des tanins condensés dans les plantes tropicales. Chimie analytique. 2019. hal-02960703

HAL Id: hal-02960703

<https://hal.inrae.fr/hal-02960703>

Submitted on 7 Oct 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.

Université des Antilles
UFR des Sciences Exactes et Naturelles
Année Universitaire 2018-2019

Contribuer à la mise en place d'une méthode de dosage des tanins dans les feuilles des plantes

Rapport de Stage

Enseignant Référent :

Mme Cristel ONESIPPE

Responsable de Stage :

Mme Carine MARIE-MAGDELEINE CHEVRY

Institut National de Recherches Agronomiques (INRA)

Unité de Recherches Zootechniques

Domaine de Duclos 97170 Petit-Bourg

Table des matières

Liste d'abréviations	2
Liste des figures et tableaux	2
Laboratoire d'accueil.....	3
Remerciments.....	4
Abstact.....	5
Résumé	5
I. Introduction.....	6
II. Le parasitisme gastro-intestinal :.....	7
III. Les Molécules étudiées:	7
A. Les Tanins :	7
B. Les tanins condensés :	8
IV. Matériels et méthodes :	9
A. Matériels utilisés :.....	9
B. Méthodes :	11
1. Chromatographie liquide haute pression (CLHP)	11
a) Principe de la Chromatographie Liquide par Haute Pression :	11
b) Protocole :	11
2. Thiolyse :	13
V. Résultats et discussion :.....	14
Conclusion et perspectives :	18
VI. Références Bibliographiques :	19
Annexes :.....	21

Liste d'abréviations

INRA : Institut National de Recherches Agronomiques

URZ : Unité de Recherches Zootechniques

HPLC : High Pressure Liquid Chromatography = Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance

TC : Tanins Condensés

MS : Matière Sèche

BM Adduct : Adduit de Benzyl Mercaptan

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Unité de Flavan-3-ol	8
Figure 2 : Structure des monomères flavan-3-ol communes dans les TC	8
Figure 3 : Solutions des Extraits de TC	9
Figure 4 : Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance	10
Figure 5 : Dihydroquercétine (étalon interne)	11
Figure 6 : Chromatogramme de la solution Standard 1	14
Figure 7 : Chromatogramme de la solution standard 2	14
Figure 8 : Chromatogramme HPLC obtenu pour l'extrait de TC de feuille de goyavier avant thiolyse	17
Figure 9 : Chromatogramme HPLC obtenu pour l'extrait de TC de feuille de goyavier après thiolyse	17
Tableau 1. Gradient utilisé pour l'analyse HPLC des échantillons d'extrait de TC	12
Tableau 2. Temps de rétention, longueur d'onde max et facteur de réponse des standards et étalon interne.	15
Tableau 3. Concentrations en flavanols libres et en TC des extraits de TC des six plantes ...	16

Laboratoire d'accueil





Laboratoire de l'Unité de Recherches Zootechniques (URZ) de l'Institut National de Recherches Agronomiques (INRA)

L'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) est un institut français de recherche en agronomie fondé en 1946. Il a le statut d'établissement public à caractère scientifique et technologique et est géré conjointement par le Ministère de la Recherche et le Ministère de l'Agriculture.

Il s'agit du premier institut de recherche agronomique en France, et le deuxième en sciences agricoles dans le monde.

Les recherches conduites dans cet institut porte aussi bien sur l'environnement que sur l'alimentation, sans oublier l'agriculture.




L'INRA se charge d'explorer, de comprendre, et d'expérimenter par le biais de nombreuses missions, parmi lesquelles :

-  La production et diffusion de connaissances scientifiques
-  La contribution à l'innovation par le partenariat et le transfert
-  La formation à la recherche par la recherche
-  L'élaboration de stratégie de recherche européenne et nationale.

Afin de développer ses recherches, l'INRA possède 17 centres dans toute la France, dispatchés sur plus de 150 sites (France et Outre-mer).

Le centre régional Antilles-Guyane est le seul centre INRA implanté en milieu tropical. Les travaux qui y sont menés concernent la Guadeloupe, la Martinique et la Guyane, mais également toute l'outre-mer française et les pays des régions tropicales humides. Cependant, les activités et recherches conduites sur les différents sites divergent selon la localisation. Le site de Guyane est composé d'une Unité Mixte de Recherche porté sur le la recherche en forêt tropicale humide (EcoFoG) tandis qu'en Guadeloupe, il existe trois unités dont une Unité Mixte de Recherche (UMR ASTRE) deux Unités de Recherche (UR ASTRO et URZ)

L'URZ (Unité de Recherche Zootechnique) est l'une des unités présentes sur le site qui est chargée des « Alternatives pour la conception biotechnique de systèmes d'élevage agroécologiques en milieu tropical humide ». Les travaux de l'URZ concernent les connaissances des technologies disponibles pour l'agriculture durable et tournent autour de trois thématiques :

-  L'adaptation des animaux aux contraintes d'élevages tropicaux
-  La valorisation multicritères des ressources végétales
-  Les performances et fonctions des systèmes d'élevages tropicaux

Cette unité travaille en étroite collaboration avec la Plateforme Tropicale d'Expérimentation sur l'Animal (PTEA) qui est un centre dont les recherches sont axées sur la production porcine et les expérimentations en alimentation et parasitisme dans les milieux contrôlés. L'unité

possède 12 ha de propriété et de cheptels hors sol contenant des porcins, des bovins et des caprins, ainsi qu'un abattoir, plusieurs ateliers et des bâtiments d'élevage.

L'Unité URZ a été créée en 1965, les travaux de recherches qui y sont effectués portent sur plusieurs espèces (bovins, caprins, porcins, ovins, lapins). La mission de cette unité est de trouver des méthodes, procédés, qui amélioreront les productions animales dans les départements d'Outre-Mer et la région Caraïbes. L'une de ces recherches porte sur la lutte contre le parasitisme gastro intestinal des ruminants. Les expérimentations présentées ci-après rentrent dans le cadre de cette étude.

Remerciments

Je tiens à remercier Madame Suzitte CALIF pour avoir été mon intermédiaire dans ma démarche de recherche de stage.

Je remercie également Madame Carin MARIE-MAGDELEINE de m'avoir proposé un sujet pour mon stage.

Je remercie mes encadrants Messieurs Lucien PHILIBERT, Yoann FELICITE et Julien HIRA

Je remercie toute l'équipe de l'URZ qui s'est montrée à l'écoute et a su apporter des réponses à mes questionnements.

Abstact

The condensed tannins of plant origin have many biological effects on the small ruminants of breeding on the food aspects, health and environmental ones. Those effects change with varying type and quantity of tannins. In order to incorporate condensed tannins in animal feeding-stuffs, it is necessary to be able to quantify them. The colorimetric methodologies currently used are inadequate, due to the complex structure of condensed tannins.

In this study we begun a quantitative analysis with HPLC method, for the analysis of six species of plant containing condensed tannins. This result have to be complemented by the synthesis of adduct benzyl mercaptan, which will allow further characterization of the chemical structure.

Résumé

Les tanins condensés d'origine végétale présentent des effets biologiques multiples chez les petits ruminants d'élevage sur le plan alimentaire, sanitaire et environnemental. Ces effets varient selon le type et la quantité des tanins. Afin d'incorporer les tanins condensés dans l'alimentation des ruminants, il est nécessaire de pouvoir les quantifier. Cependant, les méthodologies colorimétriques actuellement mises en œuvre restent inadaptées, du fait de la complexité de structure des TC.

Dans ce projet nous avons initié une méthode de dosage quantitatif via l'analyse HPLC, pour l'étude de six espèces de plantes à TC. Les travaux doivent être complétés par la synthèse des adduits benzyl-mercaptan, qui permettra une caractérisation plus poussée de la structure chimique.

I. Introduction

L'élevage des petits ruminants occupe une place importante dans l'économie des zones tropicales. En Guadeloupe, il est dédié quasi exclusivement à la production de viande destinée à la consommation (Madassamy et al. 2007). Cependant, le développement de cette filière est perturbé par le parasitisme gastro-intestinal. Certaines parasitoses gastro-intestinales, comme l'haemonchose, peuvent se révéler mortelles, notamment pour les jeunes ruminants (40% de mort avant sevrage), entraînant de lourdes pertes économiques pour l'éleveur. Pour lutter contre le parasitisme gastro-intestinal, les éleveurs ont recours à l'utilisation de médicaments dont le coût n'est pas négligeable. L'utilisation répétée de ces médicaments a conduit à l'apparition de résistances des parasites à l'agent actif. Des études menées en Guadeloupe et en Martinique ont démontré que 100% des populations de nématodes gastro-intestinaux sont résistantes aux benzamidazoles, une famille d'anthelminthiques (Mahieu, (2014)).

C'est en prenant en considération ces faits que l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA), a mis en place son programme de recherche de lutte intégrée contre le parasitisme gastro-intestinal chez les petits ruminants d'élevage. Parmi les méthodes de lutte, figure la phytothérapie. En effet, les métabolites secondaires des plantes pourraient être exploités à des fins antiparasitaires. Les tanins condensés (TC), qui font partie des métabolites secondaires des plantes, peuvent jouer un rôle essentiel dans l'alimentation et la santé des petits ruminants, mais également sur l'environnement. En effet, des études ont montré :

- Une meilleure efficacité alimentaire : les protéines sont protégées contre la dégradation du rumen, assurant in fine un gain de poids par l'animal (Terrill *et al.*, (1992) ; Niezen *et al.*, (1995)) et une meilleure résistance aux maladies.
- Un contrôle du parasitisme gastro-intestinal : Les TC agissent directement sur les nématodes du tube digestif.
- Un moindre impact environnemental : Les TC modulent la méthanogenèse dans le rumen, par action directe sur les microorganismes méthanogènes et indirecte sur les populations protozoaires (Bhatta *et al.*, (2009)).

Ces effets biologiques des TC dépendent de leur concentration, leur structure et leur poids moléculaire (Barry, (1989) ; Wang *et al.*, (1994)). La caractérisation des tanins condensés est donc un critère important pour le choix de la ressource végétale utilisable en productions animales. La complexité structurale des TC rend leur caractérisation difficile. Les méthodes colorimétriques couramment utilisées pour quantifier les TC ne sont pas appropriées (grande variabilité de la méthode butanol-HCl et spécificité des flavanols pour la méthode Vanilline Sulfurique, Schofield *et al.*, (2001)).

Le laboratoire de l'URZ, qui étudie le potentiel bio actif des ressources végétales riches en TC pour une utilisation en productions animales, travaille, entre autres, à estimer les teneurs de ces composés dans les matières végétales.

L'Objectif de ce stage est de contribuer à l'analyse quantitative des TC contenus dans différentes plantes tropicales, par la méthode HPLC.

II. Le parasitisme gastro-intestinal :

Les « parasites » sont des vers de la classe des nématodes ils sont appelés strongles gastro-intestinaux ou encore strongles digestifs.

Le tube digestif des ruminants peut être infecté à plusieurs organes : la caillette, l'intestin grêle et/ou le gros intestin. La contamination peut s'opérer de différentes manières soit par ingestion ou par pénétration transcutanée des larves présentes dans le sol.

Le parasitisme gastro-intestinal a de fortes répercussions sur les élevages. En raison de la diminution de production de lait, la contamination de la viande et l'augmentation du taux de mortalité des spécimens infectés.

III. Les Molécules étudiées:

Les végétaux produisent différents métabolites. Les métabolites primaires sont essentiels au développement de la plante, on y retrouve les glucides, les lipides et les acides aminés.

Les métabolites secondaires se classent en de nombreux groupes, dont trois grands groupes chez les plantes :

- **Les composés phénoliques** :tanins, lignine, flavonoïdes
- **Les composés azotés** : alcaloïdes, bétalaïne, hétérosides cyanogènes et glucosinolates
- **Les terpènes**

A. Les Tanins :

Selon les espèces ils sont localisés dans les feuilles, l'écorce ou les fruits.

Ce sont des polymères naturels. Leur structure chimique est très variable, mais comporte toujours une partie polyphénolique ; on peut ainsi les classer en :

- *tanins hydrolysables*, qui donnent après hydrolyse soit de l'acide gallique, soit de l'acide ellagique ;
- *tanins condensés*, non hydrolysables, qui rougissent par oxydation et donnent du pyrocatéchol ;
- *tanoïdes divers*.

En raison de leur structure chimique, les tanins exercent une action antioxydante sur les tissus où ils sont localisés.

Ils exercent également, vis-à-vis de certains champignons, de bactéries et de virus, une action antibiotique.

B. Les tanins condensés :

Les tanins condensés sont des oligomères ou polymères de flavanols. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone de type C₄→C₈ ou C₄→C₆. Ils sont *non hydrolysables* mais traités à chaud par un acide, ils se dégradent en pigments colorés formés d'anthocyanidols.

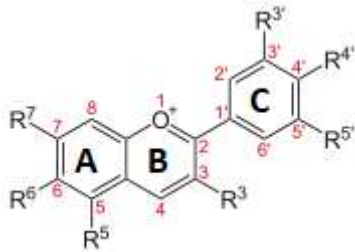
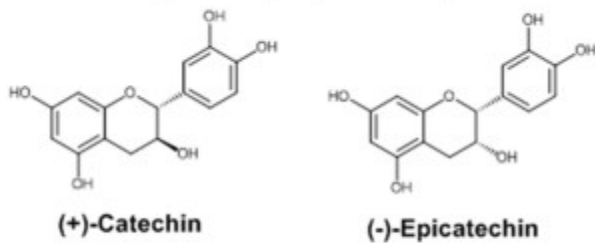


FIGURE 1: UNITE DE FLAVAN-3-OL

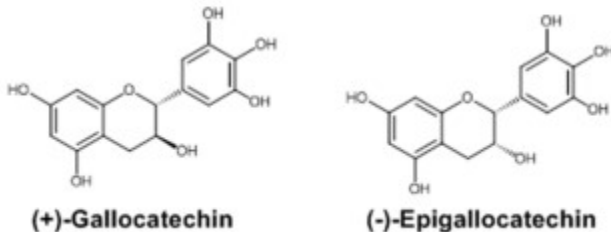
Procyanidin (PC) Building Blocks



(+)-Catechin

(-)-Epicatechin

Prodelphinidin (PD) Building Blocks



(+)-Gallocatechin

(-)-Epigallocatechin

FIGURE 2: STRUCTURE DES MONOMERES FLAVAN-3-OL COMMUNES DANS LES TC (ZELLER ET AL. 2015)

On constate, dans les tanins d'origine naturelle, une variation de la stéréochimie sur des monomères (PC) et (PD). Ils diffèrent par la configuration des substituants en C2 et C3 du cycle C (fig. 1) :

- en cis pour l'épicatechine et l'épigallocatechine, et en trans pour catechine et gallocatechine.

Cependant il a été démontré que ces variations ont relativement peu d'effet sur la détection et le dosage des tanins. (Schofield, unpublished data).

Les Tanins sont réputés pour leurs propriétés antioxydantes, antibactériennes, antifongiques,

Activités biologiques des TC chez les ruminants

Les TCs sont des composés d'importance nutritionnelle chez les ruminants. Les effets biologiques des TC concernent l'ingestion, la digestion, les émissions de CH₄ et la santé animale. Ces effets dépendent de la concentration totale en TC et de leur structure, et peuvent varier selon la source végétale, l'état physiologique et l'espèce animale concernés (Archimède et al. (2018)).

Impact sur l'ingestion et la digestion

A une concentration moyenne de 20 à 40 g/kg MS (dans le fourrage), les TC diminuent la concentration ruminale des protéines alimentaires et augmentent l'absorption des acides aminés indispensables dans l'intestin grêle (+62 %) sans diminuer la digestion des fibres dans le rumen (Min *et al.* (2003)). Un effet antinutritionnel des TC peut apparaître lorsque leur concentration dépasse les 50 g/kg MS, mais ce seuil approximatif varie avec le fourrage.

Impact sur le bien-être et la santé

L'émission de CH₄ par les ruminants diminue jusqu'à 40%, avec la richesse en TCs du fourrage consommé. (Jayanegara *et al.* (2012)). Le risque de météorisation dû aux aliments riches en protéines diminue à partir d'une teneur en TCs de 50 g/kg MS (Min et al. (2003)).

IV. Matériels et méthodes :

Les extraits de 6 plantes tropicales, préalablement obtenu au laboratoire de l'URZ ont été analysés par HPLC avant et après thiololyse.

A. *Matériels utilisés :*

- Les échantillons analysés :
 - Extrait de feuille d'Icaque (*Chrysobalanus icaco* L.)
 - Extrait de feuille de Raisinier de bord de mer (*Coccoloba Uvifera*)
 - Extrait de feuille de Cajou (*Anacardium occidentale*)
 - Extrait de feuille de Goyavier (*Psidium guajava* L.)
 - Extrait de feuille de Pois d'Angole (*Cajanus cajan* L.)
 - Extrait de feuille de Chataigne (*Artocarpus altilis*)



FIGURE 3 : SOLUTIONS DES EXTRAITS DE TC

- Les Réactifs :
 - Méthanol pour HPLC
 - Acide acétique (C₂H₄O₂) à 1%
 - Acide chloridrique (HCl)
 - Benzyl mercaptan
 - Les Flavan-3-ols (Catéchine, Epicatéchine, Gallocatéchine, Epigallocatéchine et Dihydroquercétine) des laboratoires Sigma
- La verrie :
 - Bêchers
 - Eprouvette graduée
 - Pipette graduée
 - Piluliers
 - Seringue de 50µL
- Les appareils :

HPLC équipé :

 - d'une colonne C18 de 250 mm de long et de 4,6 mm de diamètre
 - d'un dégazeur : Degrassi MetaChem Technologies Inc
 - de deux pompes une pour chaque composant de l'éluant de VARIAN ProStar
 - d'un détecteur IR qui analyse aux longueurs d'ondes suivantes : 254,0 et 280,0 nm modèle : VARIAN ProStar 355 IR
- Logiciel de supervision :

Galaxie Chromatography Software version 1.10.1.2006 de Agilent Technologies



FIGURE 4 : CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE

Les échantillons étudiés ont été choisis car la concentration de tanins de ces derniers est connue donc l'expérience suivante permet de vérifier l'efficacité de la méthode de dosage de Tanins par HPLC.

B. Méthodes :

1. Chromatographie liquide haute pression (CLHP)

a) Principe de la Chromatographie Liquide par Haute Pression :

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange facilitant de ce fait leur identification et de leur quantification.

Les composés à séparer, les solutés, sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide, l'éluant. Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique.

La colonne utilisée est une colonne C18 de 250 mm de long et de 4,6 mm de diamètre à phase inverse. Elle est donc apolaire. Les Tanins sont des molécules polaires du fait de leurs fonctions hydroxyles .

- Méthode d'étalonnage utilisée :

Les teneurs sont estimées par la méthode d'étalonnage interne. Le dosage par étalonnage interne repose sur l'ajout en quantité parfaitement connue et unique dans toutes les solutions étalons et tous les échantillons, d'une molécule qui sert de référence durant les phases de l'analyse. Le dosage, plutôt que d'être fait de façon absolue à partir d'une droite d'étalonnage de l'analyte cible (étalonnage externe), se fait de façon relative par rapport à cette molécule de référence, appelée « étalon interne ».

Dans cette étude la Dihydroquercétine sera l'étalon interne. Il sera donc rajouté dans les échantillons à une concentration connue afin de pouvoir calculer le coefficient de réponse des différents analytes.

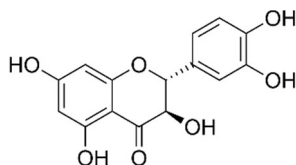


FIGURE 5: DIHYDROQUERCÉTINE (ETALON INTERNE)

b) Protocole :

Les échantillons analysés sont des extraits de tanins condensés de feuilles de plantes conservés dans un congélateur à -80°C.

Les extraits sont sous forme poudreuse ils sont donc solubilisés dans du méthanol pour obtenir des solutions de concentration 4mg/mL.

Les solutions sont filtrées à 0,45 microns.

Pour le passage des échantillons nous procédons d'abord à un conditionnement de la colonne C18 et un rinçage des tubes avec la phase mobile de composition 20% MeOH et 80% H₂O + C₂H₄O₂ à 1 %.

Une fois le conditionnement réalisé, les échantillons peuvent être injectés selon le gradient suivant (Tableau 1.) :

Tableau 1. Gradient utilisé pour l'analyse HPLC des échantillons d'extrait de TC

Temps en minutes	Composition de phase mobile en %	
	MeOH	H ₂ O + C ₂ H ₄ O ₂ à 1 %
0-5	20%	80%
5-40	20 à 75%	80% à 25%
40-45	75 à 100%	25 à 0%
45-50	100%	0%
50-55	100 à 20%	0 à 80%
55-60	20%	80%

Chaque passage d'extraits sur l'HPLC dure 60 minutes. Le volume d'analyte à injecter dans l'HPLC est de 20 µL.

Les standards sont passés séparément afin de connaître leurs temps de rétention et absorbance max. Cela permettra d'identifier les pics obtenus.

- Catéchine ($t_r = 6,86$ min)
- Epicatéchine ($t_r = 11,4$ min)
- Epigallocatechine ($t_r = 11,28$ min)
- Gallocatechine ($t_r = 5,36$ min)
- Dihydroquercétine ($t_r = 17,65$ min)

Une fois ces injections réalisées, 2 standards seront préparés

Pour pouvoir calculer le coefficient de réponse de chaque composé, (qui permettra par la suite de déterminer la concentration des composés dans les échantillons), nous devons injecter des Solutions standards.

- Standard 1 : dans lequel sont présent en même proportion du :
 - Catéchine (0,05 mg/mL)
 - Epicatéchine (0,10 mg/mL)
 - Epigallocatechine (0,22 mg/mL)
- Standard 2 : dans lequel il y a sous les proportions 9:1 les composés suivants :
 - Gallocatechine (0,01 mg/mL)

L'étalon interne Dihydroquercétine est ensuite rajouté aux deux solutions standards, à la concentration de 0,047 mg/mL.

On peut alors déterminer les facteurs de réponse k des Standards par le calcul qui suit :

$$\frac{\text{Aire du pic de l'analyte}}{[\text{Concentration de l'analyte}]} = k * \frac{\text{Aire du pic de l'étalon}}{[\text{Concentration de l'étalon}]}$$

$$\Rightarrow k = \frac{\text{Aire du pic de l'analyte}}{[\text{Concentration de l'analyte}]} * \frac{[\text{Concentration de l'étalon}]}{\text{Aire du pic de l'étalon}} \quad (\text{formule 1})$$

Ensuite chaque extrait de TC est analysé afin de connaître la quantité de tanins condensés et de flavanols libres présents. Les extraits de concentration de 4 mg/mL sont additionnés de Dihydroquercétine à 0,4 mg/mL dans une proportion 8 : 2. On a alors une concentration de 0.08 mg/mL de Dihydroquercétine.

Le facteur de réponse k est propre à chaque analyte. Grâce à celui-ci, on peut déterminer les concentrations des analytes dans les échantillons comme suit :

$$\Rightarrow [\text{Concentration de l'analyte}] = \frac{[\text{Concentration de l'étalon}]}{\text{Aire du pic de l'étalon}} * \frac{\text{Aire du pic de l'analyte}}{k} \quad (\text{formule 2})$$

2. Thiolyse :

Les extraits de tannins (sous forme poudreuse) obtenus à partir des feuilles sont dissous dans de l'éthanol pour obtenir une solution de 4 mg/mL. Cette dernière est filtrée par un filtre de téflon de 0,45 μm . La réaction de thiolyse se fait par ajout de méthanol acidifié par de l'acide chloridrique à 3,3%.

Pour effectuer la thiolyse 50 μL d'extrait sont prélevés auquel sont ajouté 50 μL de méthanol acidifié suivi de 100 μL de solution de benzyl mercaptan. Le mélange est conservé dans un vial puis incubé à 40°C pendant 30 minutes.

Pour arrêter la réaction le vial est trempé dans un bain glacé. Les vials sont ensuite stockés durant 18h à -25°C. Puis les échantillons sont analysés sur l'HPLC par la méthode « Thiolyse des Tanins ».

A la fin de cette thiolyse les tanins ont été séparés en leurs différents monomères les flavan-3-ols. Ils seront séparés et identifier par HPLC. Cependant le procédé ne peut identifier que les unités terminales des polymères. Ceux-ci ne représentent qu'une très faible proportion des flavanols.

Pour identifier les autres monomères appelés « unité d'extension » il est nécessaire de fixer un groupement adduit de benzyl mercaptan sur le C₄ du flavan-3-ol.

V. Résultats et discussion :

1°) Analyse des Etalons et standards

Le chromatogramme du mélange des 4 standards et de l'étalon montre la présence de 5 pics (figures 6 et 7). L'analyse s'est donc bien déroulée. Les résultats des facteurs de réponse des analytes, calculés selon la formule 1) vu précédemment, sont présentés dans le Tableau 2 ci-après. Les facteurs de réponse des standards par rapport à l'étalon interne DHQ varient entre 0.09 et 0.5 et ont des valeurs comparables à celles observées dans la littérature (Gea et al., 2011).

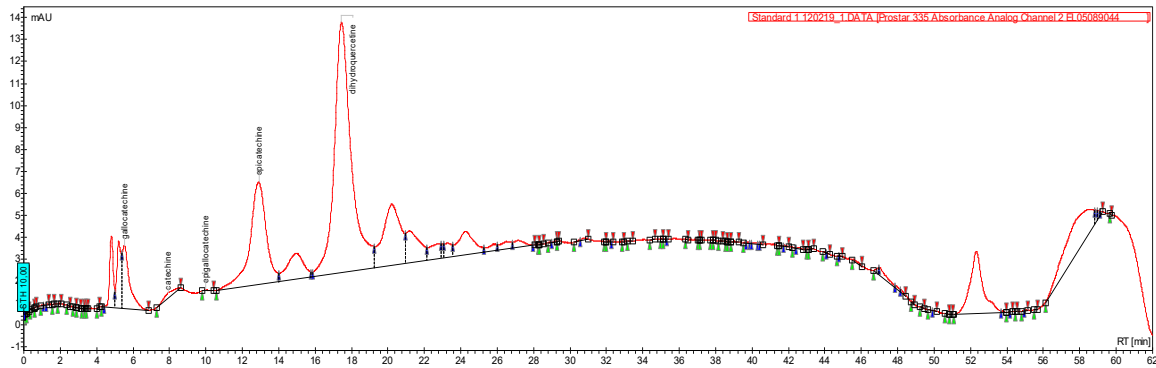


FIGURE 6 : CHROMMATOGRAMME DE LA SOLUTION STANDARD 1 (VOIR PAGE 12)

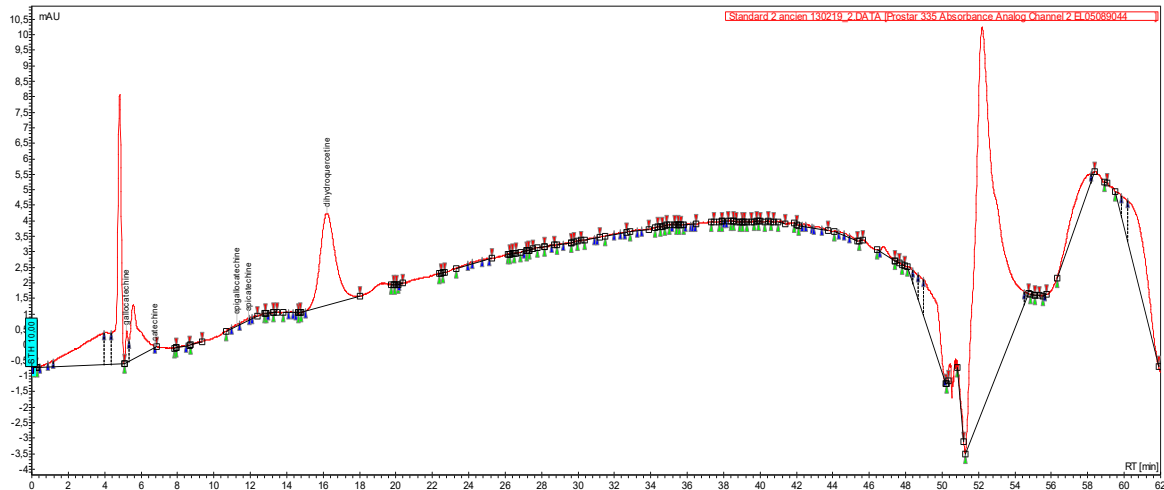


FIGURE 7 : CHROMMATOGRAMME DE LA SOLUTION STANDARD 2 (VOIR PAGE 12)

Tableau 2. Temps de rétention, longueur d'onde max et facteur de réponse des standards et étalon interne.

Analyte	Concentration (mg/mL)	Temps de rétention (minute)	Longueur d'onde d'Absorbance max (nm)	Facteur de réponse k (par rapport à la DHQ)
Catéchine	0,0125	6,86	230	0,25
Epicatéchine	0,025	11,4	277	0,51
Epigallocatechine	0,055	11,28	228	0,18
Gallocatechine	0,009	5,36	236	0,09
Dihydroquercétine (DHQ)	0,01175	17,65	287	1

2°) Analyse chromatographique des extraits de TC

Les résultats obtenus pour l'analyse des chromatogrammes des extraits de TC des 6 plantes sont présentés dans le Tableau 3 ci-après.

Les temps de rétention obtenus lors des analyses des extraits sont les mêmes que ceux obtenus pour l'analyse des standards et des analytes seuls (Tableau 2). L'acquisition spectrale s'est donc bien déroulée.

Les résultats obtenus montrent que les concentrations en flavanols libres varient entre $1,37 \cdot 10^{-4}$ et $1,024$ mg/mL. Toutes les plantes évaluées contiennent des composés galloylés. Seuls les extraits de TC d'icaque et de châtaigne ne contiennent pas de catéchine. L'extrait de TC de goyave est le seul contenant de l'épigallocatechine. Aucun extrait de plante testée ne contient d'épicatéchine libre. Les teneurs en TC obtenues varient entre 1.7 et 18.63 g/100g d'extrait sec. C'est l'extrait de TC de goyave qui est le plus riche en TC. On constate une valeur en flavanols libres supérieure à celle des TC pour l'icaque. La feuille d'icaque a été sélectionnée au laboratoire pour sa richesse en TC suite à un premier screening phytochimique. Face au résultat obtenu, l'hypothèse émise est que l'ensemble des TC présents dans l'échantillon n'aurait pas été détecté par la méthode HPLC utilisée, car en raison de leur masse moléculaire élevée (haut degré de polymérisation), une partie de ces TC aurait un temps de rétention plus long que la durée d'acquisition définie. Ces TC n'auraient pas été entraînés par la phase mobile, contrairement aux flavanols libres, plus légers. Cette hypothèse pourrait être rapportée à l'ensemble des échantillons testés. Compte tenu de cette hypothèse, il est probable que la teneur en TC estimée lors de l'étude soit partielle (Tableau 3).

Tableau 3. Concentrations en flavanols libres et en TC des extraits de TC des six plantes, déterminées à l'aide de l'analyse HPLC

Plantes	Concentration en mg/mL						Tanins condensés g/100g d'extrait sec
	Catéchine	Gallocatéchine	Epicatéchine	Epigallocatechine	Flavanols libres	Tanins condensés	
Icaque	0	1,024	0	0	1,024	38,40.10 ⁻²	12
Pois d'Angole	6,34.10 ⁻⁴	1,41.10 ⁻⁴	0	0	7,75.10 ⁻⁴	27,84.10 ⁻²	8.70
Châtaigne	0	1,37.10 ⁻⁴	0	0	1,37.10 ⁻⁴	5,63.10 ⁻²	1.76
Cajou	6,54.10 ⁻²	4,49.10 ⁻²	0	0	11,03.10 ⁻²	18,86.10 ⁻²	5.89
Goyave	1,25.10 ⁻¹	8,85.10 ⁻³	0	4,70.10 ⁻¹	6,039.10 ⁻¹	59,62.10 ⁻²	18.63
Raisin	5,86.10 ⁻²	6,21.10 ⁻²	0	0	12,07.10 ⁻²	5,43.10 ⁻²	1.70

3°) Analyse chromatographique post thiolyse

L'étalon DHQ est bien présent sur tous les chromatogrammes des extraits thiolyés et au même temps de rétention. L'analyse s'est donc bien déroulée. Si on compare les chromatogrammes pré et post thiolyse pour une plante donnée, On constate que le nombre de pics observés a augmenté après la thiolyse de l'extrait (figures 7 et 8). De plus, des pics de flavanol libres sont retrouvés. Cela montre bien qu'une lyse a été réalisée sur les composés TC présents dans l'extrait. D'autre part, les pics observés ont des absorbances plus faibles que ceux de l'analyse avant thiolyse.

Les TC contenus dans les extraits ayant été thiolyés, leurs unités terminales sont transformées en flavan-3-ols libres et leurs unités d'extension, en dérivés. Ce sont ces composés que l'on observe sur le chromatogramme (figure 8).

Durant le cours du stage, le Benzyl Mercaptan, qui est un composé essentiel pour le dosage des flavanols après thiolyse, a connu un retard lors de la livraison. Il a donc été impossible de doser les flavanols thiols (unités d'extensions) résultant de la thiolyse, et par conséquent de déterminer les caractères structuraux des TC (degré de polymérisation, ratio procyanidine/prodelphinidine).

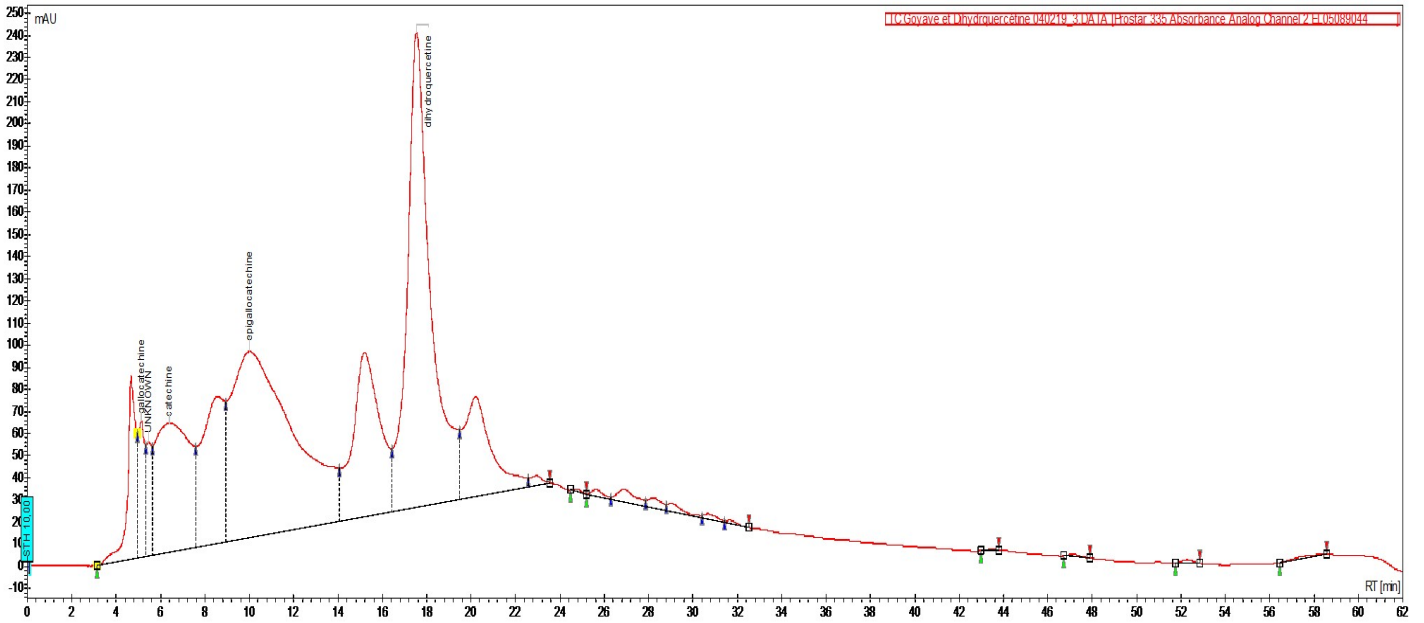


FIGURE 8 : CHROMATOGRAMME HPLC OBTENU POUR L'EXTRAIT DE TC DE FEUILLE DE GOYAVIER AVANT THIOLYSE

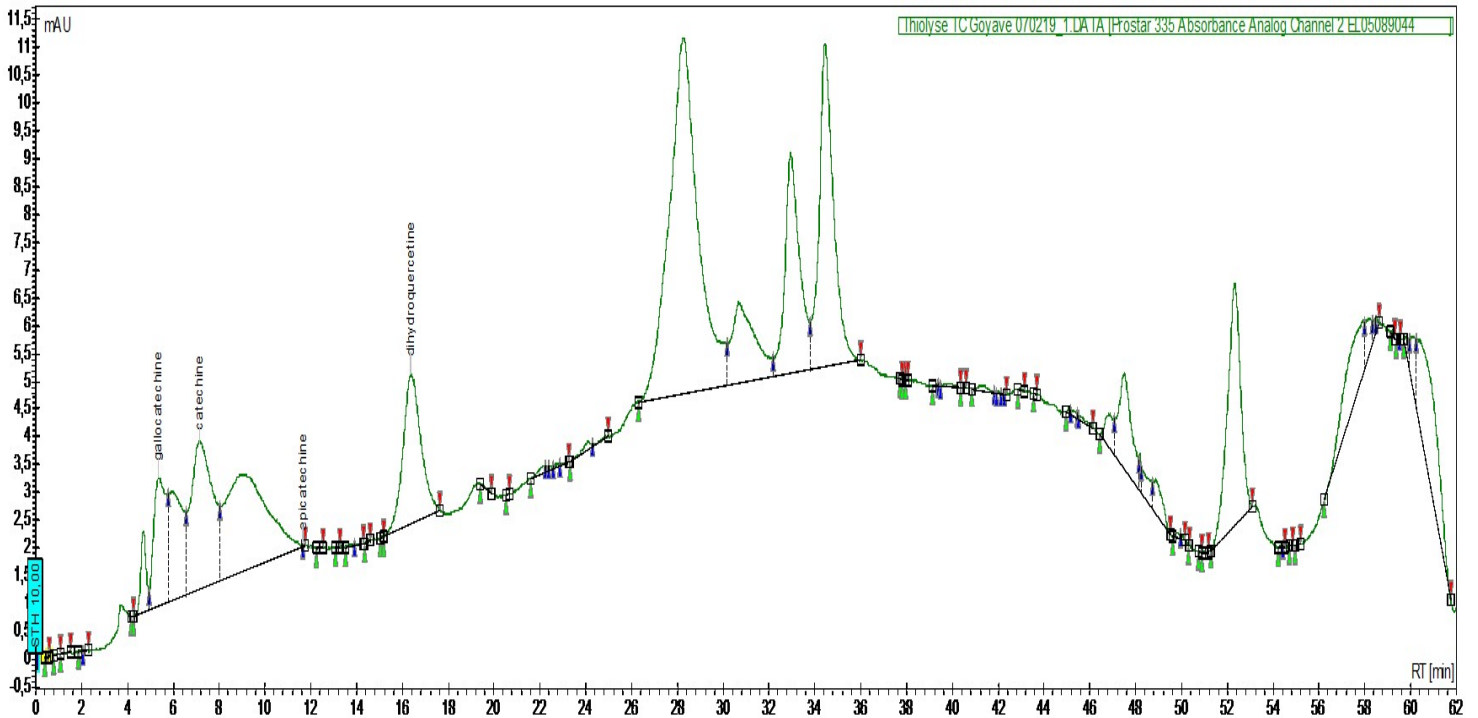


FIGURE 9 : CHROMATOGRAMME HPLC OBTENU POUR L'EXTRAIT DE TC DE FEUILLE DE GOYAVIER APRES THIOLYSE

Conclusion et perspectives :

L'objectif de ce stage était d'initier une méthodologie de caractérisation des tanins condensés dans les végétaux, par la méthode HPLC après thiolysé. Ces travaux préliminaires ont permis d'obtenir les profils chromatographiques des TC de 6 plantes tropicales et de déterminer leurs concentrations en flavan-3-ols libres : Catéchine, Gallocatéchine, Epicatéchine et Epigallo-catéchine.

L'étude de la caractérisation des TC doit être complétée par des essais d'injection sur une plus longue durée d'acquisition, afin de voir si l'ensemble des TC est élué selon cette méthode avant thiolysé. De plus, il est nécessaire de synthétiser des BM adducts pour la détermination des paramètres structuraux. Une analyse LC-MS viendrait finaliser l'identification des pics. D'autre part, cette première étude montre qu'on observe des structures différentes des TC des 6 plantes testées. Cette diversité de structure pourrait traduire une diversité bioactive, à vérifier par des essais biologiques *in vitro* et *in vivo*.

VI. Références Bibliographiques :

AN GEA, ELISABETTA STRINGANO, RON H. BROWN, AND IRÈNE MUELLER-HARVEY (2011) In Situ Analysis and Structural Elucidation of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) Tannins for High-Throughput Germplasm Screening *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 495-503.

Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., (2001), Analysis of condensed tannins : a review. *Animal Feed Science and technology*.

TERRILL T.H., DOUGLAS G.B., FOOTE A.G., PURCHAS R.W., WILSON G.F. and BARRY T.N. (1992b) Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*). *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 119, 265-273.

NIEZEN J.H., WAGHORN T.S., CHARLESTON W.A.G. and WAGHORN G.C. (1995) Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lamb grazing either Lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 125, 281-289.

BHATTA R., UYENO Y., TAJIMA K., TAKENAKA A., YABUMOTO Y., NONAKA I., ENISHI O. and KURIHARA M. (2009) Difference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile fatty acid production and methanogenic archae and protozoal populations. *Journal of Dairy Science*, 92, 5512-5522

BARRY T.N. (1989) Condensed tannins their role in ruminant protein and carbohydrate digestion and possible effects upon the rumen ecosystem. In: Nolan J.V., Leng R.A. and Demeyer D.I. (eds) *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*, pp. 153-169. Armidale, NSW, Australia: Penambul Books.

WANG Y., WAGHORN G.C., BARRY T.N. and SHELTON I.D. (1994) The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* on plasma metabolism of methionine, cysteine and inorganic sulphate by sheep. *British Journal of Nutrition*, 72, 923-935.

Mahieu M, (2014), Gestion du parasitisme gastro-intestinal des petits ruminants en zone tropicale humide. Thèse de doctorat, Sciences Agronomiques, Université de Lorraine, 177p.

Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., McNabb, W.C., 2003, *The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106, 3-19.

Jayanegara, A., Leiber, F., Kreuzer, M., 2012, Meta-analysis of the relationship between dietary tannin level and methane formation in ruminants from in vivo and in vitro experiments. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96, 365-375.

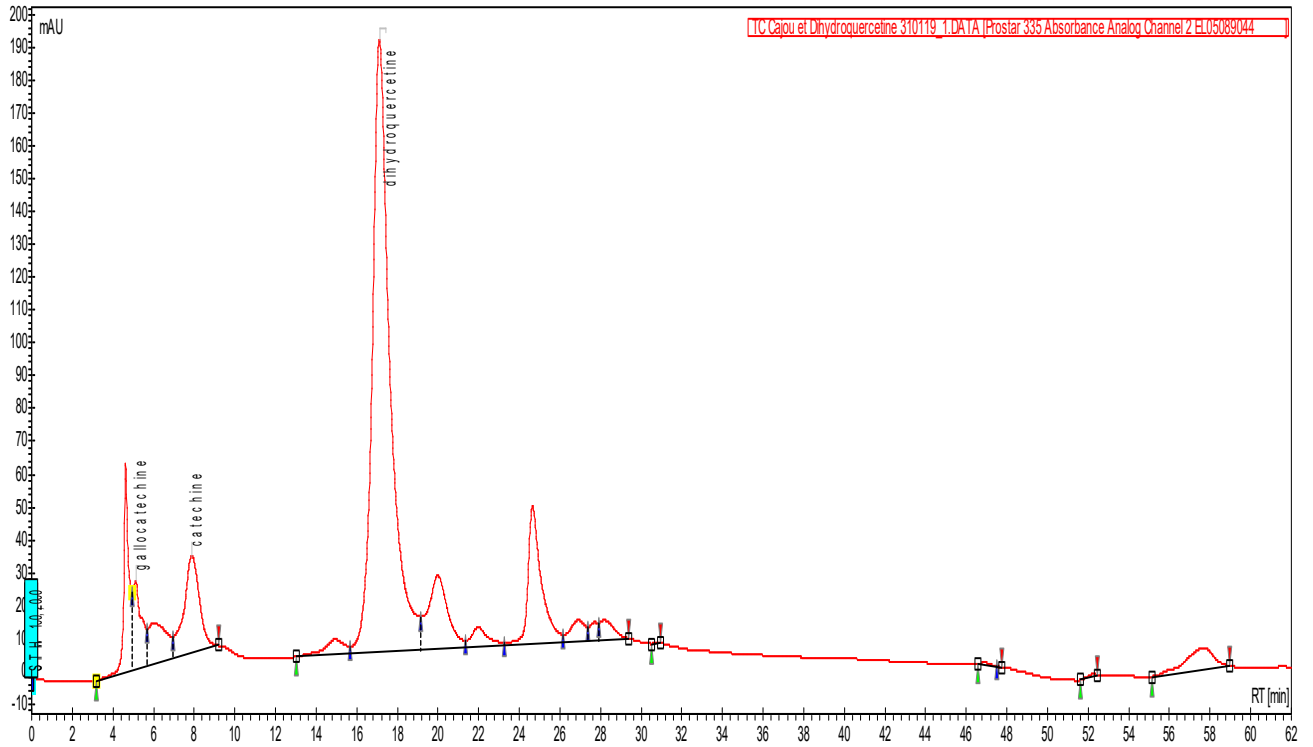
Min, B.R., Hart, S.P., 2003, Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.*81, E102–E109.

Archimède, H., Marie-Magdeleine, C., Boval, M., Sauvant, D., 2018, Specificities of feeding ruminant livestock in warm areas, In: INRA (Ed.) *INRA feeding system for ruminants*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, p. 640.

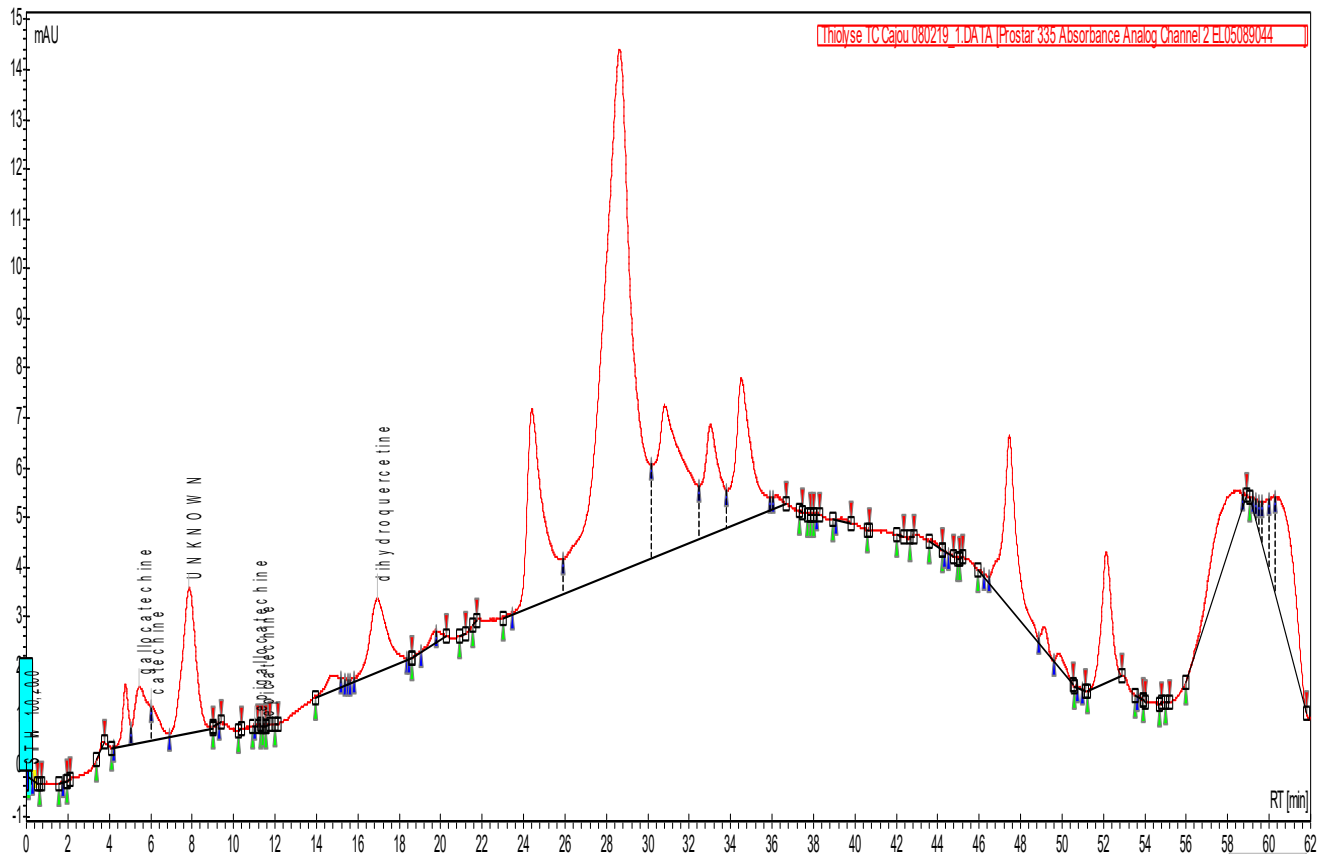
Zeller, W.E., Ramsay, A., Ropiak, H.M., Fryganas, C., Mueller-Harvey, I., Brown, R.H., Drake, C., Grabber, J.H., 2015, ^1H – ^{13}C HSQC NMR Spectroscopy for Estimating Procyanidin/Prodelphinidin and cis/trans-Flavan-3-ol Ratios of Condensed Tannin Samples: Correlation with Thiolytic. *J. Agric. Food Chem.*63, 1967-1973.

Annexes :

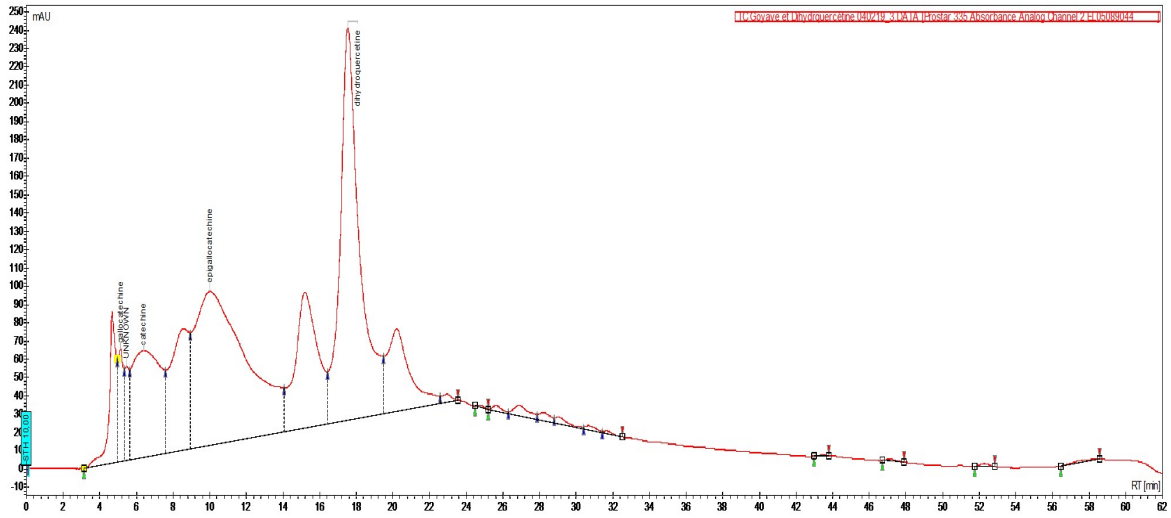
Annexe 1 : Chromatogramme TC Cajou avant thiolys



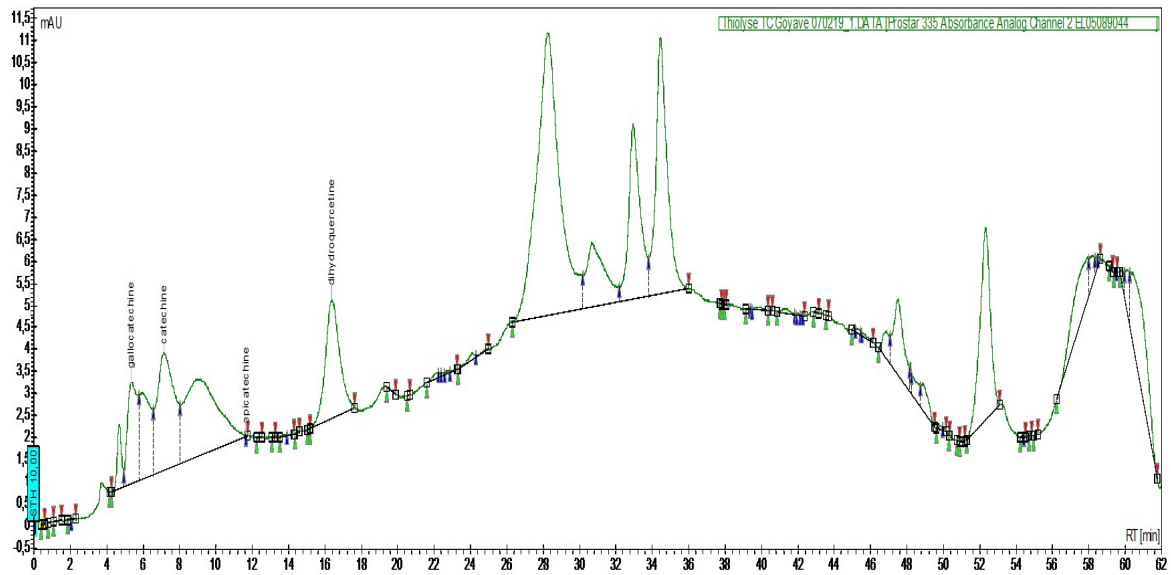
Annexe 2 : Chromatogramme thiolys TC Cajou



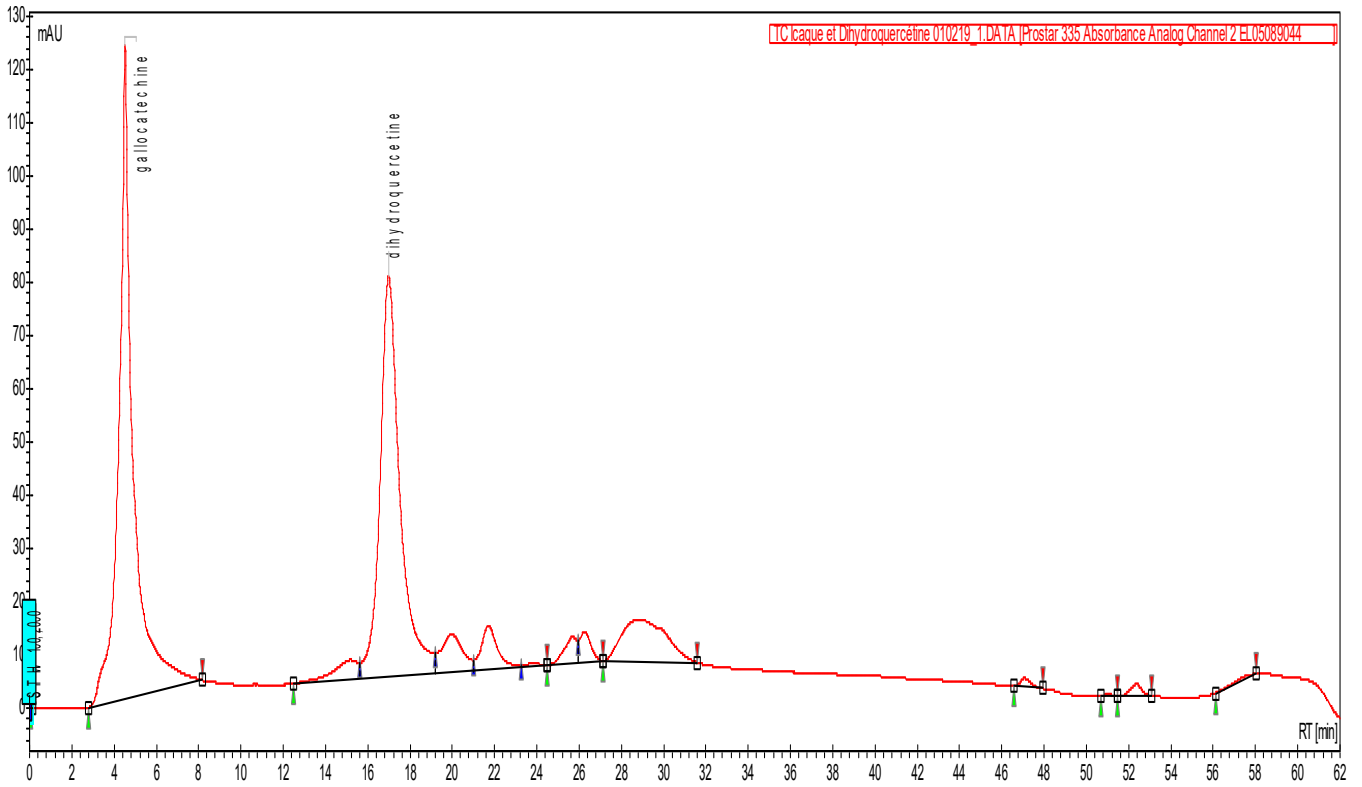
Annexe 3 : Chromatogramme TC Goyave avant thiolys



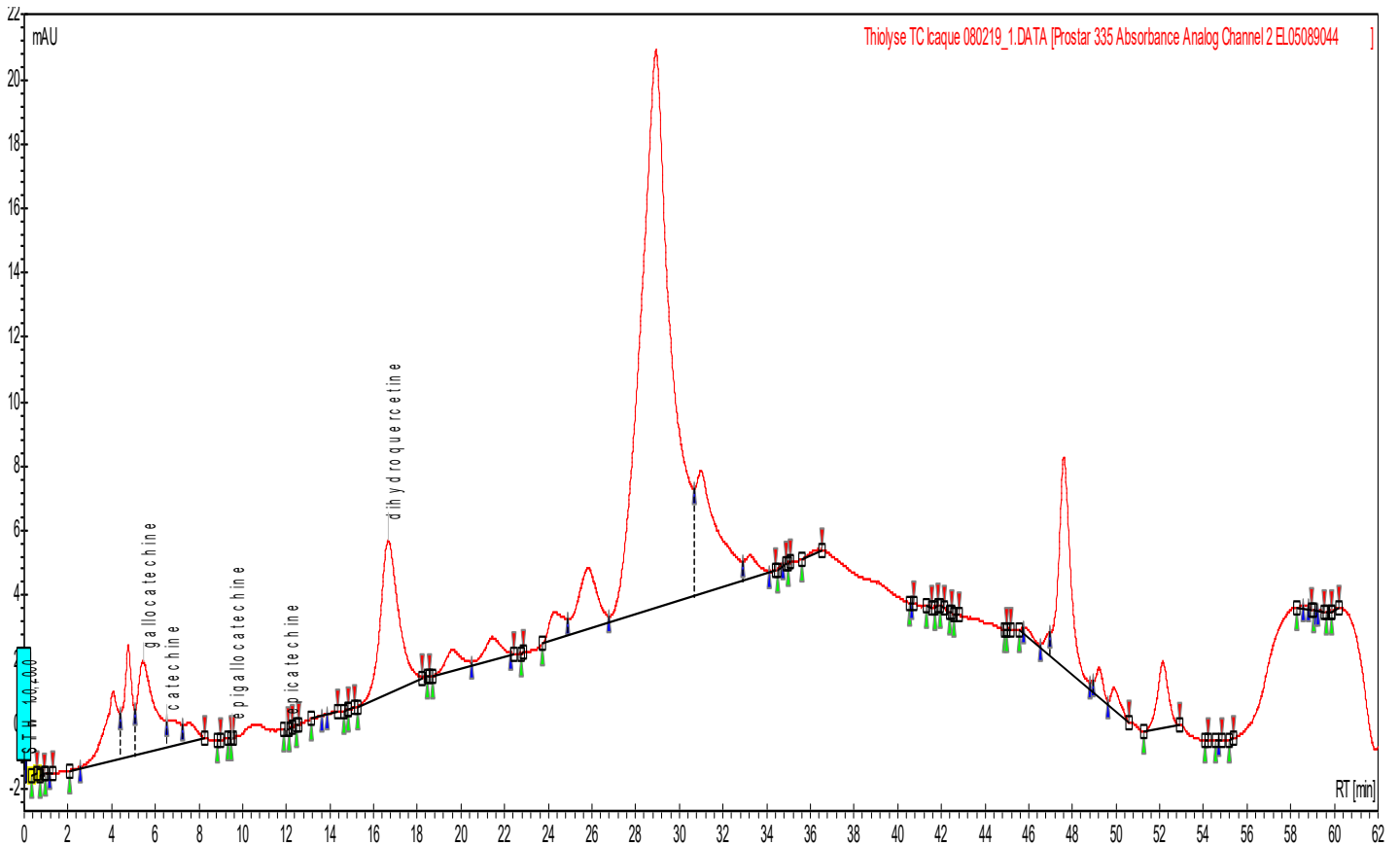
Annexe 3 : Chromatogramme thiolys TC Goyave



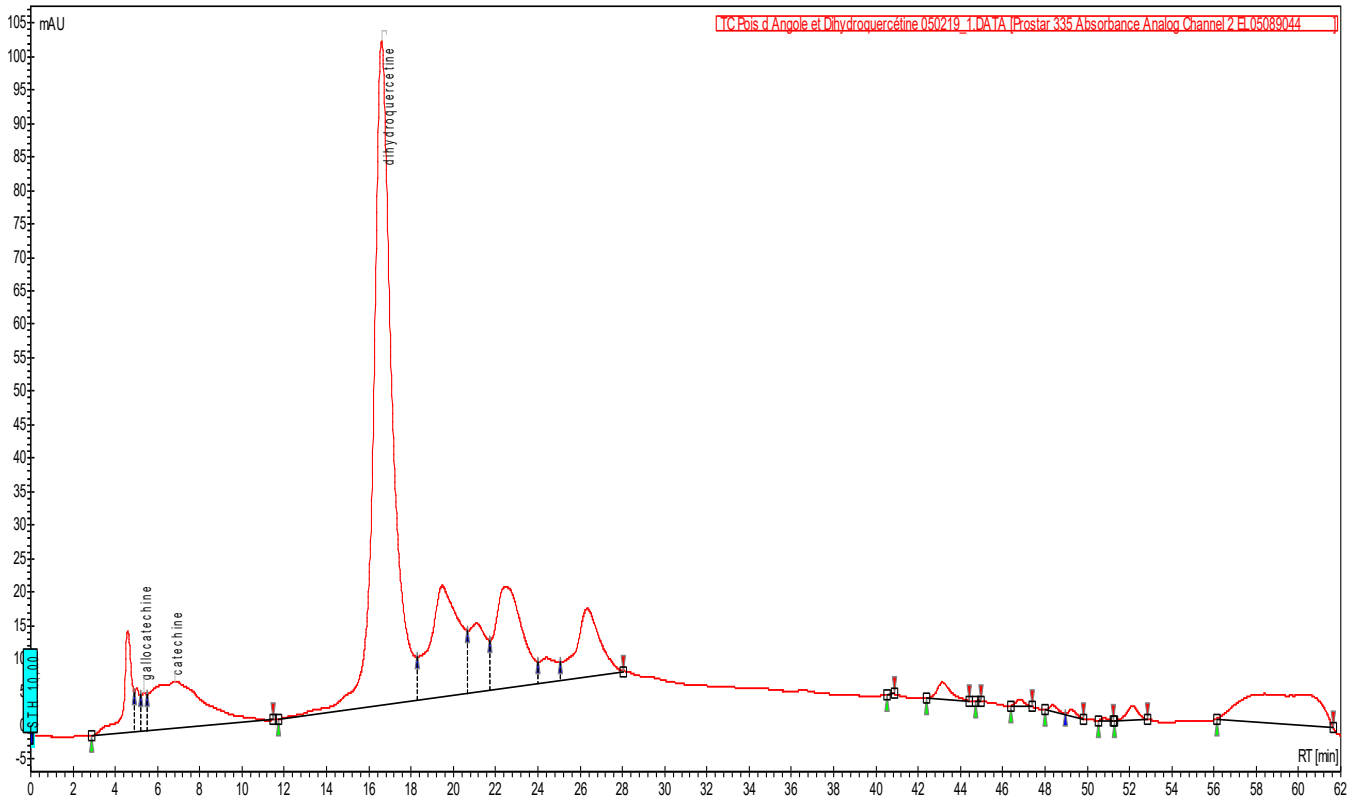
Annexe 5 : Chromatogramme TC Icaque avant thiolysse



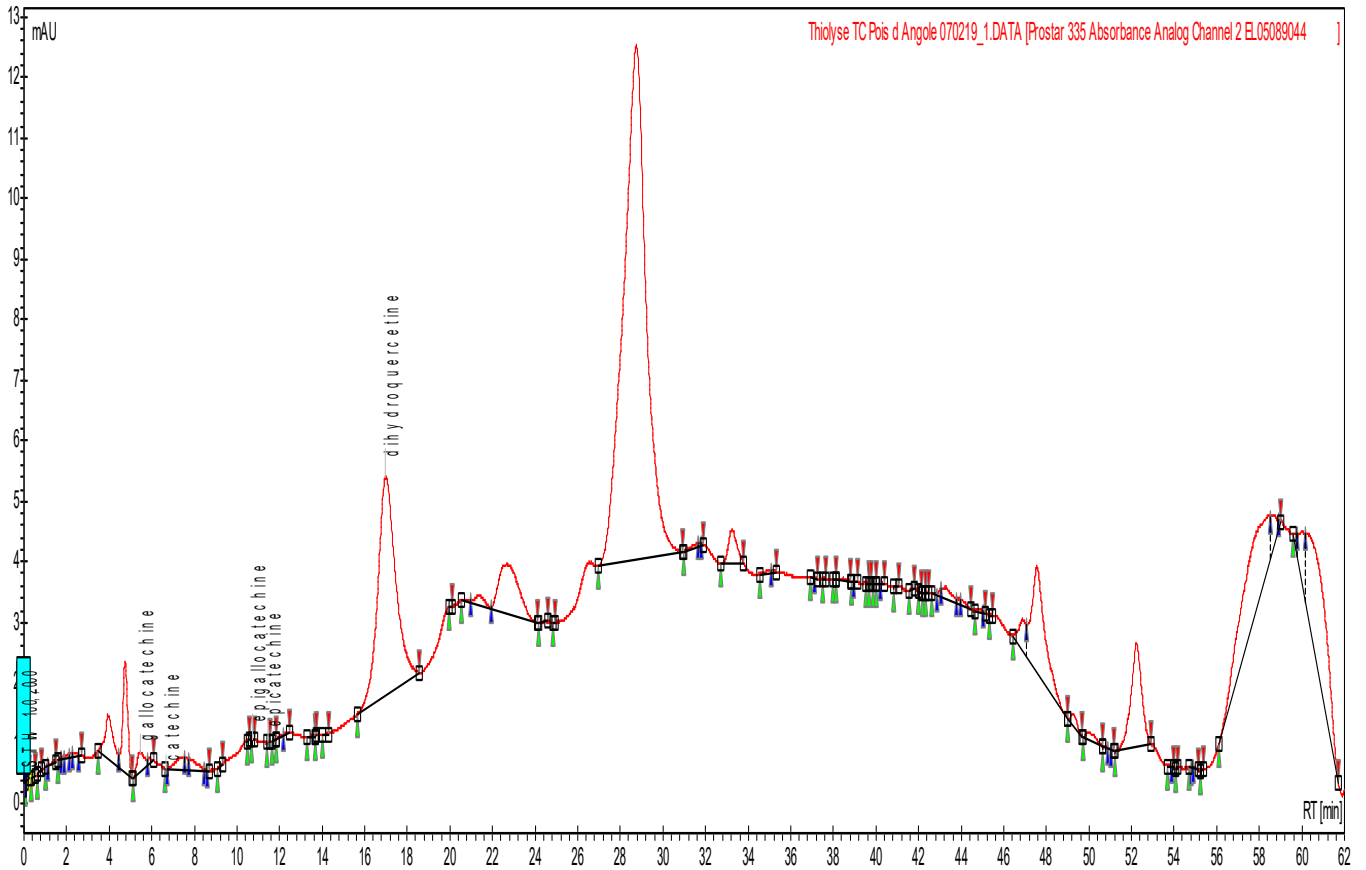
Annexe 6 : Chromatogramme thiolysse TC Icaque



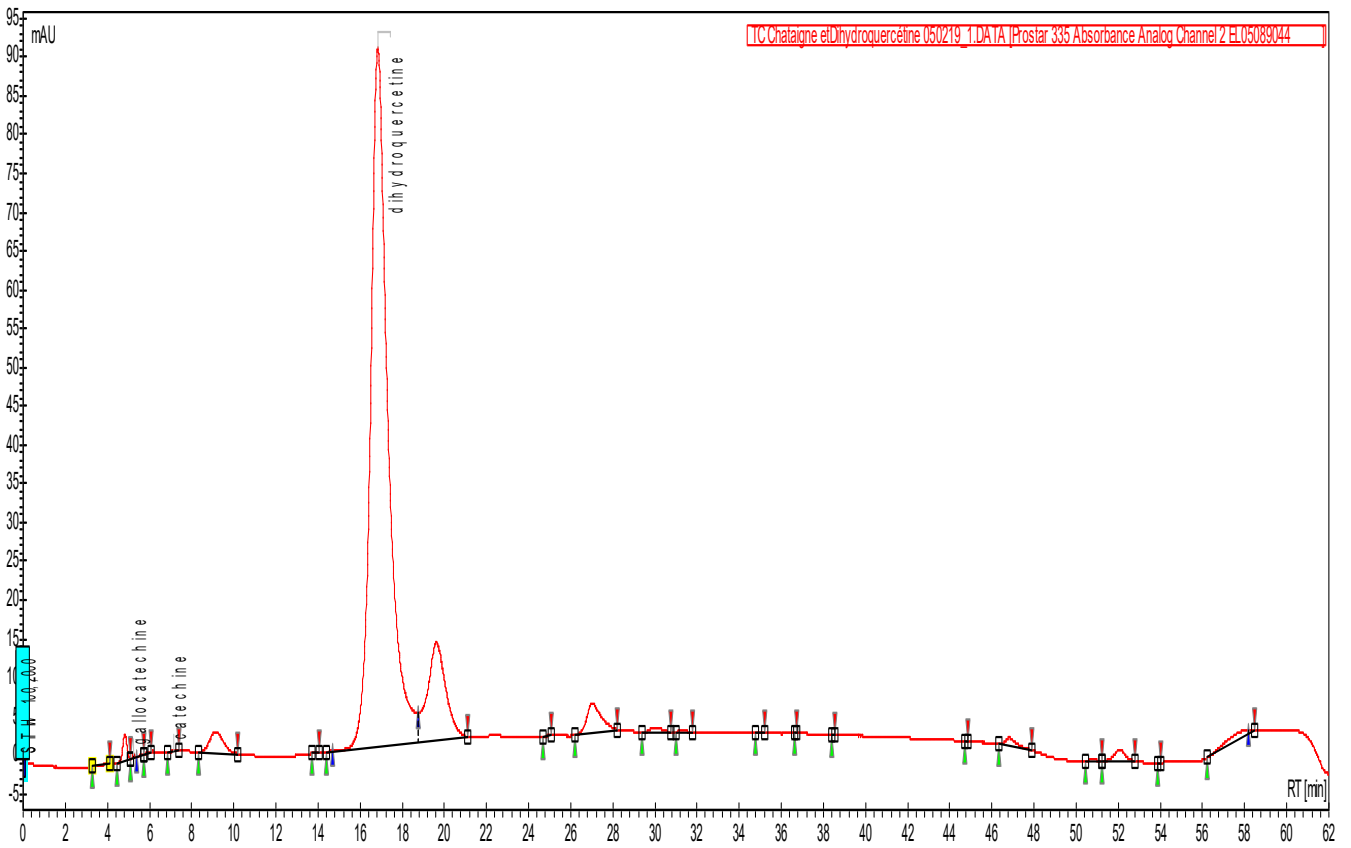
Annexe 7 : Chromatogramme TC Pois d'Angole avant thiolysse



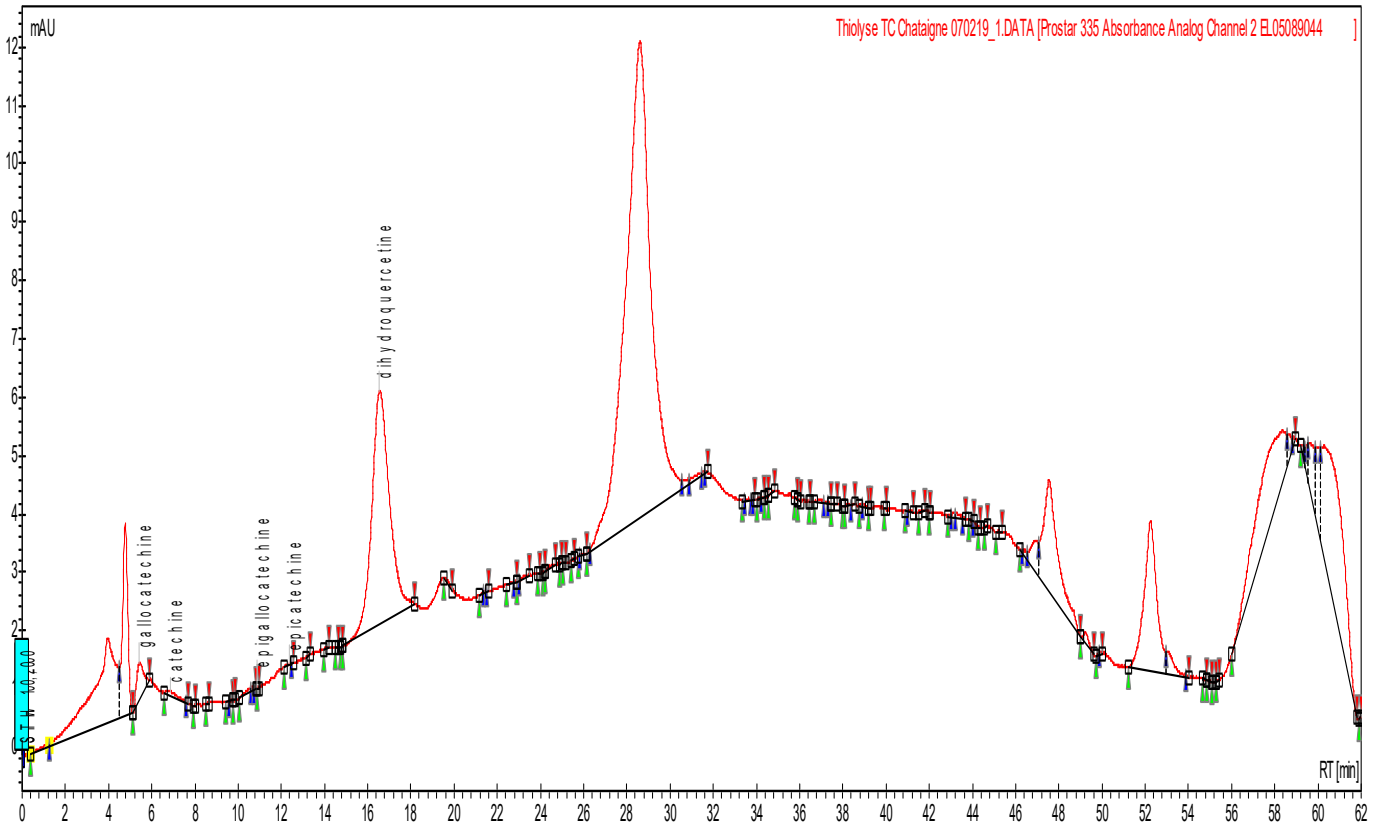
Annexe 8 : Chromatogramme thiolysse TC Pois d'Angole



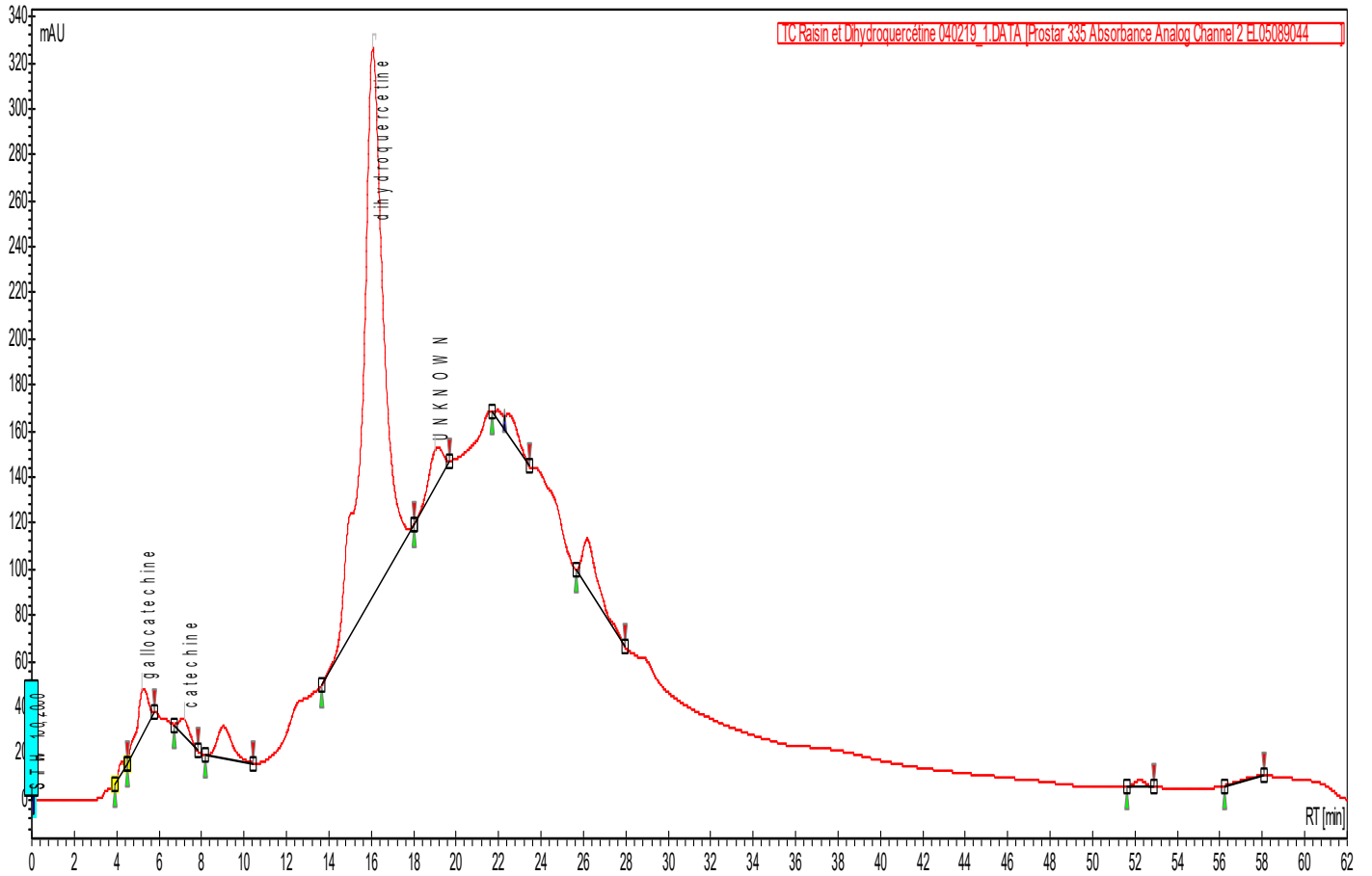
Annexe 9 : Chromatogramme TC Chataigne avant thiolys



Annexe 10 : Chromatogramme thiolys TC Chataigne



Annexe 11 : Chromatogramme TC Raisin avant thiolys



Annexe 12 : Chromatogramme thiolys TC Raisin

