



**HAL**  
open science

# Étude d'une méthodologie de prédiction de la caractérisation chimique de plantes tropicales riches en tanins condensés par chimiométrie

Laurie Nerome

► **To cite this version:**

Laurie Nerome. Étude d'une méthodologie de prédiction de la caractérisation chimique de plantes tropicales riches en tanins condensés par chimiométrie. Chimie. 2018. hal-02960781

**HAL Id: hal-02960781**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02960781>**

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.

# Etude d'une méthodologie de prédiction de la caractérisation chimique de plantes tropicales riches en tanins condensés par chimiométrie.



**NEROME Laurie**

**M2 PCMA**

Année 2017/2018

Maître de stage : MARIE-MAGDELEINE Carine  
Tuteurs de stage : HOCHLAF Majdi SCHWELL Martin

## REMERCIEMENTS

Je tiens avant tout à adresser mes remerciements à tous ceux qui ont participé au bon déroulement de mon stage au sein de l'Unité de Recherche Zootechnique de l'INRA au cours de ces cinq mois.

Je tiens, tout particulièrement, à remercier ma responsable de stage Mme Carine Marie-Magdeleine pour sa patience, ses conseils et sa disponibilité. Mais surtout merci de m'avoir permis d'acquérir une véritable expérience professionnelle et humaine.

Mes remerciements également au personnel de laboratoire, Suzitte Calif, Lucien Philibert et Yoann Félicité, qui m'ont apporté leur aide et ont répondu à toutes mes questions.

Une pensée pour mes camarades stagiaires Laura, Marie-Lauranna et tous ceux que j'ai pu rencontrer au cours de ce stage et qui ont participé à l'agréable ambiance du laboratoire.

Je remercie mes parents et ma famille pour leur soutien et leur encouragement.

Enfin, merci aux universités Paris-Est et Marne-La-Vallée, de nous avoir donné l'opportunité de gagner une expérience humaine et professionnelle.

# SOMMAIRE

<b>Organisme d'accueil</b> .....	<b>4</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>5</b>
<b>Lexique</b> .....	<b>6</b>
<b>I) Introduction</b> .....	<b>7</b>
<b>II) Etude bibliographique</b> .....	<b>8</b>
<b>1) Les tanins condensés</b> .....	<b>8</b>
<b>A) Structure chimique</b> .....	<b>8</b>
<b>B) Activité biologique</b> .....	<b>9</b>
<b>2) Techniques de dosage</b> .....	<b>10</b>
<b>3) Spectroscopie proche infrarouge (SPIR)</b> .....	<b>11</b>
<b>4) Chimométrie</b> .....	<b>12</b>
<b>III) Expérimentation</b> .....	<b>13</b>
<b>1) Matériels et méthodes</b> .....	<b>13</b>
<b>A) Matériel Végétal</b> .....	<b>13</b>
<b>B) Appareillage</b> .....	<b>15</b>
<b>C) Méthodes</b> .....	<b>16</b>
<b>2) Résultats et discussion</b> .....	<b>20</b>
<b>A) Analyse quantitative</b> .....	<b>20</b>
<b>B) Analyse qualitative</b> .....	<b>22</b>
<b>IV) Conclusion</b> .....	<b>23</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>25</b>
<b>Annexe</b> .....	<b>28</b>

# ORGANISME D'ACCUEIL

L'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) est un institut français de recherche en agronomie fondé en 1946. 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.

L'INRA est constitué de 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. Le site de Guadeloupe est composé de trois unités (UMR ASTRE ; UR ASTRO et URZ).

L'URZ (Unité de Recherche Zootechnique) a pour objectif de rechercher 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'élevage tropicales
- La valorisation multicritères des ressources végétales
- Les performances et fonctions des systèmes d'élevage tropicaux

Cette unité travaille en étroite collaboration avec la Plateforme Tropicale d'Expérimentation sur l'Animal (PTEA) une unité expérimentale qui met en œuvre les travaux de recherche de l'URZ. 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.

## RÉSUMÉ

Les tanins condensés d'origine végétale présentent des effets biologiques multiples chez les petits ruminants d'élevage sur les plans 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 analyser de façon simple et rapide. Cependant les méthodologies actuelles restent complexes et difficiles à mettre en œuvre.

Dans cette étude nous avons évalué la méthode de spectroscopie proche infrarouge comme alternative aux dosages classiques, pour une analyse qualitative et quantitative rapide des tanins condensés de 3 plantes tropicales. Nous avons ainsi pu développer une méthode quantitative applicable aux plantes de Manioc et Pois d'angole. Les spectres ont été prétraités par **SNV** couplé à une **SG** de degré 1 avant de procéder à une régression **PLS**. Les coefficients de corrélations des droites de calibration pour l'estimation des TCs et les SECV sont respectivement de 0,64 et 3,16 dans le manioc ; et de 0,87 et 2,95 pour le pois d'angole. De plus, des corrélations significatives ont été obtenues entre valeurs SPIR prédites et valeurs de référence pour le set de validation (supérieur à 0,7 pour les deux plantes). Des travaux sont encore à poursuivre pour aboutir à une analyse qualitative.

## ABSTRACT

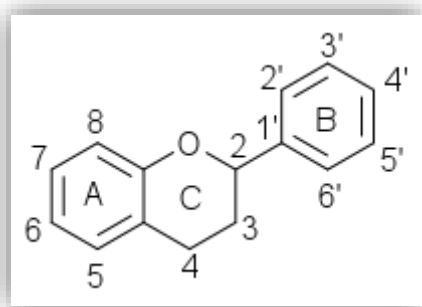
Plant Condensed tannins may have multiple biological effects in farmed small ruminants in terms of food, health and environment. These effects vary according to the type and quantity of tannins. In order to incorporate condensed tannins into the diet of ruminants, it is necessary to be able to analyze them simply and quickly. However, current methodologies remain complex and difficult to implement.

In this study, we evaluated the chemometric method of near infrared spectroscopy, as an alternative to conventional assays, for a rapid qualitative and quantitative analysis of condensed tannins of 3 tropical plants. Using SNV and SG1 spectral pretreatments and PLS regression, we have thus been able to develop a quantitative method applicable to Cassava and Pigeon Pea plants, with a calibration curve correlation and SECV of respectively 0,64 and 3,16 for Cassava, and of 0,87 et 2,95 for Pigeon Pea. Work is still to be done to reach a qualitative analysis for these plants.

## LEXIQUE ET ABREVIATIONS

- ❖ **Rumen** : Premier des quatre compartiments du système digestif des ruminants, aussi appelé la panse.
- ❖ **MS** : Matière sèche.
- ❖ **MODI** : Matière organique digestible ingérée.
- ❖ **Outlier** : Valeur aberrante d'un échantillon qui fausse le résultat.
- ❖ **SNV** : *Standard Normal Variate*. Transforme les spectres de façon à ce que leur moyenne et leur dérivé standard égales à 0 et 1 respectivement.
- ❖ **SG** : *Savitzky-Golay*. Algorithme Produisant une dérivé d'ordres 0, 1 ou 2.
- ❖ **RMSEC** : Erreur quadratique moyenne de calibration de la méthode (root-mean-square error).
- ❖ **RMSECV** : Erreur quadratique moyenne de validation croisée.
- ❖ **RMSEP** : Erreur quadratique moyenne de précision.

## D INTRODUCTION



**Figure 1: Monomère de Catechine**

Les tanins condensés (TC) sont des polymères constitués d'unités de flavan-3-ols liées par des liaisons carbone-carbone 4→8 ou 4→6 (Zeller et al. 2015).

Les tanins sont des molécules complexes présentes dans de nombreux végétaux tels que les prunes et les raisins ou le manioc et la leucène.

Les tanins condensés sont notamment reconnus pour leur impact positif dans l'agriculture. Il a été démontré que les TC agissent sur la dynamique gastro-intestinale des ruminants. En effet, ils sont impliqués dans la modulation de la protéolyse des ruminants. (Min et al. 2003). De manière générale l'ajout des TC dans l'alimentation des ruminants permet d'augmenter la productivité des fermes. Il leur a également été reconnu une réduction des parasites intestinaux suite à leur utilisation. (Hoste et al. 2006).

De plus les TC ont pour effet d'inhiber la méthanogènes chez les ruminants. Par conséquent on observe une diminution d'émission de méthane après ingestion de TC. Ceux-ci ont donc un effet écologique positif indirect. (Patra et al. 2010).

Compte tenu du potentiel multi-actif de ces molécules, il apparaît intéressant de les incorporer les tanins dans l'alimentation des ruminants. Pour cela, il est nécessaire de pouvoir déterminer la concentration en tanin des plantes comestibles par les ruminants.

Il existe plusieurs techniques de dosage de tanins (butanol-HCl, Vanilline, HPLC, LC-MS..), présentant toutes des désavantages plus ou moins contraignants (méthodologies lourdes et coûteuses, pas de standards universel, manque de spécificité des techniques). De plus, la complexité de structure et de composition des TC rend leur quantification difficile.

La méthodologie SPIR (spectroscopie proche Infra rouge), utilisée en industrie agro alimentaire et en agriculture, pourrait être une alternative aux dosages classiques tout en permettant une caractérisation rapide des plantes à TC. Il s'agit d'une méthode écologique, simple, rapide et fiable, qui permet l'analyse qualitative et quantitative d'échantillons, quasi instantanément (Dykes et al. 2014). La méthode SPIR est couplée à la chimiométrie, méthode mathématique et statistique pour l'analyse optimale des données chimiques. La fiabilité et la précision du modèle statistique développé reposent sur la robustesse de la base de données utilisée.



Lors de ce stage nous avons cherché à caractériser, de manière qualitative et quantitative, les tanins condensés de différentes espèces végétales, en utilisant la SPIR couplée à la chimiométrie

## **ID ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

Les tanins sont des substances polyphénoliques solubles dans l'eau et présentes dans de nombreux végétaux. On les retrouve dans le bois, écorces, fruits, feuilles, racines etc. ( Mané et al. 2007 ; Ricci et al. 2015).

Les tanins sont classés en deux catégories, les tanins hydrolysables et les tanins condensés (Bate-Smith. 1973).

- Les tanins hydrolysables sont des polyesters de glucides et d'acides phénols, ils sont facilement hydrolysables par les acides et les enzymes (tannase) en ose (généralement le glucose) et en acides phénols.
- Les tanins condensés (TCs), aussi appelés proanthocyanidines, sont des polymères et oligomères de flavan-3-ol qui permettent la formation de complexes avec les protéines. Non hydrolysables, en milieu acide fort et à chaud ils se polymérisent en donnant des précipités insolubles rouges bruns appelés phlobaphènes. (Sahraoui. 2001).

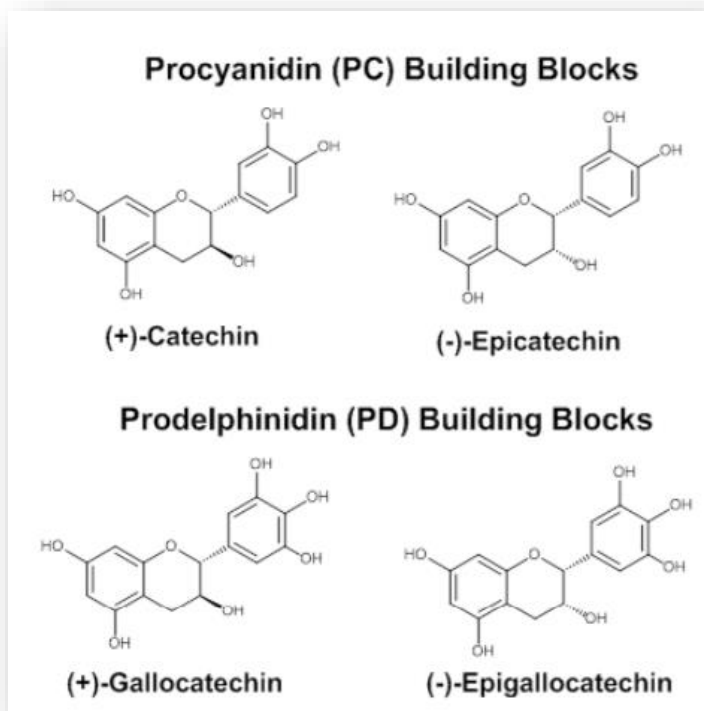
### **1) LES TANINS CONDENSÉS**

#### **A) STRUCTURE CHIMIQUE**

Les tanins condensés (ou proanthocyanidines) sont des polymères de flavan-3-ols. Ces polyphénols, sont des métabolites secondaires présents dans de nombreuses plantes ligneuses et herbacées.

Polymères d'unités flavaniques liées entre elles en liaison C4-C8 ou C4-C6 ((Biaye, 2002) (Kebbeb, 2014), lors de réactions d'auto-oxydation ou sous l'action de la polyphénoloxydase. Ils sont décrits comme des « composés phénoliques solubles dans l'eau, possédant une masse comprise entre 500 et 3000, qui en plus de la réactivité usuelle des composés phénoliques ont la capacité de faire précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines » (Bate-Smith et al. 1962).

Les TCs sont communément définis en deux catégories (fig. 2) :



**Figure 2: Structure des monomères flavan-3-ol communes dans les TC (Zeller et al. 2015)**

- les procyanidines (PC), dérivés des monomères catéchine et épicatechine ;
- les prodelphinidines (PD), dérivés des monomères gallocatéchine et épigallocatéchine.

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'épigallocatéchine, et en trans pour catéchine et gallocatéchine.

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

## B) ACTIVITÉ BIOLOGIQUE

Les TCs sont des composés d'importance nutritionnelle chez les ruminants. Les effets biologiques des TC concernent l'ingestion, la digestion, les émissions de CH<sub>4</sub> 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 (de 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 CH<sub>4</sub> (exprimée en g/kg MODI) 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).

On constate une diminution moyenne de 50% des parasites intestinaux chez les moutons et chèvres nourris aux fourrages contenant 45 à 55 g de TC/kg de MS (Min *et Hart*, 2003).

## **2) TECHNIQUES DE DOSAGE**

Il existe plusieurs techniques chimiques de dosage des tanins (colorimétriques, physico-chimiques, biochimiques). Toutes présentent des avantages et inconvénients (Tableau. 1).

<b>Méthode</b>	<b>Principe</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Butanol-HCl</b> (Porter <i>et al.</i> 1986)	<b>Colorimétrique</b> Réaction de dépolymérisation des TCs en milieu acide. Libération des anthocyanidols (composé de dégradation coloré).	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Spécifique aux tanins condensés.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Nécessite un étalonnage spécifique au tanin dosé.</li><li>○ Eviter les milieux aqueux : décoloration en présence d'eau.</li></ul>
<b>Thiolyse</b> (Matthews <i>et al.</i> 1997; Labarbe <i>et al.</i> 1999)	<b>HPLC</b> Réalisé avec du toluène- $\alpha$ -thiol et du phénylméthane thiol.	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Détermination de la structure et nature des tanins.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Nécessite d'avoir laproanthocyanidine pure.</li></ul>
<b>Folin-Ciocalteu</b> (Mitjavila <i>et al.</i> 1971)	<b>Colorimétrique</b> Sépare les substances phénoliques des tanins.	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Test général pour phénols.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Tous les phénols réagissent.</li></ul>
<b>Bleu de Prusse</b> (Graham, 1992)	<b>Colorimétrique</b> Similaire au test Folin-Ciocalteu	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Test général pour phénols.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Tous les phénols peuvent réagir suivant les conditions.</li><li>○ La température, le pH et le temps peuvent agir sur la couleur.</li></ul>
<b>Vanilline</b> (Sun <i>et al.</i> 1998)	<b>Colorimétrique</b> La vanilline réagit avec les TCs en présence d'acide pour	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Spécifique aux benzènediols.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>○ Nécessite un étalonnage spécifique au tanin dosé.</li></ul>

	produire un complexe coloré.		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Couteux en temps et réactifs.</li> <li>○ La couleur peut varier avec la structure du tanin.</li> </ul>
<b>Enzyme</b> (Mole et al. 1987)	<b>Inhibition enzymatique</b> Les tanins inhibent les enzymes qui agissent comme des protéines.	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Permet une évaluation biologique des tanins</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Certains enzymes sont beaucoup plus réceptifs que d'autre.</li> </ul>

**Tableau 1. Description des méthodes de dosage des tanins condensés**

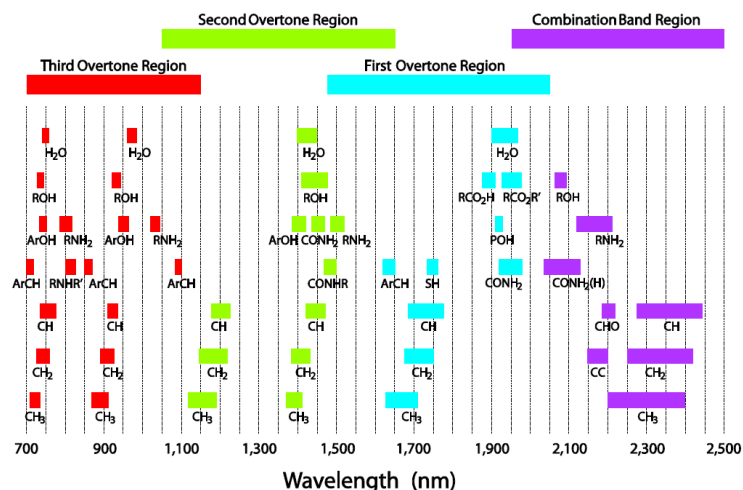
La méthode la plus utilisée est la méthode BuOH –HCl. L'INRA URZ a choisi d'utiliser la « méthode **Vanilline-Sulfurique** » pour sa répétabilité et sa fiabilité. Cependant, cette technique reste longue du fait des extractions multiples.

### 3) LA SPECTROSCOPIE PROCHE INFRAROUGE (SPIR)

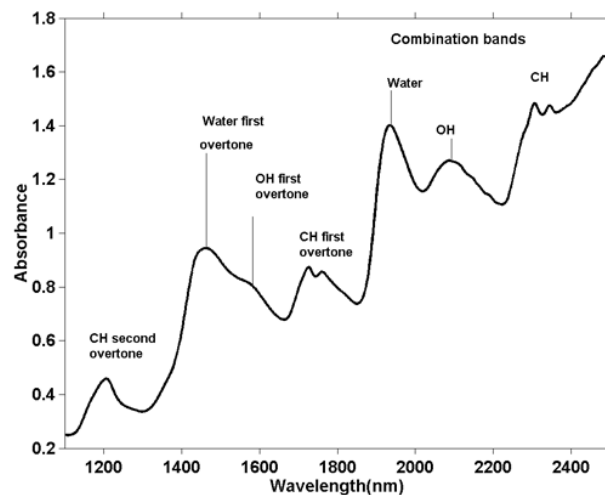
La spectroscopie proche infrarouge (SPIR) est une technique dont le principe repose sur l'absorption des rayons proche infrarouge (780-2500 nm) par la matière organique. (Tafer et el. 2011). Cette absorbance provient de vibration fondamentale. Ainsi chaque groupe moléculaire a son empreinte distinct en SPIR. Cela est dû à la relative forte absorption des vibrations (harmoniques et combinaisons).

On distingue alors les C-H aliphatiques des C-H aromatiques ou alors les C-O carboxyle et les O-H carboxyle etc. (Xiaobo et al. 2010). Les molécules organiques ont un motif d'absorption spécifique qui permet de déterminer la composition chimique des échantillons analysés.

Le diagramme en figure 3 reprend les effets les plus importants qui servent à l'analyse d'un spectre PIR (Fig. 4).



**Figure 3: Bandes significatives SPIR**



**Figure 4: Exemple de spectre (pâte à biscuit) (Davies)**

Généralement, l'analyse SPIR implique une acquisition rapide d'un grand nombre de valeurs d'absorbance. Le spectre ainsi décrit est utilisé pour la prédiction de composition chimique d'échantillon. La SPIR est utilisée en complément de diverses techniques d'analyse quantitatives et qualitatives. Le grand nombre de variables spectrales implique une prédiction compliquée. Cependant le choix du modèle de prédiction (chimométrie) permet de minimiser ce problème (Boaz et al. 2005).

Cette technique est intéressante car rapide, peu coûteuse et non-destructrice. La SPIR est largement utilisée dans les milieux de l'agriculture (Moneda et al. 2009), de la pétrochimie (Murugesan et al. 2009) ou encore pharmaceutique (Gendrin et al. 2008).

#### 4) LA CHIMIOMÉTRIE

La chimométrie 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 » (Geladi et al. 1990).

Il s'agit en réalité d'une régression (linéaire ou pas) qui permet de prédire une (ou plusieurs) variable Y à partir des données spectrales (SPIR) recueillies dans une matrice X.

Cette analyse peut être réalisée de manière :

- **Supervisée** (prédictive), consiste à partir d'une base de données contenant les entrées (X) (spectre SIR) et les sorties (Y) (concentration TCs), d'apprendre à prédire pour toute nouvelle entrée la valeur de sortie. (Laloë. 2010)
- **Non supervisée** (descriptive), est le cas où on dispose d'uniquement des entrées (X) sans les sorties (Y). Cette méthode consiste alors à effectuer un partitionnement des données appelé le clustering. Il s'agit de regrouper les observations en différents groupes homogènes (les clusters), en faisant en sorte que les données de chaque sous ensemble partagent des caractéristiques communes. (Laloë. 2010).

### III) EXPÉRIMENTATION

#### 1) MATÉRIELS ET MÉTHODES

##### A) MATÉRIEL VÉGÉTAL




###### *Echantillons de référence pour l'analyse quantitative.*

Lors de la réalisation d'une analyse chimométrique il est nécessaire d'avoir une base de données conséquente (au minimum une centaine d'échantillons), avec une variabilité de teneur en TC importante. En effet cela permet d'obtenir la méthode la plus précise possible.

Afin de constituer une base de données importante, nous avons récupéré au laboratoire, divers échantillons (feuilles, fèces, contenu de rumen..), issus des 3 espèces de plantes à TCs : *Manihot esculenta*, *Leucaena leucocephala* et *Cajanus Cajan* (Tableau 2).

Ces échantillons séchés à l'étuve, lyophilisés ou granulés proviennent de protocoles précédents, et sont conservés à température ambiante ou à froid

Nous avons à notre disposition un total de 391 échantillons des 3 espèces différentes.

Manioc	Leucène	Pois d'angole
		
<i>Manihot esculenta</i> communément appelé le Manioc (famille : euphorbiaceae)	<i>Leucaena leucocephala</i> communément appelé le faux mimosa ou leucène (famille : mimosaceae)	<i>Cajanus Cajan</i> communément appelé le Pois d'angole (famille : fabaceae)

**Tableau 2. Présentation des 3 espèces de plantes utilisées pour la détermination quantitative des TC.**

Elle consiste en 246 échantillons de manioc, 64 de leucène et 81 de pois d'angole. Ces échantillons ont été broyés avant détermination de leurs teneurs en TCs et réalisation de leurs spectres SPIR.

### ***Echantillons pour l'étude qualitative***




Dans l'objectif de réaliser une étude qualitative, 9 autres espèces de plantes à TC ont été récoltées en complément des 3 autres utilisées pour l'étude quantitative. Il s'agit de plantes tropicales, présentes en plus ou moins grande quantité sur l'île, dont la teneur approximative en TC a déjà été démontrée (Tableau 3).







De cette façon, une variable supplémentaire est ajoutée, l'espèce végétale.

Lors de notre expérimentation, nous nous sommes intéressés aux feuilles des espèces citées ci-dessous (Tableau 3), à l'exception de la grenade où la coque du fruit est utilisée.

Dix échantillons par espèces sont récoltés, puis séchés à l'étuve (chaleur tournante) à 40°C pendant 72h (pour à un poids constant). Après broyage, les échantillons sont passés au SPIR pour réalisation de leurs spectres.

### **Liste des plantes récoltées**

<b>Badarmier</b>	<b>Manguier</b>	<b>Anacardier</b>
		
<b>Terminalia catappa</b> communément appelé amandier pays (famille : <b>Combretaceae</b> )	<b>Mangifera indica</b> (famille : <b>Anacardiaceae</b> )	<b>Anacardium occidentale</b> communément appelé pommier-cajou (famille : <b>Anacardiaceae</b> )
<b>Arbre à pain</b>	<b>Grenade</b>	<b>Châtaignier pays</b>

		
<b>Artocarpus altilis</b> (famille : <b>Moraceae</b> )	<b>Punica granatum</b> (Famille : <b>Lythraceae</b> )	<b>Artocarpus altilis</b> (famille : <b>Moraceae</b> )
<b>Goyavier</b>	<b>Raisinier bord de mer</b>	<b>Icaquier</b>
		
<b>Psidium guajava</b> (famille : <b>Myrtaceae</b> )	<b>Coccoloba uvifera</b> (Famille : <b>Polygonaceae</b> )	<b>Chrysobalanus icaco</b> (famille : <b>Polygonaceae</b> )

**Tableau 3 : Présentation des 9 plantes récoltées.**

## **B) APPAREILLAGES**

Lors de ce stage nous avons utilisé les appareils suivants :

- Centrifugeuse couplé d'un concentrateur (**MiVac®**), utilisé pour l'extraction des TC lors du dosage de ceux-ci ;
- Spectromètre UV (**Perkin Elmer®, Lambda 25**), qui nous a permis de déterminer les concentrations en TC (lu à 500 nm) ;
- Spectromètre proche infrarouge (**FOSS® NIRSystems 6500**), avec un balayage de 400 à 2490 nm (intervalle de 10 nm).
  - o logiciel ISIScan : acquisition de spectre
  - o logiciel WinISI : conversion de spectre (format .nir → .txt)
  - o logiciel CHEMFLOW : analyse de spectre / développement de méthode



## C) MÉTHODES

### ○ Analyse quantitative

#### *Dosage des TC par la méthode Vanilline-Sulfurique :*

Pour réaliser une analyse chimométrique quantitative, il est nécessaire de déterminer au préalable les concentrations en TC des échantillons de référence. Pour obtenir ces teneurs, le protocole du laboratoire, qui consiste en un dosage colorimétrique par la vanilline sulfurique, a été réalisé.

Les tanins condensés de chacune des plantes sont dosés en prenant pour standard (gamme) le tanin condensé (TC) de la plante. Le dosage se fait en deux étapes : Isolation des tanins afin d'obtenir un extrait de tanins aqueux ; puis dosage de l'extrait par réaction avec la vanilline.

L'extraction est réalisée par une solution d'acide ascorbique  $1\text{g.l}^{-1}$  dans un mélange acétone/H<sub>2</sub>O 70%/30%. À 100 mg de matériel végétal on ajoute 4 ml de solution d'extraction et on agite 5 min. On récupère la solution en la filtrant sur coton. L'opération est effectuée à 4 reprises pour la même fraction de matériel végétal. Au filtrat recueilli, on ajoute 7 ml de d'éther di-éthylique pour dépigmentation. On agite, laisse décanter, puis on récupère la phase aqueuse (phase inférieure). On élimine les traces de solvant au concentrateur miVac (30 min à 30°C). On obtient alors un extrait aqueux de tanins.

Les préparations de dosage, sont réalisées dans des tubes à essai plongés dans un bain de glace, à  $T < 10^\circ\text{C}$ . Les tubes sont ensuite laissés à température ambiante pendant 20 min.

Les préparations sont faites selon le tableau ci-après :

	<b>0,05 ml</b>	<b>1 ml</b>	<b>2 ml</b>
<b>Echantillon</b>	Extrait aqueux tanins	H <sub>2</sub> O	Vanilline 1%
<b>Gamme G</b>	Gamme	H <sub>2</sub> O	Vanilline 1%
<b>Blanc Echantillon BF</b>	Extrait aqueux tanins	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 70%
<b>Blanc Gamme BG</b>	Gamme	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 70%
<b>Blanc Vanilline BV</b>	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	Vanilline 1%
<b>Blanc acide (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) BA</b>	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 70%

Vanilline 1% : x g vanilline dans 0,x L d'acide (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) à 70 %.

Gamme : il s'agit d'une gamme d'étalonnage. On prépare une solution mère TC de 1mg.ml<sup>-1</sup> dans la solution d'extraction (acide ascorbique dans acétone/H<sub>2</sub>O). A partir de cette solution mère on réalise 6 dilutions successives dans l'eau pour obtenir les points de gamme de 1 à 0,06 061mg.ml<sup>-1</sup>. Chaque extrait de tanins est fait en triple. Plusieurs blancs vanilline(BV) sont réalisés (minimum 3). Afin de normaliser les expériences, les résultats obtenus sont exprimés en fonction du pourcentage de matière sèche (MS) des végétaux étudiés. Les concentrations sont exprimées en g.100g<sup>-1</sup> de feuilles rapportées à la matière sèche. La concentration en tanins condensés est calculée comme suit :

$$\frac{(Abs - BF - BV - b) \times Volume\_d'extraction}{MS \times a \times masse\_échantillon \times Volume\_de\_prise}$$

Avec :

*Abs* : Absorbance moyenne mesurée pour l'échantillon

*BF* : Absorbance BF

*BV* : Absorbance BV

*a* et *b* : Constantes déterminées à partir de la gamme

*MS* : pourcentage de matière sèche de l'échantillon

Le pourcentage de matière sèche (MS) des matières premières est déterminé par séchage à l'étuve (103°C, 24h), jusqu'à poids constant.

Cette méthode développée par l'INRA a fait l'objet d'étude de validation. Il faut considérer une erreur de 20% sur les teneurs en TC obtenu par ce dosage.

#### ***Acquisition des spectres SPIR :***

Les échantillons récoltés (et les échantillons de référence) sont passés au spectromètre proche infrarouge. Les spectres, sous formes de matrice, seront par la suite récupérés. Ce sont les données d'entrée X.

Ces spectres sont obtenus assez facilement. En effet l'avantage de cette méthode est qu'elle n'emploie aucun produit chimique et que l'échantillon n'est pas détruit.

Suivant le protocole d'utilisation du SPIR (voir annexes), les échantillons sont mis en cellule puis passés au spectromètre (en duplicata).

Les spectres sont récupérés à l'aide du logiciel WinISI. Celui-ci permet de faire un premier « nettoyage » des spectres (calculer la moyenne des duplicata, supprimer les cellules qui auraient posées problème).

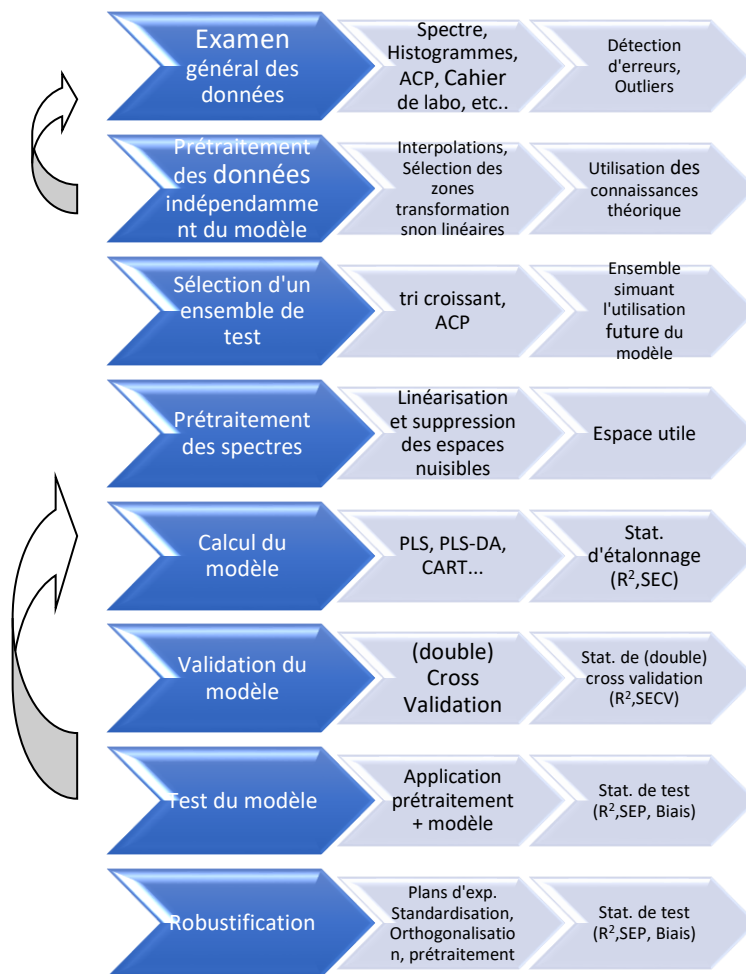
### *Analyse statistique*

Après acquisition des spectres SPIR des 3 espèces de plantes (Manioc, Leucène, Pois d'angole), ceux-ci sont traités pour l'analyse statistique (fig. 5). Le but étant de développer un modèle (équation) permettant la prédiction de la teneur en tanins condensés.

Ainsi les spectres seront prétraités afin d'éliminer les effets additifs et multiplicatifs. Les outliers sont déterminés par une ACP (analyse des composants principaux) et éliminés.

Ces spectres prétraités nous permettent de réaliser une régression en y combinant les valeurs des TC obtenus par dosage. La méthode est validée grâce à des échantillons test. Pour une validation fidèle, un rapport de 2/3 d'échantillons pour le développement de la méthode (calibration) et 1/3 d'échantillon test pour la validation, est respecté (Dykes et al. 2014). Ainsi, pour valider un modèle, l'erreur quadratique moyenne (RMSEC) doit être inférieure à 5%. De plus, le coefficient de détermination ( $R^2$ ) de la droite teneur en TC expérimentale en fonction de la teneur théorique doit être le plus proche possible de 1.

Cette analyse statistique sera réalisée à l'aide du logiciel **Chemflow**.



**Figure 5: Etape d'une étude chimométrique**

○ **Analyse qualitative**

L'analyse qualitative permet de déterminer à partir des spectres SPIR la nature des échantillons. On parle alors de **classification**. On sait qu'il est possible de classer des échantillons selon la granulation. Ici nous avons choisi une classification selon :

- L'espèce végétale ou famille botanique;
- La nature de l'échantillon (feuilles, pellet...);
- Le traitement de l'échantillon (feuilles séchés, lyophilisés, congelés...).

L'analyse qualitative est également réalisée sur le logiciel ChemFlow.

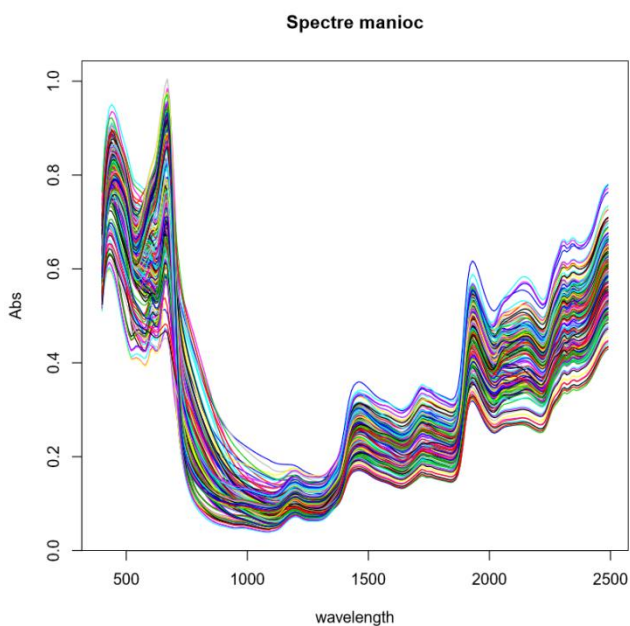
Pour cette analyse les plantes récoltées seront utilisées. Plusieurs méthodes seront testées pour essayer de discriminer les échantillons notamment la PLS-DA (Partial Least Square Discriminant Analysis) ou la CART (Classification And Regression Tree).

## 2) RÉSULTATS ET DISCUSSION

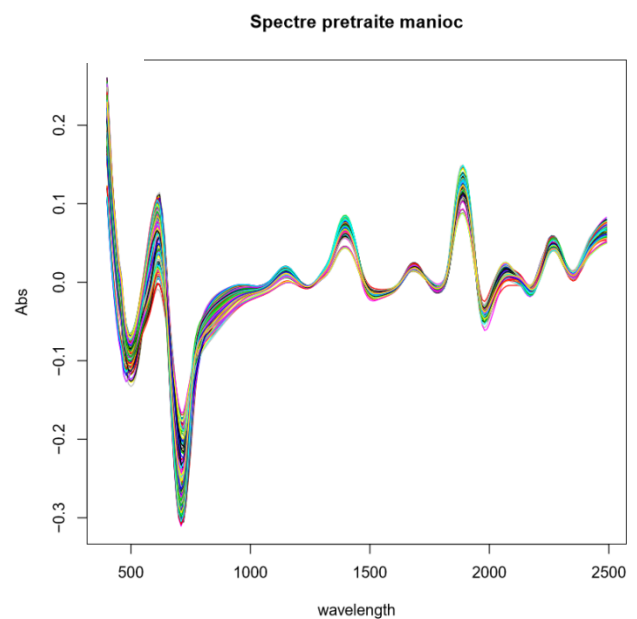
### A) ANALYSE QUANTITATIVE

Les concentrations en TC des échantillons de référence varient de 1,05% à 24,34% MS. La validation de la méthode a été faite avec ces mêmes échantillons, de manière à ce que les sets de calibration et de validation soient comparables en moyenne et en variabilité.

En observant l'ensemble des spectres, on constate un effet additif (fig. 6). Avant toute exploration (détection d'outliers) cet effet a été supprimé par une **SNV** couplé à une **SG** de degré 1 (fig. 7). D'autre part, dans la région proche IR (780-2500 nm), on observe les bandes d'absorbance caractéristiques des vibrations d'élongation OH aux alentours de 1450 et 1930 nm, ainsi que celles des composés phénoliques de types flavonoïdes et TC, aux alentours de 1415-1512nm, 1650-1750 nm et 1955-2035nm (Dykes et al., 2014).



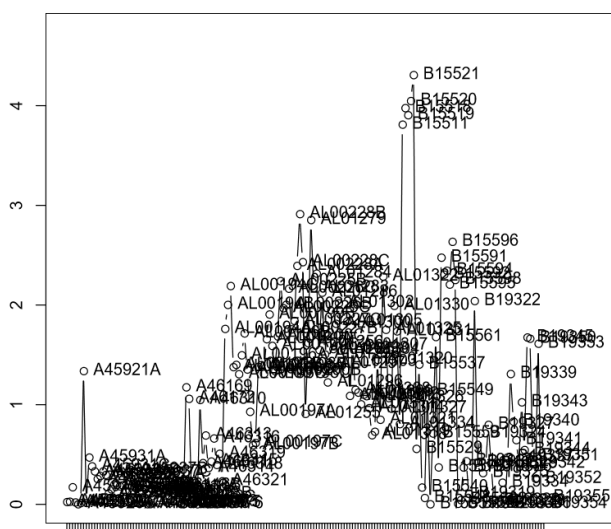
**Figure 6: Spectre Infrarouge des échantillons Manioc**



**Figure 7: Spectre prétraité des échantillons Manioc**

Une ACP (Principal component Analysis) a été réalisée après les prétraitements pour une détermination des outliers. Une ACP permet d'obtenir plusieurs diagrammes permettant de visualiser la distribution des spectres en fonction de différentes variables. Dans notre cas le test Hotelling ( $T^2$ ) est le plus révélateur (fig. 8). Les échantillons sortant du lot (outliers) sont alors supprimés (ex : A4521A ; fig. 8).

T2



**Figure 8: Cartographie: Test Hotelling**

La méthode choisie pour le calcul du modèle est une régression PLS (partial least squared). Elle a été appliquée sur chacune des trois plantes individuellement. Après plusieurs essais de test du modèle, nous avons constaté que les échantillons « pellet » et « jus de rumen » ne répondaient pas à la méthode. Cela est probablement dû au manque d'homogénéité de ces échantillons (les pellets ont été écrasés au pilon, la paille imbibé de jus de rumen coupée aux ciseaux). En effet, comme souvent mentionné dans la littérature, les spectres peuvent être altérés par certaines grandeurs d'influence comme la granulométrie

(Williams at al., 2001). Ces échantillons ont donc été supprimés du set de données de calibration.

Dans le cas des échantillons de leucène, après la suppression des pellets, il n'y a pas suffisamment de données pour réaliser une régression. Par conséquent, seuls les échantillons manioc et Pois d'angole ont été valorisés pour la suite de l'étude quantitative et les échantillons leucene ont été utilisés comme test, dans l'optique d'affirmer l'analyse qualitative (*voir analyse qualitative*).

Les statistiques de calibration obtenues pour la validation du modèle de prédiction des teneurs en TCs dans le manioc et le pois d'angole, sont présentées dans le Tableau 4. Les valeurs de RMSEC et RMSECV inférieures à 5, montrent une bonne qualité du modèle.

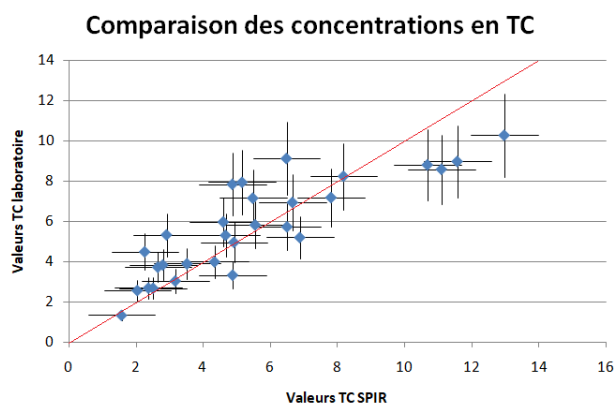
Validation de la méthode						
	n	intervalle	moyenne	RMSEC	RMSECV	R <sup>2</sup>
Manioc	55	2,69-10,27	5,69	3,01	3,16	0,64
Pois angole	21	1,58-21,45	12,31	2,54	2,95	0,87

**Tableau 4 : Statistique de calibration pour la prédiction de TC. n =nombre échantillons test ; intervalle en %TC.**

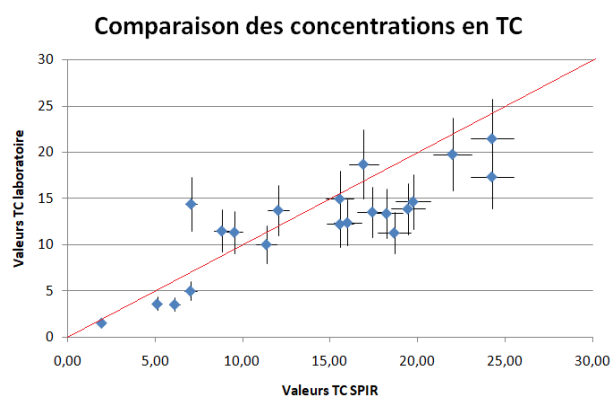
Nous avons ensuite tracé les diagrammes de corrélation des teneurs TC obtenus selon les 2 méthodes (valeurs TC SPIR versus valeurs TC laboratoires ; fig. 9 et 10). On obtient alors deux équations avec une corrélation positive entre l'estimation NIRS et les valeurs de références :

- pour le Manioc de  $TC_{\text{Vanilline}} = 0,667 TC_{\text{NIRS}} + 2,030$  ( $r^2 = 0,731$ ) et une RMSEP de 3,89%.

- pour le Pois d'angle  $TC_{\text{Vanilline}} = 0,682 TC_{\text{NIRS}} + 2,660$  ( $r^2 = 0,706$ ) et une RMSEP de 1,58%.



**Figure 9: Comparaison %TC Vanilline/SPIR (Manioc)**



**Figure 10: Comparaison %TC Vanilline/SPIR (Pois d'angle)**

Les valeurs de  $r^2$  supérieures à 0,7 et les erreurs de précision (RMSEP) inférieures à 5% montrent que ces équations permettent une bonne approximation de la teneur en TC des échantillons surtout dans le cas du Manioc. Néanmoins pour un résultat plus précis il sera nécessaire d'améliorer la méthode de dosage à la vanilline. Une autre solution possible serait de corriger la méthode en utilisant le niveau de pureté du TC référent du dosage (gamme d'étalonnage) obtenu par la méthode thiolysé HPLC.

## B) ANALYSE QUALITATIVE

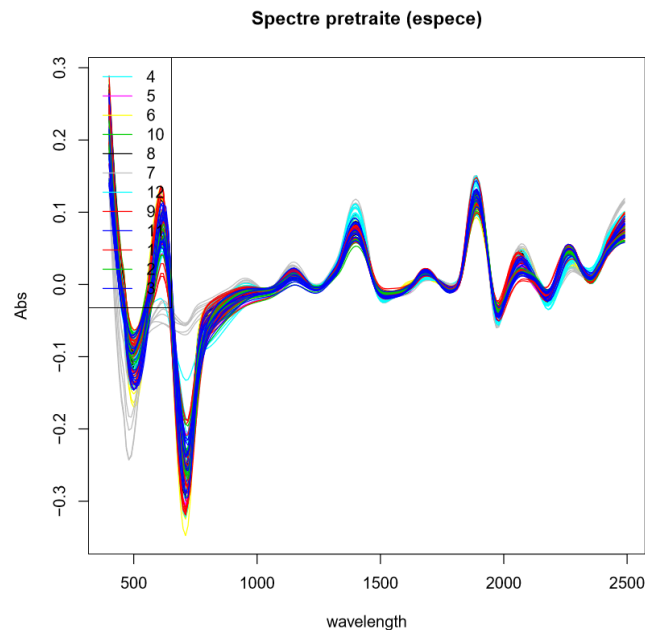
Afin de réaliser une classification, les spectres des 9 plantes récoltés et des 3 plantes du laboratoire ont été analysés. Ces spectres ont subi les mêmes prétraitements que lors de l'analyse quantitative.

Une plante se différencie visiblement des autres (fig. 11). Représentées en gris, les coques de grenade ont un spectre différent des feuilles des autres plantes.

Cependant, en traçant les spectres selon les espèces (fig. 11), les familles botaniques ou les traitements, aucune différence n'est constatée. En effet, les spectres semblent se superposer en tous points. Il semble difficile de réaliser une classification. Cette observation va se confirmer après l'essai de plusieurs techniques (PLS\_DA, CART,...).

Néanmoins, si on utilise les échantillons Pois d'angole comme test sur un modèle Manioc, on ne retrouve pas les teneurs en TC dosées. Par conséquent, une classification devrait être possible.

Nous savons par la littérature que les conditions de conservation (température) et la granulométrie des échantillons ont un effet sur les spectres SPIR (Williams et al., 2001). Il ne faudrait donc ne faire varier qu'une variable à la fois (avant de les combiner) pour développer une méthode d'analyse qualitative.



*Figure 11: Spectres prétraités des plantes récoltées (1:Manioc; 2:Leucène;3:Pois d'angole;4:Badarmier;5:Arbre à Pain;6:Anacardier;7:Grenade;8:Goyavier;9:Manguier;10:Châtaignier;11:Raisinier;12:Icaquier)*

#### IV) CONCLUSION

L'objectif de ce stage était de déterminer une méthode de quantification et qualification des tanins condensés dans des plantes tropicales.

Les résultats ont montré qu'il était effectivement possible d'obtenir une approximation de la teneur en tanins condensés via la SPIR, notamment dans le cas du manioc et du pois d'angole, avec une erreur des modèles comprises entre 2,5 et 3%. A notre connaissance, il s'agit de la première ébauche d'équation de prédiction SPIR pour la teneur en TCs sur ces espèces végétales. Cela a été rendu possible par la nature et quantité de ces échantillons (secs, homogènes et abondants).

Cependant il s'est avéré difficile de réaliser une classification des échantillons de plantes testés. Malgré tout, certains résultats montrent que certaines espèces végétales pourraient être dissociées.



Les modèles obtenus peuvent cependant être améliorés. Pour l'analyse quantitative, il faudrait par exemple augmenter la précision sur le dosage des tanins condensés par la vanilline. Il serait également avisé de choisir une même granulométrie pour tous les échantillons car il a été démontré, dans la littérature, que celle-ci impacte la réfraction de rayon infrarouge. D'autre part, le modèle peut également être amélioré dans le temps, en l'entretenant par ajouts successifs de données et réalisation de validations.

Pour l'analyse qualitative, il serait plus judicieux de ne faire varier qu'une variable à la fois, tout en contrôlant la granulométrie.

Il est donc possible dans le cas de plantes tropicales, de prédire la teneur en tanins condensés en affinant la méthode. Nous pouvons espérer une substitution du dosage chimique par la spectroscopie proche infrarouge.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

## WEBOGRAPHIE

- ❖ <https://fr.wikipedia.org/wiki/Tanin>
- ❖ [https://fr.wikipedia.org/wiki/Tanin\\_condensé](https://fr.wikipedia.org/wiki/Tanin_condensé)
- ❖ Photo grenade : *Hebus.com* © rudy10
- ❖ Photo raisinier : *ti-blog-an-nou.over-blog.com*
- ❖ <http://poisonousplants.ansci.cornell.edu/toxicagents/tannin.html>
- ❖ Photo icaquier : Photographie : Marie-Nicole ROYAL
- ❖ *NIR Band* : [www.ipgphotonics.com](http://www.ipgphotonics.com)

## BIBLIOGRAPHIE

- ❖ A.K. Patra, J. Saxena. *A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen.* **Phytochemistry.** 71 (2010) 1198-1222.
- ❖ A. Murugesan, C. Umurani et al. *Production and analysis of bio-diesel from non-edible oils – A review.* **Renewable and sustainable energy Reviews** 13 (2009) 825-834.
- ❖ B.R. Min, T.N. Barry, G.T. Attwood et al. *The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages.* **Animal feed science and technology.** 106 (2003) 3-19.
- ❖ C.E. Miller, P. Williams et al. *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries.* **American Society of Cereal Chemists.** (2001) 19-37.
- ❖ C. Gendrin et al. *Monitoring galenical process development by near infrared chemical imaging : One case study.* **European Journal of pharmaceutical and biopharmaceutics.** 68 (2008) 828-837.
- ❖ C. Santos-Buelga, A. Scalbert. *Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health,* **J. Sci.Food Agric.** 80 (2000) 1094–1117.
- ❖ D. Bertrand. *La spectroscopie proche infrarouge et ses applications dans les industries de l'alimentation animale.* **INRA Prod. Anim.** 15(3) (2002) 209-219.

- ❖ D. Cozzolino, W.U. Cynkar, R.G. Damberg et al. *Measurement of condensed tannins and dry matter in red grape homogenates using near infrared spectroscopy and partial least squares*. **J. Agri. Food. Chem.** 56 (2008) 7631-7636
- ❖ Dr. Sahraoui. *Les Tanins*. **Laboratoire de pharmacologie**. 2001.
- ❖ F. Dos Santos Grasel, M. Flôres Ferrão, C. Rodolfo Wolf. *Ultraviolet spectroscopy and chemometrics for the identification of vegetable tannins*. **Industrial crops and products**. 91 (2016) 279-285.
- ❖ Gea, E. Stringano, R.H. Brown, I. Mueller-Harvey. *In situ analysis and structural elucidation of sainfoin tannins for high-throughput germplasm screening*. **J. Agri. Food. Chem.** 59 (2011) 495-503.
- ❖ Gersho and R. M. Gray. *Vector Quantization and Signal Compression*. **Kluwer Academic Publishers**, 1991.
- ❖ G.P Moneda et al. *Non-destructive technologies for fruit and vegetable size determination – A review*. **Journal of food engineering**. 92 (2009) 119-136.
- ❖ H. Archimède, C. Marie-Magdeleine, M. Boval, D. Sauvant. *Specificities of feeding ruminant livestock in warm areas*. **INRA feeding system for ruminants** (2018) 375-400.
- ❖ H.D. Graham. *Stabilization of the prussian blue color in the determination of polyphenol*. **J. Agri. Food. Chem** 40 (1992) 801-805.
- ❖ H.M. Ropiak, A. Ramsay, I. Mueller-Harvey. *Condensed tannins in extracts from European medicinal plants and herbal products*. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**. 120 (2016) 225-231.
- ❖ J. H. B. Kemperman. *The median of a finite measure on a Banach space*. In *Statistical data analysis based on the L1-norm and related methods*, 1987.
- ❖ K. Khanbabaee, T. Van Ree. *Tannins : Classification and Definition*. **Nat. Prod. Rep.** 18 (2001) 641-649.
- ❖ K.F.Smith, W.M. Kelman. *Predicting condensed tannin concentrations in lotus uliginosus schkuhr using near-infrared reflectance spectroscopy*. **J. Sci. Food. Agric.** 75 (1997) 263-267.
- ❖ L. Dykes, L. Hoffmann JR., O. Portillo-Rodriguez et al. *Prediction of total phenols, condensed tannins, and 3-deoxyanthocyanidins in sorghum grain using near-infrared spectroscopy*. **Journal of cereal science** 60 (2014) 138-142.
- ❖ 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.

- ❖ M. Takeshita, Y. Ishida, E. Akamatsu, Y. Ohmori, M. Sudoh, H. Uto, H. Tsubouchi, H. Kataoka, *Proanthocyanidin from blueberry leaves suppresses expression of subgenomic hepatitis C virus RNA*, **J. Biol. Chem.** 284 (2009) 21165–21176.
- ❖ N. Boaz, R.C. Ronald **Journal of Chemometrics.** 19 (2005) 107-118.
- ❖ N. Tafer, M. Ferraty et al. *Nouvelles techniques de monitoring cérébral en réanimation pédiatrique — Spectroscopie proche infrarouge (NIRS)*. **Réanimation** 20 (2011) S650-S654.
- ❖ P. Geladi, K.J. Esbensen. *Chemometrics.* 4 (1990) 337-354 ; *ibid.* (1990) 389-412.
- ❖ P. Schofield, D.M. Mbugua, A.N. Pell. *Analysis of condensed tannins : a review*. **Animal feed science and technology.** 91 (2001) 21-40.
- ❖ Q. Dong, H. Zang, A. Liu, G. Yang et al. *Determination of molecular weight of hyaluronic acid by near-infrared spectroscopy*. **J. Phar. Biomed. Ana.** 53 (2010) 274-278.
- ❖ R. A. Wheeler, W. R. Chaney, K. D. Johnson et al. *Leucaena forage analysis using near infrared reflectance spectroscopy*. **Animal feed science technology.** 64 (1996) 1-9.
- ❖ Ramsay, A.R. Williams, S.M. Thamborg, I. Mueller-Harvey. *Galloylated proanthocyanidins from shea (vitellaria paradoxa) meal have potent anthelmintic activity against ascaris suum*. **Phytochemistry.** 122 (2016) 146-153.
- ❖ R.B. Broadhurst, W.T. Jones. *Analysis of condensed tannins using acidified vanillin*. **J. Sci. Fd. Agric.** 29 (1978) 788-794.
- ❖ R.C. Schneider, K.-A. Kovar **Forensic Science International.** 134 (2003) 187-195.
- ❖ Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. *Analysis of condensed tannins: a review*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 21-40.
- ❖ Rira, M., Marie-Magdeleine, et al. *Effect of condensed tannins on methane emission and ruminal microbial populations*. **Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production.** (2013) 501-502.
- ❖ S.R. Lavin, K.E. Sullivan, S.C. Wooley, K. Stone et al. *Near infrared reflectance spectroscopy analyses of nutrient composition and condensed tannin concentrations in carolina willow*. **Zoo Biology.** 34 (2015) 576-582.
- ❖ Takahashi, T. Shimada, S.Kawano. *Nondestructive determination of tannin content in intact individual acorns by near-infrared spectroscopy*. **Ecol. Res.** 26 (2011) 679-685.
- ❖ W.E. Zeller, A. Ramsay, H.M. Ropiak, C. Fryganas et al. *<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC NMR spectroscopy for estimating procyanidin/prodelphinidin and cis/trans-flavan-3-ol ratios of condensed tannin*. **J. Agri. Food. Chem.** 63 (2015) 1967-1973.
- ❖ Z. Xiaobo, Z. Jiewen et al. *Variables selection methods in near-infrared spectroscopy*. **Analytica chimica acta.** 667 (2010) 14-32.

# ANNEXE

# UTILISATION DU SPECTROMÈTRE DANS LE PROCHE INFRAROUGE (NIRS)

## Matériels à prévoir

- Coupelles rotatives pour échantillons secs,
- Coupelles rotatives étanches pour échantillons liquides,
- Cartons numérotés,
- Pinceau,
- Spatule ou cuillère,
- Plateaux,
- Papier joseph,
- Alcool,

Logiciel d'utilisation : ISISCAN

- Ouvrir le logiciel ISISCAN
- Mot de passe : INRA URZ

## I. Tests de vérification du bon fonctionnement du spectromètre.

Avant toute utilisation du spectromètre 5 tests doivent être réalisés pour vérifier le bon fonctionnement de l'appareil.

### 1. Test de performance.

Ce test permet de mesurer les performances du spectromètre proche infrarouge, en combinant le test d'exactitude des longueurs d'onde et de la bande passante au test de bruit photométrique. Il valide l'état de fonctionnement de l'appareil.

*NB : Ce test est le plus long (20 min) il est donc préférable de le réaliser en premier.*

- Dans le menu « **Diagnostics** » choisir « **Performance test** », le test est réalisé sur 10 cycles, puis cliquez sur « **run** ».

Main Noise Noise Spectra Noise Summary Wavelength

Date/Time: 07/05/2018 09:25:04 Export

Operator: INRA URZ Print All

History

Results	Status	Bias	RMS	P-P
Wavelength Test	PASS			
Bandwidth Test	PASS			
Noise Test (VIS)	PASS	0,005	0,072	0,836
Noise Test (NIR)	PASS	0,010	0,012	0,061

Number of cycles: 10 Remove water regions:

Run Export Noise Spectra Abort

- L'idéal est d'avoir PASS aux quatre tests.
- Si ce n'est pas le cas relancer le test de performance sur 10 cycles (ou 5 cycles puis 10 cycles si vous l'avez déjà relancé).
- Cependant il est tout de même possible d'utiliser l'appareil si le « **noise test** » a échoué.

## 2. Test de linéarisation.

Ce test contrôle la précision des longueurs d'onde du spectromètre. La mesure est effectuée en comparaison avec un standard interne en polystyrène dans la région du visible et du proche infrarouge.

- Dans le menu « **Diagnostics** » choisir « **Linearize** ».
- Par défaut l'analyse se fait dans la région visible, il suffit donc de cliquer sur « **run** ».

Linearize Results Spectrum

Settings

Region:  VIS  NIR

Channel:  Reference  Sample

Scans: Number of revs: 32

Results

Peak Position	Found	Nominal	Delta
315.715	805.057	805.230	-0.173
368.543	878.737	878.520	0.217
561.584	1143.869	1143.630	0.239

	K	Phi	Error	Ratio
Current	3287.746	0.10967	0.167	
Suggested	3302.842	0.10843	0.211	1,267

Run Save New Constants Keep Current Constants Print Export

Progress:

A la fin du test vérifiez que le ratio comparant la valeur interne à la valeur expérimentale soit proche de 1.

- Si le ratio est proche de **1** cliquez sur « **keep current constant** » pour garder les anciennes valeurs enregistrées.
- Si le ratio est inférieur à **0.5** cliquez sur « **save new constant** » pour prendre en compte les nouvelles valeurs.

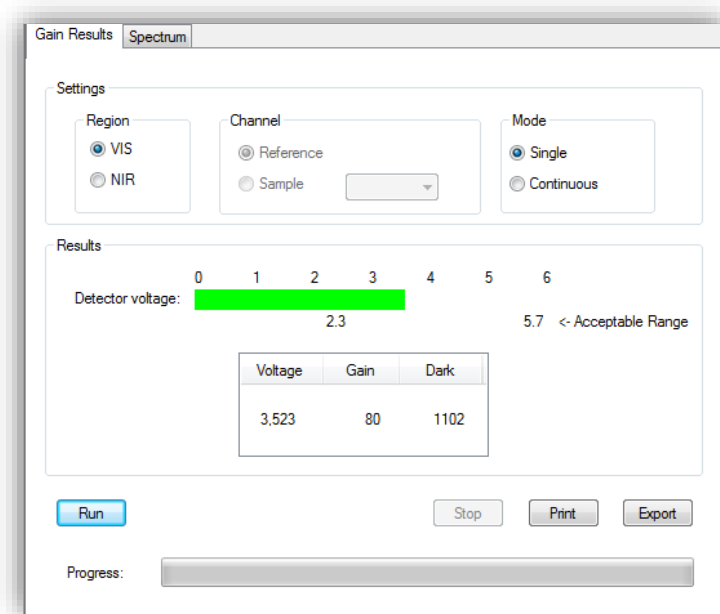
➤ Dans le menu « **region** » cliquez sur « **NIR** » puis sur « **run** ».

- Idem que pour la région du visible.

### 3. Test du gain.

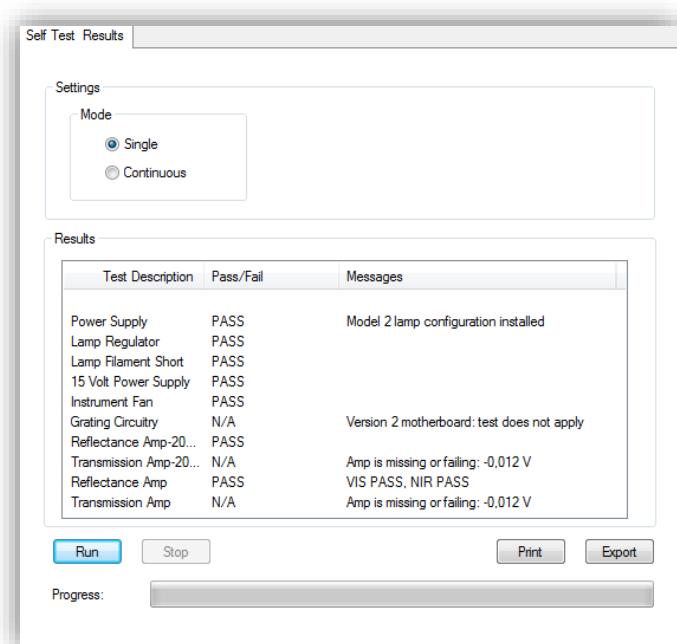
Ce test contrôle la qualité de la source lumineuse et la stabilité du détecteur.

- Dans le menu « **Diagnostics** » cliquez sur « **Gain test** ».
- Dans le menu « **Region** » cliquez « **VIS** » puis « **run** »
- Réalisez le test dans les régions « **VIS** » et « **NIR** » et vérifiez qu'on a bien « **Acceptable Range** ».



### 4. Auto-test.

Ce test contrôle tout l'électronique de l'appareil.



- Dans le menu « **Diagnostics** » cliquez sur « **self test** ».
- Le test est réalisé en mode « **Single** » puis cliquez « **run** ».
- Vérifiez les résultats du test (**PASS**).



## 5. Cellule de contrôle.

La cellule de référence permet de vérifier la stabilité du spectromètre au cours du temps.

- Dans le menu à gauche, double cliquez sur « **Check cell** ».
- Enregistrez les informations concernant la cellule de référence.
- Récupérez la cellule de référence en s'assurant que la vitre en quartz est propre.
- Cliquez sur « **collect** » (le carton ayant l'inscription du numéro de la cellule doit être du côté de l'opérateur et visible par lui) et faire tomber la cellule dans l'analyseur.

*NB : remettre la cellule de référence dans sa boîte.*

Product: CheckCell

Sample number: 30/04/2018|07:28:37

Field #1: 1182 S

Field #2: 21175 S

Field #3: 2003

Field #4: CHECK CELL

Field #5: STANDARD

Comments:

Operator: INRA URZ

Date: 30/04/2018 07:28:37

Sample Cup: Ring

Collect Abort

Results SPC Graphs History Spectrum

Sample Number: 30/04/2018|07:21:54

Product: CheckCell

Comments:

Changes: 0 Analyses have changed!

Field #1: 1182 S

Field #2: 21175 S

Field #3: 2003

Field #4: CHECK CELL

Field #5: STANDARD

Scan #: 86

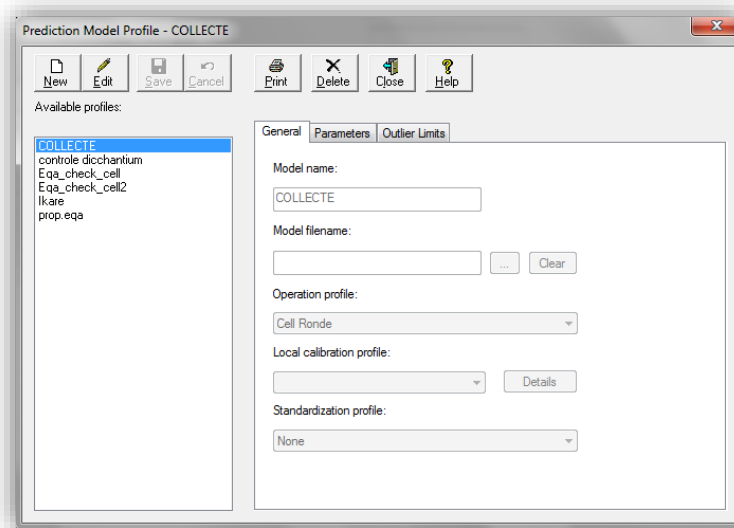
Parameter	Result	Mean	Std	Global H	Neigh H	T Statistic
DM	90,02	90,10	1,35	9,64	0,00	-0,06
CF	1,74	3,07	3,33	9,64	0,00	-0,40
PROTEIN	45,19	40,40	12,05	9,64	0,00	0,40
FAT	1,37	1,24	1,51	9,64	0,00	0,09

- Vérifiez que les résultats restent à peu près constants. Il est possible de voir les précédents résultats de la cellule de contrôle dans « **history** ».

## II. Création d'un model de prédiction.

Le model de prédiction sert de référence au spectromètre lui permettant de tracer des spectres plus précis avec les informations souhaités par l'utilisateur.

- Par défaut le model de prédiction utilisé est « **COLLECTE** »
- Dans le menu « **Profiles** » cliquez sur « **Prediction Model Profile** » puis sur « **New** »
- Choisir les paramètres souhaités

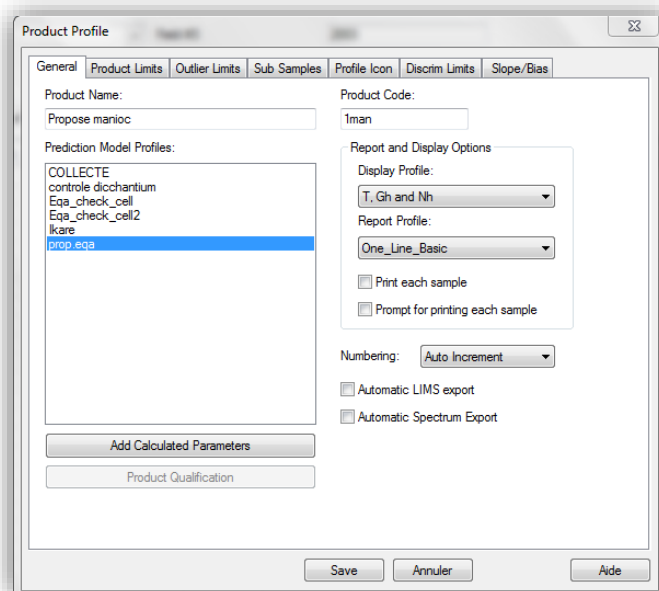


## III. Création d'un code produit.

Le code produit permet au logiciel d'identifier l'échantillon scanné et d'utiliser un model de prédiction adéquat.

Plusieurs codes produits ont déjà créés et sont visibles dans le menu à gauche dans « **products** ».

Si les codes produits ne correspondent pas aux échantillons que vous avez, créez vos propres codes produits.



- clic doigt sur « **products** » et choisir « **add products** ».

La fenêtre « product profile » s'ouvre.

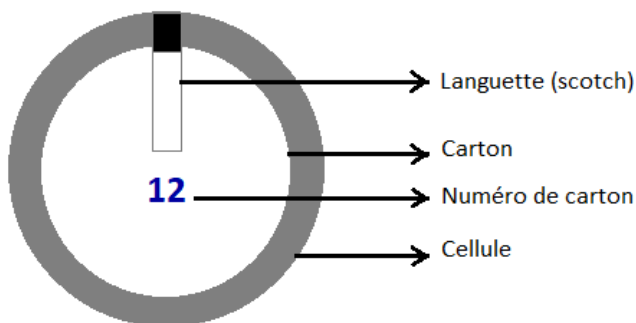
- Entrez le nom du produit « **Product name** » et le code produit unique à chaque produit.
- Dans « **Display profile** » sélectionnez les paramètres « **T, Gh and Nh** ».
- Dans « **Report profile** » sélectionnez « **One\_Line\_Basic** ».

- Dans « **Numbering** » sélectionnez « **Auto increment** ».
- Choisir le model de prédiction souhaité.
- Cliquez sur « **Ok** » et vérifiez que le code a bien été créé.

## IV. Analyse d'échantillons

### 1. Préparation des échantillons.

Le spectromètre proche infrarouge analyse les échantillons dans des cellules. Ces cellules doivent être remplies au préalable (*dans une pièce différente, le spectromètre ne supportant pas la poussière*).



- Remplir la cellule à l'aide d'une spatule.
- Refermez la cellule avec le carton en exerçant la même pression sur toute la surface.
- S'assurez que la surface de lecture est homogène et qu'il n'y a aucun trou.
- Chaque échantillon est passé deux fois au spectromètre : prévoir deux cellules par échantillon à analyser.

La méthode du NIRS ne détruit pas l'échantillon ; récupérez les échantillons et nettoyez les cellules à l'aide d'un pinceau puis la vitre avec de l'alcool.

- Des cellules différentes sont utilisées pour les échantillons liquides.

### 2. Création du fichier LIMS.

- Ouvrir le fichier Createur\_Liste\_LIMS.xls

	A	B	C	D	E	F	G
1	K5820						
2	K5821					Nettoyer La liste actuelle	
3	K5822		Produit	Code Produit			
4	K5823		Manioc frais	manf			Nettoyage
5	K5824						
6	K5825		Série				
7	K5826		K5820-29			Créer le fichier LIMS CSV	
8	K5827						
9	K5828						Créer
10	K5829						
11	K5820						
12	K5821						
13	K5822						
14	K5823						
15	K5824						
16	K5825						
17	K5826					Créer un fichier de purge	
18	K5827						
19	K5828						Créer
20	K5829						
21							
22							
23							

- Dans la première colonne entrez les codes labo. Une série est composée d'environ 10 échantillons.
- Ne pas oubliez de rentrer les codes labo deux fois (ou plus selon le nombre de reprise).
- Dans la feuille « **Produit** » ajoutez le nom du produit et le code produit choisi (*le même que dans ISIScan*).
- Revenir sur « **Feuil1** » et choisir le produit dans le menu déroulant.
- Modifiez le nom de la série et créez « **le fichier LIMS CSV** ».
- Enregistrez le fichier sous un nom quelconque (*généralement « 1.csv » suffit*).

### 3. Lancement de l'analyse des échantillons.

- Placez les cellules dans le passant après avoir nettoyé la vitre de lecture avec le papier Joseph imbibé d'alcool (*laissez l'entrée du spectromètre vide*).
- Assurez-vous de l'ordre des cellules (*identique à celle du fichier LIMS*)
- Dans le menu « **File** » cliquez « **import LIMS** ». Importez le fichier LIMS créé.
- La lecture automatique se déclenche dès l'importation des échantillons. Il suffit de déclencher le distributeur (*celui-ci étant indépendant du spectromètre*) en appuyant sur la languette à la sortie du spectromètre.
  - Si une fois l'importation du fichier LIMS, la lecture automatique ne se déclenche pas redémarrer le logiciel **sans éteindre la lampe**. La lecture démarre dès l'ouverture du logiciel.
  - Les échantillons peuvent aussi être analysés individuellement si la lecture automatique ne se déclenche pas. Clic droit sur le premier échantillon, cliquez sur « **scan** » puis « **collect** ».
- S'assurez que les cellules ne restent pas bloquées à l'entrée du spectromètre.

## V. Récupération des spectres.

- Dans le menu à gauche, clic droit sur le produit à exporter, cliquez sur « **Export** » puis sur « **Export NIR/CAL** ».
- Enregistrez le fichier « **.nir** » en cliquant sur « ... » pour choisir le nom et l'emplacement du fichier.
- Les fichiers « **.nir** » sont ouvert et convertis avec le logiciel « **WINISI** »