



**HAL**  
open science

# Evaluation de la Thermosensibilité des tanins condensés

Mounien Maïly

► **To cite this version:**

Mounien Maïly. Evaluation de la Thermosensibilité des tanins condensés. Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-02961597

**HAL Id: hal-02961597**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02961597>**

Submitted on 8 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 Sciences Exactes et Naturelles  
Campus de Fouillole  
97157 Pointe à Pitre



INRA Domaine Duclos  
97170 Petit-Bourg  
0590255900  
[www.antilles-inra.fr](http://www.antilles-inra.fr)

Rapport de stage de L3  
Licence BB  
Science de la santé

Evaluation de la thermosensibilité des tanins condensés  
des feuilles de pois d'angole et de manioc.



Stagiaire : Maïly MOUNIEN

Maître de stage : Mme. Carine Marie-Magdeleine  
Tuteur : Mme. Nathalie Minatchy  
Enseignant référent: Mme. Marie-Noëlle Sylvestre

## Présentation de l'organisme d'accueil : L'INRA

Créé en 1946 l'Institut National de la Recherche Agroalimentaire est un établissement public à caractère scientifique et technologique placé sous la tutelle conjointe des ministères chargés de la Recherche et de l'Agriculture.

Créée depuis 1949 le centre Antilles-Guyane est le seul centre régional situé en zone tropicale (Antilles Françaises) et subéquatorial (Guyane Française), au domaine de Duclos à Petit Bourg en Guadeloupe.

Il s'agit du principal acteur de la recherche agronomique dans la zone Caraïbe.

Il contribue au développement durable de l'agriculture aux Antilles de par ses programmes de recherche sur l'agriculture, l'alimentation et l'environnement suivant deux axes :

- Axe 1 : « Agro-écologie intégrée des agrosystèmes tropicaux humides : contribution à l'innovation pour la sécurité alimentaire et la santé publique »
- Axe 2 : « Ecologie intégrée des écosystèmes forestiers tropicaux humides : contribution à la compréhension des écosystèmes complexes et à l'adaptation aux changements ».

Le site à Petit-Bourg comprend aujourd'hui deux unités de recherche :

- L'Unité de Recherche Agrosystèmes tropicaux (ASTRO) qui conduit des recherches pour la mise au point de systèmes de culture innovants durables et acceptables en étudiant notamment :
  - ▲ La gestion des milieux fragiles et fragilisés (fragilité intrinsèque des sols tropicaux ; améliorations et remédiations possibles) ;
  - ▲ Les interactions plante-pathogène-milieu focalisées sur la culture de l'igname ;
  - ▲ l'ingénierie agro-écologique (plantes de service, substances actives naturelles) pour la gestion de la nutrition des cultures et la lutte contre les bioagresseurs ;
  - l'agronomie, l'économie et la durabilité des agrosystèmes
- L'Unité de Recherche Zootechniques (URZ) qui produit des connaissances et des technologies au service d'une agriculture « productive et durable », dont la nuisibilité environnementale et la nocivité des produits sont minimisées, conformément aux principes de l'agro-écologie

### Remerciements :

Je tiens d'abord à remercier M. Harry Archimède pour m'avoir permis d'effectuer mon stage au sein de l'unité de recherches zootechniques de l'INRA et pour son aide et ses conseils pour l'exploitation des résultats.

Je remercie ma tutrice, Mme. Nathalie Minatchy pour son encadrement.

Mes remerciements vont également à mon maître de stage Mme. Carine Marie-Magdeleine pour ses conseils et sa bonne humeur

Je remercie particulièrement Suzitte Calif, qui a pris le temps de m'enseigner les techniques de laboratoires

Enfin je remercie tout le personnel de l'unité zootechnique de l'INRA pour leur accueil, leurs enseignements pratiques et leurs conseils.

## Résumé:

Des études ont montré que la consommation de plantes à tanins condensés chez les ruminants a un effet sur le parasitisme gastro-intestinal ainsi que sur la réduction de la production de méthane.

Dans le but de mettre au point un alicament riche en tanins condensés sous forme de granulé dédié à l'alimentation des animaux, l'Unité de Recherche Zootechnologiques de l'INRA mène des recherches sur l'effet de la transformation de la matière première végétale sur la dégradation des tanins. Deux espèces végétales ont été choisies : le pois d'angole et le manioc. Des cinétiques de séchage de ces feuilles ont été effectuées à 3 températures et pendant 5 temps de séchage différents. Les échantillons ainsi obtenus ont été analysés pour déterminer leur teneur en tannins condensés après séchage, par dosage colorimétrique par la méthode de la vanilline- $H_2SO_4$ . Des analyses de la matière sèche et de la matière minérale ont également été réalisées. L'objectif est donc de d'observer s'il existe une corrélation entre les cinétiques de séchage et la teneur en tanins condensés ; puis de déterminer un traitement de séchage optimal permettant une perte minimale en tanins condensés.

## Sommaire

---

Résumé .....	p.4
I. Introduction.....	p.6
Synthèse bibliographique.....	p.6
1. Les tanins .....	p.6
a. Généralité sur les tanins.....	p.6
b. Structures chimiques et propriété des tanins condensés.....	p.7
c. Facteurs de variation de la teneur en tanin.....	p.7
2. Effets des tanins condensés sur les animaux.....	p.8
a. Effets bénéfiques des tanins condensés.....	p.8
b. Effets néfastes des tanins condensés.....	p.8
3. Ressources végétales.....	p.9
a. Le pois d'angole.....	p.9
b. Le manioc .....	p.10
II. Matériels et méthodes.....	p.10
1. Matériel végétal.....	p.10
a. Prélèvement et conditionnement.....	p.10
b. Traitement préalable (séchage).....	p.11
2. Dosage des tanins condensés.....	p.12
a. Extraction et purification des tanins condensés.....	p.13
b. Dosage des tanins condensés.....	p.14
3. Analyses chimiques.....	p.15
a. Matière sèche .....	p.15
b. Matière minérale.....	p.16
III. Résultats .....	p.17
IV. Discussion.....	p.21
Conclusion et perspectives .....	p.23
Références bibliographiques.....	p.24
Annexes.....	p.25

## I. Introduction

Des études ont montré que la consommation de plantes à tanins condensés chez les ruminants a un effet sur le parasitisme gastro-intestinal ainsi que sur la réduction de la production de méthane.

L'INRA souhaite développer un granulé à visée alicamentaire afin de nourrir les petits ruminants tout en leur apportant un médicament permettant de lutter contre les parasites gastro-intestinaux..

Cependant compte tenu de la sensibilité des tanins condensés à la température et à l'humidité, il est nécessaire de prendre des précautions lors de la fabrication de ces granulés, notamment lors de l'étape de séchage. C'est la raison pour laquelle il est important d'étudier la thermosensibilité des tanins condensés afin de connaître l'évolution de la concentration en fonction de la température ou de la durée de séchage. Deux matières premières ont été choisies en raison de leur teneurs en tannins condensés et de leurs aptitudes nutritives : le pois d'angole et le manioc.

Des cinétiques de séchage ont été réalisées lors d'un stage précédent sur ces deux matières premières à trois températures différentes : 32 °C, 40 °C et 46 °C.

L'objectif de mon stage a donc été de réaliser les analyses des tannins condensés après séchage afin de modéliser des cinétiques de dégradation des tannins en fonction de la température de séchage. Après une synthèse bibliographique sur les tannins et leurs propriétés anthelminthiques, les matériels et méthodes utilisés pour l'expérimentation seront présentés. Puis les résultats obtenus et la discussion concernant les perspectives de ce travail pour l'élaboration d'un granulé alicament seront abordés.

### Synthèse bibliographique

#### 1. Les tanins

##### a. Généralité sur les tanins

Les tanins sont des substances végétales stockées à haute concentration dans les vacuoles intracellulaires des plantes. Ils constituent un moyen de défense des végétaux contre les attaques bactérienne et fongique, empêchant l'installation massive de colonies de bactéries ou de champignons en inhibant leur croissance.

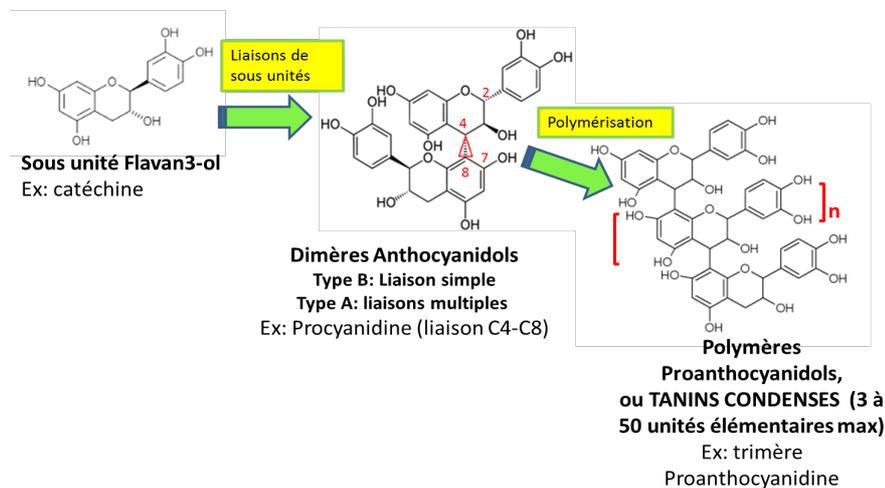
Les tanins sont des métabolites secondaires des plantes supérieures ayant la propriété de se lier aux macromolécules, en particulier les protéines. Les tanins possèdent des propriétés astringentes qui contribuent notamment de lutter contre les attaques des prédateurs des végétaux (insectes et herbivores).

En raison de leur variabilité structurale les tanins se divisent en 2 catégories principales :

- les tanins hydrolysables (groupe principalement responsable des effets toxiques pouvant apparaître lors de la consommation de certaines plantes)
- les tanins condensés (ils ne traversent pas la barrière intestinale, ils sont donc beaucoup moins toxiques que les tanins hydrolysables).

### b. Structure chimique et propriétés des tanins condensés

Les tanins condensés, ou proanthocyanidols, sont des polyphénols appartenant à la famille des flavonoïdes. En général, les tanins condensés ont des poids moléculaires supérieurs aux tanins hydrolysables. Ce sont des polymères de flavan-3-ols liés par des liaisons de type C-C ou C-O-C.



### c. Facteurs de variation de la teneur en tanin

La teneur en tanin peut varier selon les espèces et variétés végétales, les parties végétales et le stade végétatif considérés. Les conditions environnementales sont aussi déterminantes. Le stress lié au climat, le taux d'humidité ainsi que la nature des sols influencent également la teneur en tanins condensés.

Des études ont montré que le procédé de transformation et le conditionnement influencent la teneur en tanins condensés ; en effet elle varie sensiblement en fonction des procédures de dessiccation appliquées et des modes de stockage des échantillons.

De plus, les tanins sont thermolabiles. On observe un effet dénaturant de la température dès 40°C (Palmer et al.)

## 2. Effets des tanins condensés sur les animaux

Contrairement aux effets toxiques des tanins hydrolysables, les tanins condensés sont associés à des effets bénéfiques chez les animaux lorsqu'ils sont ingérés de manière modérée.

### a. Effets bénéfiques des tanins condensés

La consommation modérée des plantes à tanins condensés influe sur les paramètres zootechniques en augmentant la croissance des jeunes animaux, en améliorant la production et la qualité du lait ou de la laine (ovins), ou encore les performance reproductives. (Min et al., 2001; Rochfort et al., 2008). Luque et al. (2000) .

L'amélioration des paramètres zootechniques découle de l'effet des tanins condensés sur la digestion des aliments. Ils ont la capacité d'interférer avec la digestion microbienne en formant des complexes TC-protéines qui protègent les protéines de la dégradation dans le rumen. Par conséquent, le flux de protéines directement assimilable dans l'intestin augmente. Davantage d'acides aminés sont alors assimilables pour le métabolisme de l'animal.

La consommation des plantes à tanins condensés (l'ingestion de tanins condensés) est également associée à des effets bénéfiques sur la santé des ruminants. Ils agissent en prévention de la météorisation spumeuse (qui se traduit par une accumulation de gaz issus de la fermentation ruminale) (Ramírez-Restrepo et Barry, 2005; Rochfort et al., 2008; Waghorn, 2008 in press) ou des épisodes de diarrhées (Min et al., 2001; Waghorn et Mc Nabb, 2003). De plus des études ont montré que les l'ingestion de tanins condensés diminuait le parasitisme gastro-intestinal chez les ruminants. (Min et Hart, 2002; Waghorn et Mc Nabb, 2003; Hoste et al., 2006).

### b. Effets néfastes des tanins condensés

Cependant à trop forte consommation les tanins condensés peuvent avoir des effets inverses que ceux vu précédemment. Au niveau des paramètres zootechniques des teneurs élevées en tanins condensés affecterait négativement la production de lait ou de laine.

De même que pour les effets positifs, les pertes de productions sont directement liées à des perturbations de digestion. La forte complexation entre les tanins condensés et les protéines et fibres les rend moins digestibles. Dans l'intestin les tanins condensés affecteraient la physiologie digestive en interagissant avec les protéines de la membrane des cellules intestinales en diminuant ainsi l'absorption de certaines molécules dont les minéraux.

### 3. Ressources végétales

#### a. Le pois d'angole

Le pois d'angole est une espèce végétale vivace de la famille des *Fabaceae*. Connu également sous le nom de pois cajan, c'est une légumineuse cultivée dans les régions tropicales et subtropicales.

#### Importance nutritionnelle du pois cajan

Le pois cajan est principalement cultivé pour ses grains dont la valeur nutritive est comparable à celle du haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) (NIYONKURU, 2002). En effet, connus pour être une excellente source de protéines (21,7%), les grains mûrs du pois cajan sont une bonne source d'énergie (343 kcal par 100 g de partie comestible), de vitamines (A 28 UI, B6) et d'acides aminés essentiels (lysine, phénylalanine, valine, leucine et isoleucine). Les grains sont également riches en acides gras dont les principaux sont l'acide linoléique et l'acide palmitique (USDA, 2004 ; VAN DER MAESEN, 2006). La consommation de ces grains est surtout importante dans les pays tropicaux en développement (Inde, Kenya etc.).

En alimentation animale, le feuillage coupé constitue, frais ou conservé, un bon fourrage servant à nourrir le bétail. En effet, les feuilles sont riches en protéines (21-25%/Matière Sèche (MS)) et en fibres (30-35% de cellulose brute/MS) (GRIMAUD, 1988). Pour les animaux de pâturage, on peut réaliser des coupes tous les deux ou trois mois avec une productivité de 1,5 à 3,5 t de MS/ha/par coupe et une valeur azotée de 100 à 120 g de Matière Azotée Digestible (MAD)/100 kg de matière sèche (ANONYME, 2002). Par ailleurs, des essais, conduits en station, ont montré qu'une introduction de graines de pois cajan ayant subi un broyage comme seule transformation dans l'aliment des porcs et des volailles n'entraînait aucun trouble de croissance chez ceux-ci.

Les pourcentages d'incorporation pouvant être atteints sont de 15% chez le porc à l'engrais et 25% à 30% chez le poulet de chair (GRIMAUD, 1988).

#### b. Le manioc

Le manioc est un arbuste de la famille des *Euphorbiaceae*, originaire d'Amérique centrale et d'Amérique du Sud, et cultivé dans les régions tropicales et subtropicales.

On consomme généralement ses racines tubérisées riches en amidon, mais aussi ses feuilles en Afrique, en Asie et dans le nord du Brésil.

Le manioc est une plante arbustive, semi-ligneuse, atteignant en culture 2 à 4 mètres de hauteur. Elle est pluriannuelle, mais généralement cultivée comme plante annuelle. Comme toutes les Euphorbiacées, ses diverses parties contiennent du latex. Les tiges, dont le diamètre ne dépasse pas 2-3 cm, sont en grande partie remplies de moelle et, de ce fait, fort fragiles. Les feuilles sont alternes, à multiples lobes foliaires, de formes variées. La couleur des feuilles, quelques fois pourpres dans le jeune âge, est vert clair à vert foncé. Les feuilles sont portées par de longs pétioles; ceux-ci, de même que les nervures foliaires, sont de couleur verte ou rouge à pourpre, plus rarement blanchâtres.

La racine de manioc est un aliment assez pauvre. Elle ne renferme que 0,50 à 0,75 % de matières protéiques, 0,33 % de glucose et 1 % de saccharose et dextrine; elle contient quelque 35 % d'amidon mais pas du tout de matières grasses; le reste de la matière sèche est en grande partie constitué de cellulose. Contrairement aux feuilles qui sont très riches en protéines et en tanins

## II. Matériels et méthodes

### 1. Matériel végétal

#### a. Prélèvement et conditionnement

Les feuilles des deux espèces ont été récoltées en une seule fois et, après avoir été mélangées pour constituer un lot homogène, elles ont été placées dans des sachets de 400 grammes environ, au congélateur. Ceci pour éviter la perte de tannins et le pourrissement des feuilles.. La matière première congelée est mise directement dans le sécheur sans décongélation.

## b. Traitement préalable

Les feuilles de pois d'angole et de manioc sont ensuite dans un séchoir à entraînement d'air chaud.

### Principe du séchage :

Les feuilles sont d'abord pesées ( $\approx 50\text{g}$ ) dans des sachets perforés afin de permettre à l'eau de s'évaporer plus facilement. Ces sachets sont ensuite placés sur différents niveaux les plaques dans le séchoir. Un ventilateur aspire l'air extérieur passe dans un système de chauffage afin d'augmenter sa capacité d'absorption de l'eau. L'air sec se diffuse alors dans le séchoir. En traversant la matière fraîche l'air sec entraîne l'eau contenu dans les feuilles. La température du séchoir est réglée selon le traitement à effectuer et est vérifiée à l'aide d'un thermomètre.

Les feuilles subissent des traitements différents de température ( $32^{\circ}\text{C}$ ,  $40^{\circ}\text{C}$  et  $46^{\circ}\text{C}$ ) et de durée de séchage (4h, 8h, 16h, 24h, et 48h).

Les échantillons sont ensuite pesés et conditionnés dans des sachets hermétiques et nommés par un code labo (une lettre suivie de 4 chiffres) qui permet de retrouver la provenance de chaque échantillon ainsi que le traitement qu'il a subi. Puis ils sont remis au congélateur en attendant d'effectuer les analyses biochimiques.

L'étude des cinétiques de séchage a fait l'objet d'un stage précédent (Essais préliminaires pour la réalisation d'un granulé à propriétés alicamentaires à partir de ressources végétales de la Caraïbe réalisé par Nancy Latchimy)

Les résultats de son stage ont montré que la teneur en matière sèche est atteinte plus rapidement avec une température de  $40^{\circ}\text{C}$  qu'à  $32^{\circ}\text{C}$ .

Mon stage avait donc pour objectif de réaliser le dosage des tanins condensés dans les échantillons séchés et congelés.

Il a débuté par la numérotation et le broyage des échantillons

Chaque échantillon a été découpé en fins copeaux et mis dans un petit sachet transparent avec son code labo indiqué.

Les échantillons doivent rester le plus souvent possible au congélateur afin d'éviter qu'ils ne s'humidifient.

Ayant 80 échantillons à doser, nous avons effectué plusieurs séries de dosage de 10 échantillons avec dans chaque série au moins un témoin correspondant à la plante fraîche (n'ayant pas subi de traitement de séchage).

## 2. Dosage des tanins condensés

Les tanins condensés doivent d'abord être extraits de la matière végétale avant de pouvoir être dosés. A partir d'un échantillon, on extrait successivement les tanins libres (solubles dans l'eau) avec un mélange SDS/B-mercaptoéthanol (qui permet de casser les ponts disulfures) et les tanins liés aux fibres. Ils sont ensuite purifiés. Après l'extraction le dosage se fait par la méthode vanilline- $H_2SO_4$ .

### Principe du dosage :

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

Elle ne réagit pas avec les unités intermédiaires des proanthocyanidines car son site de fixation (Carbone 6) est pris dans la liaison monomère-monomère C4-C6.

Le principe du test est le suivant (Figure 2): la vanilline est protonée en milieu acide, ce qui conduit à un carbocation ayant une déficience électronique. Ce carbocation réagit en position 6 ou 8 du cycle A du flavonoïde (Tanin condensé). Le composé intermédiaire obtenu est déshydraté afin d'obtenir un composé de couleur rouge.

On réalise également une gamme d'étalonnage à partir d'une solution mère de tanins condensés purs issus de la plante à doser.

### Matériels nécessaires :

- Bain d'eau glacé
- Spectrophotomètre
- Agitateur
- Pipettes, tubes à essai, béchers, fioles
- Entonnoirs, coton
- Portoirs
- Pipette distributrice

### Réactifs (chimiques et biologiques :

- $H_2SO_4$  à 70 % :
  - o 700 ml  $H_2SO_4$  glacé +300 ml  $H_2O$  glacé et faire le mélange dans un bain glacé (préparation sous hotte)

- Vanilline 1% :
  - 1g de vanilline dans 100ml de solution d'acide sulfurique à 70 %. faire le mélange dans un bain glacé (préparation sous hotte)  
Agiter et attendre que la vanilline soit complètement dissoute. Il conviendra de prendre la température de la solution avant emploi ( $\leq 12^{\circ}\text{C}$ ).
- Méthanol
- Tanin condensé pur de la plante étudiée :
  - Préparer à partir d'une solution mère de 1 mg/ml.  
Faire une gamme allant de 15 à 2 000  $\mu\text{g/ml}$  soit 8 points de gamme.  
Faire une dilution en cascade mettre 1 ml de méthanol dans tous les tubes, partant du plus concentré au moins concentré.
- Solution S1 :
  - 1400ml d'acétone, 2g d'acide ascorbique QSP 2litres

a. Extraction et purification des tanins condensés

Extraction :

Dans des tubes à vis de 10ml, contenant 100mg d'échantillon, introduire 4ml de solution S1 (Annexe : Photo1). Agiter au vortex portoir pendant 5min puis filtrer à l'aide d'un entonnoir et du coton. Répéter l'opération 4 fois puis récupérer le filtrat dans des tubes MIVAC de 30ml. (Annexe : Photo2)

Dépigmentation :

Ajouter 7ml d'éther diéthylique et agiter.

Deux phases apparaissent. Une phase supérieure contenant la chlorophylle et une phase inférieure contenant les tanins. (Annexe : Photo3)

Aspirer et jeter la phase supérieure dans un flacon à déchet prévu à cet effet. (Annexe : photo4)

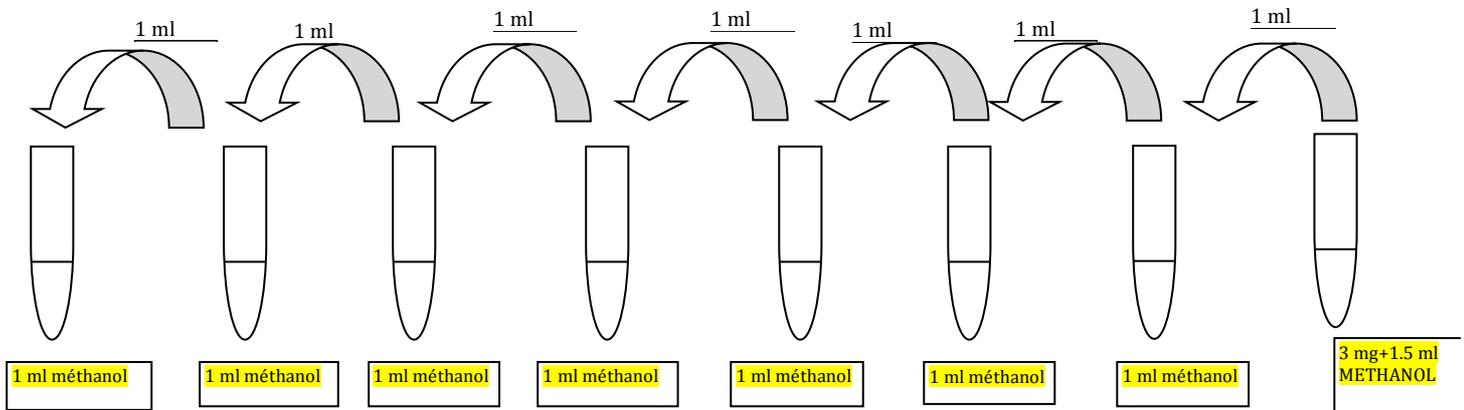
Evaporation :

Placer les tubes dans le MIVAC (Annexe : Photo9) en les équilibrant et évaporer le solvant pendant 30min à  $38^{\circ}\text{C}$  (lancer 30min à  $38^{\circ}\text{C}$  afin d'évaporer le solvant)

- Pendant les 30min on réalise la gamme d'étalonnage ainsi que la vanilline 1%.

Réalisation de la gamme : On prépare 8 points de gamme en faisant une dilution en cascade. Dans un tube à hémolyse on pèse 3mg de solution mère que l'on dilue dans 1,5 ml de méthanol, on homogénéise. Puis dans 7 autres tubes on ajoute 1ml de méthanol.

On réalise une dilution en cascade en prélevant 1ml dans chaque tube et en partant de la solution la plus concentrée. (Annexe : photo 8)



Réalisation de la vanilline 1% : Peser 1g de vanilline (poudre à l'odeur de vanille). Dans une éprouvette prélever 100ml d'acide sulfurique  $H_2SO_4$  à 70% et le transvaser dans une bouteille en verre fumée pour protéger la solution de la lumière. Ajouter la vanilline en poudre et homogénéiser ensuite à l'aide d'un barreau magnétique.

On obtient une solution jaune qui réagit à la lumière.

Une fois le solvant évaporé dans le Mivac on obtient un extrait aqueux de tanins. (Annexe : photo5)

#### b. Dosage des tanins condensés

##### Dilution :

Transvaser l'extrait aqueux de tanins dans une fiole jaugée de 20ml. Rincer le tube MIVAC avec de l'eau distillée et transvaser dans la fiole. Compléter le niveau à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge puis agiter en s'assurant que la fiole est fermée hermétiquement.

##### Dosage :

La difficulté de cette étape est dans le nombre de tube de dosage à préparer. Il faut 4 tubes par échantillons dont un pour le blanc et 3 tubes pour la gamme dont 1 pour le blanc.

Au total pour une série de 10 échantillons il faut préparer 64 tubes. Il est donc important de se concentrer afin de ne pas faire d'erreurs.

On prépare les tubes à doser selon le tableau suivant :

	Extrait aqueux tanins	H2O glacé		VANILLINE 1%	
ECHANTILLON (*3)	0.05 ml	1 ml	Agitation	2 ml	Agitation
GAMME (*2)	0.05 ml	1 ml	Agitation	2 ml	Agitation
BLANC Vanilline (H2O) (*4)	0.05 ml (H <sub>2</sub> O)	1 ml	Agitation	2 ml	Agitation
BLANC	Prélèvement	H2O glacé	Agitation	H2SO4 70%	Agitation
BLANC Concentration gamme 0.015	0.05 ml	1 ml	Agitation	2 ml	Agitation
BLANC ech (*nombre ech)	0.05 ml	1 ml	Agitation	2 ml	Agitation
BLANC acide (H2O)*10	0.05 ml (H <sub>2</sub> O)	1 ml	Agitation	2 ml	Agitation

Les préparations se font dans un bain d'eau glacé. La réaction entre l'eau et l'acide étant exothermique, afin de ne pas endommager les tanins il est préférable de travailler à environ 5°C.

Les tubes sont mis en agitation 1 minute puis remis quelques minutes au bain glacé. Ensuite on les laisse évoluer 20min à température ambiante. (Annexe : photos 6 et 7)

On lit l'absorbance de la solution colorée obtenue avec un spectrophotomètre à 500 nm.

### 3. Autres analyses chimiques

Des analyses complémentaires sont nécessaires afin de déterminer la valeur nutritive des matières végétales.

Matériels :

- Dessiccateur
- Capsules en porcelaine
- Une étuve : 103°C
- Un four

#### a. Matière sèche :

Cette méthode consiste à sécher les échantillons à l'étuve afin de déterminer le pourcentage d'humidité résiduelle.

La détermination de la matière sèche (MS) est importante car tous les autres constituants de la valeur alimentaire sont exprimés en fonction de la teneur en MS pour éviter des variations liées à la réhydratation de l'échantillon entre le séchage et les analyses de laboratoire. La MS, constituée de la matière organique et de la matière minérale (MM), correspond à la matière qui demeure dans l'échantillon de fourrage, lorsque l'humidité

résiduelle est éliminée. La détermination de la MS est indirecte car c'est l'humidité résiduelle qui est mesurée. Après avoir taré des capsules en porcelaine, elles sont remplies avec environ 1g d'échantillon et placées à l'étuve à 103°C pendant 12h afin d'éliminer l'humidité résiduelle et d'obtenir le résidu sec.

Les échantillons sont ensuite pesés et la teneur en MS est obtenue en soustrayant l'humidité résiduelle du poids frais de l'échantillon.

#### b. Matière minérale :

Cette méthode consiste à sécher les échantillons au four afin de déterminer la matière minérale. La matière minérale est obtenue après incinération complète de la matière organique. Cette valeur est utilisée pour déterminer le pourcentage de matière organique d'un échantillon. Le résidu sec obtenu pour la détermination des MS est calciné dans un four à moufle à 550°C pendant 6 heures (la matière organique (MO) est brûlée) afin de déterminer les cendres totales qui représentent les matières minérales (MM).

Les capsules sorties de l'étuve ou du four sont placées dans un dessiccateur pendant 20min afin d'éliminer l'humidité.

#### Matière organique (MO) :

La détermination de la matière organique permet de savoir dans l'échantillon la part de nutriments potentiellement disponibles pour l'animal. Elle est constituée principalement par les molécules du vivant (protéines, lipides, sucres et leurs dérivés), toutes ces molécules ayant pour base le carbone, l'oxygène et l'hydrogène (CHO). La mesure de la MO est indirecte, elle passe par la pesée de la MM. La MO est ensuite calculée en soustrayant la MM de la MS.

### III - Résultats

La concentration en tanins condensés est calculée de la manière suivante:

$$\% TC = \frac{(Abs\ final - b) \times Volume\_d'extraction}{MS \times a \times masse\_échantillon \times Volume\_prise\_d'essai}$$

Avec :

$$Abs\ final = Abs\_échantillon - Abs\_blanc\_échantillon - Abs\_blanc\_vanilline$$

a et b : constantes déterminées à partir de la gamme

MS : pourcentage de matière sèche de l'échantillon

Afin de normaliser les expériences les résultats sont exprimés en fonction du pourcentage de matière sèche exprimé en  $mg.100mg^{-1}$ . Les résultats des analyses chimiques et du dosage de tous les échantillons sont répertoriés dans un tableau. Pour traiter ces données, nous avons ensuite réalisé une moyenne à partir des trois valeurs obtenues pour une modalité (Température de séchage/ temps).

Les moyennes des analyses effectuées sur les feuilles de manioc sont répertoriées dans le tableau suivant :

Traitement	MS	MM	TC ( $mg.100\ mg^{-1}$ )
Initial	33,20	18,99	5,417
32°C/4h	42,86	6,69	4,091
32°C/8h	43,81	8,34	4,091
32°C/16h	75,46	9,44	2,652
32°C/24h	69,45	7,82	2,193
32°C/48h	80,90	8,21	1,9
40°C/4h	47,33	7,14	3,765
40°C/16h	76,29	7,51	2,103
40°C/24h	86,35	8,30	2,588
40°C/48h	90,66	6,64	1,934
46°C/4h	52,17	0,38	2,394
46°C/16h	78,35	8,62	1,386
46°C/24h	86,06	7,79	1,666
46°C/48h	91,07	7,17	1,775

Tableau 1 : Résultats des analyses de matières sèches, matières minérales et des Tannins condensés dans les feuilles de manioc.

De même, les moyennes des analyses effectuées sur les feuilles de pois d'angole sont répertoriées dans le tableau suivant :

Traitement	MS	MM	%TC
Initial	40,02	4,44	6,629
32°C/4h	52,1	4,9	4,013
32°C/8h	73,31	5,28	3,243
32°C/16h	86,96	5,47	1,504
32°C/24h	90,5	5,25	1,116
32°C/48h	90,89	5,15	1,766
40°C/4h	62,3	5,09	1,282
40°C/8h	87,21	5,29	1,328
40°C/16h	90,13	5,09	1,14
40°C/24h	91,63	5,08	1,768
40°C/48h	92,07	5,25	1,411
46°C/4h	81,74	5,21	2,18
46°C/8h	89,22	4,01	3,408
46°C/24h	93,35	4,94	1,948
46°C/48h	94,03	5,82	1,682

Tableau 2: Résultats des analyses de matières sèches, matières minérales et des Tannins condensés dans les feuilles de pois d'angole.

A partir de ces valeurs, on peut alors tracer les courbes donnant la teneur en tanins condensés en fonction de la durée et de la température de séchage.

Ces courbes sont de nature exponentielle décroissante.

Les points de cinétiques de dégradation des tannins condensés, en fonction de la température, ont été ajustés avec le modèle mathématique suivant :  $[TC] = b \cdot (\exp(-c \cdot t))$  où [TC] représente la teneur en tannins en % de la matière sèche et t la durée du séchage.

Le logiciel SAS a été utilisé pour l'ajustement mathématique. Le logiciel traite les données et propose des modélisations se rapprochant de la réalité expérimentale. Il permet de déterminer plusieurs valeurs :

b représente la concentration initiale de TC dans la ressource, soit donc l'ordonnée à l'origine.

c représente le taux moyen (% par heure) de disparition des TC,

La thermosensibilité des tanins condensés peut donc être observée par leur vitesse de disparition (% par heure) en fonction de la température de traitement.

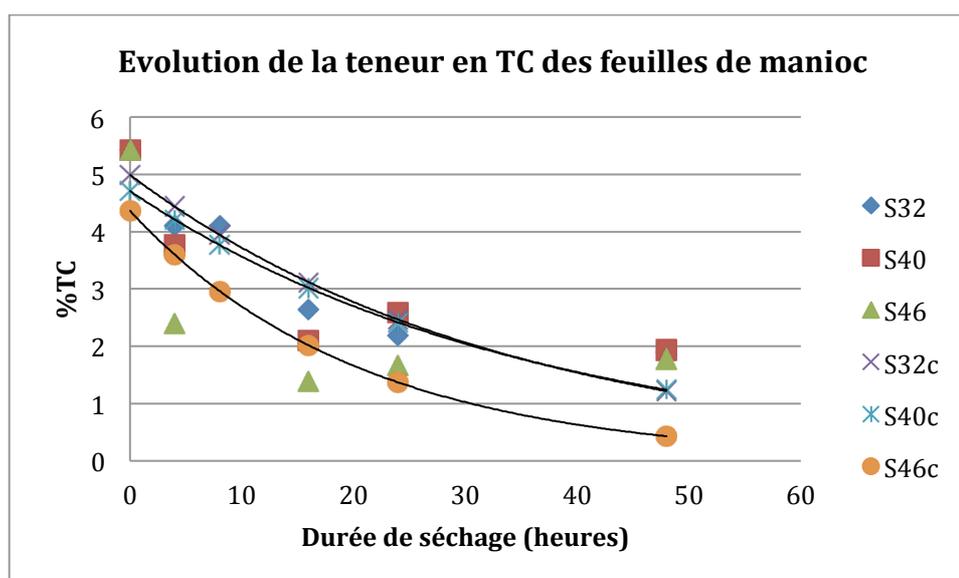
Les valeurs de b et c obtenues par la modélisation mathématique sont présentées dans le tableau suivant. L'erreur standard obtenue est également mentionnée.

	Feuilles de manioc		Feuilles de pois d'angle	
	1.1.1 Ordonnée à l'origine	1.1.3 Taux moyen de disparition des TC (% / h)	1.1.5 Ordonnée à l'origine	Taux moyen de disparition des TC (% / h)
	1.1.2 b	1.1.4 c	1.1.6 b	c
<b>32°C</b>	4,98 ± 0,38	2,9 ± 0,64	6,27 ± 0,791	8,2 ± 2,3
<b>40°C</b>	4,71 ± 0,641	2,8 ± 1,05	6,54 ± 1,346	31,5 ± 16,38
<b>46°C</b>	4,36 ± 1,057	4,8 ± 2,85	6,61 ± 1,841	27,2 ± 21,46

Grâce à ces valeurs, on peut donc présenter sur le même graphe les points expérimentaux obtenus et tracer les courbes théoriques à partir de l'équation.

#### Pour le manioc

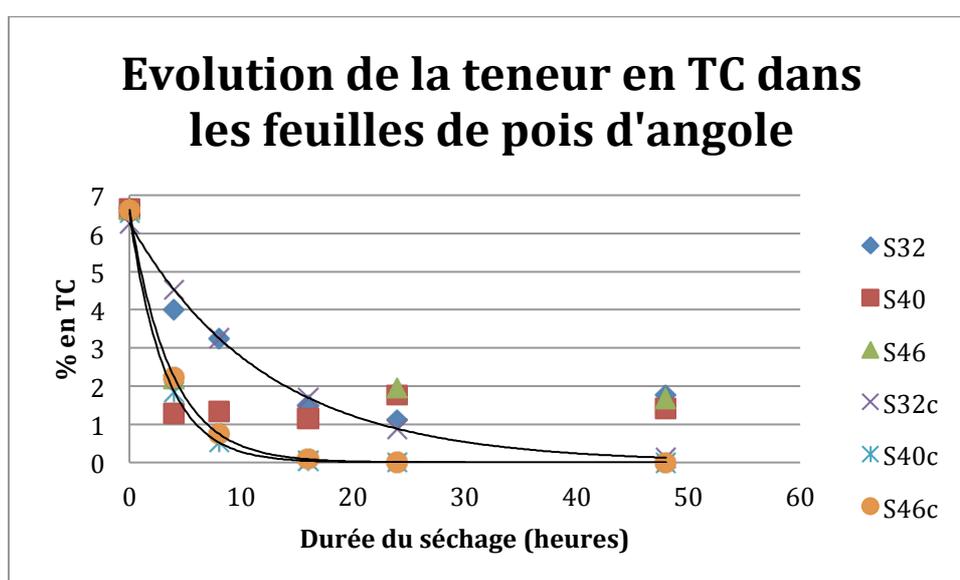
Temps	S32	S40	S46	S32c [TC]=4,98 exp(-2,9*t)	S40c [TC]=4,71 exp(-2,8*t)	S46c [TC]=4,36 exp(-4,8*t)
0	5,42	5,42	5,42	4,99	4,71	4,36
4	4,09	3,76	2,39	4,44	4,21	3,60
8	4,09	.	.	3,94	3,77	2,96
16	2,65	2,1	1,39	3,12	3,02	2,01
24	2,19	2,59	1,67	2,46	2,41	1,37
48	1,9	1,93	1,775	1,22	1,24	0,43



Courbe 1: Evolution de la teneur en tanins condensés des feuilles de manioc en fonction de la température et de la durée de séchage

### Pour le pois d'angole

Temps	S32	S40	S46	S32c [TC]=6,27 exp (-8,2*t)	S40c [TC]= 6,54 exp (- 31,5*t)	S46c [TC]= 6,61 exp(-27,2*t)
0	6,63	6,63	6,63	6,27	6,538	6,614
4	4,01	1,28	2,18	4,52	1,857	2,231
8	3,24	1,33	.	3,26	0,527	0,752
16	1,50	1,14	.	1,69	0,043	0,086
24	1,12	1,77	1,948	0,88	0,003	0,010
48	1,77	1,41	1,682	0,12	0,000	0,000



Courbe 2 : Evolution de la teneur en tanins condensés des feuilles de pois d'angole en fonction de la température et de la durée de séchage..

#### IV – Discussion

Pour les deux graphiques on identifie globalement des courbes à tendance exponentielle décroissante en adéquation avec les cinétiques de séchage des matières végétales obtenues lors d'un stage précédent.

On observe que pour le manioc les vitesses de dégradation des tanins condensés pour les cinétiques de séchage aux températures de 32°C et de 40°C sont à peu près similaires (2,94%/h et 2,78%/h). En revanche à 46°C la vitesse double à 4,83%/h

Pour le pois d'angole le taux de disparition des TC de 8,2%/h à 32°C. Puis on observe que les vitesses de disparition sont beaucoup plus importantes à 40°C (31,5%/h) et à 46°C (27,2%/h).

La dégradation des TC est alors beaucoup plus poussée pour le pois d'angole que pour le manioc. Lors d'expérimentations ultérieures, un effet "espèce" pourra donc être étudié.

Des travaux précédents ont montré que le mode de séchage a un effet significatif sur la teneur en TC des ressources. Les ressources séchées par lyophilisation (témoin) ont des teneurs en TC significativement plus élevées ( $P < 0.05$ ) que celles séchées à l'étuve et au soleil. Bien que significatives, les différences ont été faibles entre la lyophilisation et le séchage au soleil (séchage modéré). Les ressources séchées à l'étuve ont eu les teneurs en TC significativement plus faibles ( $P > 0.05$ ) que les deux autres traitements.

Ces résultats montrent que le séchage solaire sous abri est comparable avec la lyophilisation contrairement au séchage en étuve.

Notre expérimentation avait donc pour but de vérifier que les tannins condensés sont protégés à plus basse température (32°C). Cependant, nos résultats montrent que même à basse température une dégradation non négligeable est observée.

Ceci peut être s'expliquer par les caractéristiques du mode de séchage appliqué à nos échantillons. En effet lors du séchage en tunnel, les feuilles sont mises en présence d'un flux d'air renouvelé en permanence. La disparition des tanins condensés peut donc être due à leur oxydation. En présence d'air les tanins subissent une transformation de nature oxydative, accélérée par la présence de  $Fe^{3+}$ , conduisant à une coloration brune. (P. RIBEREAU-GAYON)

De plus, lors de la modélisation, nous observons des erreurs standards assez importantes pour les résultats obtenus. Différentes sources d'erreurs peuvent être à l'origine des incertitudes :

Les appareils de mesures :

- lecture de l'absorbance avec le spectrophotomètre
- mise à niveau de la balance

Les erreurs de manipulation :

- Les échantillons étant coupés à la main par différentes personnes, la prise d'essai en échantillon n'est donc pas homogène. Donc pour différents échantillons on ne dose pas la même quantité de tige et de feuilles.
- Les manipulations ont été effectuées par deux personnes différentes, cela peut donc induire un effet technicien.
- Lors du pipetage des échantillons (gouttes restées dans le conne)
- Durée de repos des tubes à essai à température ambiante avant la lecture

Les essais seront donc réalisés à nouveau pour préciser certains résultats. En outre, les cinétiques de dégradation des tanins doivent être croisées avec les cinétiques de séchage. Ainsi, en fonction de la température de séchage, on pourra prédire la quantité de TC résiduel dans une matière première à un stade de séchage suffisant permettant la conservation (> 85 % de MS). Ceci sera utile pour la mise au point d'un procédé de fabrication de granulés alicamentaires préservant la teneur en TC.

### **Conclusion et perspectives :**

Ce stage avait pour objectif d'étudier la thermo-sensibilité des tanins condensés pour deux matières premières végétales : le pois d'angole et le manioc.

Les échantillons préalablement séchés à différentes températures ont été analysés.

Les résultats obtenus ont permis de confirmer l'existence d'une corrélation entre les cinétiques de séchage et la dégradation de la teneur en tanins condensés. Cependant cette dégradation est importante même à basse température.

Des développements ultérieurs devront porter sur la possibilité de prédire la teneur en tanins résiduels en fonction de la température et des conditions de séchage.

De même, un effet espèce pourra être étudié afin de proposer un traitement de séchage optimal permettant de protéger les tannins de façon suffisante pour garder leur effet biologique.

### **Bilan personnel :**

Ce stage a été une belle expérience professionnelle dans le domaine de la recherche qui m'a permis de comprendre comment fonctionne un institut national tel que l'INRA et les méthodes mises en places pour effectuer un travail de recherche.

J'ai acquis une rigueur dans le travail en laboratoire notamment pour la méthode de dosage des tanins condensés. Tout au long de ce stage, les enseignements et les conseils transmis par le personnel m'ont permis d'acquérir une autonomie pour la réalisation des manipulations, grâce à la confiance qui m'a été accordée.

De plus la bonne ambiance qui régnait dans l'unité de recherche dès les premiers jours m'a aidé à bien m'intégrer et à prendre confiance en moi.

## Références bibliographiques :

1. BRUNET, S., (2008)  
Analyse des mécanismes d'action antiparasitaire de plantes riches en substances polyphénoliques sur les nématodes du tube digestif des ruminants, Thèse de Doctorat, Université de Toulouse.
  
2. MARIE-MAGDELEINE, M., (2009)  
Etude de ressources végétales tropicales pour un usage anthelminthique en élevage de ruminants, Thèse de Doctorat, Université Antilles-Guyane.
  
3. MARIE MAGDELEINE C, ARCHIMEDE H, (2015)  
Plantes anthelminthiques pour les animaux d'élevage  
Brochure INRA
  
4. P. RIBEREAU-GAYON  
Interprétation chimique de la couleur des vins rouges, Institut d'œnologie, Université de Bordeaux II
  
5. LATCHIMY N, (2015)  
Essais préliminaires pour la réalisation d'un granulé à propriétés alicamentaires à partir de ressources végétales de la Caraïbe.  
Stage de L3 Licence BBC - Université de Cergy Pointoise
  
6. V.PAOLINI, Ph. DORCHIES, H.HOSTE  
Effets des tanins condensés et des plantes à tanins sur les strongyloses gastro-intestinales chez le mouton et la chèvre  
Unité Mixte Associée 1225 INRA/ENVY « Physiopathologie des Maladies infectieuses et Parasitaires des Ruminants », Toulouse

## Annexes :



Photo 1 : matières végétales dans la solution S1

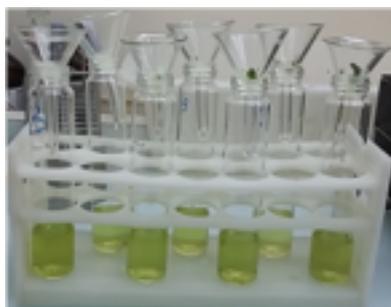


Photo 2 : filtrat obtenu après extraction et filtration

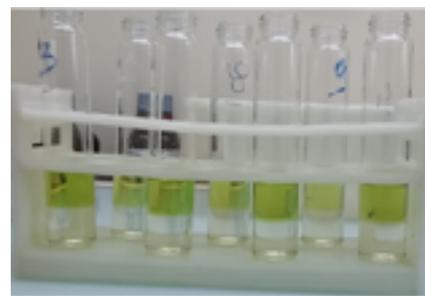


Photo3 : dépigmentation du filtrat à l'éther diéthylique

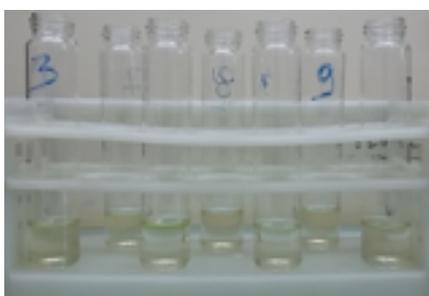


Photo4 : phase contenant les tanins condensés

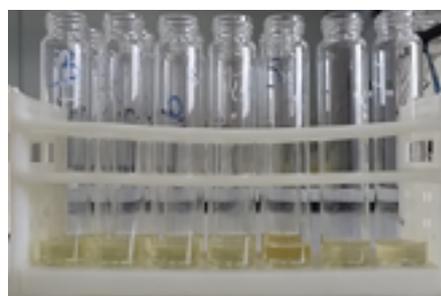


Photo5 : extrait aqueux de tanins obtenu après évaporation au Mivac

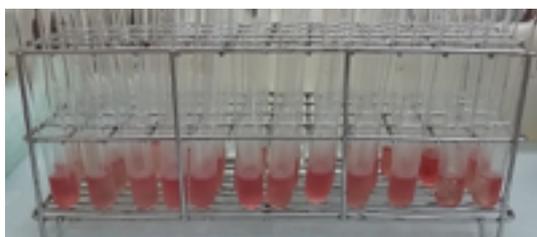


Photo6 : solution colorée obtenue avec les échantillons de manioc



Photo7 : solution colorée obtenue avec les échantillons de pois d'angle

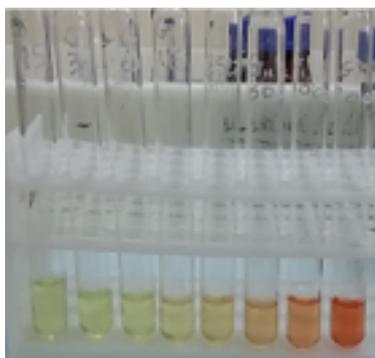


Photo8 : Gamme d'étalonnage



Photo9 : Concentrateur Mivac