



HAL
open science

Caractérisation des tanins condensés de plantes tropicales

Amandine Contaret

► **To cite this version:**

Amandine Contaret. Caractérisation des tanins condensés de plantes tropicales. Chimie. 2014. hal-02961680

HAL Id: hal-02961680

<https://hal.inrae.fr/hal-02961680>

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.

Lycée Polyvalent Charles COEFFIN
BTS CHIMISTE

Rapport de stage



Unité de Recherche Zootechnique, Centre Antilles-Guyane
Domaine Duclos
Prise d'eau 97170 PETIT BOURG

Caractérisations des tanins condensés de plantes tropicales

Réalisé par CONTARET Amandine,
Sous la direction de Madame CHEVRY MARIE-MAGDELEINE,
Responsable de laboratoire

Année 2013-2014

Table des matières

Table des matières	1
I. Remerciements	3
II. Présentation de l'entreprise	4
1) <i>INRA</i>	4
2) <i>L'unité de recherche Zootechnique (URZ)</i>	5
3) <i>Le laboratoire d'analyse</i>	5
III. Introduction	6
1) <i>Les métabolites des plantes</i>	6
2) <i>Les tanins condensés</i>	6
3) <i>Ma mission</i>	8
IV. Matériels et méthodes	9
1) <i>Les échantillons analysés</i>	9
2) <i>Les appareils utilisés</i>	10
3) <i>Screening des plantes étudiées</i>	11
1) <u>A.</u>	<u><i>Préparation de l'infusée</i></u> 12
2) <u>B.</u>	<u><i>Recherche de proanthocyanidols</i></u> 12
4) <i>Extraction et purification des tanins condensés</i>	12
3) <u>A.</u>	<u><i>Extraction à l'Accelerated Solvent Extractor (ASE)</i></u> 12
4) <u>B.</u>	<u><i>Purification des tanins condensés</i></u> 13
5) <i>Thiolyse des tanins condensés</i>	13
6) <i>Analyse HPLC</i>	14
V. Résultats	14
1) <i>Screening des proanthocyanidols dans les plantes</i>	15
2) <i>Analyse HPLC</i>	16
VI. Analyses et discussions	18
1) <i>Screening</i>	18
2) <i>Caractérisation par la méthode de thiolyse</i>	18
VII. Conclusion-perspectives :	19

Tables des illustrations

Figure 1 : Façade extérieur du laboratoire

Figure 2 : Structure chimique d'un tanin condensée (proanthocyanidol)

Figure 3 : structure de deux anthocyanes spécifiques, la delphinidine et la cyanidine

Figure 4 : structure des unités monomériques formant les tanins condensés

Figure 5 : identification succincte des différentes parties de l'ASE

Figure 6 : Identification des différentes parties de l'évaporateur MiVac.

Figure 7 : Identification des différentes parties de L'HPLC.

Figure 8 : Fractionnement d'un trimère de tanins condensés par thiolysé

Figure 9 : Chromatogrammes HPLC des TC de manioc amer et Leucaena avant et après thiolysé.

Tableau 1 : Résultat du screening des proanthocyanidols dans les différentes plantes.

Tableau 2 : Résultats de l'analyse des chromatogrammes HPLC des standards de proanthocyanidols, écart à l'étalon interne dihydroquercétine (DHQ).

Annexe 1 : Screening phytochimique, partie proanthocyanidols.

Annexe 2 : Mode opératoire purification des tannins condensés.

Annexe 3 : Mode opératoire de la thiolysé

Annexe 4 : Résultats obtenus par analyse HPLC des Tannins condensés (TC) thiolysés écart à l'étalon interne dihydroquercétine (DHQ).

I. Remerciements

Avant de procéder à la présentation de ce rapport je tiens à remercier Madame CHEVRY-MARIE MAGDELEINE Carine pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire et offert un accueil chaleureux. Mais surtout un grand merci pour ton aide, ta disponibilité, ton soutien et ta bonne humeur.

Je remercie plus particulièrement FELICITE Yoann qui à accepter de m'encadrer durant ces semaines de stage. Merci d'avoir été patient, bienveillant, taquin, disponible, de toujours bonne humeur, de m'avoir aidé dans mes manipulations et aussi d'avoir été un très bon dictionnaire.

Je remercie également CALIF Suzitte qui m'a appris à faire des longues séries de pesées dans la joie et la bonne humeur et aussi merci pour avoir eu confiance en moi et m'avoir confié ton travail.

Enfin un grand merci pour cette équipe chaleureuse et joviale du laboratoire d'analyses de l'URZ :

PHILIBERT Lucien, pour ta présence et ta disponibilité à répondre à mes questions.

SILOU Tatiana, cette dame dévouée, toujours souriante, prête à aider et pour ta gentillesse.

ABINNE-MOLZA Lucina, pour sa bonne humeur, son sourire et sa motivation.

Un merci particulier aux stagiaires :

Lisa, pour ta bonne humeur et tes rires, pour tes explications et ta patience.

Loïc, pour ta disponibilité, ta gentillesse, ton aide et tes services.

Amandine, mon très cher homonyme, pour avoir été exactement mon double jusqu'au bout.

Anthony, pour ton soutien, ta franchise, ta bonne humeur ainsi que les délires, tes conseils et ta bienveillance. Courage à toi pour la suite en thèse.

Steeve, Roseline, Willy, Jesse, Mayline, Célia, Cassandra, Linejy, Lawrence, Jordan pour avoir été de bons amis toujours prêts à rire et à conseiller, merci d'avoir bien voulu partager vos expériences et vos projets avec moi.

Vous allez beaucoup me manquer.

Je remercie également Madame CLODINE-FLORENT pour ses conseils et son soutien. De même, merci aux professeurs de la 1-2TSCH.

II. Présentation de l'entreprise

1) INRA

L'INRA, premier Institut National de la Recherche Agronomique en Europe et deuxième dans le monde, est un organisme de recherche scientifique publique finalisé, placé sous la double tutelle du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche et du ministère de l'agriculture et de la pêche.

Il a pour but de mener des recherches finalisées pour une alimentation saine et de qualité, pour une agriculture compétitive et durable et pour un environnement préservé et valorisé.

L'INRA bâtit des programmes de recherche en France et en Europe pertinent pour la société. Il s'engage vis-à-vis de la société au moyen de contrat d'objectifs à 4 ans avec l'état. Il accompagne le développement des filières et des territoires, il met en œuvre un partenariat de transfert tout en veillant à préserver le bien public.

Il entretient des partenariats scientifiques avec des grands instituts de recherche dans le monde tels que : l'université, l'enseignement agronomique et vétérinaire Il compte des recherches et des chercheurs distingués par des prix prestigieux.

1839 chercheurs et 1891 thésards travaillent à l'INRA, 1519 chercheurs et étudiants étrangers sont accueillis chaque année à l'INRA, 2572 ingénieurs et 4121 techniciens sont mobilisés.

Le centre Antilles-Guyane

Il est le principal acteur de la recherche agronomique dans la zone caribéenne depuis 60 ans, et est l'un des 19 centres de recherche décentralisés de l'institut.

Créé en 1949, il est installé sur deux territoires (Guadeloupe et Guyane) et est divisé en quatre unités de recherche sur deux domaines expérimentaux :

- 5) L'Unité de Recherche Agrosystèmes Tropicaux (URASTRO)
- 6) L'Unité Mixte de Recherche Écologiques des Forêts de Guyane (ECOFOG)
- 7) L'Unité de Recherche Qualité des Fruits et des Légumes Tropicaux (UMRQUALITROP)
- 8) L'Unité de Recherche Zootechnique (URZ)

Sa mission, cherché à valoriser les ressources naturelles des Antilles tout en promouvant une agriculture durable et économique.

Son objectif, élaboré des techniques innovantes, des nouvelles technologies adaptées à l'environnement tropical, qui accompagneront l'évolution des exploitations agricoles.

2) L'unité de recherche Zootechnique (URZ)

L'URZ est composée d'une Unité de recherche et d'une Unité expérimentale. Elle accueille 12 chercheurs, 40 ingénieurs, techniciens, administratifs. Elle a pour mission principale de mener des études sur les contraintes rencontrées dans les zones intertropicales en production animale (bovins, caprins, porcins ...)

Les programmes de recherches sont tout d'abord centrés sur la façon d'adapter les animaux aux contraintes des systèmes d'élevage tropicaux (chaleur, croissance, strongles gastro-intestinaux...). Ainsi l'URZ joue donc un rôle important dans l'objectif de l'INRA et offre des stratégies de production porcine, bovine, caprine et ovine en zone tropicale.

3) Le laboratoire d'analyse

L'Unité de Recherche Zootechnique est sous la direction de Madame Maryline BOVAL. Madame Carine CHEVRY MARIE-MAGDELEINE, chercheur responsable de laboratoire, dirige avec Lucien PHILIBERT responsable adjoint, une équipe composée de 5 techniciens de la recherche : Yoann FELICITE (biochimiste), ABINNE-MOLZA Lucina (biologiste), Lucien PHILIBERT (biochimiste, physico-chimiste), CALIF Suzitte (physico-chimiste) et SILOU Tatiana (biochimiste, physico-chimiste).

Pour répondre aux questions des programmes de recherches, des analyses physico-chimiques et biologiques y sont réalisées. Les manipulations se font sur des aliments du bétail, des contenus digestifs, des excréments mais également sur des prélèvements sanguins.

Diverses techniques analytiques sont utilisées telles que l'HPLC, la distillation, la spectrométrie, la microscopie... Les dosages effectués sur les produits analysés (aliments, fourrage, fèces, contenus digestifs,...) servent à déterminer leurs taux en matières organiques et azotées totales, en amidon, acide gras, glucose, ou encore parois cellulaires. Le laboratoire de L'URZ est donc une plateforme technique servant au développement régional et à la recherche agronomique.



Figure 1 : Façade extérieure du laboratoire

III. Introduction

Dans le cadre de la formation au Brevet de Technicien Supérieur Chimiste, les étudiants de première année sont appelés à effectuer un stage en entreprise afin de mettre en pratique les connaissances acquises en enseignement théorique. Ce stage est constitué : d'une première semaine de découverte puis de sept semaines de stage d'affilée.

Celui-ci a été réalisé au sein de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA), plus exactement au laboratoire d'analyse de l'Unité de Recherche Zootechnique (URZ).

Le stage s'est déroulé en deux temps : une étape de découverte d'une semaine et une étape de projet d'étude spécifique de sept semaines.

La semaine de découverte a été l'occasion de découvrir les nombreuses manipulations réalisées au laboratoire parmi lesquelles : - l'évaluation de matière sèche, - les mesures de parasitologie, - hématocrites, - OPG (Œuf par gramme), - le contrôle qualité des caprins.

Dans un second temps, durant la période de stage de sept semaines, j'ai dû répondre à la problématique suivante : « **Caractérisation des tanins condensés de plantes tropicales** », sous la direction de Mme Chevry Marie-Magdeleine et la tutelle du biochimiste Félicite Yoann.

1) Les métabolites des plantes

Une plante produit un grand nombre de composés, appelés métabolites. Il existe deux types de métabolites :

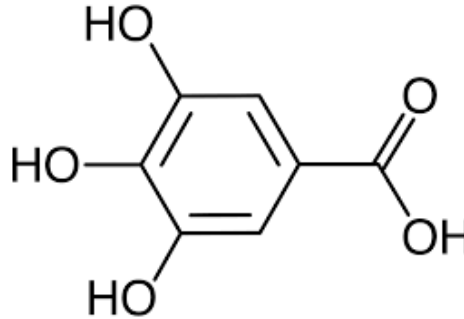
- Les métabolites primaires qui sont directement impliqués dans la croissance, le développement et la reproduction normale de la plante.
- Les métabolites secondaires ne sont donc pas directement impliqués dans les processus physiologiques fondamentaux de la plante. Ils sont indispensables à la nutrition, la croissance et au développement d'un organisme. Ils peuvent servir notamment à la défense contre les attaques extérieures. Les métabolites secondaires sont classés en trois grands groupes, dont trois chez les plantes : (phénols, azotés, terpènes).

2) Les tanins condensés

Les tanins sont des métabolites secondaires des plantes, leur conférant une protection contre les prédateurs (insectes et herbivores). Ils se divisent en deux catégories : les tanins hydrolysables et les tanins condensés. Nous nous attarderons sur les tanins condensés, objet de notre étude. Car en effet, des travaux menés par C. MARIE-MAGDELEINE ont montré que les TC pouvaient avoir un effet sur la santé des ruminants (antiparasitaire) mais aussi sur leur croissance (effet nutritionnel).

Les tanins condensés, appelés aussi proanthocyanidines, sont des composés formés à partir d'unités monomériques ou polymériques de flavan-3-ols de la famille des flavanoïdes, ce qui les différencie des tanins hydrolysables.

Tanin hydrolysable qui après hydrolyse donne l'Acide gallique



Les **flavonoïdes** sont des *métabolites secondaires* des plantes partageant tous une même structure de base, formés par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones : C₆-C₃-C₆, chaîne souvent fermée en un hétérocycle oxygéné hexa- ou pentagonal (Figure 2). Plus précisément, les tanins condensés sont constitués d'unités de **flavan-3-ols**, qui constituent un sous-groupe des flavonoïdes, liées entre elles par des liaisons carbone-carbone, simples (type B) ou multiples (type A), de type 4→8 ou 4→6 (Figure 2).

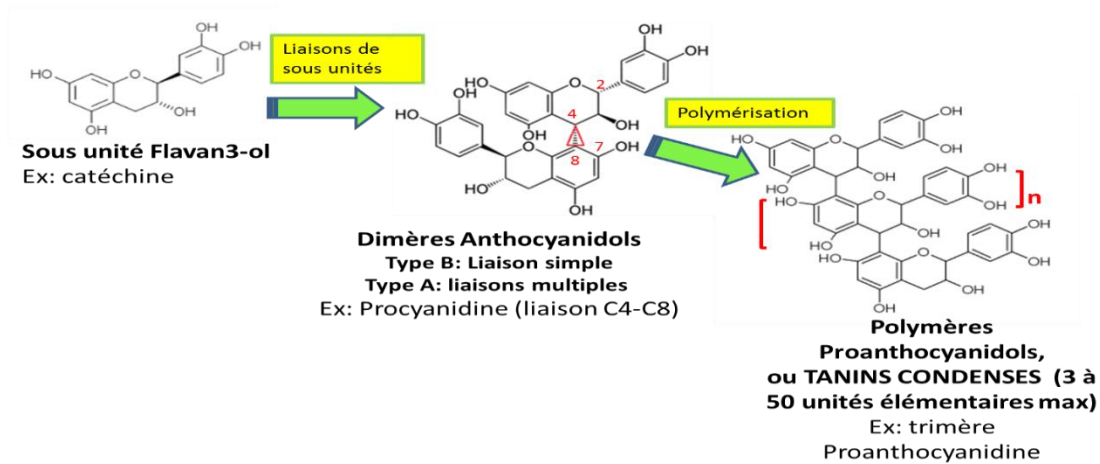


Figure 2 : Structure chimique d'un tanin condensée (proanthocyanidol)

Une particularité des tanins condensés 4→8, qui explique leur appellation de proanthocyanidines, est qu'ils libèrent, à chaud et en présence d'acide, des anthocyanes. Il s'agit de molécules de la famille des flavonoïdes qui sont des pigments colorés par la plante et qui ont donc la capacité d'absorber une partie de la lumière visible. Les anthocyanes libérés peuvent être de plusieurs types distincts, dont cyanidine et delphinidine, présentés dans la figure 3:

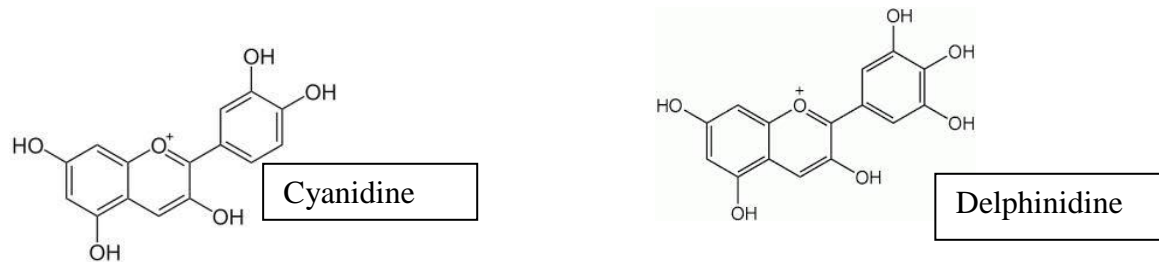


Figure 3 : structure de deux anthocyanes spécifiques, la delphinidine et la cyanidine

Deux types de tanins condensés sont distingués selon qu'ils libèrent de la delphinidine ou de la cyanidine. Ils sont appelés respectivement prodelphinidines (polymères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine) et procyanidines (polymères de catéchine et d'épicatéchine).

La **figure 4** présente quatre des monomères participant le plus souvent à la formation des tanins :

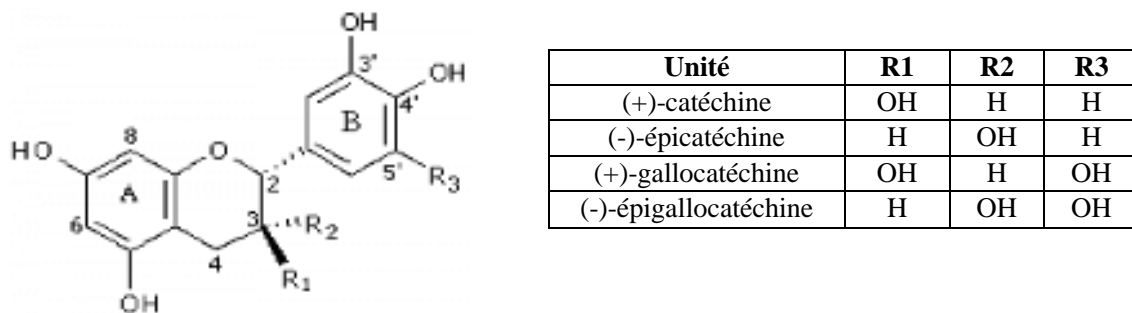


Figure 4 : structure des unités monomériques formant les tanins condensés

3) Ma mission

L'URZ, plus particulièrement l'ingénieur MARIE- MAGDELEINE Carine, se consacre à l'étude de la classe phénolique des tanins condensés à travers des expériences *in vivo* et *in vitro* depuis 2007. L'objectif du projet de recherche actuel est la caractérisation de plantes riches en tanins condensés afin de mettre au point des granulés ayant des activités anthelminthiques*.

Les tanins condensés sont mondialement connus pour leurs propriétés chimiques contre les strongles (parasites), touchants notamment les petits ruminants. En effet, le parasitisme gastro-intestinal est un problème majeur chez les petits ruminants, conduisant à une forte baisse de productivité. C'est pour lutter en particulier contre le parasite le plus pathogène, *Haemonchus contortus*, devenu résistant aux produits vétérinaires chimiques, que l'URZ étudie les tanins condensés.

En effet, ces métabolites secondaires des plantes sont connus pour avoir un effet bénéfique sur la santé des animaux. Ainsi, les effets de la consommation des

plantes à tanins condensés (TC) par les animaux ont été observés sur les parasites gastro-intestinaux.

Différents essais ont montré que chez les ruminants, l'ingestion de TC était associée à des effets bénéfiques sur les paramètres zootechniques, sur la physiologie digestive et sur la santé (Barry et Al, 1999). Ces effets sont variables en fonction de la qualité et de la quantité de tanins ingérés par l'animal.

L'estimation des tanins condensés dans la ressource végétale est donc un critère important pour le choix de la ressource végétale en vue d'une alimentation animale. Il a aussi été montré que la nature du tanin condensé pouvait influencer sur les effets antiparasitaires. Par exemple, les monomères de prodelphidines ont généralement une plus grande activité anthelminthique que les monomères des procyanidines (Molan et Al., 2003).

Dans le projet de recherche mené à l'URZ, il est prévu de concevoir des aliments pour animaux à base de plantes riches en tanins condensés, afin d'améliorer leurs productions.

Afin d'être étudiés, les échantillons de plantes doivent subir un screening (test chimique rapide qui confirme la présence de tanins et autres métabolites secondaires), puis être caractérisés pour leur teneur et qualité en tanins condensés.

C'est donc sur la partie caractérisation qualitative des tanins que j'interviens durant mon stage. Le but est de classer les plantes en différents groupes, afin d'étudier par la suite leurs effets sur la santé et la nutrition animale.

IV. Matériels et méthodes

1) Les échantillons analysés

Les plantes retenues au laboratoire sont des plantes à feuillages (car destinées aux ruminants) connues, d'après des travaux antérieurs, pour leur teneur élevée en TC dans leurs feuilles. Un total de 13 échantillons a été traité :

- le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) AL0000197 variétés amère et douce (« Ka manioc ») AL00195,
- le Leucaena (*Leucaena leucocephala*) AL00201,
- l'Amandier (*Terminalia Catppa*) AL00477,
- la Banane (*Musa Paradisiaca*) (fruit entier) A44267 et (peau) A44266,
- le Cajou (*Anacardium occidentale*) AL00472,
- le Goyavier (*Psidium guajava*) AL00471,
- le Grenadier (*Punica granatum*) AL00474,
- l'Icaque (*Chrysobalamus icaco*) AL00470,
- le Manguier (*Mangifera indica*) AL00469,
- le Pois d'Angole (*Cajanus Cajan*) AL00205,
- le Raisin (*Coccoloba uvifera*) AL00473.

Ces plantes ont été lyophilisées afin d'assurer une meilleure conservation, puis broyées.

2) Les appareils utilisés

- Accelerated Solvent Extractor (ASE)

L'ASE est un automate qui permet d'extraire des composés organiques présents dans des échantillons. Il utilise l'effet combiné d'une température élevée et de la pression pour permettre à l'utilisateur d'isoler les composés d'intérêt, tout en conservant l'intégrité de l'échantillon. On peut retenir ou éliminer les interférents. La sélectivité de l'extraction dépend de l'analyte et de l'application.

L'ASE réduit la consommation de solvant et augmente la vitesse d'extraction pendant le traitement des échantillons. Il permet de transposer des différentes méthodes d'extraction telles que les ultra-sons, les micro-ondes ou le Soxhlet. (Voir protocole en annexe).

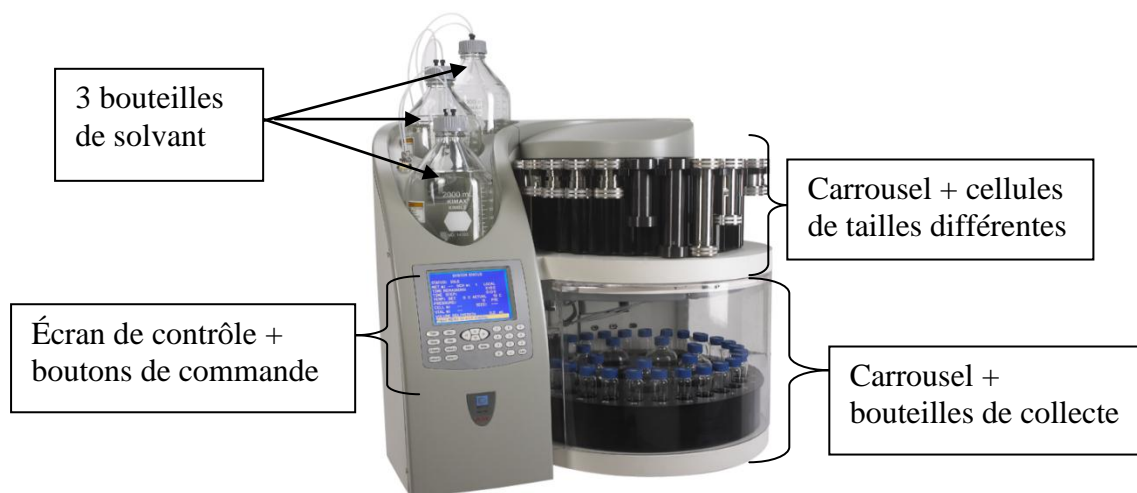


Figure 5 : identification succincte des différentes parties de l'ASE

- MiVac

Le MiVac est une centrifugeuse basse pression permettant l'évaporation de solvant à faible température.

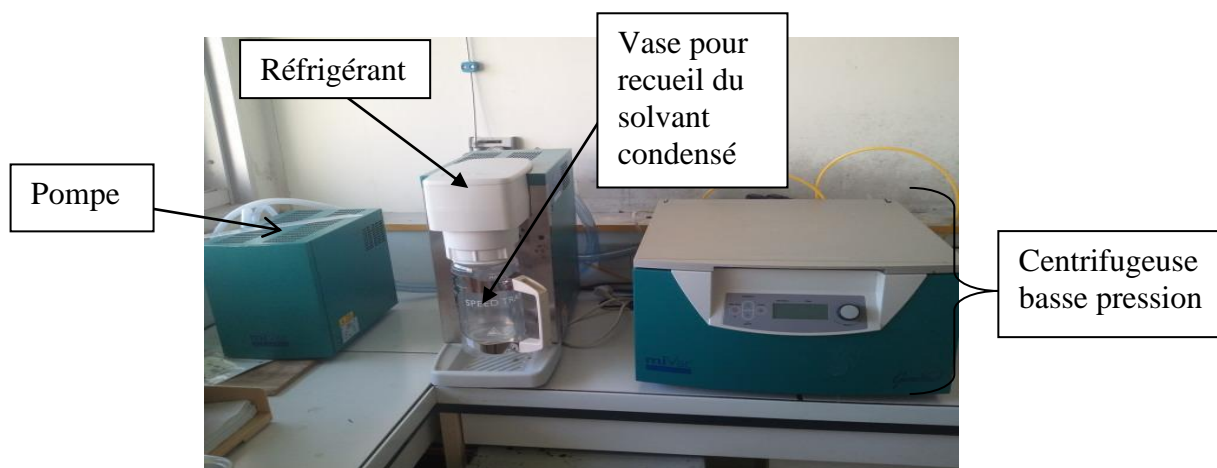


Figure 6. Identification des différentes parties de l'évaporateur MiVac.

- Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP ou HPLC)

La Chromatographie en phase liquide à haute performance est une technique chromatographique dont la phase mobile est liquide. L'échantillon à analyser est poussé par un éluant liquide (appelée aussi phase mobile) dans une colonne remplie d'une phase stationnaire composée de grains solides très fins. Le débit d'éluant est assuré par une pompe à haute pression. Dans la colonne, les divers composés de l'échantillon sont séparés l'un de l'autre en raison de leurs diverses affinités à l'égard des deux phases – stationnaire et mobile. Cette méthode de pointe qui est utilisée en chimie analytique permet de séparer et d'identifier les constituants d'un mélange. Elle est utilisée pour l'identification, le dosage ou pour des contrôles de routine tels que la vérification de formulation médicamenteuse par comparaison avec un chromatogramme témoin.

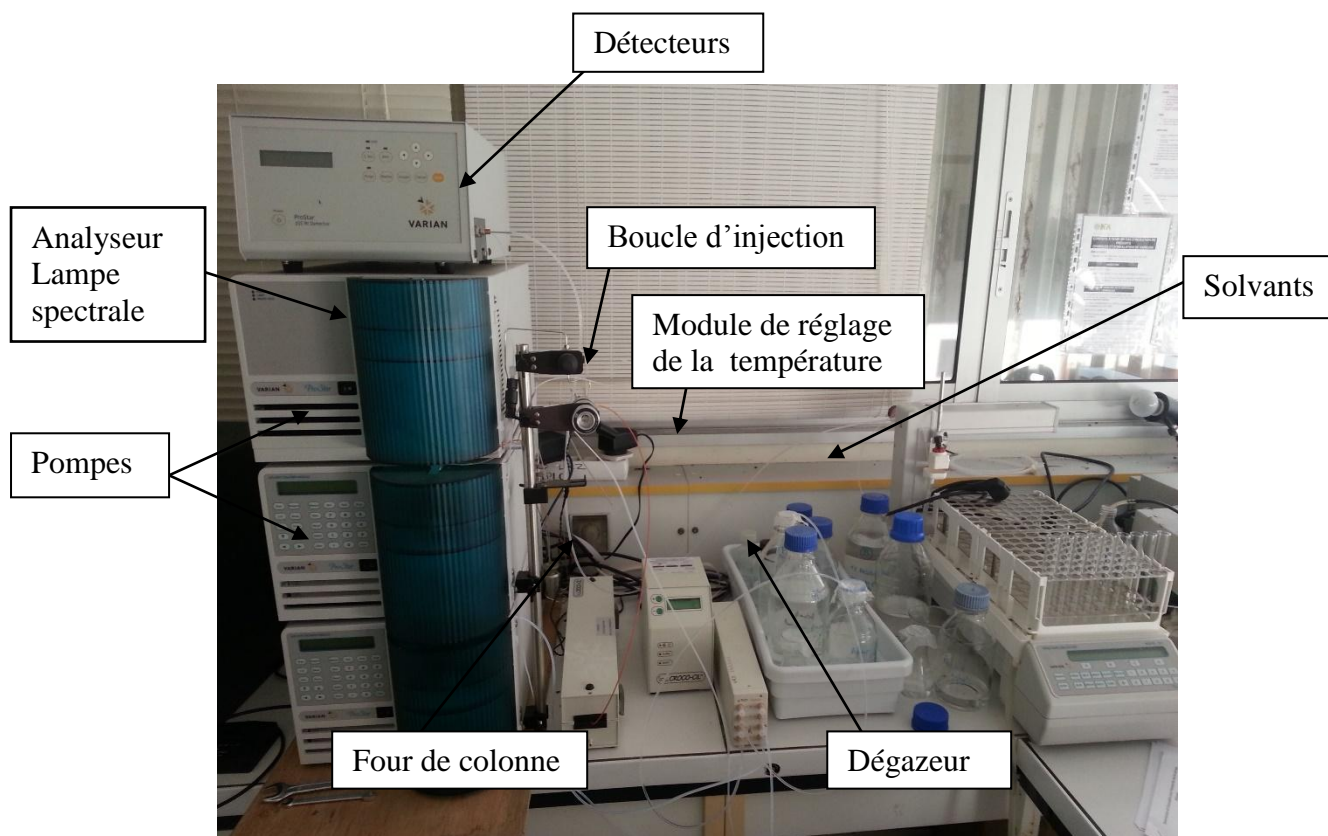


Figure 7. Identification des différentes parties de L'HPLC.

3) Screening des plantes étudiées

Afin de vérifier la présence de tanins condensés au sein des organes broyés (plantes, fruits) préalablement à l'étude, il est prévu de procéder à un test de screening phytochimique.

Cette méthode est basée sur le fait que les métabolites mis en présence de réactif chimique déterminé subissent une réaction spécifique qui permet de les identifier les

uns par rapport aux autres. À la fin du screening on est alors capable d'établir la liste des métabolites présents dans le matériel végétal.

A. Préparation de l'infusée

Laisser Infuser : 2g d'organes broyés sont placés dans un erlenmeyer contenant 20mL d'eau bouillante. Boucher l'erlenmeyer et laisser infuser 20minutes. Filtrer

B. Recherche de proanthocyanidols

La plante témoin est la feuille de manguier.

Dans un tube introduire 2mL de l'infusée + 2mL d'acide chlorhydrique. Placer le tube dans un bain-marie bouillant pendant 5minutes. Répéter le processus pour les autres infusées.

Si coloration rouge apparente la réaction est positive, on peut donc procéder à l'extraction.

Il est procédé à deux essais à des concentrations différentes d'infusés afin de permettre une meilleure visualisation du résultat.

4) Extraction et purification des tanins condensés

Il s'agit dans un premier temps, de séparer les tanins condensés des tanins hydrolysables de chacune des plantes. Les tanins condensés extraits et purifiés de chaque plante serviront par la suite de référence individuelle pour le dosage.

A. Extraction à l'Accelerated Solvent Extractor (ASE)

Une première extraction solide-liquide va permettre de récupérer la fraction contenant les tanins condensés. Cette extraction se fait de manière automatisée, à l'aide de L'Accelerated solvent extractor (ASE) par le mélange de solvant : - eau distillée 30% - acétone 70% - acide ascorbique 1%, qualité NORMAPUR.

Dans un premier temps, une cellule contenant la poudre de plante à extraire est préparée :

Pour cela, 25 g de la plante broyée sont mélangés à 5 g de terre diatomée (pouvoir absorbant et comblant), et introduits dans la cellule prémunie d'un filtre. La cellule est fermée et posée sur le carrousel de l'ASE. Le programme d'extraction est lancé.

Suite à l'extraction automatique à l'ASE, les solutions obtenues seront dépigmentés avec le même volume d'éther diéthylique permettant l'élimination des protéines et de la chlorophylle de la plante, dans une ampoule à décanter.

La phase inférieure est récupérée et l'opération répétée 3 fois. Puis le solvant (éter diéthylique) est évaporée au MiVac, on obtient alors un extrait de tanins semi-solide que l'on récupère avec un peu d'eau. (Celui peut être traité directement en calculant la concentration de méthanol à rajouter à l'extrait aqueux pour la purification).

Le filtrat final est placé dans un pot en verre préalablement taré, et mis au congélateur avant lyophilisation, méthode de séchage par sublimation (cette opération n'est pas nécessaire si la purification peut être faite dans l'immédiat).

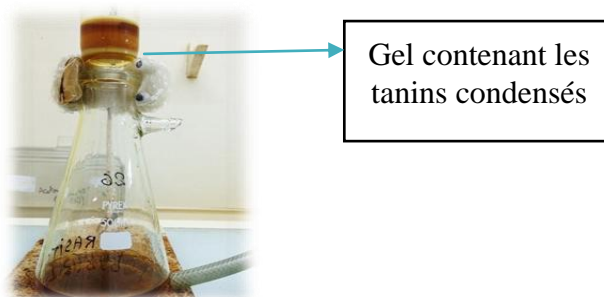
B. Purification des tanins condensés

L'extrait aqueux de tanins condensés (TC), est passé sur colonne de Sephadex LH20 (gel d'exclusion). 4g de Sephadex LH20 sont introduits dans un creuset filtrant et conditionné à l'aide de 50 ml d'une solution de méthanol à 50%.

Le mélange est versé sur le gel de Sephadex, on l'élue avec 50-100mL de méthanol pour éliminer les tanins hydrolysables et ensuite élué avec 100 mL de solution acétone/eau 70%/30%, afin de récupérer les tanins condensés piégés. L'acétone du filtrat est évaporée au MiVac et l'extrait aqueux est congelé avant lyophilisation.

Plusieurs extractions de TC sont effectuées sur plantes différentes avant de passer au lyophilisateur.

Colonne de Sephadex



5) Thiolyse des tanins condensés

La thiolyse est une méthode d'hydrolyse. Le nucléophile utilisé est le benzyl mercaptan, et l'acide sert de catalyseur. Les unités d'élongation du tanin seront donc libérées sous forme de dérivés benzylthioéther, tandis que l'unité terminale est libérée sous forme de monomère flavan3-ol libre. L'équation globale est présentée dans la **figure 8**. Les produits de décomposition des tanins peuvent ensuite être analysés par HPLC.

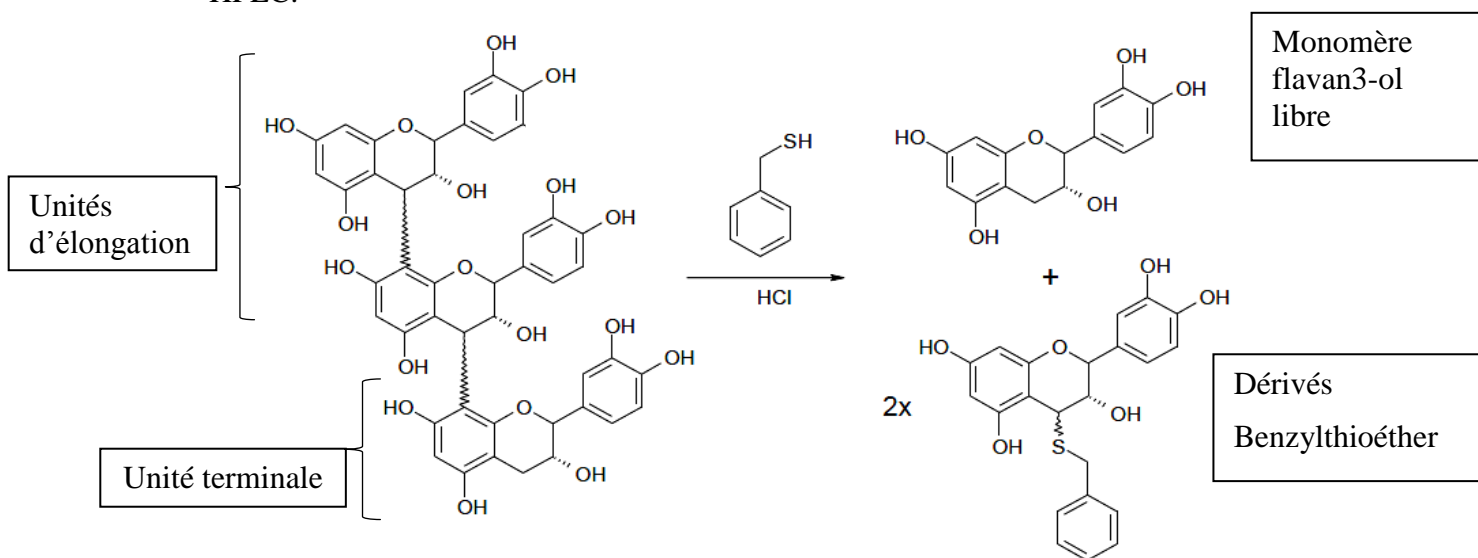


Figure 8. Fractionnement d'un trimère de tanins condensés par thiolyse.

Mode opératoire :

Rapport de stage

CONTARET Amandine BTS Chimiste

La Thiolyse est réalisée sur les TC purifiés des plantes. Dans un premier temps, 4mg de poudre de TC sont pesés dans un bécher et mélangé à 1mL de méthanol. Le bécher est ensuite recouvert de parafilm et passé dans un bain à ultra-sons pendant 3min afin de faciliter la solubilisation. La solution de TC est filtrée sur un filtre Caméron à 0.45 μ m et est placé dans un Vial de 4.0mL.

Dans un tube Eppendorf, 50 μ L de la solution de TC sont mélangés à 50 μ L de méthanol acidifié avec de l'HCl à 3.3%, suivi de 100 μ L de benzyl mercaptan à 95% dans du méthanol. Le tube est soigneusement fermé et mis à incuber à 40°C pendant 30min.

La réaction est stoppée en plaçant le tube Eppendorf dans un bain de glace, puis 250 μ L d'eau sont rajoutés suivi de 50 μ L d'étalon interne : dihydroquercétine en solution méthanolique.

Le tube est alors congelé pour être analysé le lendemain. La solution obtenue sera injectée en HPLC dans les 24h.

6) Analyse HPLC

Pour caractériser les familles de TC, on a eu recours à la chromatographie liquide haute performance (HPLC ou CLHP). Le but ultime est de déterminer les familles de TC contenues dans un TC purifié.

Manipulation :

Les monomères étalons (catéchine, épicatechine, épigallocatechine) d'une part et les TC purifiés des différentes plantes d'autre part avant thiolyse (à une concentration de 4mg/ml dans du méthanol de qualité HPLC avec ajout de l'étalon interne) et après thiolyse, sont injectés.

Conditions de travail, selon la méthode de Gea et al. (2011) :

- Phase mobile : 1% acide acétique dans l'eau (solvant A) et méthanol qualité HPLC (solvant B).
- Phase stationnaire : colonne C18
- Débit 0.75 mL min⁻¹
- Gradient d'élution: 0-5 min, 20% B; 5-40 min, 20-70% B; 40-45 min, 70-90% B; 45-50 min, 90% B; 50-55 min, 90-20% B; et 55-60 min, 20% B.
-

Les différents chromatogrammes sont analysés en déterminant l'absorbance max (λ_{\max}) de chaque composé et son écart par rapport à l'étalon interne ($\Delta TR = TR_{\text{composé}} - TR_{\text{DHQ}}$). Les composés montrant une même λ_{\max} (arrondie à la dizaine supérieure) et un même ΔTR (au dixième près) seront considérés comme potentiellement identiques

V. Résultats

1) Screening des proanthocyanidols dans les plantes

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous et sur la figure A.



Screening infusé de plantes avant ajout d'acide chlorhydrique

Screening 1^{er} essai : 2mL d'infusée + 2mL d'acide chlorhydrique.



Screening 2eme essai diluée au 1/3. : 0.5mL d'infusée +1.5mL d'eau distillée + 2mL d'acide chlorhydrique.



Tableau 1. Résultat du screening des proanthocyanidols dans les différentes plantes.

Matériel végétal (1er ESSAI)			Coloration de l'extrait + HCl+ bain-marie	Groupe chimique
Plantes	Organe	Extrait		proanthocyanidols
Amandier AL00477	Feuilles	Marron	Marron	Fiole 2 ++

Banane fruit A44267	Fruit	Marron claire	Marron claire	FiOLE 59 +
Banane peau A44266	Peau	Marron claire	Marron	FiOLE 25 ++
Cajou AL00472	Fruit	Marron claire	Marron très foncé	FiOLE 58 +++
Goyavier AL00471	Feuilles	Marron foncé	Marron très foncé	FiOLE 28 +++
Grenadier AL00474	Fruit	Rose	Marron très foncé	FiOLE 49 +++
Icaque AL00470	Feuilles	Jaune-orangé	Marron très foncé	FiOLE 5 +++
Ka manioc AL00195	Feuilles	Marron claire	Marron très foncé	FiOLE 14 +++
Leucaena AL00201	Feuilles	Marron claire	Marron	FiOLE 57 ++
Manguier AL00469	Feuilles	Marron claire	Marron très foncé	FiOLE 26 +++
Manioc amer AL00197	Feuilles	Marron claire	Marron très foncé	FiOLE 1 +++
Pois d'angoles AL00205	Feuilles	Marron	Marron très foncé	FiOLE 8 +++
Raisin AL00473	Feuilles	Marron claire	Marron	FiOLE 33 ++

Matériel végétal (2eme ESSAI : dilution)			Coloration de l'extrait + HCl+ bain-marie	Groupe chimique
Plantes	Organe	Extrait		proanthocyanidols
Amandier AL00477	Feuilles	Marron	Marron	FiOLE 2 ++
Banane fruit A44267	Fruit	Marron claire	Marron claire	FiOLE 59 +
Banane peau A44266	Peau	Marron claire	Marron claire	FiOLE 25 +
Cajou AL00472	Fruit	Marron claire	Marron très foncé	FiOLE 58 +++
Goyavier AL00471	Feuilles	Marron foncé	Marron très foncé	FiOLE 28 +++
Grenadier AL00474	Fruit	Rose	Marron très foncé	FiOLE 49 +++
Icaque AL00470	Feuilles	Jaune-orangé	Marron très foncé	FiOLE 5 +++
Ka manioc AL00195	Feuilles	Marron claire	Marron	FiOLE 14 ++
Leucaena AL00201	Feuilles	Marron claire	Marron	FiOLE 57 +
Manguier AL00469	Feuilles	Marron claire	Marron	FiOLE 26 ++
Manioc amer AL00197	Feuilles	Marron claire	Marron	FiOLE 1 ++
Pois d'angoles AL00205	feuilles	Marron	Marron très foncé	FiOLE 8 +++
Raisin AL00473	feuilles	Marron claire	Marron très foncé	FiOLE 33 +++

2) Analyse HPLC

Les analyses HPLC avant et après thiolyses font apparaître des différences. On prendra à titre d'exemple les échantillons de TC de Leucaena et de Manioc amer (figure 9).

Avant thiolysé, il est observé la présence de 30 pics pour le TC de Leucaena et de 27 pics pour le TC de manioc amer ; tandis qu'après thiolysé on observe 43 pics pour le TC de Leucaena et 33 pics pour le TC de manioc amer.

L'analyse des chromatogrammes HPLC des plantes est présentée en annexe 3. Les résultats obtenus pour les standards sont présentés dans le tableau 2.

Les valeurs des écarts à l'étalon interne dihydroquercétine (DHQ) sont calculées afin de permettre de comparer les pics entre eux. Les données ont été triées selon la valeur de l'écart à l'étalon puis par valeur d'absorbance max.

Les composés obtenus ont des absorbances max qui varient entre 220 et 530 nm. Les standards ont une absorbance max proche de 280 nm.

Les TC des plantes icaque et cajou contiennent un composé ayant les mêmes écarts à DHQ et absorbance max que la catéchine. Les TC de cajou, leucaena, manioc amer et icaque contiennent un composé potentiellement commun également et ayant les mêmes écarts à DHQ et zone d'absorbance max que l'épigallocatechine. Les TC de cajou, leucaena et pois d'angle contiennent un composé potentiellement commun également et ayant les mêmes écarts à DHQ et absorbance max que l'épicatéchine.

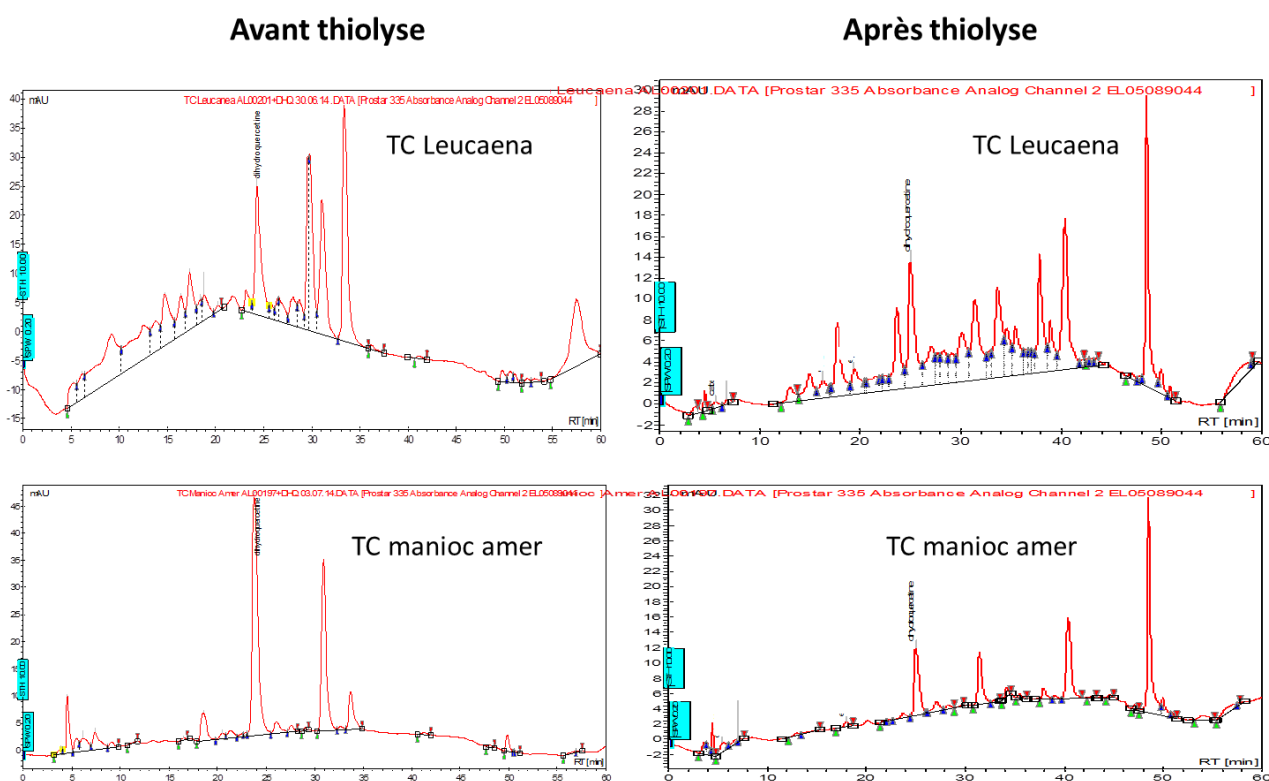


Figure 9. Chromatogrammes HPLC des TC de manioc amer et Leucaena avant et après thiolyse.

Tableau 2. Résultats de l'analyse des chromatogrammes HPLC des standards de proanthocyanidols, écart à l'étalon interne dihydroquercétine (DHQ).

Standard	Absorbance max (nm)	$\Delta Tr = Tr$ du pic - Tr DHQ
Catéchine	275	-12.45
Épigallocatechine	273	-7.28
Épicatéchine	276	-5.64

VI. Analyses et discussions

1) Screening

Pour le premier essai effectué nous avons pu observer que lors de l'ajout d'acide chlorhydrique dans les tubes d'infusés la plupart d'entre eux prenait une teinte rouge, révélant déjà la présence de proanthocyanidols. Après 5 minutes au bain-marie bouillant, on constate que les solutions sont trop foncées et sont difficiles à interpréter.

Il est décidé avec FELICITE Yoann de faire une dilution au 1/3, rendant ainsi les concentrations plus faibles et lisibles. On obtient ainsi une meilleure lecture de la présence des métabolites en l'occurrence une meilleure visibilité. La présence des proanthocyanidols est donc confirmée dans toutes les plantes à tester. Il est donc possible de poursuivre l'étude avec tous les échantillons choisis.

2) Caractérisation par la méthode de thiolyse

Pour caractériser les familles de TC, on a eu recours à la thiolyse et les produits de réaction ont été analysés par la technique de chromatographie liquide haute performance (HPLC) avec détecteur à barrette de diodes. Le but ultime est de déterminer les familles de TC contenues dans un TC purifié.

Dans un premier temps, on cherche les conditions expérimentales à partir de solutions dont nous connaissons la composition.

Par intégration des pics obtenus, le logiciel de traitement des données permet d'obtenir un chromatogramme. Celui-ci permet d'accéder **à deux informations utiles** :

- des **aires de pics** qui sont directement liées à la concentration de l'échantillon injecté.
- le **temps de rétention** du composé sur la colonne chromatographique. Chaque temps de rétention est spécifique d'un composé dans les conditions d'élution choisies. (détermination des composés présents avec l'étalon)

Le total des aires de pics est égal à 100%, ainsi avec Mr FELICITE et Mr PHILIBERT, nous avons décidé d'éliminer les pics de 0.010 à 0.150% qui sont directement liés à une dérive de la ligne de base du chromatogramme.

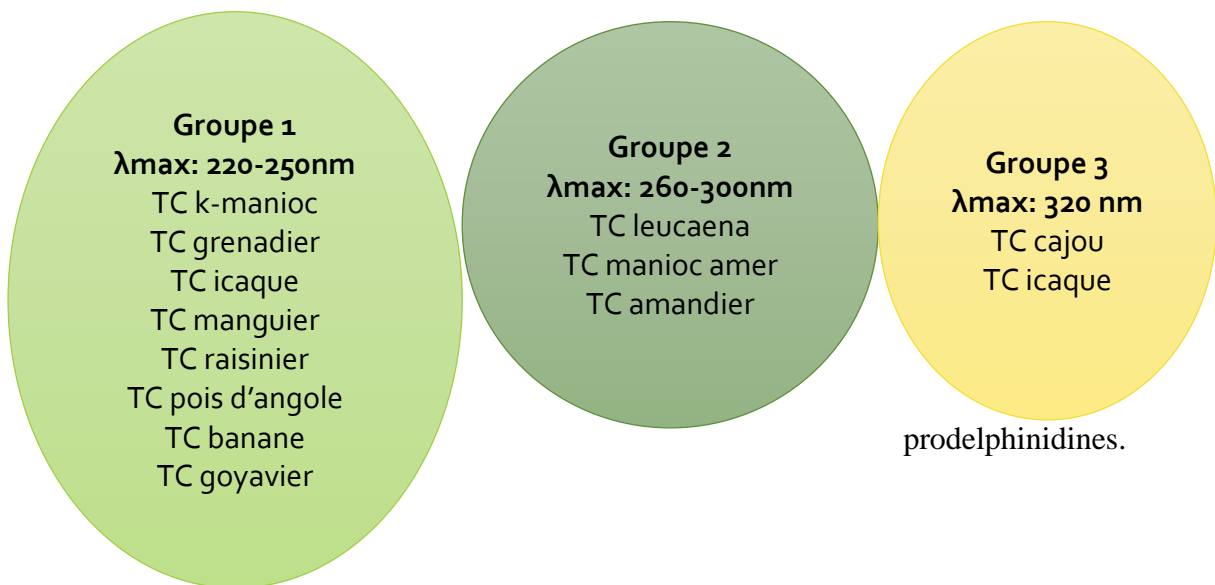
La réalisation d'injections de TC purifiés **montre que les conditions expérimentales sont très importantes.**

- **Les premières mesures donnent** des chromatogrammes, qui ne **répondent pas à l'attente prévue par la réalisation de la solution examinée.**
- **Recherche de solutions à apporter :**

- Pour étalonner, nous avons effectué des lavages afin de conditionner la colonne par la phase mobile de thiolyse entre chaque injection. **Cette méthode ne donne pas de résultats probants.**
- il est décidé de faire le conditionnement avec une autre méthode créée par Mr FELICITE à l'aide de méthanol entre chaque injection. **Ca marche**

Les résultats observés avant et après thiolyse, à savoir l'augmentation du nombre de pics après thiolyse, montrent bien qu'une hydrolyse a eu lieu et que donc l'expérimentation s'est bien déroulée.

La méthode peut maintenant être appliquée à la détermination de la composition d'un tannin (TC) de diverses plantes. Les TC des plantes icaque, leucaena, cajou et pois d'angole contiennent des procyanidines, tandis que ceux de cajou, leucaena, manioc amer et icaque contiendraient des



VII. Conclusion-perspectives :

La méthode de la thiolyse a permis dans un premier temps de classer les plantes en 3 groupes, selon les absorbances max des composés contenus dans les TC. Grâce à cette première étude, il a été montré que certaines contiendraient des prodelphinidines et/ou des procyanidines, qui ont une valeur antiparasitaire.

Afin de préciser le potentiel « santé animale » des plantes, l'étude doit être approfondie en déterminant le pourcentage de chaque monomère dans les tanins en tant qu'unité d'élongation et d'unité terminale, ainsi que le degré de polymérisation moyen, et en réalisant parallèlement des essais antiparasitaires.

Références bibliographiques

- Gea, A., Stringano, E., Brown, R. H., and Mueller-Harvey, I. 2011. In Situ Analysis and Structural Elucidation of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) Tannins for High-Throughput Germplasm Screening. *J. Agric. Food Chem.* 59, 495–503.
- Molan, A.L., Meagher, L.P., Spencer, P.A., Sivakumaran, S., 2003. Effect of flavan-3-ols on in vitro egg hatching, larval development and viability of infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis*. *International journal for parasitology* 33, 1691-1698.
- V.Paolini, Ph.Dorchies, H.Hosté., Organic Eprints [PDF en ligne], [consulté le 7 juillet 2014]. Disponible sur <http://www.orgprints.org>
- Hosté, Dr Hervé, INRA., Organic Eprints [en ligne] [Alternatives to chemical drugs in the control of gastrointestinal parasitism in small ruminants : role of condensed tannins.], 2005-2007, [consulté le 7 juillet 2014]. Disponible sur: <http://www.orgprints.org>
- Jimmy Wales, Wikipedia. [en ligne], 2001, [Métabolites secondaires, Tanin condensé, Anthelminthique], [consulté le 10 juillet 2014]. Disponible sur <http://www.fr.wikipedia.org>
- Ecovie, [en ligne] [Les principes actifs des plantes médicinales], [consulté le 18 juillet 2014]. Disponible sur <http://www.medecinesnaturelles.com>
- Biaye Mamadou, [Actions pharmacologiques des tanins], [PDF en ligne], 2002, [consulté le 19 juillet 2014]. Disponible sur <http://www.indexmedicus.afro.who.int>

GLOSSAIRE :

Tanin Condensé appelé aussi proanthocyanidols sont des métabolites secondaires des plantes. Ce sont des composés non hydrolysables, qui peuvent être dépolymérisés en Anthocianidol (pigment naturel).

Anthelminthique est un médicament antiparasitaire, il désigne en réalité plus souvent les antiparasitaires ciblant les nématodes, susceptible de parasiter les réseaux sanguin et lymphatique, ainsi que tous les parasites intestinaux de type vers.

Métabolites secondaires est une molécule qui, par exclusion, n'appartient pas au métabolisme primaire. Il est indispensable à la nutrition, il assure la croissance, le développement d'un organisme.

HPLC ou CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance)


ASE (Extracteur de Solvant Accéléré)

Anthocyanes sont des poisons apparentés au cyanure. Ex : Des anthocyanes, à dose modeste, dans une plante donnera des vertus antiseptiques à celle-ci.

Screening c'est une méthode permettant d'identifier des métabolites les uns par rapport aux autres à l'aide d'un réactif chimique

Flavonoïdes sont des pigments végétaux de couleur jaunes, oranges et bleus. Ils sont souvent liés à la fonction antispasmodique.

Annexe 1. Screening phytochimique, partie proanthocyanidols

 Centre Antilles-Guyane	Unité : Unité de Recherches Zootechniques	
	Service/équipe : Laboratoire d'analyses	
Nature du document : MODE OPERATOIRE		
SCREENING		
Rédigé par : PLACERDAT Jessica	Code : MO-PHYT-001	Nombre de pages : 10
Revu par : Philibert Lucien Marie-Magdeleine Carine	N° Version : 1	
Validé par : responsable AQ	Emis le : 07/11/11	
Destinataires : tt agent laboratoire	Modifiée le :	

1. Objet et domaine d'application

Cette procédure permet de mettre en évidence l'ensemble des métabolites présents dans les plantes.

La préparation du matériel végétal sera différente en fonction du métabolite recherché.

2. Documents de référence

- ❖ Bull.Soc.Pharm.Bordeaux, 2003, 142,61-78.Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *thymelaea lythroides*. N.DOHO, K.YAMNI, S.TAHROUCH, L.M. IDRISSE HASSANI, A. BADO, N. GMIRA.
- ❖ Etude de la phytochimie et de l'activité antipaludique de l'*Archornea Cordifolia* Schmach (Euphorbiaceae) Thèse, 2002, TOGOLA Adiaratou.
- ❖ Etude biosystématique et chimiotaxonomique de sept espèces du genre Combretum au Sénégal Thèse, 1996, DIBOR Dione.

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

Tout agent de laboratoire, stagiaire...

4. Hygiène et sécurité

L'utilisation de solvant implique une protection obligatoire.

Il est important de manipuler avec des gants et selon les produits d'utiliser des lunettes de protection. De plus il est préférable de préparer et d'utiliser les réactifs sous une hotte.

5. Principe de la méthode

L'ensemble des métabolites présents dans le matériel végétal est extrait de la plante (macération, infusion). La méthode du screening se base sur le fait que les métabolites mis en présence de réactif chimique déterminé subissent une réaction spécifique qui permet de les identifier les uns par rapport aux autres. A la fin d'un screening on est alors capable d'établir la liste des métabolites présents dans le matériel végétal.

6. Matériels nécessaires

- Pipettes, tube à essai, bécher
- Agitateur
- portoir
- Rotavapor
- Entonnoir, coton
- Balance, coupelle de pesée, spatule
- Bain-marie
- Tubes
- Plaques de CCM1
- Seringues
- Cuve
- Evaporateur rotatif
- Sonicateur
- Erlenmeyer

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

❖ 7.1 .Préparation du matériel végétal

• 7.1.1 Solution A

Infusé à 10% :20 g d'organes broyés sont placés dans un erlenmeyer contenant 200mL d'eau bouillante. Boucher l'erlenmeyer et laisser infuser 20 minutes. Filtrer.

❖ 7.2. Réactifs chimiques

- Acétate d'éthyle
- Méthanol
- Réactif de Dragendorff (tétraiodobismuthate de potassium)
- Ammoniaque concentré et dilué à 10%
- Anhydride acétique
- Chloroforme
- Acide sulfurique concentré
- Chlorure ferrique
- Soude 1/10 et 0.2N
- Chlorure ferrique à 3% et 1%
- Poudre de magnésium
- Vanilline
- Alcool chlorhydrique 0.2N
- Ether de pétrole
- Ether éthylique

8. Contrainte de la méthode

- Certaines réactions ne sont pas spécifiques. (ex : la fluorescence U.V pour les coumarines)
- Les recherches de métabolites utilisent peu de réactifs donc en tenir compte lors de la préparation afin d'éviter tout gaspillage.
- L'interprétation n'étant pas toujours aisée, il peut être intéressant d'utiliser les extraits comme élément de comparaison.

9. Contenu du mode opératoire

❖ 9.5 Recherche des proanthocyanidols. (BATE-SMITH et RIBEREAU-GAYON 1959)

Plante témoin : écorce de Quebracho, feuille de manguier

- Dans un tube mettre:
2ml de **solution A** + 2ml d'acide chlorhydrique.

Placer le bécher dans un bain-marie bouillant pendant 5minutes.

Interprétation : L'apparition d'une coloration rouge indique une réaction positive.

Lecture

A4


Le résultat des différentes recherches chimiques est qualitatif et il peut parfois être difficile d'interpréter les résultats. Quatre classes ont été retenues :

- : **Absence de métabolites**
- + : **Présence de métabolites en concentration faible**
- ++ : **Présence de métabolites en concentration moyenne**
- +++ : **Présence de métabolites en concentration forte**

Les résultats seront rendus sous forme de tableaux :

Matériel végétal			Coloration extrait	Groupe Chimique									
Plantes	Organe	Extrait		Phénol	Quinones		anthocyanes	Flavanes	Proanthocyanidols	Coumarines	Tannins	Saponines	Alcaloïdes

Annexe 2. Mode opératoire purification des tannins condensés

 Centre Antilles- Guyane	Unité : Unité de Recherches Zootechniques Service/équipe : Nature du document : MODE OPERATOIRE	
	Dosage de tanins condensés dans les aliments	
Rédigé par : Marine GREDOIRE	Code : MO-domaine-numéro	Nombre de pages : 5
Revu par : utilisateur	N° Version : 1	
Validé par : responsable AQ	Emis le : 05/09/13	
Destinataires : tt agent laboratoire	Modifiée le : 05/09/13	

1. Objet et domaine d'application

Dosage des tanins totaux dans les aliments pour animaux (fourrages, céréales, protéagineux...) en les compartimentant en 3 fractions : tanins libres (encore appelés extractibles ou solubles), tanins liés aux protéines, et tanins liés aux fibres.

2. Documents de référence

- Terill et al, Determination of extractable and bound condensed tannins concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains, J Sci Agric 1992 ; 58,321-329.
- Procédure ASE (cf. mode opératoire ASE URZ)

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

4. Hygiène et sécurité

Prendre les précautions habituelles pour la manipulation de solvants et d'acides : travail sous hotte, port de blouse, de gants, de masque.

Port de masque pour la pesée du SDS (Sodium Dodécyl Sulfate ou lauryl sulfate) et pour le dosage au spectrophomètre.

5. Principe de la méthode

Cette technique se découpe en deux étapes :

Rapport de stage

CONTARET Amandine BTS Chimiste

- l'extraction des tanins des trois compartiments
- le dosage colorimétrique des tanins par la méthode vanilline- H_2SO_4 .

A partir d'un même échantillon, on extrait successivement les tanins libres (solubles dans l'eau) avec un mélange acétone/eau, puis les tanins liés aux protéines avec un mélange SDS/ β -mercaptoéthanol (qui permet de casser les ponts disulfures) et enfin les tanins liés aux fibres, qui sont par déduction tous les tanins restés dans la plante suite aux deux premières extractions).

Après l'extraction, le dosage se fait par la méthode vanilline- H_2SO_4 .

Pour doser les tanins condensés, une gamme d'étalonnage est nécessaire. Etant donné qu'il n'existe pas de tanins purs universels, il est nécessaire d'extraire et de purifier les tanins condensés de chaque type d'aliment qui doit être étudié. L'extraction se fait dans un mélange Acétone/eau et la purification sur colonne de Séphadex.

6. Matériels nécessaires

Spectrophotomètre pour lecture à 500 nm.

Cuves spectrophotométriques

Agitateur magnétique

Vortex

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

Acétone

Acide chlorhydrique

Diéthyl éther

Eau distillée

Sodium Dodécyle Sulfate

2-Mercaptoéthanol

Tris(hydroxyméthyl)amine méthane communément appelé Tris

Méthanol

Lipophilic sephadex LH20

Réactifs de dosage par la méthode vanilline- H_2SO_4 (cf. mode opératoire de dosage des proanthocyanidines URZ)

8. Contraintes de la méthode

Concernant les réactifs du dosage par la méthode vanilline- H_2SO_4 , il est préférable d'utiliser des solutions préparées récemment. Il faudra donc ajuster la préparation à la quantité nécessaire au dosage du jour.

De plus, compte-tenu du risque de dégradation des tanins dans la solution A cétone-Eau, il est préférable de réaliser l'extraction des Tanins le jour du dosage.

9. Contenu du mode opératoire

Extraction et purification pour la préparation de la gamme

Préparation des solutions

Solution 1 : 700 mL d'acétone, 1g d'acide ascorbique, qsp 1L d'eau distillée

Solution 2 : 500 mL Méthanol, qsp 1L d'eau distillée

Solution 3 : 700 mL d'acétone, qsp 1L d'eau distillée

Extraction des tanins en vue de la purification

Peser 25 g de l'aliment que l'on souhaite analyser dans un bêcher. Ajouter 5 g de terre de diatomée. Homogénéiser le tout.

Introduire l'aliment dans une cellule de 100 mL convenablement montée. Programmer la méthode et la séquence d'extraction. Démarrer le programme d'extraction (cf. mode opératoire procédure ASE).

Récupérer le filtrat.

Transvaser le filtrat (environ 150 mL à 250 mL) dans une ampoule à décanter de 1L.

Ajouter entre 75 et 200 mL d'éther diéthylique.

Agiter vigoureusement.

Après séparation des phases, éliminer la phase supérieure (contenant les lipides et les pigments).

La phase inférieure est marron avec parfois une partie opaque, épaisse. Attention, ce ne sont pas des lipides, il ne faut donc pas éliminer cette partie opaque.

Laver encore deux fois la phase aqueuse (inférieure) à l'aide X mL d'éther diéthylique.

Récupérer la phase inférieure dans un ballon poire de 1L et éliminer les traces de solvant à l'évaporateur rotatif (en chauffant légèrement 40°C maximum). Une fois la totalité du solvant évaporée, on obtient un extrait aqueux de tanins. Récupérer ce résidu et le fractionner dans des pots en plastiques de 100 mL. Congeler à -24°C en attendant la lyophilisation.

Lyophiliser.

Prendre chaque lyophilisat avec quelques mL de solution 2 puis les regrouper.

Purification

Préparation de la colonne de séphadex : 2 g de séphadex + 8 mL de solution 2. On mélange avec une spatule. Si le mélange est trop pâteux, rajouter quelques mL de solution 2.

Couler le mélange sur un creuset filtrant muni d'une fiole à vide reliée à une trompe à eau.

Faire passer la solution 2 sur le creuset sans assécher le gel de séphadex. Vérifier que le gel se tasse convenablement.

Rincer le gel avec environ 20 mL de solution 2.

Faire passer l'échantillon de la même manière que la solution et rincer avec 20 à 30 mL de solution 2. Les tanins restent ainsi accrochés à la colonne.

Eluer les tanins avec 24 mL de solution 3 (acétone/eau) dans un premier temps.

Rajouter encore quelques mL de solvant si on observe toujours la présence de composés colorés dans le gel de séphadex. Eluer de nouveau.


Collecter l'ensemble des tanins en une fraction, rassembler ces fractions dans un ballon de 500 mL et évaporer à l'évaporateur rotatif pour éliminer l'acétone.

Récupérer la fraction eau/tanins et la fractionner dans des pots de 100 mL. Congeler à -24°C en attendant la lyophilisation.

Lyophiliser.

Gratter les pots en plastique pour récupérer le lyophilisat sec qui contient nos tanins purifiés qui serviront à la préparation de la gamme.

Annexe 3. Mode opératoire de la thiolysse

 Centre Antilles-Guyane	Unité : Unité de Recherches Zootechniques	
	Service/équipe :	
Nature du document : MODE OPERATOIRE		
Thiolysse de tanins condensés		
Rédigé par : responsable technique	Code : MO-domaine-numéro	Nombre de pages : 3
Revu par : utilisateur	N° Version : 1	
Validé par : responsable AQ	Emis le : 14/02/04	
Destinataires : tt agent laboratoire	Modifiée le : 21/03/04	

1. Objet et domaine d'application

2. Documents de référence

« In situ Analysis and Structural Elucidation of Sainfoin (*onobrychis viciifolia*) Tannins for High-Troughput Germplasm Screening “, J.Agric. Food Chem. **2011**, 59, 495-503.

3. Liste de diffusion et si nécessaire niveau de confidentialité

4. Hygiène et sécurité

Précautions à prendre

5. Principe de la méthode

Le dosage et la caractérisation des familles de tanins des aliments sont réalisés par thiolysse.

Cette méthode de dosage a été développée pour l'analyse de tanins d'aliments contenant de la chlorophylle. La technique a donné des résultats appropriés pour la caractérisation de mélanges complexes contenant de la catéchine, de l'épicatéchine, de

l'épigallocatechine et des unités flavan-3-ols. Le temps de réaction a été standardisé à 60 min afin d'éviter la perte d'informations structurales dues aux réactions d'épimérisation et de dégradation des unités terminales flavan-3-ol.

6. Matériels nécessaires

7. Réactifs (chimiques et biologiques)

Acétone

Acide chlorhydrique à 36.7 % (w)

Dichlorométhane

Méthanol

(±)Dihydroquercétine (étalon pour HPLC)

Ampelopsine

Benzyl mercaptan

(+) catéchine

(-) epicatechine

(-) gallocatechine

(-) épigallocatechine

Procyanidine B2

Sephadex LH-20

Eau distillée

Solutions :

A - Méthanol acidifié à 3.3%: 3.3 mL de HCl à 37% dans 100 mL de méthanol

B- Benzyl mercaptan dans du méthanol : 5 mL de benzyl mercaptan

95 L de méthanol

8. Contraintes de la méthode

Contraintes de timing, etc

9. Contenu du mode opératoire

1. Préparation des tanins extractibles et des tanins non extractibles pour la thiolysé.

5 g d'aliment sont extraits une fois avec 80 mL d'acétone /eau (7 :3, v/v) contenant 80 mg d'acide ascorbique pendant 1h. La chlorophylle est enlevée de la solution acétone/eau par extraction au dichlorométhane. Puis l'acétone est évaporée à l'évaporateur rotatif et la phase aqueuse est congelée à -24°C puis lyophilisée. Les extraits aqueux sont traités au benzyl mercaptan comme décrit ci-après (voir thiolyse de tanins extractibles et non extractibles de tanins in situ).

2. Thiolyse des tanins extractibles

Les tanins extraits sont dissous dans du méthanol (4mg/mL), passés aux ultra-sons pendant 3 mn et filtrés sur un filtre Cameo en Teflon de $0.45\mu\text{m}$. La solution obtenue ($50\mu\text{L}$) est transférée dans un Vial de 0.8 mL. Puis $50\mu\text{L}$ de méthanol acidifié à l'acide chlorhydrique à 3.3% sont ajoutés suivi de $100\mu\text{L}$ de benzyl mercaptan dans du méthanol. Le Vial est fermé et incubé à 40°C pendant 30 mn. La réaction est stoppée en plaçant le Vial dans un bain de glace. Puis, $250\mu\text{L}$ d'eau sont ajoutés suivi $50\mu\text{L}$ d'étalon interne : dihydroquercétine en solution méthanolique ($50\mu\text{L}$; 0.047 mg/mL). Les échantillons sont stockés à -25°C jusqu'à l'analyse HPLC dans les 24h.

3. Analyse HPLC des produits de réaction de thiolyse

Des solutions d'étalon externe dans le méthanol sont préparées comme suit :

- Catéchine (C=0.05 mg/mL)
- Epicatéchine (C=0.10 mg/mL)
- Epigallocatechine (C=0.22 mg/mL)
- dihydroquercétine (C=0.047 mg/mL)

Puis des volumes identiques de chaque solution sont prélevés et combinés. On obtient alors la solution standard 1.

Deux autres solutions d'étalon externe sont préparées comme suit :

- Gallocatechine (C= 0.01 mg/mL)
- Dihydroquercétine (C= 0.047 mg/mL)

Ces deux solutions sont mélangées dans un ratio de 9 : 1. On obtient alors la deuxième solution standard.

Des échantillons de $20\mu\text{L}$ sont injectés en HPLC via la boucle HPLC.

Annexe 3. Résultats obtenus par analyse HPLC des Tannins condensés (TC) thiolysés. Écart à l'étalon interne dihydroquercétine (DHQ).

TC	Absorbance max	$\Delta Tr = Tr \text{ du pic} - Tr \text{ DHQ}$
Grenadier AL00474	222	-24,2
Grenadier AL00474	222	-24,1
Grenadier AL00474	222	-24,0
Amandier AL00477	272	-23,7
Icaque AL00470	281	-23,0
Icaque AL00470	281	-22,9
Pois d'angole AL00205	271	-22,3
Leucaena AL00201	271	-21,5
Manioc Amer AL00197	279	-21,3
Cajou AL00472	271	-21,3
Amandier AL00477	256	-21,1
Manioc Amer AL00197	279	-21,1
Pois d'angole AL00205	270	-21,1
Cajou AL00472	271	-21,1
Icaque AL00470	281	-21,0
K-manioc AL00193	223	-21,0
Manguier AL00469	227	-21,0
Grenadier AL00474	222	-21,0
Goyavier AL00471	250	-20,8
Banane fruit entier A44267	254	-20,6
Amandier AL00477	224	-20,6
Manioc Amer AL00197	400	-20,6
Pois d'angole AL00205	525	-20,5
Grenadier AL00474	222	-20,5
Leucaena AL00201	399	-20,5
K-manioc AL00193	223	-20,5
Cajou AL00472	418	-20,5
Icaque AL00470	223	-20,5
Manguier AL00469	223	-20,5
Raisin AL00473	223	-20,5
Banane peau A44266	223	-20,4
Goyavier AL00471	224	-20,3
Banane fruit entier A44267	398	-20,2
Banane peau A44266	223	-20,0
Raisin AL00473	223	-19,9
Grenadier AL00474	222	-19,5
Manioc Amer AL00197	279	-19,5
Cajou AL00472	274	-19,5
Icaque AL00470	281	-19,5



Leucaena AL00201	271	-19,5
Goyavier AL00471	253	-19,2
Banane fruit entier A44267	281	-19,2
Banane peau A44266	286	-19,0
Manioc Amer AL00197	279	-18,9
Goyavier AL00471	252	-18,8
Amandier AL00477	261	-18,8
Icaque AL00470	252	-18,8
Banane fruit entier A44267	253	-18,7
Goyavier AL00471	244	-18,3
Leucaena AL00201	271	-18,3
Cajou AL00472	272	-18,2
Icaque AL00470	249	-18,1
Manioc Amer AL00197	278	-18,0
Grenadier AL00474	222	-17,8
Manguier AL00469	224	-17,3
Cajou AL00472	271	-17,3
Amandier AL00477	250	-16,6
Goyavier AL00471	268	-16,6
Cajou AL00472	273	-16,3
Amandier AL00477	258	-16,2
Manguier AL00469	223	-15,1
Banane peau A44266	223	-14,0
Manguier AL00469	223	-13,3
Pois d'angole AL00205	272	-13,3
Raisin AL00473	223	-12,7
Goyavier AL00471	276	-12,7
Grenadier AL00474	222	-12,6
K-manioc AL00193	223	-12,6
Catéchine	275	-12,5
Icaque AL00470	278	-12,3
Cajou AL00472	276	-12,2
Manguier AL00469	223	-12,2
Manioc Amer AL00197	279	-12,1
Pois d'angole AL00205	274	-12,1
Leucaena AL00201	274	-12,0
Manioc Amer AL00197	279	-11,6
Icaque AL00470	279	-11,5
Manguier AL00469	223	-10,5
Pois d'angole AL00205	272	-10,4
Cajou AL00472	274	-10,2
Leucaena AL00201	275	-10,0
Leucaena AL00201	318	-8,8
Leucaena AL00201	275	-8,0
K-manioc AL00193	223	-7,7
Grenadier AL00474	222	-7,7
Manguier AL00469	225	-7,5
Icaque AL00470	279	-7,4
Cajou AL00472	274	-7,4
Épigallocatechine	273	-7,3
Leucaena AL00201	274	-7,3



Manioc Amer AL00197	279	-7,0
Amandier AL00477	262	-6,2
Pois d'angole AL00205	272	-6,2
Manguier AL00469	232	-5,7
Épicatéchine	276	-5,6
Cajou AL00472	275	-5,6
Leucaena AL00201	276	-5,6
Amandier AL00477	263	-5,6
Pois d'angole AL00205	274	-5,5
Amandier AL00477	264	-5,0
Leucaena AL00201	274	-4,6
Pois d'angole AL00205	270	-3,9
Leucaena AL00201	274	-3,5
Manguier AL00469	238	-3,3
Manioc Amer AL00197	279	-3,1
Leucaena AL00201	274	-3,0
Manioc Amer AL00197	280	-2,6
Leucaena AL00201	274	-2,6
Manguier AL00469	254	-1,7
Banane fruit entier A44267	280	-1,4
Cajou AL00472	275	-1,4
Leucaena AL00201	275	-1,4
K-manioc AL00193	278	-1,4
Raisin AL00473	275	-1,3
Manioc Amer AL00197	279	-1,3
Goyavier AL00471	275	-1,3
Pois d'angole AL00205	270	-1,2
Grenadier AL00474	224	-0,8
Grenadier AL00474	224	0,0
Goyavier AL00471	266	0,0
Manioc Amer AL00197	284	0,0
Icaque AL00470	285	0,0
Leucaena AL00201	285	0,0
Amandier AL00477	286	0,0
Banane fruit entier A44267	286	0,0
Banane peau A44266	286	0,0
Cajou AL00472	286	0,0
K-manioc AL00193	286	0,0
Pois d'angole AL00205	286	0,0
Raisin AL00473	287	0,0
Dihydroquercétine	287	0,0
Manguier AL00469	290	0,0
Pois d'angole AL00205	270	1,0
Manioc Amer AL00197	279	1,0
Leucaena AL00201	278	2,1
Manioc Amer AL00197	281	2,1
Pois d'angole AL00205	270	2,1
Manguier AL00469	271	2,1
Cajou AL00472	277	2,1
Icaque AL00470	280	2,1
Amandier AL00477	273	2,2



Raisin AL00473	280	2,2
K-manioc AL00193	281	2,2
Goyavier AL00471	280	2,2
Grenadier AL00474	247	2,2
Cajou AL00472	276	2,5
Leucaena AL00201	277	2,7
Goyavier AL00471	275	2,8
Goyavier AL00471	273	3,2
Amandier AL00477	268	3,2
Manioc Amer AL00197	279	3,3
K-manioc AL00193	250	3,3
Leucaena AL00201	272	3,3
Raisin AL00473	268	3,4
Cajou AL00472	275	3,6
Goyavier AL00471	274	3,8
Pois d'angole AL00205	270	4,0
Leucaena AL00201	274	4,1
Goyavier AL00471	273	4,2
Manioc Amer AL00197	279	4,5
Amandier AL00477	267	4,6
Raisin AL00473	268	4,6
Goyavier AL00471	275	4,6
Pois d'angole AL00205	270	4,8
Cajou AL00472	275	4,8
Leucaena AL00201	263	5,2
Amandier AL00477	267	5,2
Pois d'angole AL00205	269	5,4
Icaque AL00470	251	5,5
Grenadier AL00474	248	5,5
Icaque AL00470	246	5,7
Leucaena AL00201	257	6,4
Manioc Amer AL00197	253	6,4
Goyavier AL00471	256	6,5
Cajou AL00472	271	6,5
K-manioc AL00193	254	6,5
Amandier AL00477	265	6,5
Raisin AL00473	265	6,9
Manguier AL00469	305	7,2
Icaque AL00470	250	7,2
Icaque AL00470	250	7,3
Goyavier AL00471	270	7,7
Icaque AL00470	250	7,7
Pois d'angole AL00205	269	7,8
Leucaena AL00201	275	7,9
Manioc Amer AL00197	279	7,9
Cajou AL00472	274	8,0
Pois d'angole AL00205	269	8,1
Goyavier AL00471	272	8,3
Raisin AL00473	273	8,5
Leucaena AL00201	257	8,7
Icaque AL00470	240	8,8



Pois d'angole AL00205	261	8,9
Cajou AL00472	269	9,0
Amandier AL00477	264	9,1
Manioc Amer AL00197	279	9,2
Goyavier AL00471	250	9,3
K-manioc AL00193	245	9,3
Grenadier AL00474	249	9,3
Manguier AL00469	266	9,4
Banane fruit entier A44267	280	9,5
Banane peau A44266	277	9,6
Pois d'angole AL00205	270	9,6
Cajou AL00472	273	9,6
Leucaena AL00201	274	9,6
Grenadier AL00474	249	9,7
K-manioc AL00193	248	9,8
Goyavier AL00471	272	9,9
Icaque AL00470	250	10,4
Manguier AL00469	266	10,4
Leucaena AL00201	275	10,4
Cajou AL00472	274	10,5
Manioc Amer AL00197	279	10,5
Grenadier AL00474	249	10,6
K-manioc AL00193	276	10,7
Amandier AL00477	267	10,7
Goyavier AL00471	274	10,7
Raisin AL00473	273	10,9
Amandier AL00477	268	11,2
Leucaena AL00201	275	11,5
Goyavier AL00471	274	11,6
Raisin AL00473	274	11,7
Leucaena AL00201	276	11,9
Leucaena AL00201	276	12,1
Icaque AL00470	252	12,2
Cajou AL00472	275	12,2
Manguier AL00469	267	12,4
Grenadier AL00474	280	12,5
Amandier AL00477	269	12,8
Leucaena AL00201	275	12,9
Pois d'angole AL00205	275	12,9
Raisin AL00473	276	12,9
Icaque AL00470	278	12,9
Cajou AL00472	276	12,9
Manioc Amer AL00197	279	12,9
Grenadier AL00474	280	13,1
Manguier AL00469	267	13,1
K-manioc AL00193	245	13,1
Goyavier AL00471	243	13,2
Banane fruit entier A44267	280	13,4
Banane peau A44266	277	13,4
Raisin AL00473	276	13,5
Leucaena AL00201	275	13,9



Amandier AL00477	267	13,9
Icaque AL00470	279	13,9
Pois d'angole AL00205	271	13,9
Cajou AL00472	276	14,0
Manioc Amer AL00197	279	14,0
Grenadier AL00474	280	14,2
Manguier AL00469	272	14,2
K-manioc AL00193	278	14,2
Goyavier AL00471	276	14,3
Raisin AL00473	276	14,6
Amandier AL00477	230	15,3
Icaque AL00470	230	15,4
Leucaena AL00201	232	15,4
Pois d'angole AL00205	232	15,4
Manioc Amer AL00197	231	15,4
Cajou AL00472	232	15,5
Grenadier AL00474	231	15,6
Manguier AL00469	231	15,6
K-manioc AL00193	231	15,6
Goyavier AL00471	232	15,8
Banane fruit entier A44267	232	15,9
Banane peau A44266	231	15,9
Raisin AL00473	228	16,0
Cajou AL00472	260	16,2
Raisin AL00473	263	16,9
Leucaena AL00201	275	17,2
Leucaena AL00201	275	17,7
Cajou AL00472	273	17,8
Manioc Amer AL00197	279	17,8
Leucaena AL00201	275	18,1
Icaque AL00470	251	18,2
Banane peau A44266	277	18,3
Cajou AL00472	274	18,4
Leucaena AL00201	275	18,5
Pois d'angole AL00205	262	18,6
Icaque AL00470	251	18,6
Cajou AL00472	272	18,7
Cajou AL00472	273	19,1
Banane fruit entier A44267	280	19,4
Grenadier AL00474	280	19,5
Goyavier AL00471	259	19,5
Amandier AL00477	263	19,6
Manioc Amer AL00197	279	19,6
Pois d'angole AL00205	266	19,6
Icaque AL00470	253	19,6
Manguier AL00469	264	19,8
Grenadier AL00474	280	19,9
Banane peau A44266	275	20,1
Banane fruit entier A44267	279	20,1
Amandier AL00477	262	22,0
Leucaena AL00201	276	22,1



Pois d'angole AL00205	264	22,1
Icaque AL00470	253	22,1
Manioc Amer AL00197	279	22,1
Cajou AL00472	274	22,1
Manguier AL00469	263	22,3
Grenadier AL00474	251	22,4
K-manioc AL00193	253	22,4
Goyavier AL00471	258	22,5
Banane fruit entier A44267	279	22,6
Amandier AL00477	261	22,6
Banane peau A44266	256	22,7
Pois d'angole AL00205	262	22,8
Raisin AL00473	263	22,8
Cajou AL00472	275	22,9
Icaque AL00470	280	22,9
Icaque AL00470	280	22,9
Manguier AL00469	263	23,0
Leucaena AL00201	277	23,0
Grenadier AL00474	280	23,1
K-manioc AL00193	253	23,3
Banane peau A44266	256	23,3
Banane fruit entier A44267	280	23,4
Amandier AL00477	264	23,4
Raisin AL00473	262	23,5
Pois d'angole AL00205	265	23,5
Leucaena AL00201	266	23,5
Manioc Amer AL00197	272	23,5
Cajou AL00472	266	23,6
Icaque AL00470	266	23,6
Manguier AL00469	264	23,7
Grenadier AL00474	270	23,7
K-manioc AL00193	263	23,9
Banane fruit entier A44267	267	24,0
Goyavier AL00471	264	24,0
Banane peau A44266	265	24,1
Raisin AL00473	264	24,3
Amandier AL00477	328	24,8
K-manioc AL00193	253	24,9
Pois d'angole AL00205	261	24,9
Leucaena AL00201	322	24,9
Manioc Amer AL00197	280	25,0
Cajou AL00472	322	25,0
Icaque AL00470	322	25,0
Manguier AL00469	262	25,1
Grenadier AL00474	281	25,2
K-manioc AL00193	253	25,3
Banane fruit entier A44267	322	25,4
Goyavier AL00471	257	25,4
Banane peau A44266	324	25,5
Raisin AL00473	261	25,7
Amandier AL00477	259	25,7



Pois d'angole AL00205	258	25,8
Leucaena AL00201	256	25,9
Manioc Amer AL00197	279	25,9
Cajou AL00472	258	25,9
Icaque AL00470	253	25,9
Manguier AL00469	260	26,1
Grenadier AL00474	251	26,1
Banane fruit entier A44267	253	26,3
Goyavier AL00471	255	26,4
K-manioc AL00193	252	26,4
Banane peau A44266	254	26,5
Goyavier AL00471	404	27,1
K-manioc AL00193	405	27,6
Banane fruit entier A44267	281	28,2
Banane fruit entier A44267	281	28,3
Manioc Amer AL00197	279	29,1
K-manioc AL00193	238	29,2
Grenadier AL00474	280	30,1
Grenadier AL00474	280	30,1
Manioc Amer AL00197	279	31,5
Grenadier AL00474	282	32,2
Icaque AL00470	282	32,3
Manioc Amer AL00197	279	32,5
Leucaena AL00201	314	32,8
Manguier AL00469	265	32,9
Pois d'angole AL00205	303	32,9
Cajou AL00472	307	32,9
Banane fruit entier A44267	281	33,1
Grenadier AL00474	282	33,1
Goyavier AL00471	266	33,2
Icaque AL00470	282	33,2
Banane peau A44266	317	33,3
Grenadier AL00474	282	33,4
Manguier AL00469	301	33,5
Leucaena AL00201	281	33,8
Pois d'angole AL00205	303	33,9
Cajou AL00472	307	34,1
Amandier AL00477	381	34,1
Banane peau A44266	316	34,3
Banane peau A44266	314	34,5
Pois d'angole AL00205	303	34,5
Banane peau A44266	316	34,6
Banane peau A44266	315	35,0