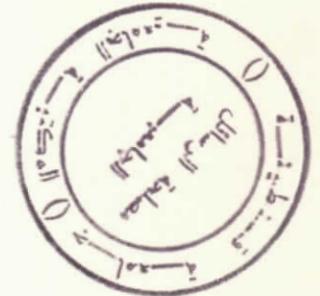


THESE

NER
2866

présentée devant l'Université de CONSTANTINE
pour l'obtention du diplôme de DOCTORAT D'ÉTAT
OPTION BIOCHIMIE APPLIQUÉE

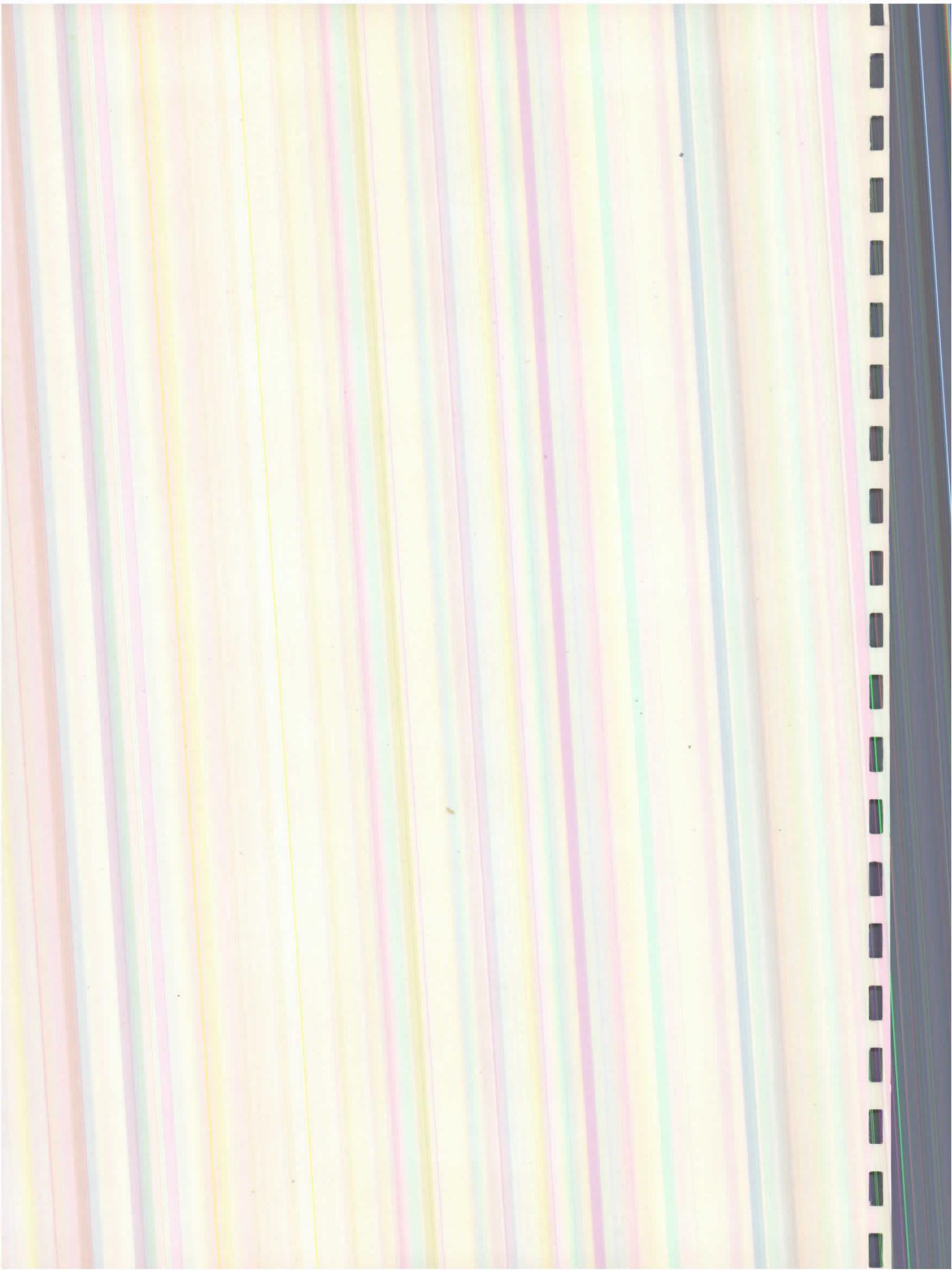


MERGHEM Rachid

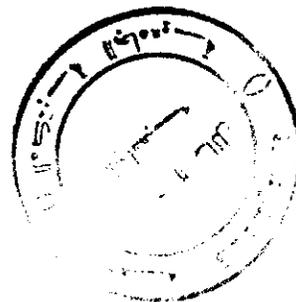
**LES FACTEURS ANTINUTRITIONNELS (F.A.N) PHÉNOLIQUES
DE *Pisum sativum* L. ET DE *Vicia faba* L. (*Leguminosae*) :
ASPECTS STRUCTURAUX, GÉNÉTIQUES ET PHÉNOTYPIQUES**

soutenu le 15 Janvier 1996

JURY :	M. BENSARI	Président
	M. JAY	Rapporteur
	M. AZOUT	Examineur
	M. DUC	Examineur
	M. GUEZLANE	Examineur
	M.KHELIFI	Examineur



THESE



présentée devant l'Université de CONSTANTINE
pour l'obtention du diplôme de DOCTORAT D'ÉTAT
OPTION BIOCHIMIE APPLIQUÉE

MERGHEM Rachid

**LES FACTEURS ANTINUTRITIONNELS (F.A.N) PHÉNOLIQUES
DE *Pisum sativum* L. ET DE *Vicia faba* L. (*Leguminosae*) :
ASPECTS STRUCTURAUX, GÉNÉTIQUES ET PHÉNOTYPIQUES**

soutenue le 15 Janvier 1996

JURY :	M. BENSARI	Président
	M. JAY	Rapporteur
	M. AZOUT	Examinateur
	M. DUC	Examinateur
	M. GUEZLANE	Examinateur
	M.KHELIFI	Examinateur



THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de DOCTEUR EN PHARMACIE
par M. J. G. ...

Présentée par M. J. G. ...

LES EFFETS PHARMACOLOGIQUES ET PHÉNOMÈNES
LIÉS À L'ACTIVITÉ DE LA PHÉNOLASE
DANS LE SÉRUM DE LA RATTE

Présentée par M. J. G. ...

Président
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur

M. J. G. ...
M. J. G. ...
M. J. G. ...
M. J. G. ...
M. J. G. ...

Imprimé par ...
1968

Je remercie vivement Monsieur le Professeur M. JAY, qui m'a reçu avec beaucoup de confiance dans l'équipe de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie dont il assure la direction ; Il m'a fait largement bénéficier de son savoir et de ses conseils éclairés, tout en me laissant une grande liberté dans mon travail ; qu'il soit assuré de ma sincérité lorsque je lui adresse ma sympathie et ma reconnaissance.

Je remercie également Monsieur le Professeur M. BENSARI, Recteur de l'Université de CONSTANTINE, pour sa confiance et pour avoir répondu favorablement à notre appel. Il nous fait l'honneur de présider ce Jury de Thèse.

J'adresse également tous mes remerciements à Monsieur G. DUC, Directeur de Recherches de la station de génétique et d'amélioration des plantes INRA Dijon pour sa collaboration et ses précieux conseils ; Je le remercie d'avoir accepté d'être membre du Jury.

Monsieur le Professeur B. AZOUT de l'Institut National Agronomique d'ALGER a accepté d'évaluer ce travail et de participer au jury, je lui adresse mes plus sincères remerciements

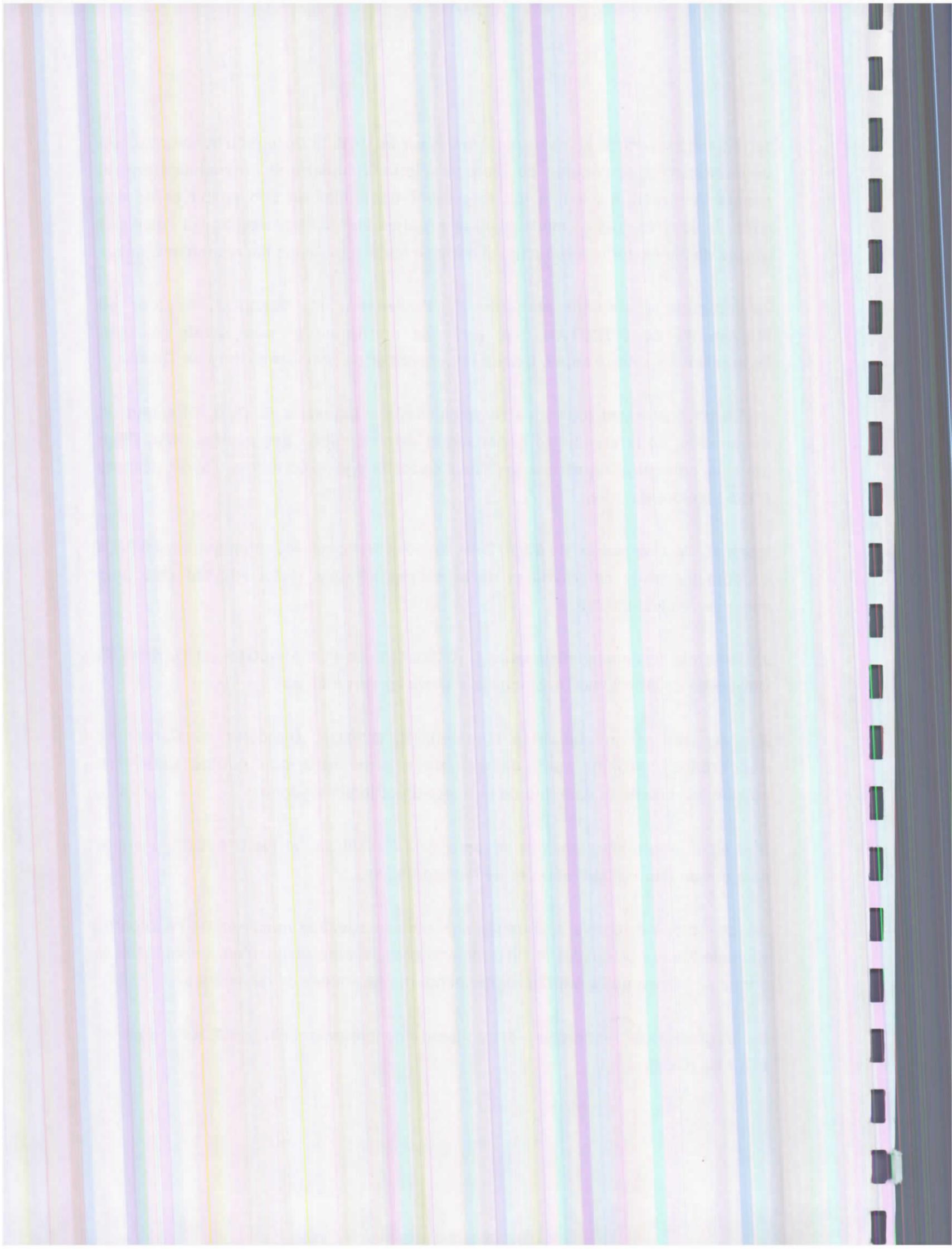
Je remercie également Messieurs L. GOZLANE de l'I.N.A ALGER, et D. KHELIFI Université de CONSTANTINE pour leur participation à ce jury.

Je suis très reconnaissant à Monsieur R. BISTON, Directeur du Centre de Recherches Agronomiques de Gembloux ainsi qu'à son équipe pour leur collaboration dans le domaine de la Spectrométrie Infrarouge.

J'adresse mes remerciements amicaux à M.R. VIRICEL et Flo. PAJONK ; Je leur sais gré de leur collaboration et de leur gentillesse.

Je remercie, à titre divers, tous les anciens et nouveaux membres de l'équipe de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie pour l'amitié qu'ils m'ont témoigné et la bonne ambiance qu'ils ont fait régner pendant ces années de recherches...

Ce programme de recherche a été soutenu financièrement par le P.E.A Programme ECLAIR (CEE).



**LES FACTEURS ANTINUTRITIONNELS (F.A.N) PHENOLIQUES
DE *Pisum sativum* L. ET DE *Vicia faba* L. (*Leguminosae*) :
ASPECTS STRUCTURAUX, GENETIQUES ET PHENOTYPIQUES.**

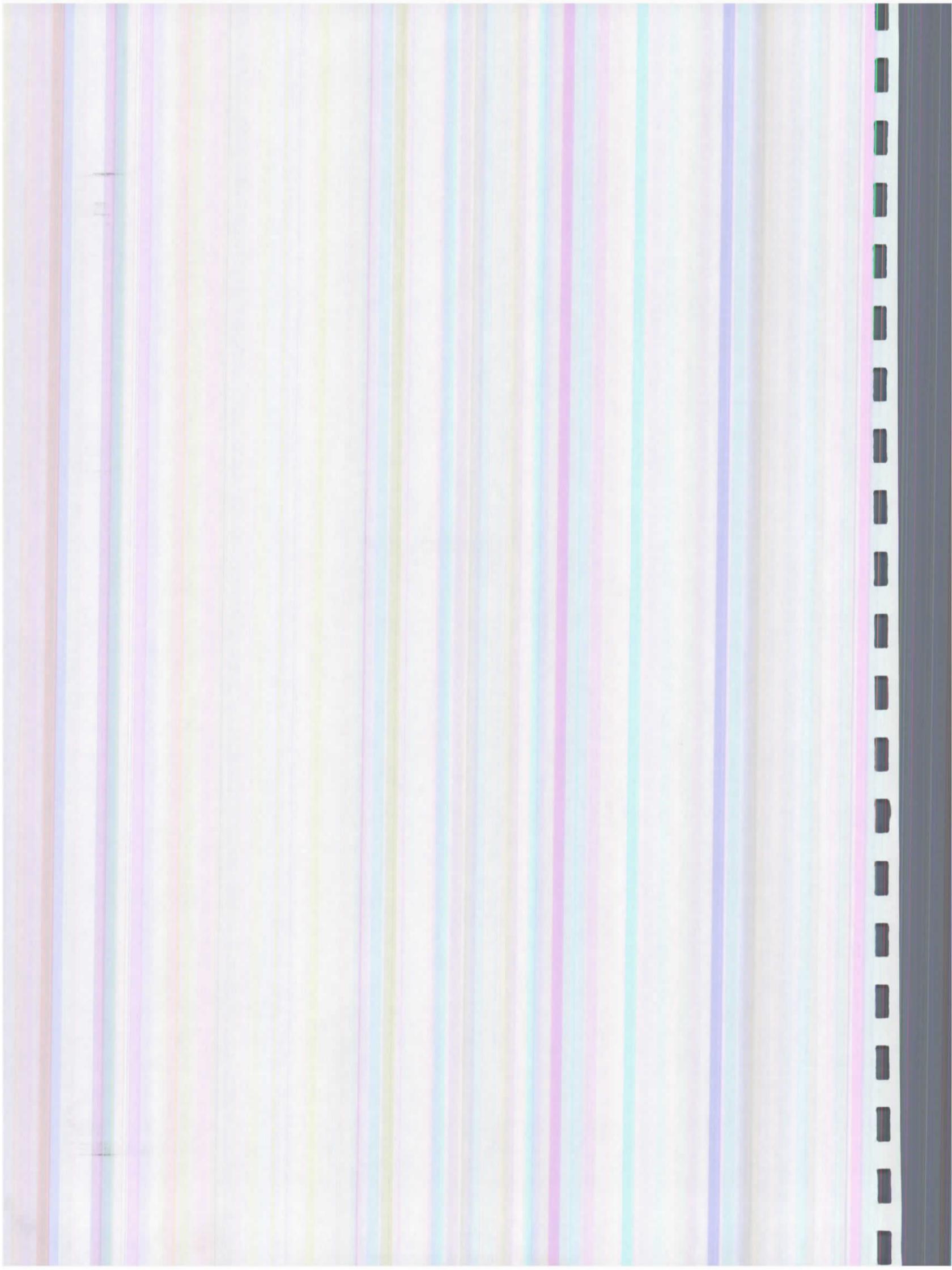
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : DONNEES GENERALES ET BIBLIOGRAPHIQUES	6
A. LES LEGUMINEUSES A GRAINES	6
1. La botanique	6
2. Les facteurs nutritionnels	10
3. Les facteurs antinutritionnels	11
B. LES TANNINS	14
1. Définition	14
2. Structures des proanthocyanidines naturelles	14
3. Effets antinutritionnels des tannins	22
CHAPITRE 2 : METHODES GENERALES D'ETUDE DES POLYPHENOLS DES GRAINES DE LEGUMINEUSES	29
A. METHODES D'EXTRACTION	29
1. Matériel végétal	29
2. Préparation des échantillons	31
3. Extraction proprement dite	32
B. METHODES CHIMIQUES DE DOSAGE	32
1. Dosages spectrophotométriques	32
2. Dosages biologiques	37
3. Relation entre les méthodes utilisées	39
4. Effet des conditions de stockage sur les tannins condensés des téguments	45
C. METHODES PHYSIQUES DE DOSAGE	46
1. La méthode colorimétrique	46
2. La méthode de spectrométrie proche infrarouge (SPIR)	49
3. Les conditions de mise en oeuvre de la validation	51

D. METHODES D'ANALYSES DES DONNEES	51
1. Analyse en Composantes Principales	52
2. Analyse de variance à 2 facteurs contrôlés	52
3. Analyse factorielle discriminante	52
CHAPITRE 3 : METHODES PARTICULIERES D'ANALYSE QUALITATIVE DES PROANTHOCYANIDINES DES TEGUMENTS DE <i>Vicia faba</i> L. et de <i>Pisum sativum</i> L.....	54
A. METHODES DE SEPARATION	54
1. Extraction des polymères phénoliques	54
2. Partition des polymères phénoliques entre solvants.....	54
3. Séparation des polyphénols sur tamis moléculaire	56
B. METHODES DE CONTROLE DU FRACTIONNEMENT	58
1. Méthodes globales	58
2. Méthodes de microdégradation.....	60
C. ISOLEMENT DES PROANTHOCYANIDINES OLIGOMERES	63
D. METHODES D'IDENTIFICATION DES PROANTHOCYANIDINES.....	64
1. Méthodes chimiques	64
2. Méthodes physiques : Spectrométrie de masse (ES-MS).....	64
CHAPITRE 4 : LES FACTEURS ANTINUTRITIONNELS (F.A.N) PHENOLIQUES CHEZ <i>Vicia faba</i> L. : DIVERSITE ET REGULATION	67
A. LE MATERIEL VEGETAL	67
B. RESULTATS DE L'ANALYSE QUANTITATIVE DU PATRON PHENOLIQUE DE LA FEVEROLE	71
1. Vérification de la stabilité des patrons phénoliques de <i>Vicia faba</i> L.	73
2. Relation entre le patron phénolique et couleur des téguments	78
3. Relation entre [fleur jaune-tégument beige], [fleur jaune- tégument rouge] et tannins :	81
4. Relation entre 2 facteurs antinutritionnels : tannins et vicine	83

5. Autres géotypes de féveroles étudiés pour le PEA programme	85
C. DETERMINISME GENETIQUE DE QUELQUES MOLECULES CARACTERISTIQUES DU PATRON PHENOLIQUE DES TEGUMENTS SEMINAUX DE LA FEVEROLE	86
1. Situation biogénétique du problème "tannins" par rapport aux autres flavonoïdes	87
2. Informations bibliographiques à propos du déterminisme génétique des principales classes chimiques citées.....	89
3. Choix du matériel d'étude.....	91
4. Approche expérimentale pour l'étude de l'héritabilité du patron phénolique de <i>Vicia faba</i> L.	94
5. Résultats et interprétation	94
CHAPITRE 5 : LES FACTEURS ANTINUTRITIONNELS (F.A.N) PHENOLIQUES CHEZ <i>Pisum sativum</i> L. DIVERSITE ET REGULATION	99
A. PRESENTATION DE LA COLLECTION DE POIS	99
1. Liste des géotypes	99
2. Protocole d'échantillonnage des graines de pois	99
3. Commentaires généraux sur la collection.....	100
B. RESULTATS et INTERPRETATIONS	105
1. Géotypes lisses et géotypes ridés	105
2. Géotypes à fleurs blanches et téguments non colorés	105
3. Géotypes à fleurs et téguments colorés	106
4. Reproductibilité et stabilité.....	107
5. Corrélation entre les divers descripteurs des FAN phénoliques.....	109
6. Colorimétrie , teneurs en phénols totaux et pouvoirs tannants	111
7. Signification des résultats	111
CHAPITRE 6 : CORRELATION ENTRE LES METHODES PHYSIQUES NON DESTRUCTIVES ET METHODES CHIMIQUES	119
1. Introduction.....	119

2. Présentation de la collection de Pois (récolte 1992).....	119
3. Détermination de la corrélation entre clarté et pouvoir tannant.....	121
4. Spectrométrie proche infra rouge.....	123
5. Conclusion	123
CHAPITRE 7 : ETUDE PARTICULIERE DES PRINCIPALES MOLECULES PHENOLIQUES DES TEGUMENTS DE LA FEVEROLE ET DU POIS.	126
A. EXPERTISE ANALYTIQUE DES PROANTHOCYANIDINES SUR LA BASE D'UN FRACTIONNEMENT PAR PARTITION ENTRE SOLVANTS.....	126
1. Bref rappel de la méthode de préfractionnement.....	126
2. Expertise quantitative de l'extrait global A et des fractions B, C, C' et D.....	128
3. Expertise des fractions B, C, D à l'aide de la CCM.....	130
4. Expertise à l'aide de la CLHP couplée aux techniques de microdégradation	134
5. Comparaison du contenu phénolique des fractions de la féverole et du pois	144
B. EXPERTISE ANALYTIQUE DES PROANTHOCYANIDINES SUR LA BASE D'UN FRACTIONNEMENT SUR TAMIS MOLECULAIRE.....	144
1. Fraction Méthyéthylcétone de <i>Vicia faba</i> L.....	146
2. Fraction méthyléthylcétone de <i>Pisum sativum</i> L.....	149
3. Conclusion	150
C. DETERMINATION DES STRUCTURES DES PROANTHOCYANIDINES.....	153
1. Les proanthocyanidines de <i>Vicia faba</i> L.....	153
2. Les proanthocyanidines de <i>Pisum sativum</i> L.....	159
3. Commentaire général et conclusion.....	166
CONCLUSIONS GENERALES	171
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	174
ANNEXES.....	185

INTRODUCTION



INTRODUCTION

Pour couvrir les besoins en protéines de l'alimentation tant humaine qu'animale, la Communauté Economique Européenne est lourdement dépendante des importations de matières premières riches en protéines. En 1990, la CEE a utilisé près de 20 millions de tonnes de soja dont la majorité est importée des USA.

Cette forte dépendance des importations d'aliments riches en protéines oblige la Communauté Economique Européenne à stimuler l'utilisation des productions locales de sources de protéines et à mettre en place un système d'aide à la production. Cela concerne essentiellement le pois (*Pisum sativum* L) et la féverole (*Vicia faba* L).

Durant la période de 1987 à 1991, l'utilisation annuelle du pois et de la féverole en alimentation animale atteint les 5,4 et 0,75 millions de tonnes respectivement (Eurostat 1991).

Lorsque des sources de protéines, comme le pois et la féverole, sont utilisées dans l'alimentation des monogastriques, les performances des animaux restent le plus souvent en deçà de celles obtenues avec les rations traditionnelles à base de larges proportions de soja (Eggum, 1980 ; Peterson et Schultz, 1980 ; Huisman, 1989).

La présence des facteurs antinutritionnels (FAN) dans les graines de Légumineuses est, en partie, responsable de ces effets. Ces composés sont définis comme étant des substances naturelles des tissus Végétaux et qui ont des effets négatifs sur les performances et la santé de l'homme et des animaux. Les facteurs antinutritionnels que l'on trouve dans les Légumineuses sont essentiellement des inhibiteurs de protéases digestives, des lectines, des inhibiteurs d'amylase, de la vicine, de la convicine, des phytates, des oligosaccharides et des tannins (Liener, 1989, Marquardt, 1989 ; Huisman et Jansman, 1991).

Parmi les facteurs antinutritionnels, les tannins méritent une attention toute particulière. Les tannins ou composés polyphénoliques constituent sans doute les métabolites secondaires les plus répandus ; chez les Légumineuses à graines, ce sont les téguments qui en sont généralement pourvus. Ces molécules se caractérisent par la propriété de s'associer et de se combiner avec les protéines, non seulement de la ration alimentaire mais aussi avec les protéines enzymatiques ou de structure du tractus digestif; ceci expliquerait les pertes de valeur alimentaire observées pour les aliments riches en ces composés. Les effets négatifs des tannins condensés sur la valeur nutritive de la

féverole ont contraint les producteurs à sélectionner des variétés sans tannins. Malheureusement, la production de féveroles dépourvues de tannins engendre non seulement une baisse de la productivité mais également une mauvaise résistance aux conditions environnementales (Bond *et al.*, 1986). En effet, les tannins jouent un rôle de défense pour le végétal lui-même en particulier vis-à-vis attaques des micro-organismes et prédateurs (Salunke *et al.*, 1990).

Pour pallier ce problème, la sélection devra s'orienter vers la recherche de nouveaux génotypes dont la teneur en tannins autoriserait une bonne tenue au champ et serait sans effet néfaste pour l'alimentation.

Notre projet de recherche s'est inséré d'une part dans un programme de travail général sur les Féveroles en collaboration avec l'INRA de DIJON et d'autre part dans le cadre des programmes ECLAIR de la Communauté Economique Européenne, qui ont pour but d'accroître l'utilisation du Pois et autres Légumineuses à graines par l'amélioration de la composition et de la valeur nutritionnelle de leurs graines à l'aide de la génétique et de divers procédés techniques.

Ce programme européen de recherche des protéagineux importants pour la CEE regroupe les volets d'activités suivants :

- recherches génétiques et multiplication des graines,
- nutrition animale,
- analyses biochimiques,
- procédés techniques,

et réunit des laboratoires des pays suivants :

- Angleterre : génétique, aspects méthodologique et statistique
- Belgique : analyse par Infra rouge
- Danemark : valeur nutritionnelle, composition chimique
- Espagne : agronomie, alcaloïdes
- France
 - INRA : aspects nutritionnels, composition chimique, génétique
 - Organismes privés : agronomie, nutrition animale
 - Université : facteurs antinutritionnels phénoliques
- Hollande : facteurs antitrypsiques, lectines
- Italie : protéines.

La mission qui a été confiée au Laboratoire de Biologie Micromoléculaire et Phytochimie a consisté en l'expertise des facteurs antinutritionnels phénoliques de 2 ressources végétales : le pois et la féverole. Au sein du programme technique dont les principaux aspects ont été présentés ci-dessus, notre contribution a concerné les points suivants :

1. A l'aide d'une méthodologie faisant appel à un ensemble de dosages chimiques, biologiques et physiques des composés polyphénoliques, un screening des graines de pois *Pisum sativum* L. et de la féverole *Vicia faba* L. a été effectué afin de :
 - dévoiler la diversité variétale
 - appréhender la variabilité phénotypique.
2. Etude génétique des caractéristiques tannantes des graines de féverole (*Vicia faba* L.) en relation avec la couleur des téguments ;
3. Validation des méthodes physiques de dosages non destructives par rapport aux méthodes chimiques ;
4. Connaissance des structures phénoliques de la graine.

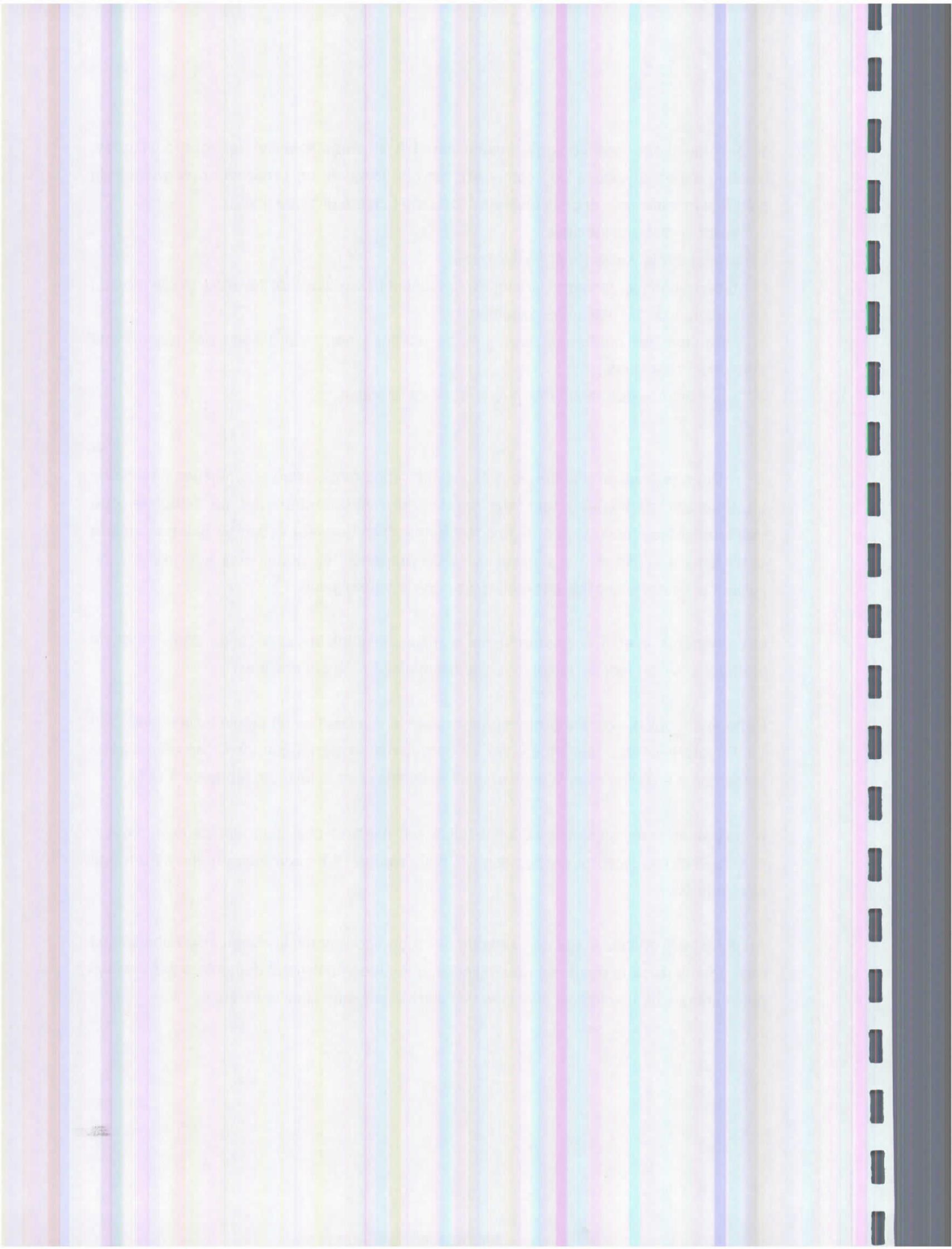
Dans le premier chapitre nous rappelons l'importance des Légumineuses étudiées, en insistant particulièrement sur les facteurs antinutritionnels phénoliques que représentent les tannins ou proanthocyanidines. Bien que leur action ne soit pas encore parfaitement élucidée, nous essayerons de rapporter les principales informations en suivant le cheminement de ces molécules dans le tube digestif.

Les chapitres 2 et 3 consisteront en la mise au point et l'application d'un panel de méthodes concernant les facteurs antinutritionnels (F.A.N) phénoliques.

Cette méthodologie sera appliquée pour évaluer la composition en tannins d'une collection de Féverole et de Pois et étudier le déterminisme génétique des caractéristiques tannantes en relation avec la couleur des téguments chez la féverole (chapitre 4 et 5).

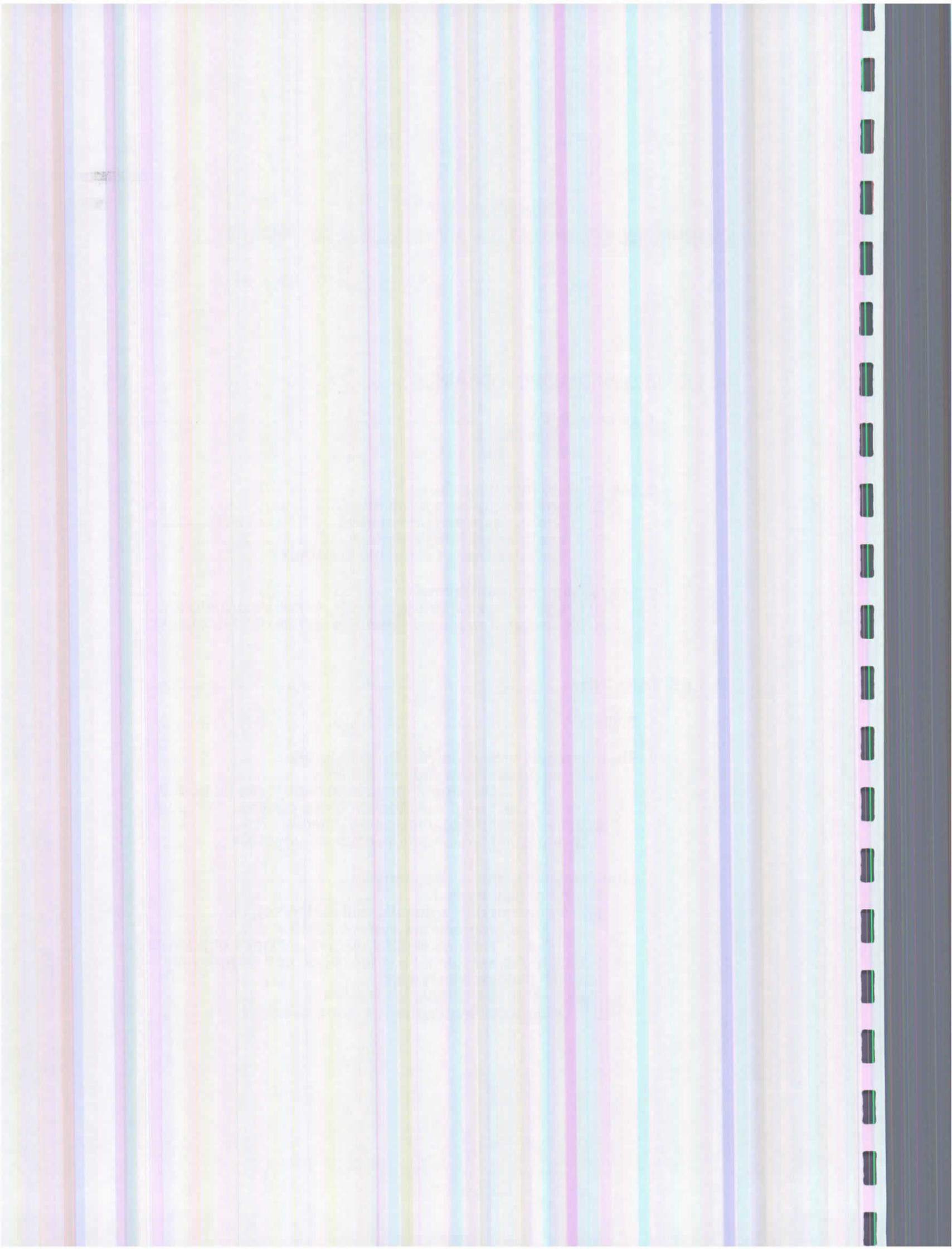
Nous présenterons au chapitre 6 les résultats préliminaires des méthodes de dosages non destructives des facteurs antinutritionnels phénoliques : spectrométrie proche infra rouge et colorimétrie.

Au chapitre 7 et dans le but de connaître de façon approfondie la composition phénolique des téguments de la graine de protéagineux, une étude analytique des différentes classes polymériques de tannins est effectuée tant chez le pois que chez la féverole.



CHAPITRE 1 : DONNEES GENERALES ET BIBLIOGRAPHIQUES

A. LES LEGUMINEUSES A GRAINES	6
1. La botanique	6
1. 1. <i>Vicia faba</i> L.	6
1. 2. <i>Pisum sativum</i> L.	8
2. Les facteurs nutritionnels	10
2. 1. Les composants protéiques	10
2. 2. Les composants glucidiques	11
2. 3. Les composants lipidiques	11
2. 4. Les vitamines et éléments minéraux	11
3. Les facteurs antinutritionnels	11
3. 1. Les facteurs antinutritionnels de nature protéique	12
3. 2. Les facteurs antinutritionnels de nature phénolique ...	13
 B. LES TANNINS	 14
1. Définition	14
2. Structures des proanthocyanidines naturelles	14
2. 1. les proanthocyanidines dimères	16
2. 1. a. les proanthocyanidines dimères de type B ...	16
2. 1. b. Les proanthocyanidines dimères de type A..	18
2. 2. Les proanthocyanidines polymères	18
2. 3. Importance des tannins chez les Végétaux	20
3. Effets antinutritionnels des tannins	22
3.1. Au niveau buccal :	22
3.2. Au niveau du tractus digestif (estomac)	22
3.2. a. Interactions tannins-protéines	22
3.2. b. Tannins et activités des enzymes digestives .	24
3.3. Liaisons participant à la formation des complexes tannins-protéines-enzymes.....	26
3.4. Devenir des complexes formés	26
3.5. Origine de l'augmentation de l'azote fécal	27



CHAPITRE 1 :

DONNEES GENERALES ET BIBLIOGRAPHIQUES

A. LES LEGUMINEUSES A GRAINES

1. La botanique

L'ordre des Légumineuses ou Légumineuses comprend plus de 12000 espèces réparties entre 600 et 700 genres. Ces plantes sont cultivées dans le monde entier et principalement dans les régions chaudes. En effet les Légumineuses constituent une part non négligeable de l'alimentation de nombreuses populations à travers le Monde et représentent une source de protéines intéressante tant pour l'homme que pour l'animal.

Les Légumineuses possèdent la capacité de fixer l'azote par symbiose avec les bactéries du sol. Outre l'aspect macro-économique pour la culture, cette propriété confère aux Légumineuses une importante richesse en protéines et particulièrement en lysine, acide aminé essentiel, déficient chez la plupart des aliments d'origine végétale.

Cet ordre comporte 3 familles : Les Mimosacées, les Césalpinacées, et les Papilionacées ou Fabacées. La dernière famille est celle qui nous intéresse plus particulièrement puisqu'elle regroupe les genres *Glycine*, *Cicer*, *Lens*, *Phaseolus*, *Lathyrus*, *Pisum* et *Vicia*, tous d'importance économique .

Dans le cadre de cette étude, notre intérêt s'est porté essentiellement sur le pois et la féverole.

1. 1. *Vicia faba* L.

Les variétés à grosses graines sont cultivées depuis longtemps dans les régions méditerranéennes sous le nom de fève. Elle est devenue depuis peu une grande culture protéagineuse en Europe, principalement en Angleterre. La moitié des volumes mondiaux, soit 4 millions de tonnes, sont produits par la Chine.

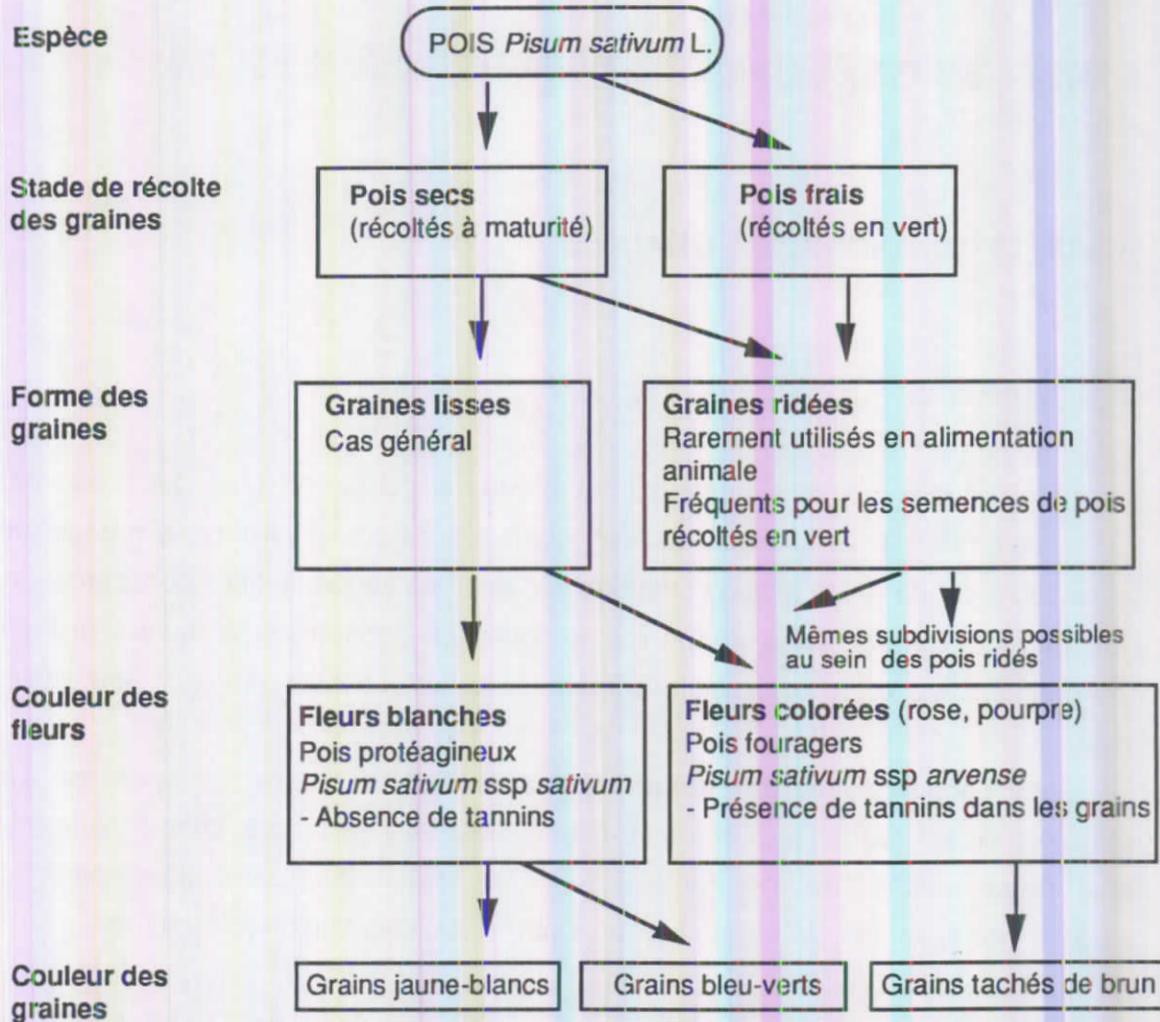


Figure 1 : Classification des pois et principales subdivisions à distinguer du point de vue qualité UNIP/ITCF 1991.

Il existe plusieurs sous-espèces et variétés de *Vicia faba* où l'on reconnaît essentiellement trois groupes définis par la taille des graines qui peuvent être très petites (variété *minor*), moyennes (*equina*) ou grosses (variété *major*). Le terme "*major*" est utilisé pour désigner les fèves alors que "*minor*" correspond aux féveroles. Il existe au sein de la sous-espèce "*minor*" une grande diversité de coloration des fleurs et des graines :

- les fleurs blanches et graines non colorées qui correspondent aux espèces dépourvues de tannins ;

- les fleurs colorées et graines à tégument gris, beige, brun, rouge, fauve, violet ou vert, pour les formes pourvues de tannins. Les graines sont parfois ornementées de taches ou ponctuations.

Ces descripteurs phénotypiques servent de base non seulement à la classification mais aussi à la sélection comme moyen de tri.

1. 2. *Pisum sativum* L.

Sélectionné comme plante potagère, le pois est devenu très récemment une grande culture protéagineuse en Europe, première source de matière riche en protéines pour les élevages de monogastriques (porcs, volailles, lapins) en France et au Danemark. Il est également cultivé en Chine et surtout en Russie qui représente la moitié de la production mondiale soit 16 millions de tonnes.

La **figure 1** illustre les principales subdivisions rencontrées chez *Pisum sativum* L.

Tous les types de pois, qu'ils soient récoltés en grains frais, en grains secs ou en plantes entières comme fourrage, appartiennent à la même espèce botanique : *Pisum sativum* L.

Les principales subdivisions de l'espèce concernent d'une part la forme de la graine (pois lisses, pois ridés), d'autre part la couleur de la fleur (fleurs blanches et fleurs colorées). Les graines des pois à fleurs blanches ne contiennent généralement pas de tannins et sont classés comme sous espèce "*Pisum sativum ssp sativum*".

Les graines des pois à fleurs colorées contiennent des tannins et sont classées dans une sous espèce à part : "*Pisum sativum ssp arvense*".

	Féverole	Pois	Blé	Tourteau de soja
M.A.T	300-310	240	131	519
Amidon	440	512	689	34
Cellulose	85	61	26	60
Matières grasses	15	18	24	23
Acides aminés				
Lysine	19,8-19,2	17,9	3,7	33
Méthionine	2,2-2,1	2,4	2,1	7,3
Cystine	4,1-4,0	3,6	3,2	8,3
Thréonine	11-10,6	9,3	4	20,2
Tryptophane	2,6-2,5	2	1,6	7

Tableau 1 : Compositions chimiques moyennes des féveroles et pois, comparées à celles du blé et du soja en matières azotées, amidon, cellulose, matières grasses et acides aminés en mg/g ms

2. Les facteurs nutritionnels

La haute teneur protidique des Légumineuses justifie en partie le caractère vital que revêtent ces plantes en alimentation animale et humaine. Leurs protéines fournissent les acides aminés indispensables à la vie avec des teneurs en lysine avoisinant 18 g Kg^{-1} de matière sèche, constituant ainsi un bon complément pour les céréales qui en sont déficientes.

2. 1. Les composants protéiques

La matière azotée du pois est en majorité de nature protéique puisque la part de l'azote non protéique est estimée entre 1,6% et 4,3% de l'azote total ; cet azote non protéique est à 65% dans les acides nucléiques (Mossé, 1990 ; Holt et Sosulki, 1981). Aussi assimile-t-on en général la teneur en matière azotée totale (M.A.T) à la teneur en protéines.

Les deux Légumineuses que sont la féverole et le pois ont des teneurs en M.A.T intermédiaires entre celle du blé et celle du tourteau de soja. Cette MAT (calculée par la quantité d'azote multipliée par le coefficient 6,25) est en moyenne de 300 g Kg^{-1} MS et 240 g Kg^{-1} MS respectivement pour la féverole et le pois d'après UNIP-ITCF (1993).

Les connaissances relatives à la nature des protéines de pois ont fait l'objet de synthèses récentes (Gueguen, 1990 ; Casey et Domoney, 1992). Les protéines solubles du pois peuvent être séparées en 2 groupes :

- les albumines représentant 25% des protéines totales,
- les globulines (60 %).

Chez *Pisum sativum*, le rapport albumines / globulines peut varier de 0,26 à 0,42 (Gueguen *et al.*, 1988). Les globulines sont constituées de viciline et légumine dans des proportions variables. La variabilité de la composition protéique du pois, qui a été souvent mise en évidence, n'est généralement pas due uniquement aux caractéristiques génétiques mais aussi aux facteurs environnementaux (Baniel *et al.*, 1992).

La valeur nutritionnelle des graines de pois dépend de la proportion des globulines et essentiellement de la viciline.

En industrie alimentaire, l'étude des propriétés fonctionnelles des protéines de pois utilisant aussi bien des isolats protéiques que les globulines, montre l'importance du rapport viciline /légumine.

Le contenu en acides aminés essentiels est présenté dans le **tableau 1** pour la féverole et le pois en comparaison avec celui du blé et de tourteau de soja. La teneur en lysine est largement supérieure à celle des céréales ; cependant les acides aminés soufrés et le tryptophane constituent le facteur limitant.

2. 2. Les composants glucidiques

L'amidon est le constituant glucidique essentiel chez les deux Légumineuses. Du point de vue structure moléculaire, l'amidon des Légumineuses est proche de celui des céréales puisque l'amylopectine représente en moyenne 70%.

Outre l'amidon qui constitue la fraction glucidique facilement assimilable par l'organisme, les parois de Légumineuses renferment des teneurs élevées en fibres. La cellulose et la lignine sont en quantités assez faibles et les autres fibres sont essentiellement des substances pectiques. Les arabinogalactanes et rhamnogalactanes sont localisés au niveau des cotylédons tandis que les téguments sont pourvus d'associations cellulose-hemicelluloses.

2. 3. Les composants lipidiques

La teneur moyenne en lipides est faible et ne dépasse guère 2%, aussi bien pour la féverole que pour le pois. Les triglycérides représentent 90% des lipides totaux. La composition des lipides des Légumineuses est proche de celles de céréales avec un caractère polyinsaturé marqué et une prédominance de l'acide linoléique (Grosjean, 1985).

2. 4. Les vitamines et éléments minéraux

Les Légumineuses constituent une bonne source de vitamines du groupe B, d'acide nicotinique et d'acide folique, mais sont dépourvues, du moins à l'état sec, d'acide ascorbique. Enfin les légumes secs sont riches en fer et leur teneur en calcium avoisine celle du blé.

3. Les facteurs antinutritionnels

La qualité des protéines des Légumineuses dépend de 3 éléments majeurs:

- leur composition, principalement en amino-acides essentiels,
- la présence dans la graine des facteurs antinutritionnels, qu'ils soient de nature protéique ou phénolique
- et finalement de la disponibilité des acides aminés.

La disponibilité des aminoacides des protéines au niveau du tractus digestif dépend de l'action des enzymes protéolytiques. La présence des substances antinutritionnelles (de

nature protéique et/ou phénolique) par action directe sur les enzymes ou par combinaison aux protéines de réserve pour former des complexes insolubles (polyphénols-protéines), affecte la disponibilité des aminoacides, rend ces protéines inaccessibles et amoindrit de façon non négligeable leur valeur alimentaire .

3. 1. Les facteurs antinutritionnels de nature protéique

Comme pour la plupart des Légumineuses, leurs graines contiennent des substances antinutritionnelles qui font partie du groupe général des inhibiteurs naturels de protéases, protéines ou peptides se liant spécifiquement et de manière stable aux enzymes hydrolysant les protéines. La graine de féverole contient également de la vicine et convicine qui sont des glycosides responsables du favisme chez l'homme.

Les inhibiteurs protéasiques sont dotés d'activité spécifique antitrypsine et antichymotrypsine. Chez le pois, ils sont localisés essentiellement au niveau des cotylédons où l'activité antitrypsique (TIA) est 13 fois supérieure à celle du tégument. Chez la féverole, la présence d'autres substances inhibitrices dans les téguments rend difficile l'étude de la distribution précise de l'activité antitrypsique dans les grains (Valdebouze *et al.*, 1980).

Il semble que l'activité antitrypsique des graines de pois et de féverole est de 5 à 20 fois inférieure à celle du soja. Cette activité est très variable, non seulement entre les différentes Légumineuses mais également entre les variétés. C'est ainsi que, pour le pois, les variétés d'hiver, plus riches en protéines, sont également beaucoup plus riches en antitrypsiques que les variétés de printemps (Leterme *et al.* , 1990). Il semble également que les pois lisses contiennent plus d'inhibiteurs antitrypsiques que les pois ridés, tandis que les cultivars à graines colorées semblent avoir une teneur plus faible que les cultivars de pois non colorés (Grosjean *et al.* ,1991).

Ces différences variétales prennent une importance particulière, notamment en ce qui concerne les isolats protéiques dans lesquels se retrouve une grande partie des inhibiteurs (Gueguen *et al.* ,1980).

L'activité antitrypsique pour la féverole est moins variable entre variétés et similaire à celle des pois de printemps avec une légère différence entre les cultivars d'hiver et de printemps (Valdebouze et Gaborit, 1985).

Ces substances antinutritionnelles sont généralement présentes dans les cotylédons et peuvent être responsables de dérèglements métaboliques et de la baisse du poids chez les animaux dont la ration alimentaire est essentiellement à base de Légumineuses (Kossa 1977).

3. 2. Les facteurs antinutritionnels de nature phénolique

Parallèlement aux composés antiprotéasiques thermolabiles des cotylédons, les graines de Légumineuses sont pourvues d'autres types de substances antinutritionnelles de nature phénolique thermostables et qui sont localisées exclusivement dans les téguments. Si les premiers composés appartiennent au métabolisme primaire qui concerne les molécules essentielles à la vie cellulaire (acides nucléiques, protéines, glucides, lipides), les seconds sont issus du métabolisme secondaire spécifique au monde des Végétaux.

Les composés phénoliques rencontrés chez les Légumineuses fourragères ou à graines sont représentés par la classe des flavonoïdes dont les tannins condensés ou proanthocyanidines dérivent directement. L'étude physiologique de ces dérivés a fait l'objet de plusieurs publications : ils participent à la régulation de la maturation des fruits (Billot 1983), à la croissance cellulaire (Nitsch 1970) et aux réactions de défense des plantes (Bate-smith 1973, Mole *et al.*, 1990a).

Sur le plan nutritionnel, l'importance des tannins réside dans leur double propriété :

- d'une part, les tannins ont une grande affinité pour les protéines de la ration alimentaire (insolubilisation),
- et d'autre part, ils réagissent avec les enzymes du tractus digestif (inactivation).

En effet ces composés polyhydroxylés interagissent avec les protéines en formant des complexes polyphénols-protéines les rendant ainsi indisponibles.

Au niveau du tractus digestif, ces composés polyphénoliques peuvent réduire le processus d'activation des enzymes et inhiber l'activité des principales protéases digestives en créant des complexes avec ces mêmes enzymes.

Les facteurs antinutritionnels de nature protéique étant thermolabiles, les traitements thermiques adéquats ont généralement un effet bénéfique sur la valeur alimentaire des Légumineuses. En revanche, ceux de nature - phénolique - ne sont pas sensibles à l'action de la chaleur, aussi est-il important de rechercher, *via* la sélection, des variétés qui présenteraient des composés polyphénoliques en quantité suffisante pour la valeur culturale et de qualité non déprimante pour la valeur nutritionnelle.

B. LES TANNINS

1. Définition

Les tannins naturels sont des molécules polyphénoliques hydrosolubles, de masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 et, qui outre les réactions habituelles des phénols, provoquent la précipitation des protéines (ou d'autres polymères).

A cette définition correspondent deux classes structurales distinctes, pouvant être présentes simultanément chez les Végétaux :

- les tannins hydrolysables,
- les tannins condensés.

Les tannins hydrolysables sont des hétéropolymères dont l'hydrolyse chimique ou enzymatique libère outre la molécule de glucose, de l'acide gallique (cas des gallotannins) ou ses formes dimériques : acide α -digallique, acide ellagique (cas des ellagitannins). La **figure 2** montre la structure de base d'un tannin hydrolysable.

Les tannins condensés résultent de la condensation de molécules élémentaires flavanes-3-ol (telles que la catéchine) ou flavanes-3,4-diols (leucoanthocyanidines). Les liaisons formées sont de type carbone-carbone ce qui rend ces molécules très difficilement hydrolysables.

Les tannins condensés sont également appelés proanthocyanidines (Freudenberg et Weignes 1960) ; en effet leur oxydation en milieu alcool-acide à chaud entraîne la formation de pigments anthocyanidiques tels que cyanidine et delphinidine. C'est certainement ce type de molécule qui est dotée de caractéristiques antinutritionnelles chez les Légumineuses ; c'est la raison pour laquelle nous allons leur consacrer la suite de ce chapitre.

2. Structures des proanthocyanidines naturelles

Les unités structurales des proanthocyanidines sont essentiellement :

- l'afzéléchine et son isomère l'épiatzéléchine (monohydroxylée sur le noyau B) ;
- la catéchine et son isomère l'épicatéchine (dihydroxylée) ;
- la gallocatéchine et son isomère l'épigallocatéchine (trihydroxylée).

A chaque classe peuvent correspondre quatre stéréoisomères (**figure 3**).

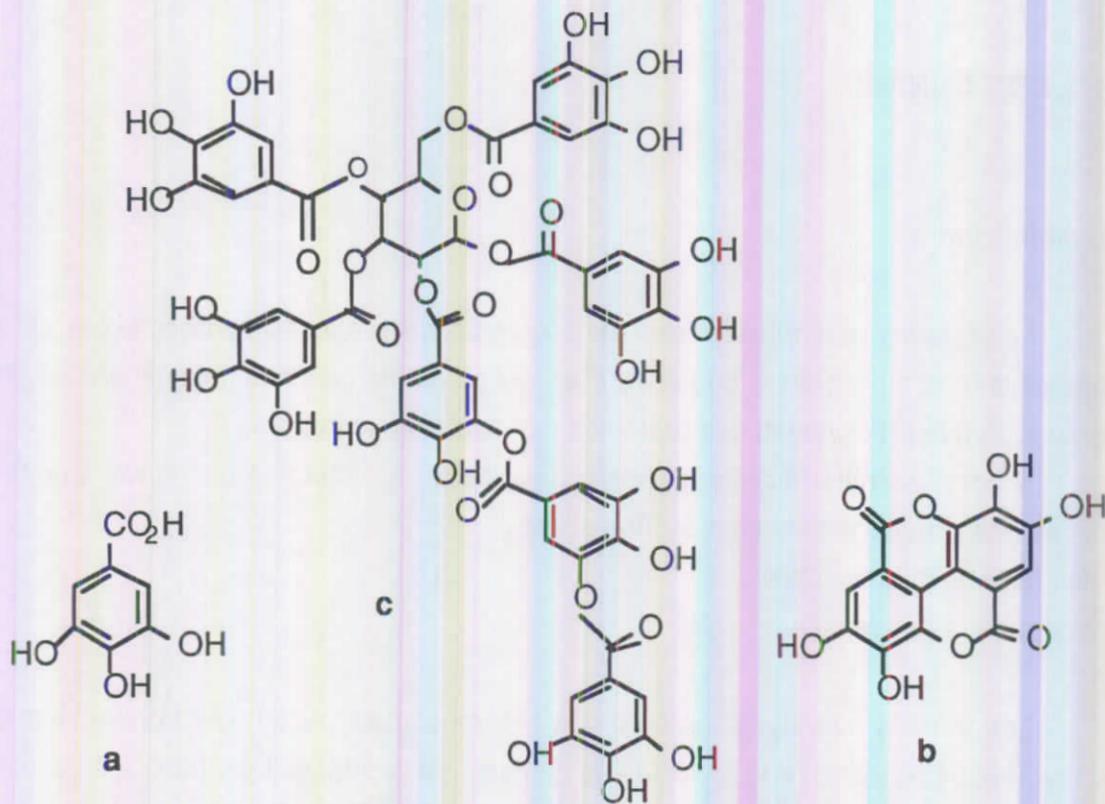


Figure 2 : structure de l'acide gallique (a), de l'acide ellagique (b) et d'un tannin hydrolysable (c)

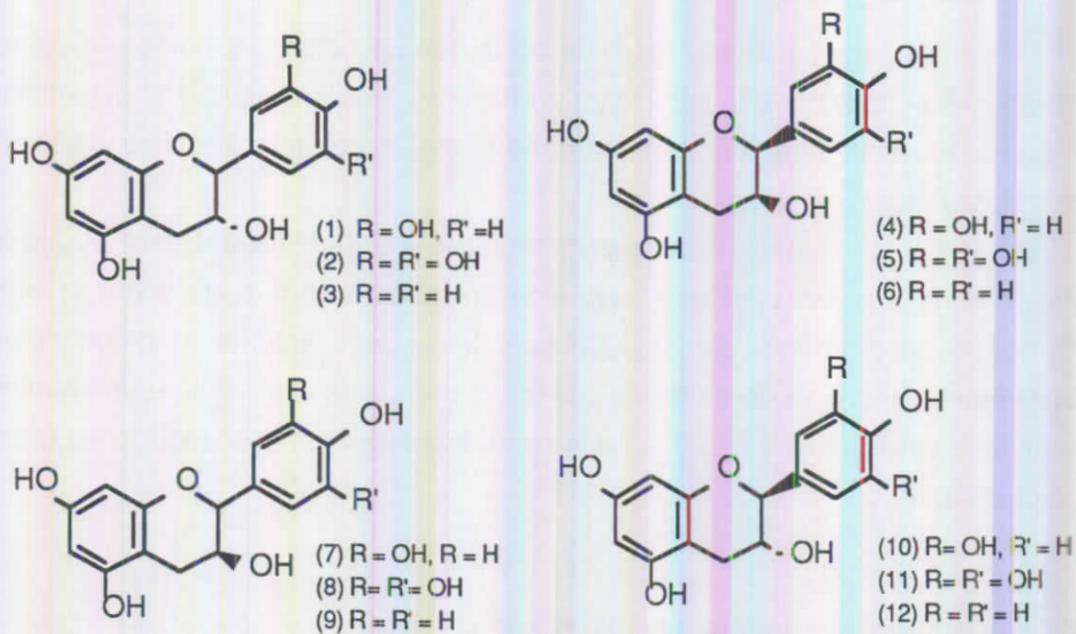


Figure 3 : flavanes-3-ol et nomenclature

- | | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| (1) : (-) épicatechine (2R, 3R) | (2) : (-) épigallocatechine (2R, 3R) |
| (3) : (-) épiafzéléchine (2R, 3R) | (4) : (+) épicatechine (2S, 3S) |
| (5) : (+) épigallocatechine (2S, 3S) | (6) : (+) épiafzéléchine (2S, 3S) |
| (7) : (+) catéchine (2R, 3S) | (8) : (+) galocatechine (2R, 3S) |
| (9) : (+) épiafzéléchine (2R, 3S) | (10) : (-) catéchine (2S, 3R) |
| (11) : (-) galocatechine (2S, 3R) | (12) : (-) épiafzéléchine (2S, 3R) |

Ces monomères peuvent être acylés, généralement en position 3 de l'hétérocycle, ou glycosilés. L'estérification des monomères tels que l'épicatéchine ou l'épigalloctéchine se traduit par une astringence plus marquée (Okuda *et al.*, 1985).

2. 1. les proanthocyanidines dimères

Les proanthocyanidines dimères, qui correspondent au degré de polymérisation le plus faible, peuvent servir de modèle pour la compréhension des structures plus complexes, de degré de polymérisation plus élevé.

Elles résultent de la condensation de deux sous-unités flavanes 3-ol, liées entre elles par l'intermédiaire d'une liaison de type C4-C8 ou C4-C6. On les classe en deux de catégories:

- les proanthocyanidines dimères de type B
- les proanthocyanidines dimères de type A

2. 1. a. les proanthocyanidines dimères de type B

La liaison carbone-carbone interflavane est rompue en milieu acide HCl 5N. Dans le cas de la procyanidine B2, on obtient la (-) épicatechine provenant de la sous-unité flavane inférieure et un 4 flavanyl carbocation à partir de la sous-unité supérieure qui se transformera en cyanidine par oxydation (Haslam 1977).

Grâce aux progrès réalisés dans l'interprétation des spectres ^1H et ^{13}C RMN, il est possible d'attribuer une configuration définitive à un nombre important de proanthocyanidines dimères (Fletcher *et al.*, 1977 ; Metche 1980).

Type	sous-unité supérieure	sous-unité inférieure	liaison interflavane	Configuration du C4
B1	(-)épicatechine	(+)catéchine	C4-C8	R
B2	(-)épicatechine	(-)épicatechine	C4-C8	R
B3	(+)catéchine	(+)catéchine	C4-C8	S
B4	(+)catéchine	(-)épicatechine	C4-C8	S
B5	(-)épicatechine	(-)épicatechine	C4-C6	R
B6	(+)catéchine	(+)catéchine	C4-C6	S
B7	(-)épicatechine	(+)catéchine	C4-C6	R
B8	(+)catéchine	(-)épicatechine	C4-C6	S

Tableau 2 : stéréochimie des proanthocyanidines dimères



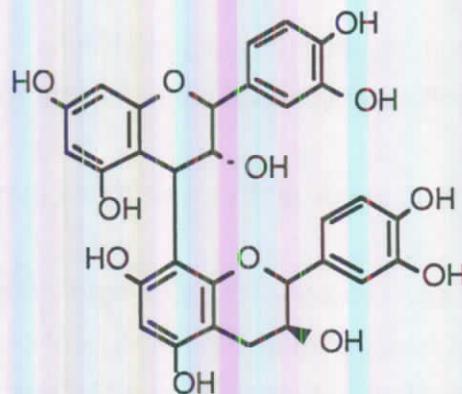
Procyanidine B3



Procyanidine B2



Procyanidine B4



Procyanidine B1

Figure 4 : structure de quelques procyanidines dimères

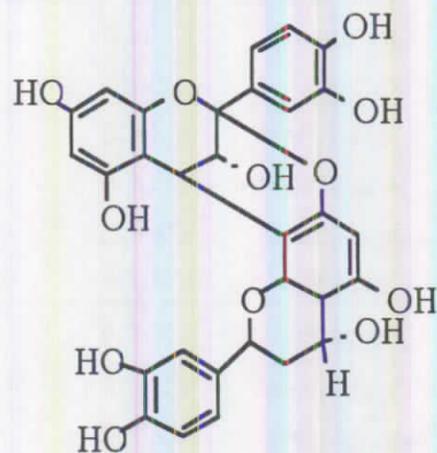


Figure 5 : structure d'une procyanidine dimère de type A

La figure 4 illustre quelques proanthocyanidines dimères.

2. 1. b. Les proanthocyanidines dimères de type A

Les proanthocyanidines A sont apparemment moins fréquentes que celles de type B (Haslam 1987). Leur traitement en milieu alcoolique par HCl 5N conduit à un rendement anormalement faible en anthocyanidines. Ce type de structure (figure 5) est résistant aussi bien à l'attaque par le toluène α -thiol en milieu acétique que par le phloroglucinol. Ces observations tendent à confirmer l'existence de deux liaisons interflavanes et ont conduit les chercheurs à affecter aux dimères de type A la configuration d'un 2,8"-epoxy-4,7"- biflavane (Jacques et Haslam 1974 ; Nonaka *et al.*, 1983, Karchesy et Hemingway 1986).

Les dernières découvertes dans ce domaine sont celles de Porter *et al.*, 1991 qui isolent de *Cacao bean* 3 nouveaux dimères de types A:

- épicatechine(2 β -5, 4 β -6)-épicatechine, premier dimère avec une liaison éther en 5 ;
- les 2 autres composés sont les premiers dimères de type A glycosilés :
 - 3-O-L-arabinopyranosyl-*ent*-epicatechine-(2 α -7, 4 α -8)-épicatechine
 - et 3-O-b-D-galactopyranosyl-*ent*-épicatechine-(2 α -7, 4 α -8)-épicatechine.

La première prodelphinidine dimère de type A ayant comme structure : épigallocatechine-(2 α -7, 4 α -8)-épigallocatechine-3-O-gallate est isolée de *Camellia sinensis* (Hashimoto *et al.*, 1989).

L'étude des proanthocyanidines des plantes médicinales (*Rheum* ssp roots) a révélé la présence de procyanidines oligomères galloylées ; ce type de composés est responsable d'activités biologiques (Nonaka *et al.*, 1981 ; Kashiwada *et al.*, 1986). Ricardo-Da-silva *et al.*, 1991 ont isolé également une procyanidine trimère monogalloylée des pépins de raisin.

L'établissement des structures fait appel à la spectrométrie de masse pour la détermination du poids moléculaire, à la RMN ^{13}C et au clivage par thylolise pour l'identification du type de procyanidines et de leurs monomères.

2. 2. Les proanthocyanidines polymères

Les molécules proanthocyanidiques peuvent atteindre des degrés de polymérisation très élevés. L'étude des tannins condensés de diverses espèces de Légumineuses (Jones *et al.*, 1976), révèle des degrés de polymérisation importants allant de 19 à 29 chez *Trifolium*

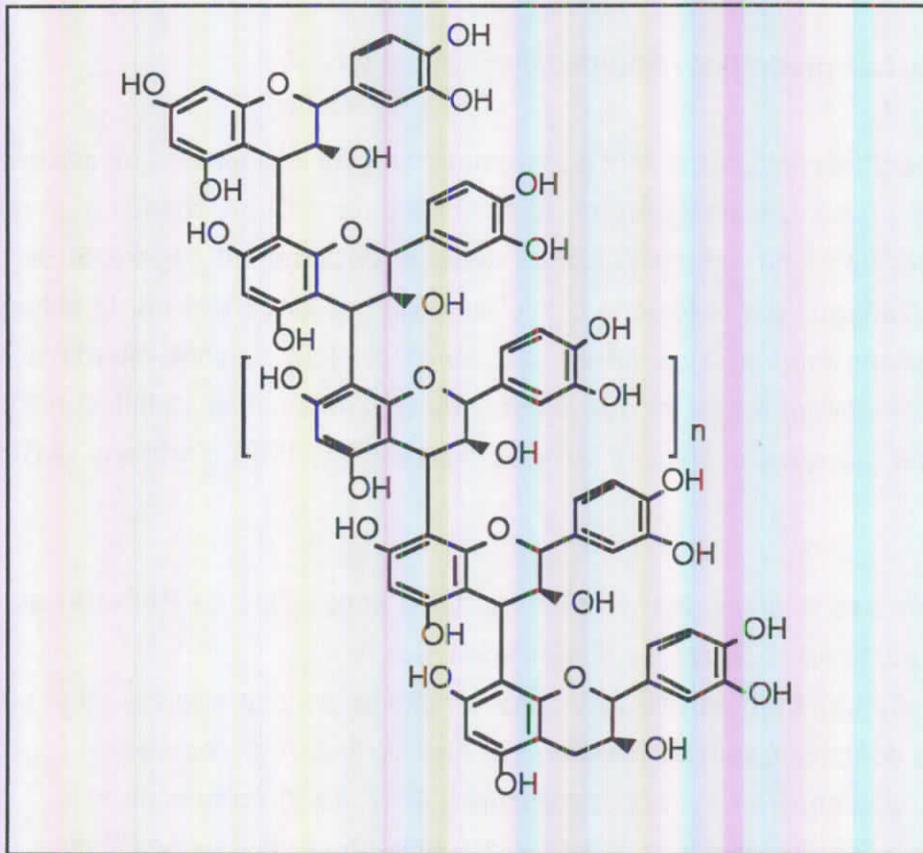


Figure 6 : structure d'une procyanidine polymère

Légumineuses	Tannins condensés (mg/100g)		
		graine entière cotylédon	
Black gram ^a	<i>Phaseolus mungo</i> L.	540-1197	13-33
Chick pea ^a	<i>Cicer arietinum</i>	78-272	16-38
Cow pea ^a	<i>Vigna sinensis</i> L.	175-590	28
Faba beans ^b	<i>Vicia faba</i> L.	750-2000	740-910
Green gram ^a	<i>Phaseolus aureus</i> L.	437-799	21-39
Lima bean ^b	<i>Phaseolus lunatus</i>	650-930	..
Peas ^b	<i>Pisum sativum</i> L.	500-1050	460-560
Pigeon pea ^a	<i>Cajanus cajan</i>	380-1710	22-43
Soybean ^a	<i>Glycine max</i> L.	45	34

^a tannins condensés en équivalents catéchine

^b tannins condensés en équivalents acide tannique

Tableau 4 : Teneurs en tannins (essentiellement catéchiques) de quelques Légumineuses selon Reddy *et al.*, 1985.

affine L., et pouvant atteindre jusqu'à 94 chez le sainfoin, *Onobrychis viciifolia* (Scop) (tableau 3)

Espèce	tissu	Poids moléculaire	Nombre de monomères
<i>Trifolium affine</i>	feuille	5800-8700	19-29
<i>Trifolium arvense</i>	feuille	7900-8200	26-27
<i>Coronilla varia</i>	feuille	10100-13200	34-44
<i>Onobrychis viciifolia</i>	feuille	17000-28100	57-94

Tableau 3 : Poids moléculaire et nombre d'unités monomères des proanthocyanidines hautement polymérisées de quelques Légumineuses (Jones *et al.*, 1976).

La figure 6 illustre un polymère de Proanthocyanidines.

2. 3. Importance des tannins chez les Végétaux

La nature, les teneurs et la localisation des tannins chez les végétaux varient considérablement en fonction de l'espèce considérée ; on les trouve généralement chez les dicotylédones, les Légumineuses en sont particulièrement bien pourvues (Salunke *et al.*, 1990).

Les tannins sont bien représentés dans la composante végétale des rations alimentaires à base de graines de sorgho (*Sorghum bicolor*), de millet (*Panicum miliaceum* L.), d'orge (*Hordeum vulgare* L.) et de colza (*Brassica napus*).

Chez les Légumineuses, les tannins sont présents chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.), le pois (*Pisum sativum* L.) le pois-chiche (*Cicer arietinum* L.), la féverole (*Vicia faba*), et les lentilles (*Lens culinaris*).

Comme pour le sorgho, les proanthocyanidines constituent chez les Légumineuses la majeure partie des tannins (Reddy *et al.*, 1985) ; elles sont localisées essentiellement dans la testa de la graine. Leur présence est étroitement corrélée à la coloration des téguments. De l'examen du **tableau 4** dans lequel figurent les teneurs en tannins condensés des principales Légumineuses, il ressort que pour certaines espèces, comme le pois (*Pisum sativum*) ou la féverole (*Vicia faba*), leur richesse en ces composés peut interférer avec la valeur alimentaire.

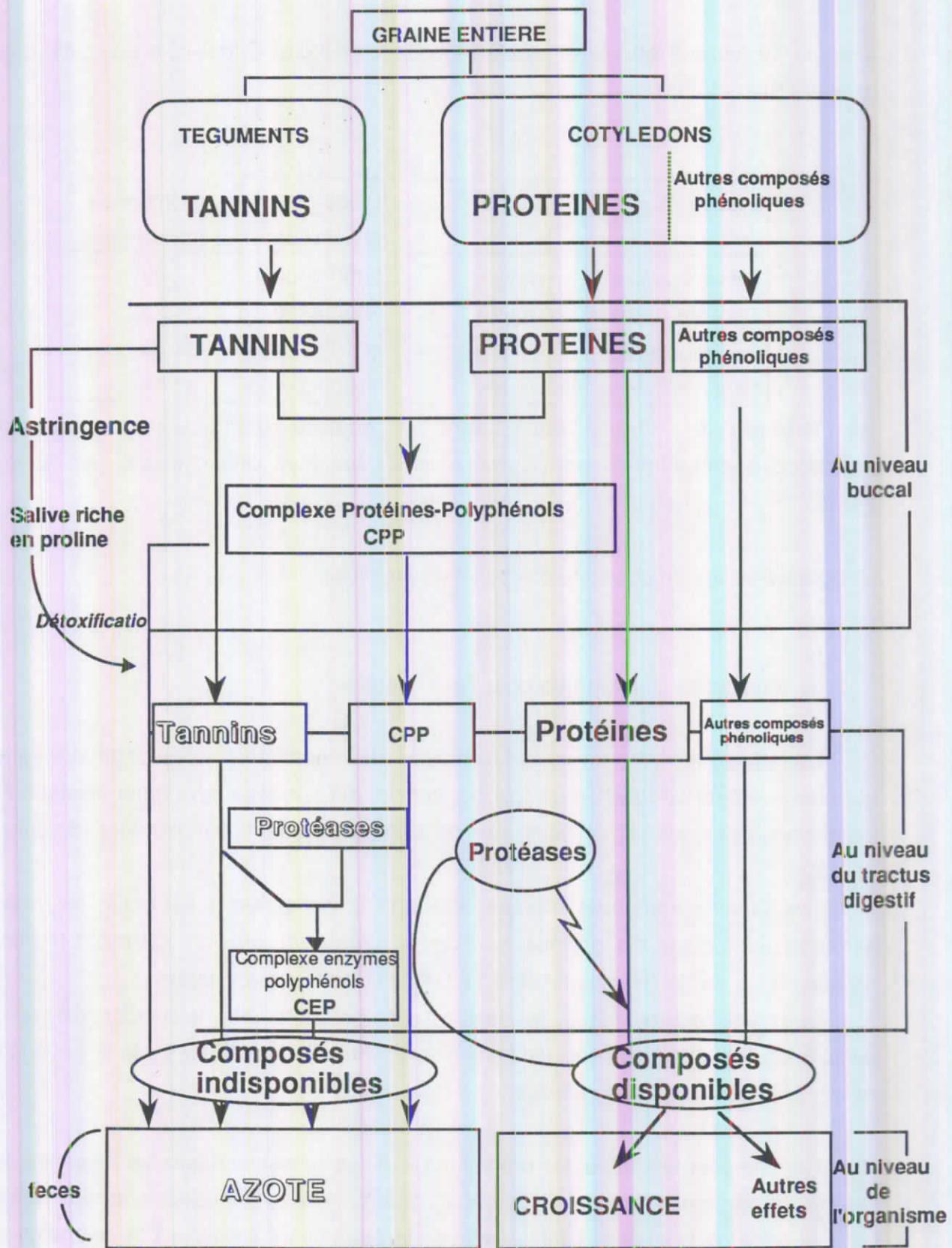


Figure 7 : Schéma résumant l'action des polyphénols dans l'organisme animal.

3. Effets antinutritionnels des tannins

Le principal intérêt des études *in vitro* et *in vivo* réside dans la compréhension des mécanismes d'action des tannins provoquant des effets néfastes sur l'organisme.

Bien que l'action des tannins condensés ne soit pas totalement élucidée, nous résumerons les principaux travaux en suivant le cheminement de ces composés dans l'organisme et leur devenir avec les aliments de la ration.

La **figure 7** résume l'action des polyphénols sur l'organisme animal.

3.1. Au niveau buccal :

Les premières interactions entre les tannins condensés (ou polyphénols) et les protéines se déclenchent au niveau de la bouche. Il en résulte un phénomène d'astringence qui découle de la formation des liaisons hydrogènes entre les groupements ortho-diphénols des tannins et les protéines de la cavité buccale ; ceci provoque une sensation de sécheresse au niveau de la bouche et un refus de l'aliment.

Ce phénomène d'astringence induit une réponse des glandes parotides qui synthétisent d'avantage des protéines salivaires riches en proline constituant un important système de défense contre la toxicité des tannins (Osawa *et al.*, 1987 ; Robins *et al.*, 1987; Butler et Mole 1988).

3.2. Au niveau du tractus digestif (estomac)

Au niveau stomacal, les tannins de la ration alimentaire se trouvent en contact avec les glycoprotéines des sécrétions, les protéines alimentaires et les protéases.

3.2. a. Interactions tannins-protéines

La formation des complexes polyphénols-protéines (CPP) serait la cause de l'indisponibilité des aminoacides des protéines. En effet ces complexes ne sont pas dégradés aux pH physiologiques et seront excrétés, ce qui conduit à une réduction de l'azote absorbé (Mitjavila *et al.*, 1971, Deshampe *et al.*, 1983 ; Bressani *et al.*, 1988).

Cultivar	IVDMD %	% Lignine tégument	%Tannins condensés	
			tégument	% tegument
<i>Vicia faba</i>				
Major				
Triple White	80,6	2,9 ± 0,1	0	13 ± 0,4
Kodrim	79	2,8 ± 0,1	0	13 ± 0,2
Fidrim	79,4	2,8 ± 0,1	0	13 ± 0,4
Exhibition	73,4	4,8 ± 0,1	2,3 ± 0,1	15 ± 0,2
Small Pod	75	4,8 ± 0,1	3,8 ± 0,2	15 ± 0,3
Broad Windsor	75,6	5,2 ± 0,1	2,4 ± 0,1	14 ± 0,3
<i>Vicia faba</i>				
Minor				
Hertz-freya	71	5,5 ± 0,1	6,0 ± 0,1	14 ± 0,3
Diana	75,5	6,3 ± 0,1	4,4 ± 0,2	13 ± 0,3

Tableau 5 : IVDMD (Digestibilité de la matière sèche in vitro), teneurs en lignine et en tannins condensés des graines de féverole (Buckley *et al.*, 1983).

Espèces	couleur	% Inhibition (test in vitro)			
		Trypsine		Amylase	
		PVP(-)	PVP(+)	PVP(-)	PVP(+)
<i>Vicia faba</i>	Blancs	5	6	4	3
	Colorés	51	0	43	2
<i>Pisum sativum</i>	Blancs	7	8	5	5
	Colorés	66	9	55	1

Tableau 6 : Inhibition de la trypsine et de l'amylase par des extraits de *Pisum sativum* L. et de *Vicia faba* L. (Griffits 1986).

In vitro, Griffiths (1979,1981) montre que la présence de tannins dans les téguments colorés tend à décroître la solubilité des protéines aussi bien pour les échantillons de pois que de féverole. Laurena *et al.*, 1984 montrent aussi que les tannins condensés du pois diminuent la digestibilité des protéines.

Buckley *et al.*, 1983 comparent huit géotypes de féverole dont les teneurs en tannins condensés s'échelonnent de 0 à 6,4%. La digestibilité de la matière végétale est appréciée en présence d'un complexe enzymatique représenté par une aliquote de fluide du rumen. Les résultats exprimés dans le **tableau 5** montrent que la digestibilité est d'autant plus grande que la teneur en tannins est plus faible ; en effet, l'IVDMD représentant la pourcentage de disponibilité de la matière sèche *in vitro* dans les conditions expérimentales est significativement plus forte chez les variétés sans tannins. Ces auteurs ont en outre démontré que l'apport des tannins condensés au milieu de la digestion *in vitro* abaisse la digestibilité de la matière végétale. Ces résultats montrent également que la proportion de lignine dans la composition des téguments est plus importante chez les variétés colorées.

3.2. b. Tannins et activités des enzymes digestives

Les tannins forment des complexes non seulement avec les protéines de la ration alimentaire mais ils peuvent également se combiner aux protéines enzymatiques du tractus digestif entraînant une baisse de leur activité biologique.

Griffiths (1986) (**tableau 6**) démontre clairement que la présence, dans une ration alimentaire, de tannins dans les téguments colorés de graines de pois et de féverole inhibe l'activité enzymatique de la trypsine ainsi que celle de l' α -amylase. La perte d'activité atteint 50-60% ; cet effet inhibiteur peut être réduit par addition de PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone) ; en effet ce polymère a la propriété de se lier fortement aux polyphénols. L'inhibition des enzymes par les tannins condensés est certainement de type non compétitif (Griffiths 1981).

Singh (1984) trouve une bonne corrélation entre la concentration en polyphénols du pois-chiche (*Cicer arietinum*) et l'inhibition de la trypsine et chymotrypsine.

OH et Hoff (1986) montrent que les inactivations de la pepsine, de la trypsine et de la chymotrypsine, dans les conditions gastriques, sont fortement influencées par les tannins.

Horigome *et al.*, 1988 purifient les tannins sur colonne de sepharose LH-20 et montrent que l'activité inhibitrice des tannins est linéairement corrélée au degré de polymérisation.

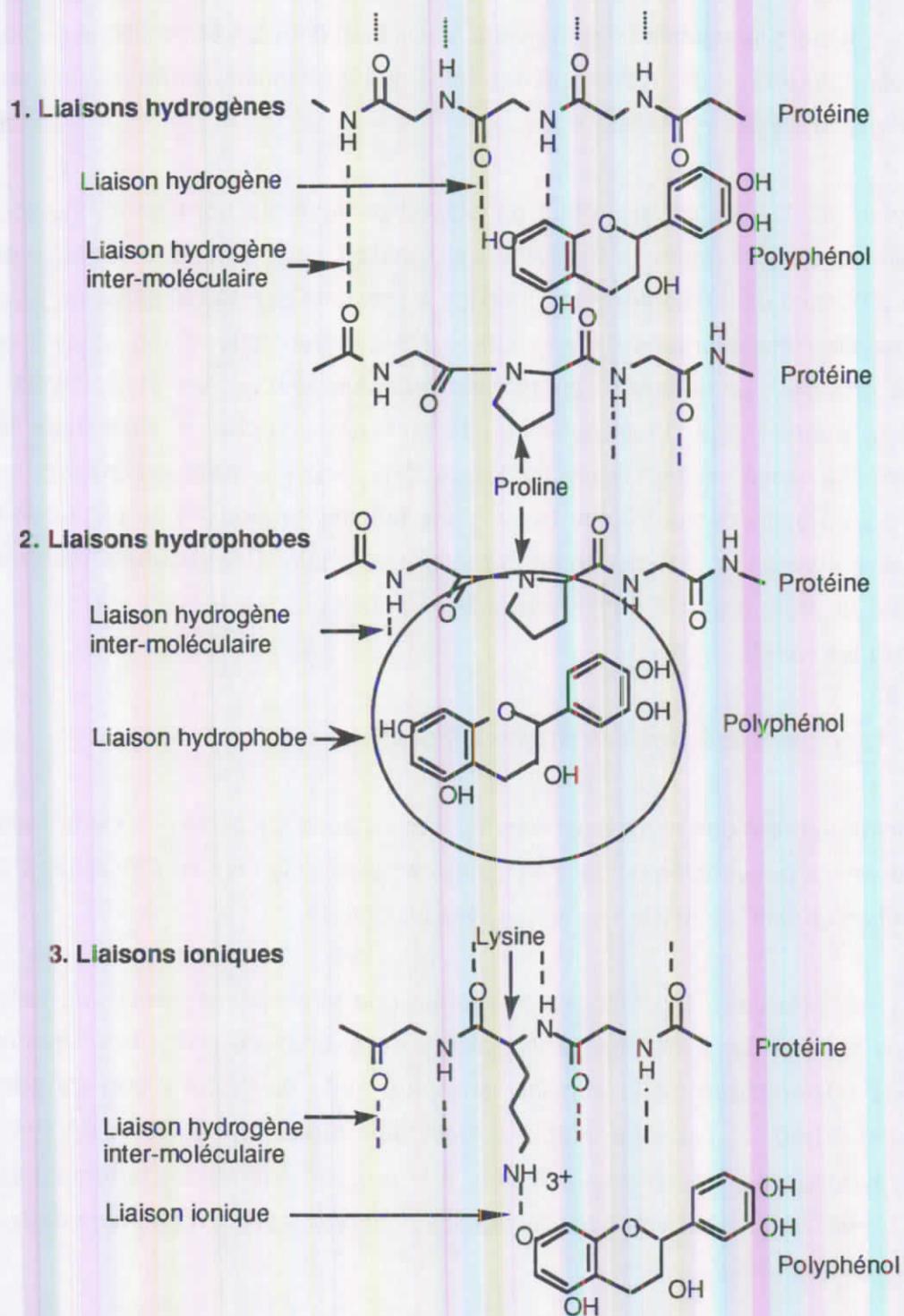


Figure 8 : Mode d'association des protéines avec les polyphénols (Asano, 1982)

La réduction de la digestibilité des aliments s'expliquerait donc par l'action des tannins qui affectent les enzymes soit en réduisant leur solubilité par formation de complexes tannins-protéines enzymatiques soit en inhibant leur activité par blocage des sites actifs.

3.3. Liaisons participant à la formation des complexes tannins-protéines-enzymes.

Plusieurs types de liaisons participent à la formation du complexe tannins-protéines parmi lesquelles :

- les liaisons hydrogènes entre les atomes d'oxygène des groupements peptidiques des protéines et les hydroxyles des fonctions phénoliques ;
- les liaisons ioniques entre les groupements chargés positivement tels que les groupements α -aminés des résidus lysine et les groupements hydroxyles des polyphénols chargés négativement ;
- les liaisons covalentes ; celles-ci peuvent se former par oxydation des hydroxyles phénoliques en quinone et être à l'origine d'une association avec les groupements nucléophiles -NH₂, SH des aminoacides ou les OH polyosidiques ;
- liaisons hydrophobes entre acides aminés hydrophobes tels que la proline, le tryptophane, la phénylalanine, la tyrosine, et les structures aromatiques des composés phénoliques.

Le mode d'association des polyphénols avec les protéines est donné dans la **figure 8**.

Selon Haslam (1989), en milieu aqueux, les liaisons hydrogènes et les liaisons hydrophobes sont probablement les plus importantes dans les contacts entre tannins et protéines.

3.4. Devenir des complexes formés

Les complexes qui résultent de la combinaison tannins-protéines sont pratiquement insolubles aux pH physiologiques ; ils sont résistants aux protéases digestives et sont éliminés au niveau des fécès, sans être dégradés.

Hernandez (1979) montre chez le rat, l'existence de corrélations entre la richesse en tannins des variétés de haricot entrant dans le régime et la quantité d'azote excrétée. Les mêmes tests en alimentation humaine aboutissent à des tendances similaires mais moins marquées.

Selon Bressani *et al.*, 1988 la présence de tannins dans les rations alimentaires conduit à une augmentation de l'azote fécal.

3.5. Origine de l'augmentation de l'azote fécal

Jusqu'à présent, les effets antinutritionnels des tannins ont toujours été interprétés en terme d'inhibition de la digestion des protéines alimentaires dûe aux tannins condensés. Cependant, la supplémentation à l'aide d'acides aminés ne peut compenser la perte de poids due aux tannins (Rogler *et al.*, 1985).

D'après Harold *et al.*, 1988, Butler et Rogler (1992) l'inhibition de la digestion par les tannins ne peut pas expliquer à elle seule l'origine de l'augmentation de l'azote fécal et de la diminution de l'énergie métabolisable.

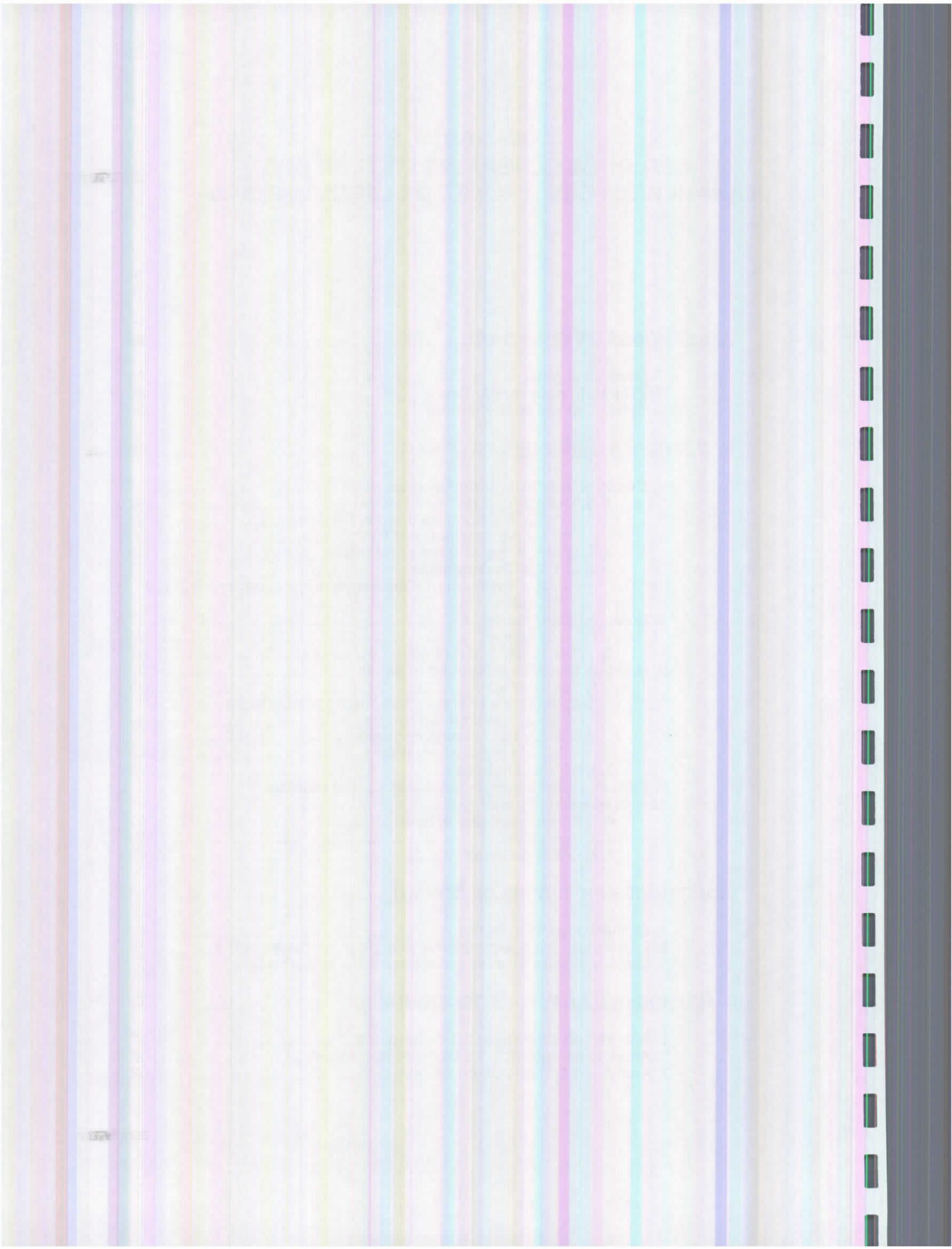
En expérimentant le rat à l'aide de caséine marquée au ^{14}C , Butler et Rogler (1992) montrent que l'augmentation de l'azote fécal observée lorsque les tannins sont présents dans l'alimentation, n'est pas d'origine alimentaire, mais résulterait de l'altération de la muqueuse du tube digestif et non de la précipitation des enzymes digestives puisque l'augmentation de l'azote fécal ne s'accompagne que de traces de radioactivité. Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de protéines marquées à l' ^{15}N ou au ^{14}C et d'acides aminés marqués à l' ^{15}N en présence de tannins de thé ou de féveroles.

Parmi les sources des protéines endogènes, une attention particulière est accordée aux protéines salivaires riches en résidus proline possédant une grande affinité pour les tannins (Mole *et al.*, 1990).

Aussi peut-on conclure avec Butler et Rogler (1992) que, tant que l'origine de l'augmentation de l'azote fécal ne sera pas élucidée, on ne pourra fournir d'arguments fiables expliquant la diminution de la valeur alimentaire des aliments riches en tannins condensés.

CHAPITRE 2 : METHODES GENERALES D'ETUDE DES POLYPHENOLS DES GRAINES DE LEGUMINEUSES

A. METHODES D'EXTRACTION	29
1. Matériel végétal	29
2. Préparation des échantillons	30
3. Extraction proprement dite	30
B. METHODES CHIMIQUES DE DOSAGE	32
1. Dosages spectrophotométriques	32
1. 1. Dosage des phénols totaux	32
1.1.a. Méthode au bleu de Prusse	32
1.1.b. Adsorption sur PVP	33
1. 2. Dosage des tannins condensés	33
1.2.a. Test vanilline	33
1.2.b. Production d'anthocyanidines par oxydation à chaud	35
2. Dosages biologiques	37
2.1. Hémanalyse	38
2. 2. Complexation à la gélatine	38
3. Relation entre les méthodes utilisées	39
3.1. Les unités	39
3.2. Spécificités et limites des méthodes utilisées	39
3.2.a. Les phénols totaux	39
3.2.b. Les tannins condensés	39
3.2.c. Le pouvoir tannant	43
3.3. Indices calculés	43
4. Effet des conditions de stockage sur les tannins condensés des téguments	45
4.1. Préparation des échantillons	45
4.2. Résultats	45
4.3. Conséquences	46
C. METHODES PHYSIQUES DE DOSAGE	46
1. La méthode colorimétrique	46
2. La méthode de spectrométrie proche infrarouge (SPIR)	49
3. Les conditions de mise en oeuvre de la validation	51
D. METHODES D'ANALYSES DES DONNEES	51
1. Analyse en Composantes Principales	52
2. Analyse de variance à 2 facteurs controlés	52
3. Analyse factorielle discriminante	52



CHAPITRE 2 : METHODES GENERALES D'ETUDE DES POLYPHENOLS DES GRAINES DE LEGUMINEUSES

A. METHODES D'EXTRACTION

Remarques préliminaires conditionnant le choix du protocole d'extraction :

- la difficulté d'extraction des composés polyphénoliques est accrue notamment dans le cas des tannins dans la mesure où ces tannins stockés dans certains compartiments cellulaires (vacuoles, membranes et parois) seront, lors du broyage mis en contact avec l'ensemble des métabolites cellulaires et en particulier des protéines pour lesquelles ils ont une grande affinité ;

- le choix des solvants spécifiques pour ce type de composés est également déterminant pour l'efficacité de l'extraction. Des solvants polaires tels que le méthanol, l'éthanol ou l'acétone sont souvent utilisés (Hagerman et Butler, 1978 ; Davis et Hosney, 1979 ; Magnolato *et al.*, 1986). Marquart *et al.*, 1977 utilisent l'eau pour l'extraction des tannins des téguments de féverole (pour mimer la situation rencontrée dans le tractus digestif). Nous avons écarté volontairement l'utilisation des acides tels que l'acide chlorhydrique comme le préconisent plusieurs auteurs (Price *et al.*, 1978 ; Carmona *et al.*, 1991) ; en effet la fragilité de la liaison interflavane peut entraîner des modifications du degré de polymérisation initial par clivage de certains polymères ou oligomères ;

- l'extraction doit rester simple et peu coûteuse en temps pour une application à des échantillonnages importants.

1. Matériel végétal

Les échantillons de Pois et de Féverole cultivés dans différentes localités (Espagne et France) sont distribués par le John Innes Institute, Norwich (Angleterre ; Programme PEA ECLAIR). Nous présenterons à la page 98 le protocole d'échantillonnage des lots de graines au sein de ce programme.

Une autre collection de Féverole provient de la station de génétique et d'amélioration des plantes de l'INRA de Dijon. Pour appréhender la variation génétique, les cultures sont effectuées sur des parcelles généralement choisies dans le même lieu ; la récolte globale concerne 100 plantes et le lot de graines à analyser est prélevé sur cette récolte.

Conditions d'extraction	Solvant	T°C	Temps mn	Phénols totaux	Tannins condensés		
					BuOH-HCl	Vanilline	%résidus
0,5 g de MS Volume : 2x100ml	MeOH/eau (70/30)	ambiante	2x20	32,8 ±2,1	62,5 ±3,5	36,1 ±1,7	27,4
		ébullition	2x20	68,3 ±3,2	98,8 ±1,3	50,1 ±0,4	13,5
	acétone.eau (70/30)	ambiante	2x20	28,5 ±2,2	51,2 ±3,6	29,3 ±1,4	34,8
		ébullition	2x20	78,3 ±2,2	116,5 ±3,3	58,4 ±0,2	11,4
1 g de MS Volume : 2x100ml	MeOH/eau (70/30)	ambiante	2x20	33,5 ±0,8	58,1 ±4,5	33,9 ±1,1	37,1
		ébullition	2x20	73,8 ±2,5	106,1 ±0,9	45,4 ±2,3	9,2
	acétone.eau (70/30)	ambiante	2x20	35,0 ±1,4	62,4 ±4,3	41,1 ±3,2	29,5
		ébullition	2x20	83,5 ±0,3	107,1 ±1,7	54,4 ±2,2	12,4

Tableau 7 : Teneurs en phénols totaux (éqs catéchine), tannins condensés (en mg.g⁻¹ pour le BuOH/HCl et en éqs catéchine pour le test vanilline) des téguments du pois (*Pisum sativum* V 256 S1) exprimées en mg g⁻¹ de tégument, calculées après diverses procédures d'extraction.

2. Préparation des échantillons

Les graines reçues sont stockées dans des dessiccateurs à l'obscurité et à 4°C. Afin d'éviter les problèmes de complexation des tannins avec des protéines, nous avons jugé nécessaire de séparer les téguments des cotylédons : les graines sont débarrassées des impuretés et décortiquées manuellement. Les téguments sont broyés en présence d'azote liquide juste avant leur extraction afin de limiter les phénomènes d'oxydation.

3. Extraction proprement dite

La mise au point du protocole d'extraction a été réalisée sur une variété de pois *Pisum sativum arvense* (variété n° 256 S1) riche en tannins condensés. Différents protocoles ont été essayés en faisant varier la température, le type de solvants et la quantité de matière première végétale.

Les résultats sont regroupés dans le **tableau 7**.

Il apparaît tout à fait clair que la méthode à chaud sous reflux améliore sensiblement l'extractibilité des composés polyphénoliques. Le taux d'extraction à chaud est en moyenne de deux fois supérieur par rapport à un mélange à froid. L'efficacité du mélange méthanol-eau semble toutefois moins nette que celle de l'acétone à 70%.

L'augmentation de la matière première pour un même volume de solvant ne pénalise pas le rendement global d'extraction. Cependant, dans tous les cas, l'extractibilité des tannins n'est jamais totale. Le dosage par oxydation en milieu butanol-acide pratiqué directement sur les résidus secs après extraction montre que plus de 27 % (à froid) et 9 % (à chaud) des tannins ne sont pas encore extraits. Ces teneurs correspondent certainement à des molécules très polymérisées et fixées sur des structures de parois cellulaires.

Nous avons décidé de travailler avec un mélange acétone-eau à chaud sous reflux appliqué sur 0,5 g de matière sèche pendant 2 x 20 mn. Afin d'éviter le phénomène d'oxydation dans les extraits polyphénoliques on utilise du métabisulfite de sodium à 0,2% dans l'eau à raison de 1 ml par 100 ml du mélange solvant.

B. METHODES CHIMIQUES DE DOSAGE

De nombreux essais ont été développés pour quantifier les composés polyphénoliques et notamment les tannins chez les plantes. On peut les classer en deux groupes : les méthodes colorimétriques et les dosages biologiques.

1. Dosages spectrophotométriques

1. 1. Dosage des phénols totaux

Le pouvoir réducteur des composés polyphénoliques a le plus souvent été mis à profit pour leur dosage. Les méthodes d'oxydo-réduction incluent les méthodes de Folin-Denis (Swain et Hillis 1959), Folin-ciocalteu (Marigo 1973) et la méthode au bleu de Prusse (Price et Butler 1977). Ces méthodes qui mesurent le potentiel rédox des phénols, ne sont pas spécifiques d'une famille structurale particulière. Elles intéressent les tannins aussi bien que d'autres composés phénoliques y compris les acides aminés aromatiques et également des composés non aromatiques tels que l'acide ascorbique.

Pour rendre ces dosages plus spécifiques, on les associe à un passage sur PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone) insoluble (Lomis et Bataille 1966). Ce polymère possède la propriété d'adsorber spécifiquement les composés polyphénoliques et permet la réalisation de dosages différentiels.

Ces divers dosages ont été comparés par Brun (1991) qui conclut que la technique au bleu de Prusse (couplée au passage sur PVPP) est la plus efficace.

1.1.a. Méthode au bleu de Prusse

Cet essai est basé sur la réduction de l'ion ferrique (Fe^{3+}) en ion ferreux (Fe^{2+}) par les tannins et autres composés phénoliques, qui conduit à la formation d'un complexe de couleur bleu de Prusse d'ou le nom de la méthode. L'absorbance de ce complexe est mesurée à 725 nm. L'intensité de la réaction colorée est fonction du degré d'hydroxylation et de polymérisation des composés polyphénoliques présents.

Le protocole de dosage que nous avons appliqué est le suivant :

- une prise d'essai de 7 ml d'extrait est additionnée de 10 ml d'eau distillée ;
- après ajout de 1 ml de réactif de chlorure ferrique (FeCl_3 0,1 M dans HCl 0,1 N) suivi immédiatement de 1 ml d'hexacyanoferrate de potassium ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,008 M dans l'eau), la réaction se développe pendant 10 mn exactement à température ambiante ;

- l'absorbance est mesurée à 725 nm puis soustraite de la valeur du blanc (H₂O+réactifs) dosé après le même temps.

Une gamme étalon est établie avec une solution de catéchine standard (Sigma).

1.1.b. Adsorption sur PVP

Cette technique est basée sur la capacité du polymère polyvinylpyrrolidone d'adsorber la totalité des phénols par le biais des liaisons hydrogènes.

Après centrifugation, le surnageant contenant les molécules non phénoliques mais pouvant réagir avec la bleu de Prusse, est dosé de la même manière que précédemment.

Protocole :

a) Conditionnement du PVP : dans un récipient, on fait bouillir le PVPP dans une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 10% pendant 10 mn. Le PVPP est rincé à l'eau distillée puis à l'acétone et finalement séché à l'étuve à 70°C.

b) Adsorption : 25 ml d'extrait dilué 4 fois moins que pour le premier dosage au bleu de Prusse sont ajustés à pH 3,5. 2 g de PVP conditionné sont mis en contact avec l'extrait sous agitation magnétique pendant 10 mn. Après décantation ou centrifugation à 3500 t/mn, une aliquote du surnageant est prélevée et dosée au bleu de Prusse.

* La différence des résultats des deux dosages réalisés avant et après adsorption sur PVP donne la teneur exacte en phénols totaux.

1. 2. Dosage des tannins condensés

Pour caractériser les tannins condensés ou proanthocyanidines deux méthodes complémentaires ont été retenues : le test à la vanilline et la production d'anthocyanidines par oxydation en milieu alcool-acide et à chaud .

1.2.a. Test vanilline

Le test vanilline est largement employé comme méthode de détermination quantitative des tannins condensés dans le sorgho, les fourrages et les graines de Légumineuses (Broadhurst et Jones,1978 ; Price *et al.*,1978a ; Brun *et al.*,1992).

Ce test est basé sur la réaction de condensation des composés polyphénoliques avec la vanilline en milieu acide. Il est spécifique des flavane-3-ols, dihydrochalcones et proanthocyanidines (Burns, 1971 ; Price *et al.* , 1978)

La vanilline se combine avec un cycle benzénique des flavanes selon le mécanismes de condensation des aldéhydes et des phénols. La condensation se fait sur les sommets des cycles benzéniques selon le mécanisme proposé par Ribereau Gayon (1968).

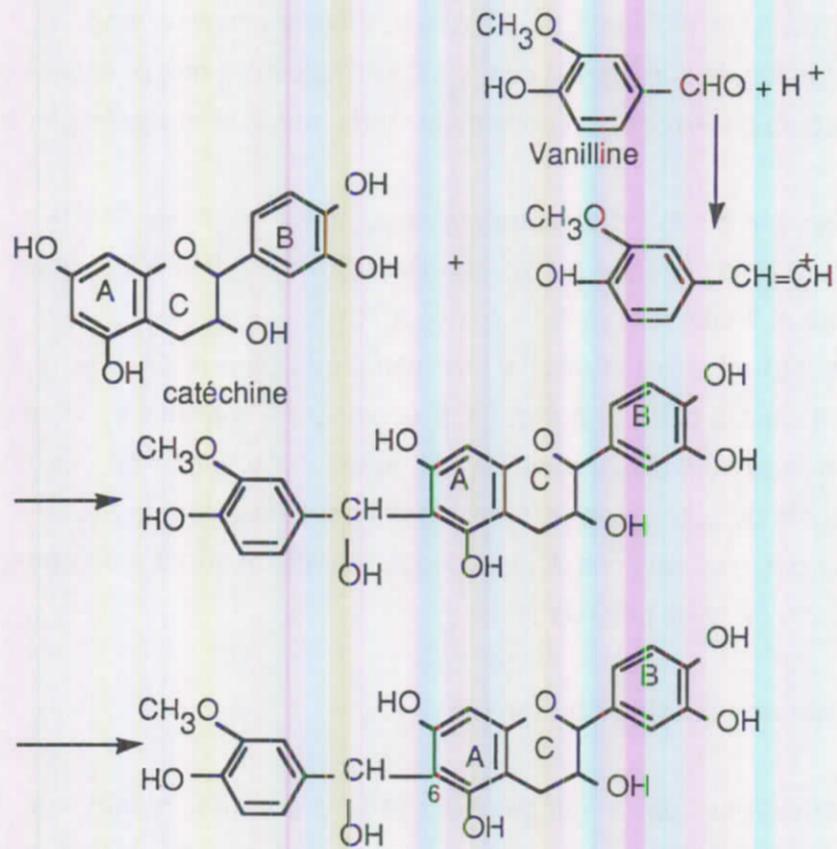


Figure 9 : condensation de la vanilline sur un flavane-3-ol

La condensation de la vanilline sur une leucoanthocyane ou flavane-3,4-diols est illustrée par la **Figure 9**.

Ce mécanisme montre le rôle privilégié que joue le carbone 6 du noyau A des flavan-3-ols dans la réaction avec la vanilline. En effet, sous l'action des groupements hydroxyles, les électrons se concentrent sur cet atome de carbone créant une charge négative qui facilite les substitutions par les réactifs électrophiles. Vraisemblablement pour les mêmes raisons, les positions 6 et 8 sont privilégiées dans les liaisons interflavaniques lors des réactions de condensation.

D'après Csochanska *et al.*, 1979, Foo et Porter 1980, Haslam 1987 les liaisons entre les molécules flavanoliques au cours des processus de condensation ont lieu préférentiellement entre les carbones 4 et 8.

Les travaux de Butler *et al.*, 1982 ont montré que lorsque l'acide acétique glacial remplace le méthanol comme solvant d'extraction, la coloration est la même pour des concentrations équimolaires de monomères, dimères ou trimères de flavanes.

Le protocole utilisé est le suivant :

- le réactif est préparé extemporanément, à volumes égaux, d'une solution de vanilline à 5,8% dans le méthanol et d'une solution d'acide chlorhydrique à 24% dans le méthanol ;
- 5 ml de réactif vanilline-HCl sont ajoutés à 1 ml d'extrait phénolique ;
- la réaction se déroule au bain marie à 30°C pendant 20 mn ;
- l'absorbance est lue à 500 nm ;

La catéchine (flavan-3-ol monomère) est le plus souvent utilisée comme standard.

1.2.b. Production d'anthocyanidines par oxydation à chaud

La production d'anthocyanidines est un dosage spécifique des tannins condensés. En effet une des propriétés caractéristiques des proanthocyanidines est la formation d'anthocyanidines par chauffage en milieu acide et alcool, ce qui les différencie le mieux des flavan-3-ols monomères. La procédure originale est décrite par Bate-Smith (1973). Par la suite, de nombreux auteurs ont utilisé cette propriété des polymères de flavanols pour les mettre en évidence dans de nombreux végétaux (Haslam, 1977 ; Porter *et al.*, 1986). Haslam 1977, propose le schéma d'oxydation suivant dans le cas de la procyanidine B3 (**Figure 10**).

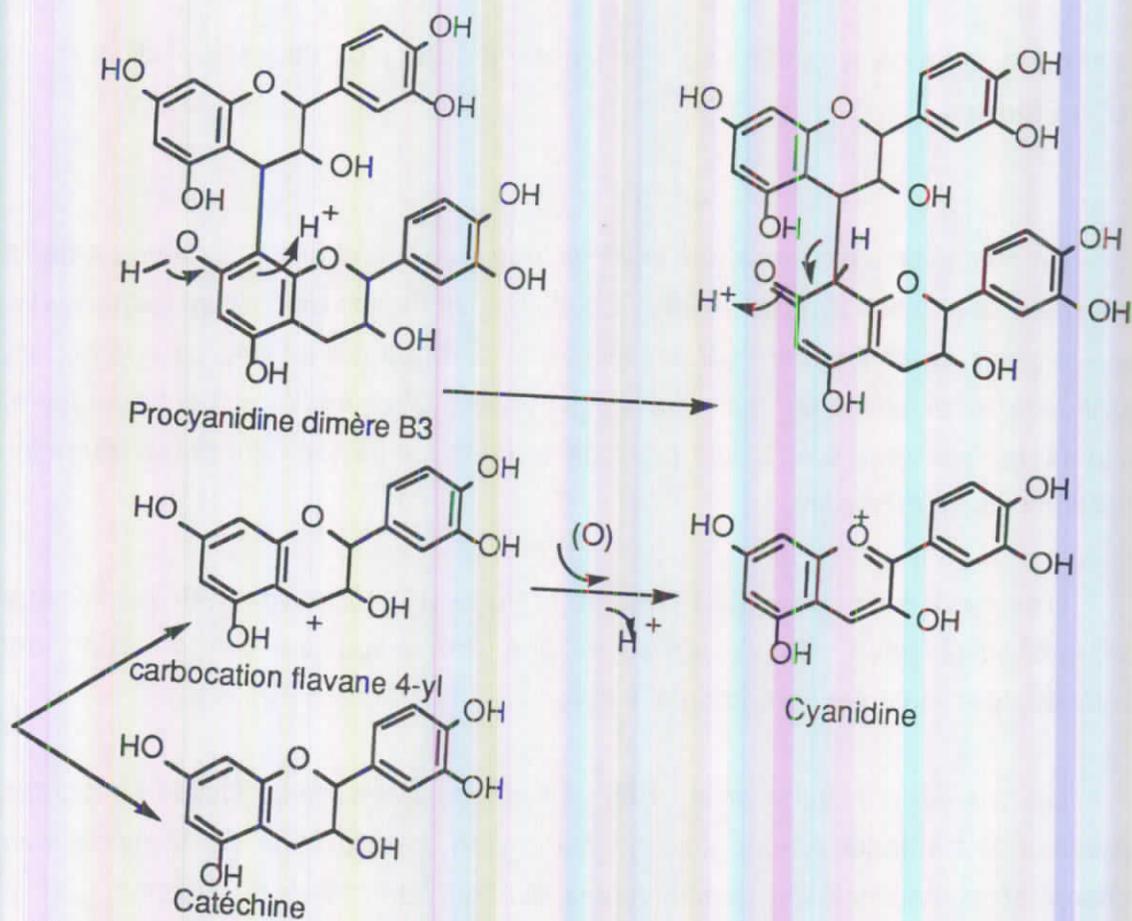


Figure 10 : Oxydation des proanthocyanidines (Haslam 1977)

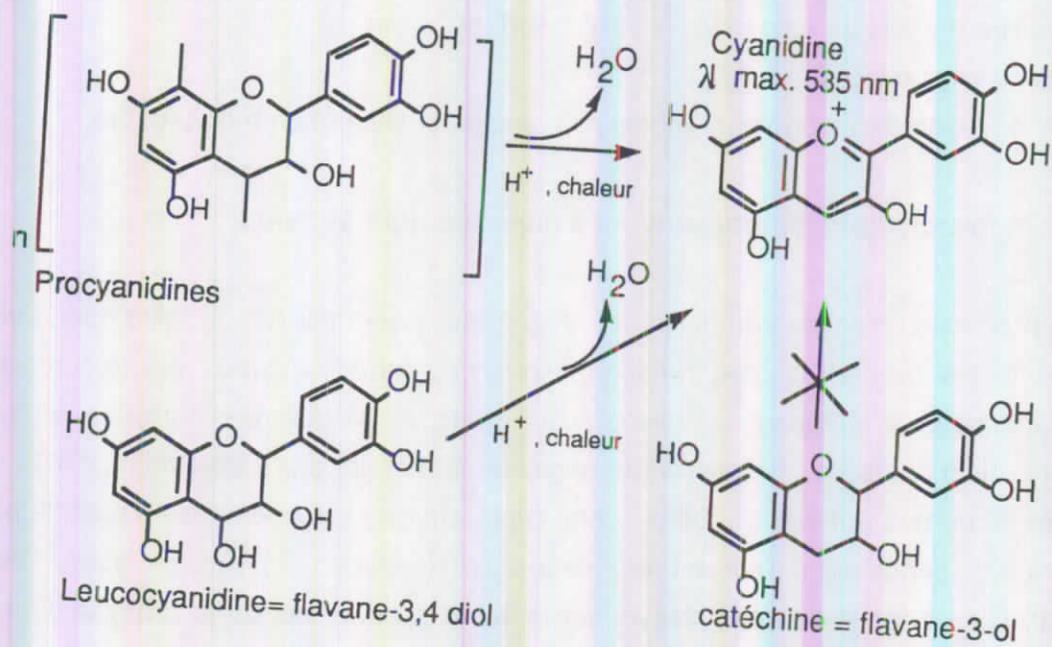


Figure 11 : Schéma d'oxydation des proanthocyanidines et des flavane-3,4-diols en anthocyanidines.

Dans un premier temps il y a formation, à partir du composé de départ d'un dimère protoné. La rupture de la liaison flavanolique C4-C8 favorise, la formation de la catéchine et un carbocation très réactif. Finalement ce composé intermédiaire se transforme par perte de proton en anthocyanidine. On notera que pour supprimer complètement cette dernière étape, il suffit d'opérer en milieu privé d'oxygène.

Ce dosage dénombre toutes les unités catéchiques engagées dans la formation des liaisons interflavanoliques et ne réagit pas avec les monomères libres (**Figure 11**)

Pour ce dosage les conditions retenues sont les suivantes :

- 0,5 ml de l'extrait polyphénolique sont ajoutés à 6 ml d'une solution de BuOH-HCl concentré (95/5).
- un catalyseur de réaction est alors ajouté (sulfate ammonium ferrique)
- la solution est portée à 100° pendant 2 heures au bain marie.

Les deux anthocyanes principalement formées lors de l'oxydation complète des extraits de Pois et de Féverole sont la delphinidine et la cyanidine avec des maxima d'absorption dans le milieu butanol acide respectivement de 547 nm et 558 nm.

Ainsi pour la lecture au spectrophotocolorimètre des hydrolysats la valeur moyenne de 550 nm a été retenue. La densité optique à cette longueur d'onde permet le calcul de la teneur en proanthocyanidines, exprimées en mg/g d'anthocyanidines grâce à la formule :

$$T = A / E \cdot Vd / P.$$

A = Absorbance à la λ max

E 1% 1 cm = coefficient d'extinction massique = 150 (bate-Smith 1973)

V= volume de l'extrait total

d = facteur de dilution

P = poids de la matière sèche.

2. Dosages biologiques

La propriété des tannins de former des complexes avec les protéines constitue le principe de base de nombreuses méthodes biologiques de détermination des tannins (Makkar 1989, Deshpande *et al* .,1986). Ces méthodes de complexation ont en outre l'avantage de fournir des informations sur l'activité biologique des tannins dans l'alimentation (Hagerman et Butler, 1989), c'est à dire sur le pouvoir tannant des extraits.

Pour quantifier les tannins *via* la précipitation protéique, différentes protéines sont employées comme la gélatine, la caséine, l'albumine de sérum bovin (BSA), l'hémoglobine ainsi que différentes enzymes. Chaque méthode de complexation tannins-protéines apportera une réponse différente pour une même source de tannin. Ceci est dû au fait que la tendance des tannins à former des complexes insolubles avec les protéines est influencée par plusieurs facteurs comme les caractéristiques des tannins eux mêmes (degré de polymérisation, hétérogénéité de la structure), la nature de la protéine (glycosylation, composition en aminoacides, poids moléculaire) et les conditions de réaction (facteurs de l'environnement physico-chimique : pH, température, temps de réaction, concentrations relative des produits) (Asquith et Butler, 1986 ; Asquith *et al.*, 1987 ; Hagerman et Butler, 1989). Les tannins ont une grande affinité pour la gélatine, riche en résidus proline (Mole *et al.*, 1990a).

Afin d'estimer le pouvoir complexant des tannins vis à vis des protéines nous avons éprouvé deux méthodes : le test à l'hémoglobine que l'on nomme hémanalyse ou pouvoir tannant et la complexation à la gélatine

2.1. Hémanalyse

Les tannins précipitent l'hémoglobine du sang frais d'ovins ; il s'ensuit une perte de coloration qu'il suffit de doser et de quantifier grâce à une gamme étalon préétablie avec un tannin standard.

Schultz *et al.*, 1981, Porter et Woodruffe 1984, indiquent qu'il existe une relation linéaire entre l'absorbance à 578 nm du surnageant, obtenu par centrifugation, et la concentration en tannins. L'utilisation d'un milieu tamponné a parfois été recommandé (Porter et Woodruffe 1984), mais nos essais dans ce sens n'ont pas montré d'amélioration de la courbe étalon.

Le protocole utilisé est le suivant :

- à 2 ml d'extrait phénolique dilué dans l'eau, on ajoute 2 ml de sang de mouton frais à environ 1,2 % dans de l'eau distillée ;
- le mélange est agité, puis laissé au repos pendant 10 mn ;
- après centrifugation 20 mn à 4000 t /mn, l'absorbance du surnageant est lue à 578 nm.

2.2. Complexation à la gélatine

Cette molécule présente l'intérêt de posséder une forte affinité pour les tannins par sa richesse en résidus prolines (Hagerman et Butler 1981 ; Kleiber 1990). Elle est probablement une des méthodes les plus sensibles.

Le protocole utilisé est le suivant :

- à 10 ml d'extrait phénolique dilué, ajusté à pH 4,5 sont ajoutés 0,2 ml d'une solution protéique à 1% de gélatine dans de l'eau salée à 10% de NaCl ;
- après agitation et centrifugation, on effectue un dosage du surnageant par le bleu de Prusse. La teneur en tannins actifs est donnée par la différence entre les dosages réalisés avant et après précipitation.

3. Relation entre les méthodes utilisées

3.1. Les unités

Les calculs de teneurs sont référencés à une droite de calibration réalisée à partir de (+)-catéchine ou d'acide tannique selon le dosage considéré :

- les phénols totaux sont exprimés en équivalents catéchine ou acide tannique ;
- les tannins condensés :
 - en équivalents catéchine pour le test vanilline ;
 - en mg d'anthocyanidines par g de matière sèche en utilisant le $E^{1\%}_{1\text{cm}} = 150$ proposé par Bate-Smith 1973 pour le test BuOH-HCl.
- le pouvoir tannant (hémanalyse) en équivalents acide tannique.

3.2. Spécificités et limites des méthodes utilisées

3.2.a. Les phénols totaux

La méthode au bleu de Prusse est très sensible et reproductible (coefficient de variation = 1,4%), et la réponse est linéaire pour la majorité des composés, pour des D.O. n'excédant pas 1,0.

Le réactif réagit avec une gamme étendue des substances phénoliques et ne fait pas de discrimination entre les polyphénols tannants et les phénols simples.

La **figure 12** représente la réactivité du bleu de Prusse avec une solution catéchique témoin.

3.2..b Les tannins condensés

a) Production d'anthocyanidines par oxydation au BuOH-HCl et à chaud : cette méthode est très spécifique car elle concerne uniquement les tannins condensés. Elle donne une estimation de la quantité de proanthocyanidines présentes dans les extraits tégumentaires. La méthode a été validée par Brun 1991 qui observe une reproductibilité supérieure à 95%.

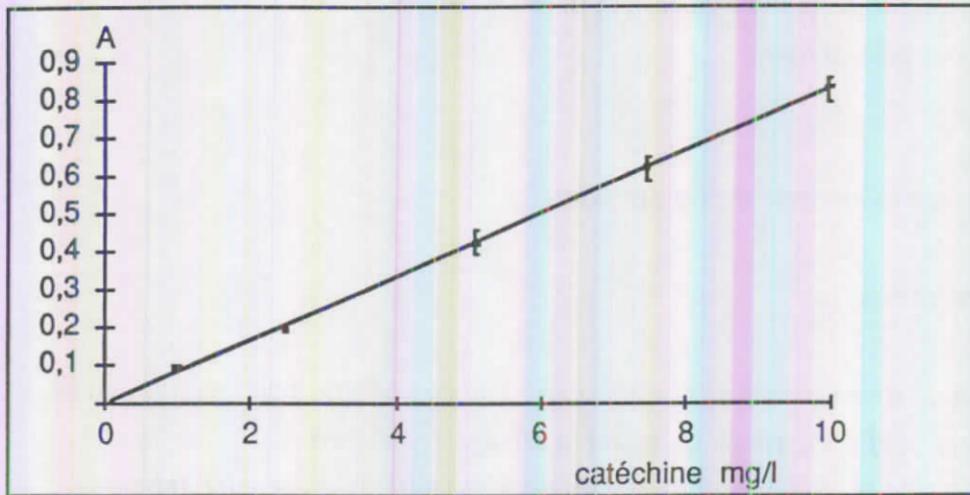


Figure 12 : Courbe étalon de la catéchine avec le réactif de bleu de Prusse.

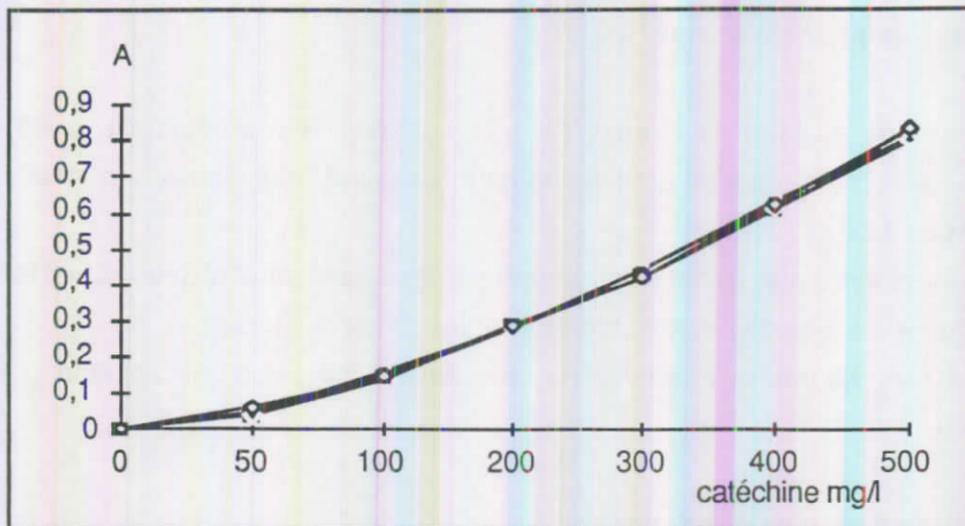


Figure 13 : reproductibilité du test vanilline sur une solution de (+) catéchine.

La présence d'alcool augmente le rendement de la réaction et permet ainsi de travailler avec de faible quantité d'acide. BRUN (1991) constate que le volume du réactif influe également sur le rendement en anthocyanidines et que la coloration peut être intensifiée par addition d'ions métalliques, en particulier de fer, sous forme de sulfates d'ammonium ferrique ; celui ci agit comme catalyseur de la réaction (Tableau 8).

Tannins de Mimosa (mg/ml)	Volume du réactif				
	3 ml	6 ml	9 ml	12 ml	6 ml + Fe+++
0,5	0,15	0,17	0,15	0,15	0,21
1	0,33	0,33	0,31	0,29	0,41
1,5	0,39	0,49	0,44	0,41	0,57
2	0,64	0,65	0,59	0,53	0,74
3	0,92	0,99	0,88	0,82	1,01

Tableau 8 : Effet du volume de réactif sur le rendement en anthocyanidines produites par traitement au BuOH-HCl, exprimé en mg par ml de solution de tannins de Mimosa (d'après le E1%/1cm = 150 de Bate-Smith), (Brun 1991).

b) Vanilline : cette méthode ne dose que la catéchine libre ou terminale. Elle mesure donc le nombre de molécules de polymères quelque soit le degré de polymérisation, mais aussi le nombre de molécules de catéchine monomère libre. Nous avons testé la reproductibilité de cette méthode sur la catéchine, elle s'est avérée bonne (Tableau 9).

Concentration catéchine(mg/l)	Absrbance à 500 nm			
	1	2	3	4
50	0,05	0,04	0,04	0,06
100	0,16	0,14	0,15	0,15
200	0,28	0,29	0,28	0,29
300	0,44	0,42	0,42	0,42
400	0,63	0,61	0,61	0,62
500	0,81	0,81	0,80	0,83

Tableau 9 : reproductibilité du test vanilline sur 4 gammes étalon de catéchine.

La figure 13 représente la reproductibilité de la vanilline par rapport à une solution de catéchine.

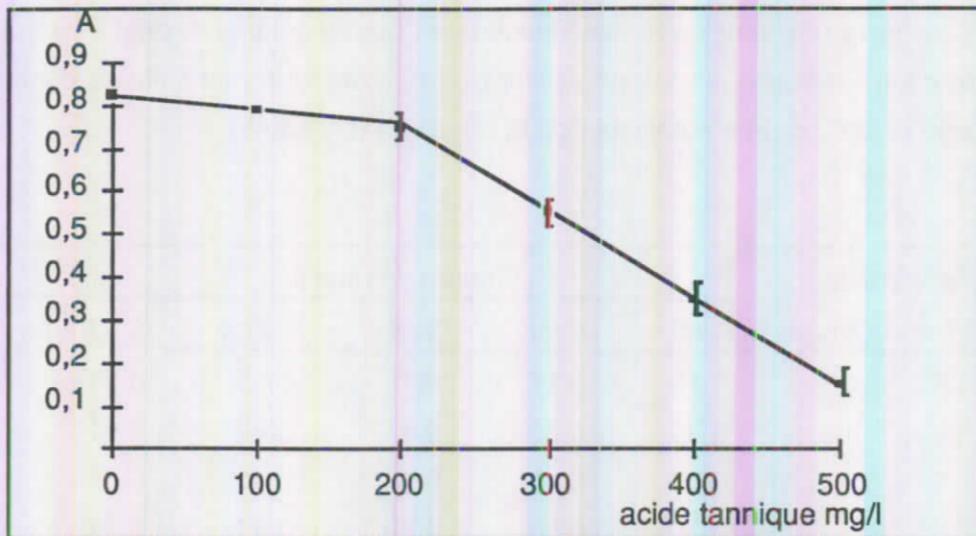


Figure 14 : Réponse de la précipitation de l'hémoglobine à une solution d'acide tannique.

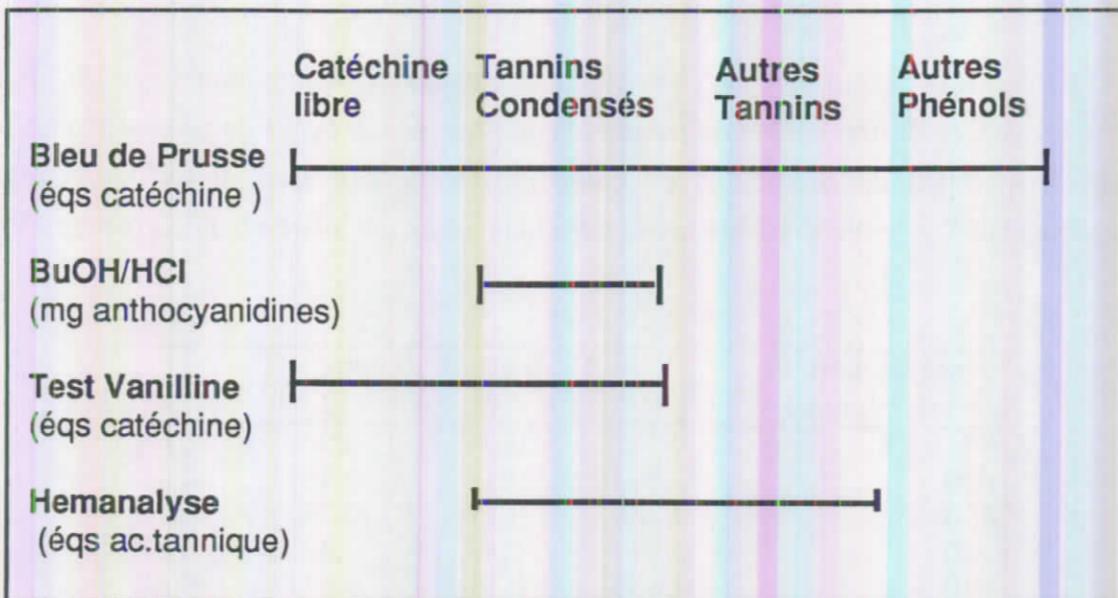


Figure 15 : spécificité des méthodes analytiques eu égard aux différentes classes chimiques des polyphénols.

3.2.c. Le pouvoir tannant

Le test de l'hémoglobine permet l'estimation de la capacité tannante des extraits tégumentaires. Il existe une très forte spécificité de cette réaction tant au niveau des protéines (Hagerman et Butler 1981) que des tannins (Asquith et Butler 1986). Ainsi, l'hydroxylation supplémentaire de la prodelphinidine par rapport à la procyanidine accroît son potentiel tannant, et parallèlement, la complexation est fonction de la taille des protéines, de leur richesse en certains acides aminés tels que la proline. D'autres produits peuvent entrer en compétition avec les protéines pour se lier au tannins et biaiser la détection du pouvoir tannant ; c'est le cas des polysaccharides ou des alcaloïdes (Haslam 1987, Ozawa *et al.*, 1987).

La fraîcheur du sang s'est révélée être un facteur important pour la reproductibilité de la réaction. Celui-ci a été conservé à l'obscurité à 4°C et n'est utilisé qu'extemporanément. La stabilité de l'hémoglobine vérifiée par spectrophotomètre est alors bonne.

La **figure 14** représente la réponse de précipitation de l'hémoglobine à une solution d'acide tannique standard. La courbe étalon obtenue n'est jamais linéaire, en raison de la nécessité d'une quantité minimum de tannins en deçà de laquelle la précipitation n'a pas lieu (d'où apparition d'un trouble), ainsi qu'en raison du mécanisme réactionnel, probablement coopératif (la fixation d'une molécule de tannin sur une protéine favorisant la fixation des suivantes). La zone de linéarité est comprise entre 2 et 5 mg/ml, les prises d'essai devront donc être ajustées de façon à donner des absorbances correspondant à cette zone. La courbe étalon est établie à chaque série de dosages.

La **figure 15** résume la spécificité des méthodes analytiques eu égard aux différentes classes chimiques des polyphénols.

3.3. Indices calculés

Ces dosages permettent d'estimer 2 indices :

- Rapport "résultats Production d'Anthocyanidines sur résultats du test vanilline" = **PA/Van**.

La comparaison des résultats des deux dosages, d'une part celui du test vanilline qui est sensible aux unités terminales des tannins condensés ainsi qu'aux monomères catéchiques libres et d'autre part celui de la production d'anthocyanidines par oxydation qui dénombre toutes les unités flavanes des seuls polymères peut nous donner une idée du degré de polymérisation moyen des proanthocyanidines (Butler *et al.*, 1982 ; Stickland, 1984 ; Brun, 1991).

- Rapport "résultats du dosage à l'hémoglobine (pouvoir tannant) sur les teneurs en phénols totaux" = **PT/Pht**, nous renseignera sur l'efficacité tannante des phénols de l'extrait.

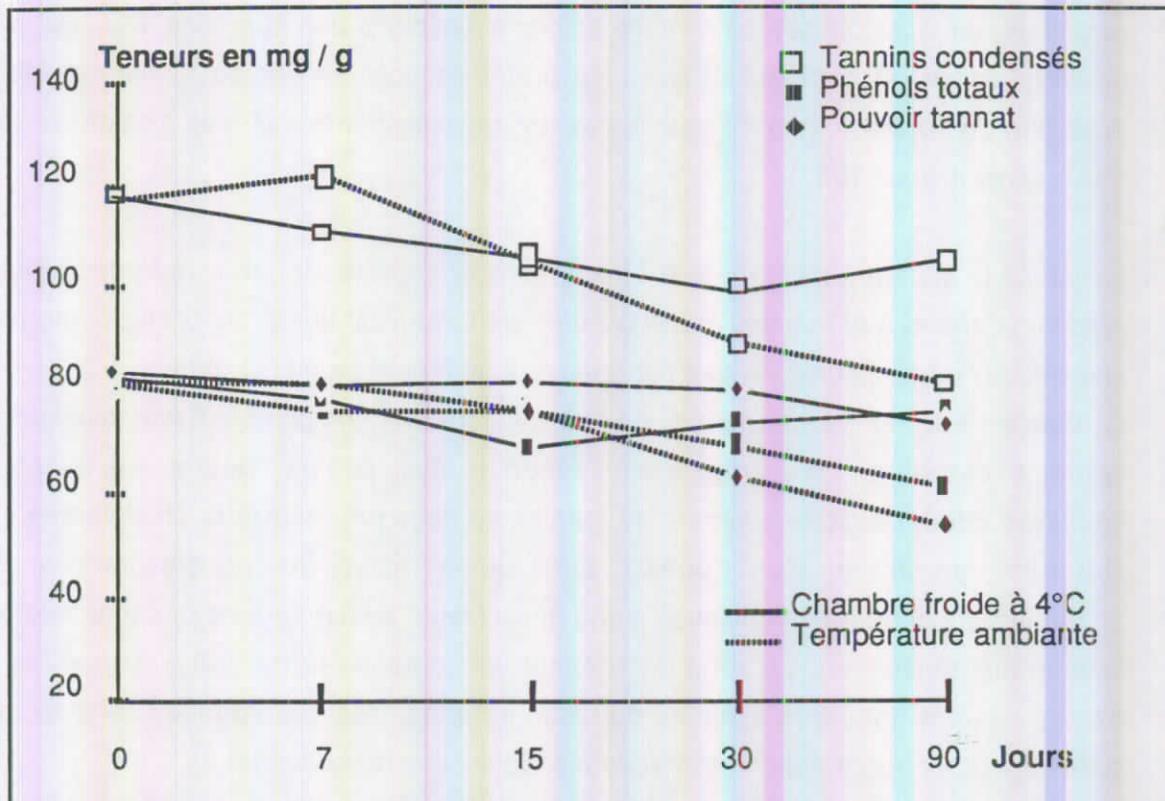


Figure 16 : Evolution des composés polyphénoliques en fonction des conditions de stockage (température et temps)

4. Effet des conditions de stockage sur les tannins condensés des téguments

Les tannins condensés s'oxydent facilement et peuvent de ce fait s'altérer lors des diverses manipulations qui mènent de la gousse au champ aux téguments dans un mortier en vue d'extraction.

Marquart *et al.*, 1978 ont mesuré l'influence du temps de stockage des graines entières de *Vicia faba* après récolte sur la concentration en tannins condensés, évaluée par le test vanilline. Cette teneur chute de 11% entre les deux séries de mesures effectuées respectivement après 2 et 14 mois de stockage.

Cansfield *et al.*, 1980, ont observé, au cours de l'entreposage des graines de féverole, des changements de couleur des téguments. Ces changements de couleur traduisent probablement au niveau moléculaire une évolution ou une oxydation du contenu polyphénolique principalement des tannins.

Argentine *et al.*, 1992 soulignent la très grande réactivité des composés polyphénoliques en milieu aqueux, à la lumière et en présence d'oxygène.

4.1. Préparation des échantillons

Des téguments de *Pisum sativum arvense* (variété n° 256 S1) sont broyés finement en présence d'azote liquide. Une partie est stockée dans un dessiccateur à 4°C en chambre froide, l'autre est laissée dans un récipient à l'air libre. L'extraction est réalisée selon le protocole décrit précédemment et les dosages effectués au temps 0, après 7 jours, 15 jours, 30 jours et enfin 90 jours de stockage.

4.2. Résultats

Les dosages ont concerné les phénols totaux (Bleu de Prusse), les tannins condensés (par oxydation au BuOH-HCl), le pouvoir tannant (par hémanalyse) et sont représentés sur la **figure 16**.

Les téguments broyés et stockés à température ambiante perdent rapidement de leur efficacité tannante.

Si après 15 jours d'expérimentation, les dosages ne détectent pas de différence sensible pour les deux modes de stockage, il n'en est pas de même après une durée de 30 jours de stockage. Comparativement aux conditions basse température, les pertes à

l'ambiante sont surtout nettes après 15 jours de stockage ; Ce phénomène est encore accentué après 90 jours : la perte moyenne en tannins est de l'ordre de 25%.

4.3. Conséquences

Consécutivement pour notre étude nous avons adopté la règle suivante :

- le broyage des téguments, en présence d'azote liquide, se fait juste avant l'extraction.
- l'extraction proprement dite se déroule en présence d'un antioxydant (le métabisulfite de sodium)
- les séries de dosages sont effectuées dans la même journée.

C. METHODES PHYSIQUES DE DOSAGE

Pour répondre à la démarche de tri du sélectionneur, il est important de disposer de méthodes non destructives, rapides et fiables permettant d'estimer le contenu phénolique des géotypes engagés dans des programmes de sélection.

L'objectif de notre approche est de vérifier si les méthodes physiques peuvent remplacer les dosages chimiques très coûteux en temps. Pour cela chaque graine a été appréhendée à l'aide de deux types d'analyses : des analyses physiques non destructives (spectrocolorimétrie et spectrométrie dans le proche infra rouge) et des analyses chimiques destructives, les deux devant s'adresser aux composés phénoliques des téguments , c'est à dire la composante facteurs antinutritionnels (FAN) phénoliques.

La comparaison des résultats des méthodes chimiques avec ceux des méthodes physiques non destructives doit permettre de vérifier s'il peut y avoir validation des méthodes non destructives que sont spectrocolorimétrie et spectroscopie proche infrarouge.

1. La méthode colorimétrique

Cette technique déjà utilisée par de nombreux auteurs dont le pôle d'intérêt est la couleur florale (Jay *et al.*, 1993) repose sur une analyse spectrale de la lumière réfléchiée par le tégument éclairé par une source lumineuse standard. Les courbes de réflectance (entre 400 et 700 nm) sont de véritables données de base de la colorimétrie à partir

desquelles la couleur est ensuite exprimée dans l'échelle CIELab définie en 1976 par la Commission Internationale d'Eclairage (CIE 1985).

Les informations physiques peuvent être utilisées directement (valeurs de réflectance versus longueur d'onde) ou indirectement alors traduites dans le système CIELab.

Chaque couleur y est exprimée par ses coordonnées, dans un espace tridimensionnel (L^* , a^* , b^*) :

- l'axe vertical L^* exprime la clarté de la couleur dont les valeurs sont comprises entre 0 (noir absolu) et 100 (blanc parfait) ;
- le plan de chromaticité est défini par deux axes perpendiculaires a^* (balance entre le magenta + et le vert -) et b^* (balance entre le jaune + et le bleu -).

Ces coordonnées donnent accès à de nouveaux indices, plus parlants :

- l'angle de teinte (h) = $\arctan(b^*/a^*)$ ou couleur de base,
- le chroma (C^*) = $(a^{*2} + b^{*2})^{0,5}$ ou saturation (qui renseigne sur la pureté de la couleur).

Ces coordonnées colorimétriques sont calculées par rapport à une source de référence l'illuminant (ici CIE D65) et un Observateur de référence (Observateur CIE 10°). Cette analyse supprime toute subjectivité liée à l'appréciation visuelle de la couleur.

L'appareil utilisé pour les mesures est un spectrocolorimètre CHROMA SENSOR-5 (CS-5), associé à un ordinateur IBM. Pour l'enregistrement des caractéristiques spectrales, les graines sont placées devant un port de mesure correspondant à un orifice de 3 mm diamètre.

Quelques valeurs

Pour chaque variété, les mesures de colorimétrie sont réalisées directement sur la graine entière. A titre d'exemple, nous présentons dans la **figure 17** les courbes de réflectance et les coordonnées CIELab de 4 variétés de féveroles.

Il en ressort que :

- la variété blanche représentée par Blandine réfléchit les radiations lumineuses de façon importante ; ce qui se traduit par des valeurs de clarté L^* de l'ordre de 65,5 sur une échelle de 100 ;
- inversement, le génotype 245 présentant un tégument noir ne réfléchit pratiquement pas la lumière ; cela se traduit par des valeurs de clarté L^* faibles de l'ordre de 24,5 ;
- le tégument vert représentant le génotype n° 893 réfléchit globalement beaucoup plus de lumière que le tégument beige (949T) ce qui se traduit par une clarté plus élevée chez le génotype à tégument vert.

% Reflectance = f(Long. Onde)

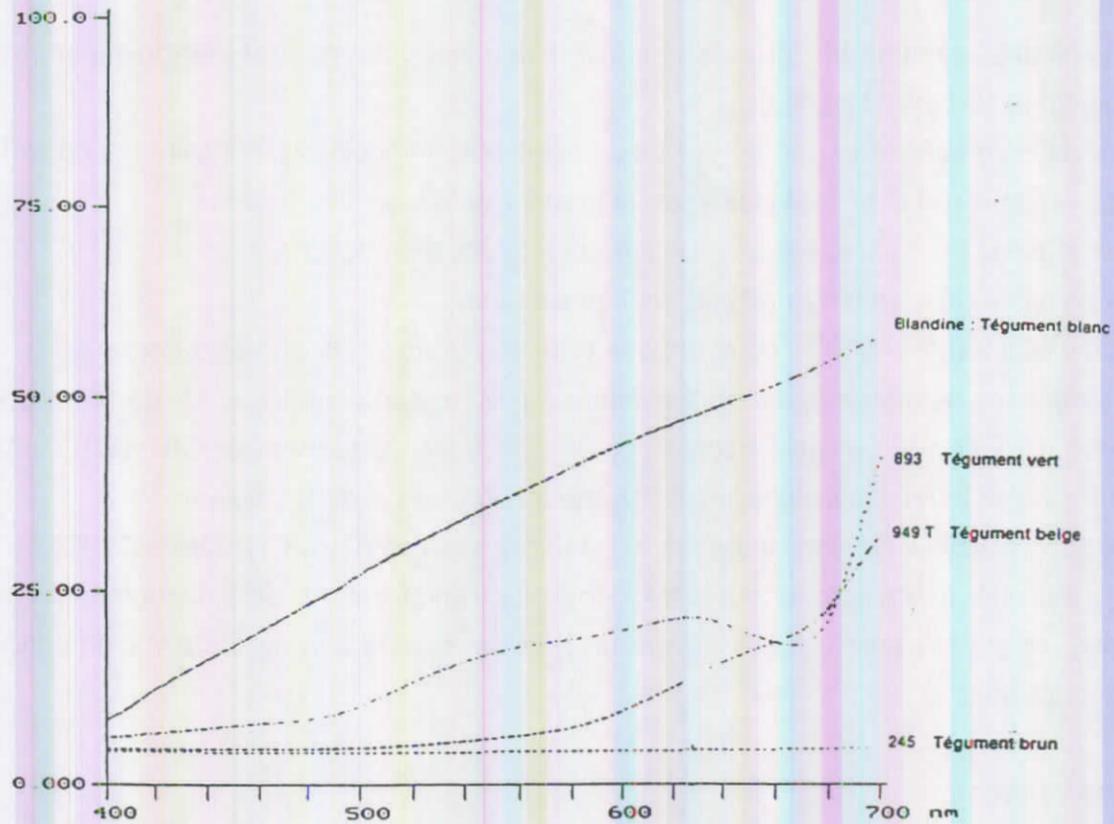


Figure 17 : courbes de réflectance des graines des génotypes de féverole : blandine, 893, 949 T et 245 .

CIELAB Coordonnées	L*	a*	b*	C*	h
Blandine	66,50	5,42	28,39	28,90	79,19
893	47,13	5,13	23,65	24,20	77,77
949 T	31,85	14,48	10,58	17,93	36,16
245	24,50	0,56	0,18	0,59	18,02

Si l'on tient compte des valeurs de h (couleur de base), on s'aperçoit que la classification de la couleur des graines estimée par l'oeil ne correspond pas vraiment aux mesures physiques données par le spectrocolorimètre.

En effet, dans le cas du génotype Blandine, la valeur h (couleur de base) de 79,19 correspond plutôt à une couleur jaune (jaune pur = 90).

De même pour le génotype 245 couleur noir, une valeur (h) de 18,02 correspond à une couleur rouge. Il faudra également tenir compte de la valeur de C^* qui, dans ce cas est proche de 0 ce qui traduit une couleur terne.

Le génotype 949 T qui a une valeur h de 36,16 semble correspondre à une couleur marron-fauve au lieu de la couleur beige (donnée par appréciation visuelle).

Il est donc à noter que l'attribution d'une couleur par l'oeil humain n'est pas fiable, car dépendante de paramètres inhérents à l'opérateur et à son environnement.

2. La méthode de spectrométrie proche Infrarouge (SPIR)

La spectrométrie dans le proche infrarouge (SPIR) est une méthode physique d'analyse permettant le dosage rapide et non destructif des constituants organiques de la matière végétale. Cette technique est largement appliquée aux céréales et aux fourrages après séchage et broyage préalable (Dardenne P, 1990). Elle a également été envisagée pour l'analyse des composés majeurs dans les protéagineux (Biston *et al.*, 1992).

L'évolution des techniques de mesure mettant en oeuvre soit la réflectance soit la transmittance permet aujourd'hui la mesure d'échantillons en graine entière isolée (Dardenne *et al.*, 1991).

Grâce à la collaboration de l'équipe "spectrométrie Infrarouge" de Libramont-Belgique (Mrs R. Biston et G. Sinnaeve), les mesures sur graine entière de *Pisum sativum* ont été effectuées en mode réflexion (1100-2500 nm) avec un spectromètre proche infrarouge PSCo 6250. Une cellule adaptée à la mesure de graines individuelles a été conçue.

Parallèlement, les graines individuelles ont été mesurées en mode transmission avec un spectromètre Tecator Infratec 1255. Ce spectromètre couvre une gamme de longueurs d'onde allant de 850 à 1150 nm.

Le traitement des données spectrales et analytiques a été effectué avec le logiciel ISI-NIRS-3 (Infrasoft International, Port Matolda PA-USA).

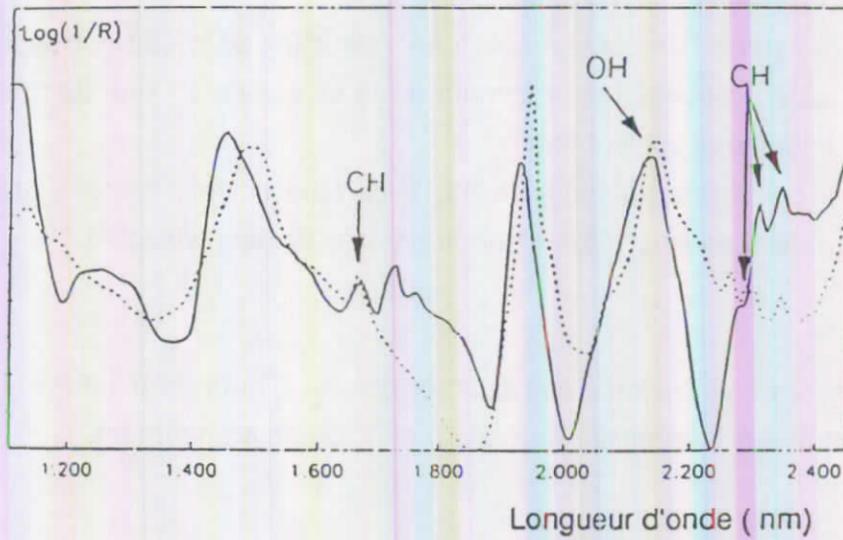


Figure 18 : spectre proche infra rouge

----- = spectre de la catéchine (standard)

— = spectre d'une graine riche en tannins condensés.

Les calibrations ont été obtenues par la méthode des carrés partiels (MPLS) optimisant le traitement mathématique des spectres. Cette technique de régression nécessite une validation croisée afin d'éviter un surajustement des modèles (Shenk et Westerhaus, 1993).

L'évaluation statistique des résultats est donnée par les coefficients de détermination sur les tests de calibration et de validation (R^2C et R^2V), par les erreurs standard de calibration (SEC), de validation croisée (SECV) et par le rapport de l'écart type de la population étudiée sur le SECV (SD/SECV). Ce rapport permet un tri (screening) des échantillons lorsque sa valeur est comprise entre 2,5 et 3,0 et permet un dosage quantitatif lorsque les valeurs sont comprises entre 3 et 5 ou plus (Williams et Sobering, 1992).

Quelques résultats

La **figure 18** illustre le spectre proche infra rouge de la catéchine (flavane-3-ol) et d'un échantillon de graine à tannins.

En se basant sur la catéchine, on observe des pics caractéristiques des liaisons OH à 1460, 1506, 2068, 2102, 2144 nm et des pics à 1132, 1650, 2144, 2306, 2350 nm pour les liaisons CH.

3. Les conditions de mise en oeuvre de la validation :

Cette étude a concerné 90 échantillons choisis pour représenter l'échelle de variation des teneurs en tannins des variétés de pois de la collection 1992.

Chaque graine a été étudiée à l'aide de deux types d'analyse :

- une double analyse physique au spectrocolorimètre et au spectromètre proche infrarouge
- une analyse qualitative et quantitative des molécules impliquées dans l'expression de la notion des facteurs antinutritionnels phénoliques des téguments (dosages chimiques). Les molécules sont essentiellement des flavonoïdes et tannins condensés.

D. METHODES D'ANALYSES DES DONNEES

1. Analyse en Composantes Principales

L'analyse des composantes principales est une méthode statistique, essentiellement descriptive. Elle autorise la représentation graphique de l'information contenue dans un tableau de données, tableau formé d'individus ou de groupes d'individus sur lesquels des

mesures de variables quantitatives ont été effectuées. L'ACP permet de visualiser la structuration des variables les unes par rapport aux autres, et repartir les individus les uns par rapport aux autres vis-à-vis de ces variables.

Le principe de l'analyse en composantes principales est simple : si on a p variables, on peut en théorie représenter les individus dans un espace à p dimensions ; en pratique il est bien sur impossible de visualiser une telle représentation quand p devient supérieur à 3. L'ACP va donc permettre de représenter les données dans un ou plusieurs espaces à deux dimensions, c'est-à-dire sur des plans. Pour cela elle va construire des combinaisons linéaires à partir des variables, pour lesquelles la variance sera la plus grande possible. Ces combinaisons sont appelées composantes principales .

Les paramètres choisis pour l'étude de nos collections de légumineuses sont les variables mesurées sur chaque variété à savoir : la teneur en phénols totaux, l'estimation des tannins condensés par oxydation au butanol-HCl, le test vanilline et le pouvoir tannant par l'hémanalyse. Les logiciels utilisés pour les analyses de données sont :

- ADE.base version 3.1 : HyperCard © Stacks et QuickBasic Microsoft ©; Programme Library for the Analysis of Environmental Data ; D. CHESSEL et S. DOLÉDEC, URA CNRS 1451, UCB Lyon I.F-69622 VILLEURBANNE Cedex, France.

2. Analyse de variance à 2 facteurs contrôlés

Cette analyse nous a permis de voir si le contenu phénolique des graines pouvait être influencé par l'effet environnement ou l'effet année de culture.

Pour le test de comparaison de moyenne nous avons utilisé le test de Newman-Keuls. Ce test permet de constituer des groupes homogènes de traitements ; ainsi les traitements appartenant à un groupe donné sont considérés comme non différents au risque ($\alpha = 0,05$). La constitution des groupes homogènes se fait à partir des plus petites amplitudes significatives (p.p.a.s) : lorsque l'amplitude observée entre les moyennes extrêmes d'un groupe de K moyennes sera inférieure à la p.p.a.s pour k moyennes, on déclarera que ces K moyennes constituent un groupe homogène.

3. Analyse factorielle discriminante

L'analyse factorielle discriminante recouvre 2 aspects : elle permet de séparer "au mieux" l'ensemble des g groupes à l'aide de p variables et effectuer un classement de différentes observations. Les logiciels utilisés pour ces analyses statistiques sont ceux de l'Institut Technique des Céréales et de Fourrages : STAT-ITCF (75116 PARIS).

CHAPITRE 3 :
METHODES PARTICULIERES D'ANALYSE QUALITATIVE
DES PROANTHOCYANIDINES DES TEGUMENTS DE
Vicia faba L. et de *Pisum sativum* L .

A. METHODES DE SEPARATION	54
1. Extraction des polymères phénoliques	54
2. Partition des polymères phénoliques entre solvants	54
3. Séparation des polyphénols sur tamis moléculaire	56
3. 1 Le gel Sephadex LH20	57
3. 2. Le dispositif	57
3.3. Protocole d'élution	57
B. METHODES DE CONTROLE DU FRACTIONNEMENT	68
1. Méthodes globales	58
1.1. Méthodes quantitatives	58
1.2. Méthodes qualitatives	58
1.2.a. Analyse par CLHP couplée à un détecteur à barrette de diodes	59
1.2. b. Chromatographie sur couches minces	59
2. Méthodes de microdégradation	60
2.1. Oxydation complète	60
2.2. Hydrolyse partielle en présence du phloroglucinol	62
C. ISOLEMENT DES PROANTHOCYANIDINES OLIGOMERES	63
D. METHODES D'IDENTIFICATION DES PROANTHOCYANIDINES	64
1. Méthodes chimiques	64
1.1. Méthodes de microdégradation	64
1.2. Cochromatographie	64
2. Méthodes physiques : Spectrométrie de masse (ES-MS)	64

10

11

CHAPITRE 3 :
METHODES PARTICULIERES D'ANALYSE QUALITATIVE
DES PROANTHOCYANIDINES DES TEGUMENTS DE
Vicia faba L. et de *Pisum sativum* L .

Les difficultés liées à l'extraction et à la purification d'une part, à l'instabilité et à la complexité structurale des proanthocyanidines d'autre part, font que leur étude structurale est relativement récente. La plupart des structures chimiques, connues aujourd'hui résultent de travaux des équipes de Sheffield avec Haslam (Angleterre), de Montpellier avec Moutounet (France) et enfin d'Afrique du Sud avec Roux et Ferreira. La plupart des identifications structurales ont été menées sur le sorgho (Strumeyer et Malin, 1975 ; Williams *et al.*., 1983; Putman et Butler, 1989). On assiste actuellement à un développement accru de la recherche des proanthocyanidines du raisin et du vin (Bourzeix *et al.*, 1986 ; Rigaud *et al.*., 1991; Ricardo-Da-Silva *et al.*., 1991c, 1992 ; Balas, 1992 ; Prieur *et al.*., 1994). Les études structurales des proanthocyanidines des Légumineuses sont peu nombreuses et concernent les graines de la féverole (Marquart *et al.*, 1977 ; Hussein *et al.*., 1990 ; Helsper *et al.*, 1993) ou les fourrages (Koupai *et al.*., 1992, 1993).

A. METHODES DE SEPARATION

1. Extraction des polymères phénoliques

Les proanthocyanidines sont extraites des téguments de la féverole *Vicia faba*.L (génotype Alfred) et du pois *Pisum sativum* ssp *arvense* (génotype V 256 S1).

15 g des téguments sont broyés en présence d'azote liquide ; l'extraction proprement dite est conduite de la même manière que pour l'étude quantitative dans un mélange solvant acétone-eau (70-30) en présence de métabisulfite de sodium. Cette extraction n'est pas spécifique et entraîne aussi les composés phénoliques non proanthocyaniques.

2. Partition des polymères phénoliques entre solvants

Le protocole suivi est schématisé dans la figure 19.

Afin d'éliminer les substances non tanniques, nous avons appliqué la méthode proposée par Jones *et al.*, 1976, utilisée par Foo et Porter 1981, Czochanska *et al.*, 1979 b, 1980, et

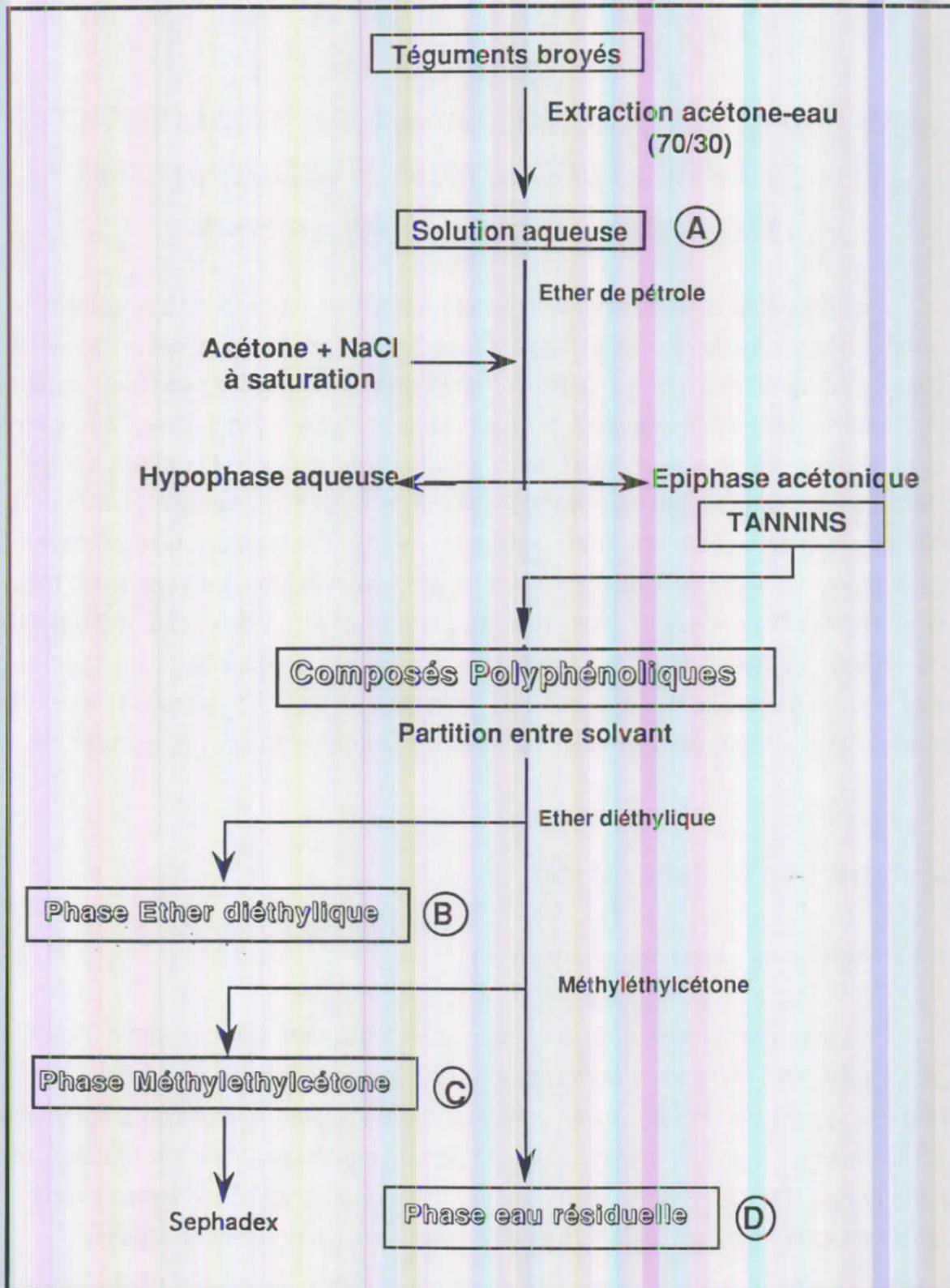


Figure 19 : procédé de préfractionnement et de purification des polyphénols des téguments du pois et de la féverole.

reprise par Brun 1991. La solution aqueuse (100 ml) est additionnée de 400 ml d'acétone ; le mélange est saturé en chlorure de sodium sous agitation puis laissé au repos.

L'hypophase aqueuse, concentrée sous vide, est reprise par un volume connu d'eau distillée. L'épiphase acétonique, riche en polymères phénoliques, est évaporée sous pression réduite à température inférieure à 35°C puis reprise par 100 ml d'eau distillée. Les substances indésirables (lipides, chlorophylles) sont éliminées de la phase aqueuse tannique par affrontement à l'éther de pétrole.

Après cette étape, de nombreux auteurs préconisent l'acétate d'éthyle comme solvant spécifique des tannins de faible poids moléculaire (Karchesy et Hemingway 1986, Brun 1991, Helsper *et al.* 1993). Vu la complexité de nos extraits tanniques bruts après diagnostic par HPLC et CCM, nous avons opté pour un protocole beaucoup plus sélectif.

L'extrait tannique brut est affronté à l'éther diéthylique, solvant communément utilisé pour les aglycones flavoniques (3 fois à un égal volume).

- l'épiphase d'éther diéthylique est récupérée puis évaporée.

- l'hypophase aqueuse contenant les molécules polymérisées est affrontée par la méthyléthylcétone au lieu de l'acétate d'éthyle (3 fois à volume égal). Les phases organiques sont réunies, déshydratées par addition du sulfate de sodium anhydre puis évaporées sous pression réduite à température inférieure à 35°C.

Finalement nous obtenons une phase aqueuse, riche en proanthocyanidines polymères. Cette phase aqueuse est dialysée en vue d'éliminer le sel et évaporée sous pression réduite.

Les différents résidus secs sont stockés sous azote à -18°C à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation.

3. Séparation des polyphénols sur tamis moléculaire

L'obtention de produits natifs purs impose au préalable une séparation globale des proanthocyanidines. Différents supports chromatographiques sont utilisés : le polyamide (Jerumanus, 1979), le gel de silice (Deshpande et Patil, 1981), le Fractogel TSK HW 40 S (Porter *et al.*, 1991 ; Ricardo-Da-Silva *et al.*, 1992), le Sephadex LH20 (Porter, 1974 ; Kolodziej, 1991 ; Kleiber, 1990 ; Brun, 1991 ; Helsper, 1993). Les meilleurs résultats sont obtenus avec des colonnes de Sephadex LH20. D'après Okuda *et al.*, 1989, Kleiber 1990,

la séparation des tannins s'effectue sur la base des différences d'adsorption des composés polyphénoliques sur le gel et non sur la base de filtration.

Pour séparer les proanthocyanidines, nous avons fait appel à la chromatographie sur gel de Sephadex LH20.

3. 1 Le gel Sephadex LH20

Le Sephadex est un gel de dextrans obtenus à partir du dextrane polyholoside polymérisé résultant de cultures de bactéries (*Leuconostoc mesenteroïdes*) dans des solutions de sucre de canne ou de saccharose.

Il faut préciser que le gel Sephadex LH20 présente une grande affinité pour les substances aromatiques en général et pour les polyphénols en particulier. Cette propriété a pour conséquence d'inverser son fonctionnement normal. En effet les molécules les plus polymérisées sont retenues par le gel de Sephadex et l'utilisation d'un gradient d'élution à base d'acétone permet de rompre les liaisons gel de Sephadex - flavanols polymérisés (Kleiber 1990).

3. 2. Le dispositif

La colonne en verre remplie de gel de Sephadex LH20 (Pharmacia) est reliée à un circuit automatisé comprenant les éléments suivants :

- une pompe péristaltique (P-1, Pharmacia) placée en sortie de colonne permettant de contrôler le débit d'élution ;
- un détecteur (HPLC detector 742, Kontron Instruments) ; détection à 280 nm.
- un enregistreur
- un collecteur de fractions.

Après plusieurs essais relatifs au débit à imposer à la pompe, au volume de solvants nécessaire à l'élution de la presque totalité des composés polyphénoliques et à la reproductibilité, nous nous sommes fixés les conditions opératoires suivantes :

- le gel Sephadex est renouvelé pour chaque nouvel extrait ;
- le volume d'élution pour chaque type de solvant est de 1000 ml pour un débit de 0,60 ml mn^{-1} ;
- une colonne de 50 cm de longueur et 2,6 cm de diamètre interne.

3.3. Protocole d'élution

Les objectifs visés par la mise au point du protocole d'élution sont d'une part la séparation des composés flavaniques des autres polyphénols présents dans l'extrait

tégumentaire et, d'autre part, le fractionnement de ces proanthocyanidines en fonction de leur poids moléculaire.

Lors des essais préliminaires, différentes observations ont attiré notre attention :

- l'élution à l'éthanol permet de "décrocher" les acides phénols, les flavonoïdes et les monomères flavaniques ; les proanthocyanidines forment un anneau en tête de colonne ; l'augmentation du volume d'élution n'améliore pas la séparation ;
- l'élution à l'éthanol suivi de méthanol à 100% est trop forte et entraîne beaucoup de composés flavaniques en un même bloc, ce qui rend la poursuite de opérations difficile ;
- après l'élution au méthanol, des proanthocyanidines restent accrochées en sommet de colonne ; un mélange de méthanol et d'acétone permet de "décrocher" ces polymères.

Ces observations nous ont aidé à mettre au point un protocole qui nous semble le mieux adapté au fractionnement et à l'élution progressive des composés polyphénoliques des extraits des téguments de pois et de la féverole.

Le protocole d'élution appliqué est le suivant :

- Elution à l'éthanol (1000 ml)
- Ethanol -méthanol 50-50 (1000 ml)
- Méthanol 100% (1000 ml)
- Méthanol -acétone 70-30 (1000 ml)

En effet l'application de ce protocole aux extraits permet de désorber la totalité des composés polyphénoliques de la colonne de Sephadex LH20.

B. METHODES DE CONTROLE DU FRACTIONNEMENT

1. Méthodes globales

1.1. Méthodes quantitatives

Le suivi quantitatif des substances polyphénoliques est réalisé à l'aide des méthodes de dosages suivantes : les phénols totaux (bleu de Prusse), les tannins condensés (BuOH-HCl à chaud) et le test vanilline, et enfin le pouvoir tannant (hémanalyse).

1.2. Méthodes qualitatives

L'analyse qualitative est réalisée par chromatographie liquide haute performance et par chromatographie sur couches minces.

1.2.a. Analyse par CLHP couplée à un détecteur à barrette de diodes

Le couplage de la CLHP à un détecteur à barrette de diodes permet d'obtenir le spectre U.V. visible de chacun des pics du chromatogramme. Cette technique nous donne une première indication sur l'identité des composés détectés.

Deux types de colonne sont utilisées :

- colonne LiCrospher Li 100 RP-18 (5 μ m) pour les composés polyphénoliques natifs et après dégradation en présence de phloroglucinol ;
- colonne analytique μ Bondapack C18, 5 μ m pour les anthocyanidines.

Les conditions utilisées pour les produits natifs sont présentées dans le tableau suivant :

	CLHP analytique	CLHP semi-préparative
Appareillage	Kontron HPLC System 600	idem
Précolonne	phase ODS -Hyperguard	idem
Colonne	LiCrospher Li 100	LiCrospher Li 100
Température	ambiante	ambiante
Solvant : A	Acide formique 4% dans l'eau	Acide formique 1% dans l'eau
Solvant : B	Méthanol	Méthanol
Gradient	tps(mn) 0 45 60 75 %MeOH 0 30 60 80	idem
Débit	1 ml/mn	
Détection	280 nm	idem
Reconditionnement de la colonne	15 mn	idem
		idem

1.2. b. Chromatographie sur couches minces

La chromatographie sur couches minces présente un grand intérêt pour compléter les informations apportées par les dosages globaux.

CCM sur gel de silice

La chromatographie sur gel de silice (Merck), avec comme éluant à base de toluène, d'acétone, d'acide formique (60/60/10) permet de séparer les proanthocyanidines en fonction de leur poids moléculaire (Lea 1978).

Après migration, le diagnostic se déroule en 2 étapes :

- examen à la lumière de Wood pour la révélation des composés phénoliques simples (classes des flavonoïdes et acides phénols) ;
- examen après pulvérisation du réactif vanilline-HCl (solution méthanolique à 5% HCl et 1% de vanilline) pour la détection des monomères, oligomères et polymères catéchiques. Après chauffage à l'étuve 75°C pendant 15 mn, les catéchines apparaissent de couleur rouge, les oligomères rouge-mauve et enfin les polymères en rouge intense avec un Rf pratiquement nul.

CCM sur cellulose

La chromatographie sur cellulose microcristalline (en présence de témoins) permet de nous renseigner sur le degré d'hydroxylation du noyau B des anthocyanidines formées après oxydation. Les plaques de cellulose microcristalline sont confectionnées au laboratoire et le solvant de migration utilisé est le Forestal (acide acétique, HCl, eau, 30v, 3v, 10v).

2. Méthodes de microdégradation

Sur chaque extrait phénolique, 2 types de traitement sont effectués :

- oxydation complète par l'acide chlorhydrique HCl 2N.
- hydrolyse partielle en présence du phloroglucinol.

2.1. Oxydation complète

L'hydrolyse des tannins condensés (proanthocyanidines) en milieu acide (Bate-Smith 1973, 1975, 1981) nous renseigne sur le degré d'hydroxylation des noyaux B des sous-unités flavanes autres que l'unité terminale.

Protocole : 2 mg de proanthocyanidines sont dissous dans 5 ml HCl (2N) et hydrolysés sous reflux pendant 1 heure. L'hydrolysate est concentré et filtré sur membrane millipore 0,45 µm en vue de son analyse.

Les conditions opératoires de l'analyse par chromatographie liquide haute performance sont celles utilisées par Hebrero 1988 :

- Colonne µ Bondapack C18, 5µ m
- solvants : A = solution aqueuse à 4,5% d'acide formique ; B = acétonitrile ;
- gradient : 10% à 15% de B dans A en 10 mn ; puis 15% à 20% B dans A en 10 mn ; et 20% à 30% de B dans A en 17,5 mn ;
- débit : 1,5 ml mn⁻¹ ; détection : 525 nm.

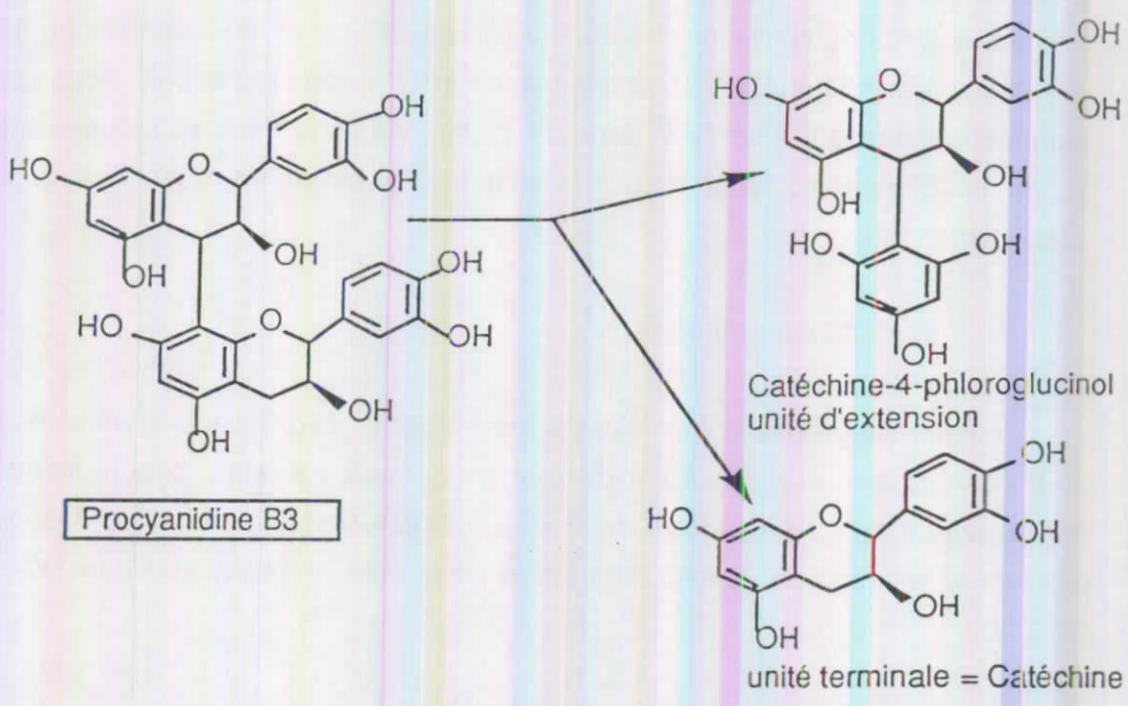


Figure 20 : Dégradation partielle de la procyanidine B3 en présence de phloroglucinol.

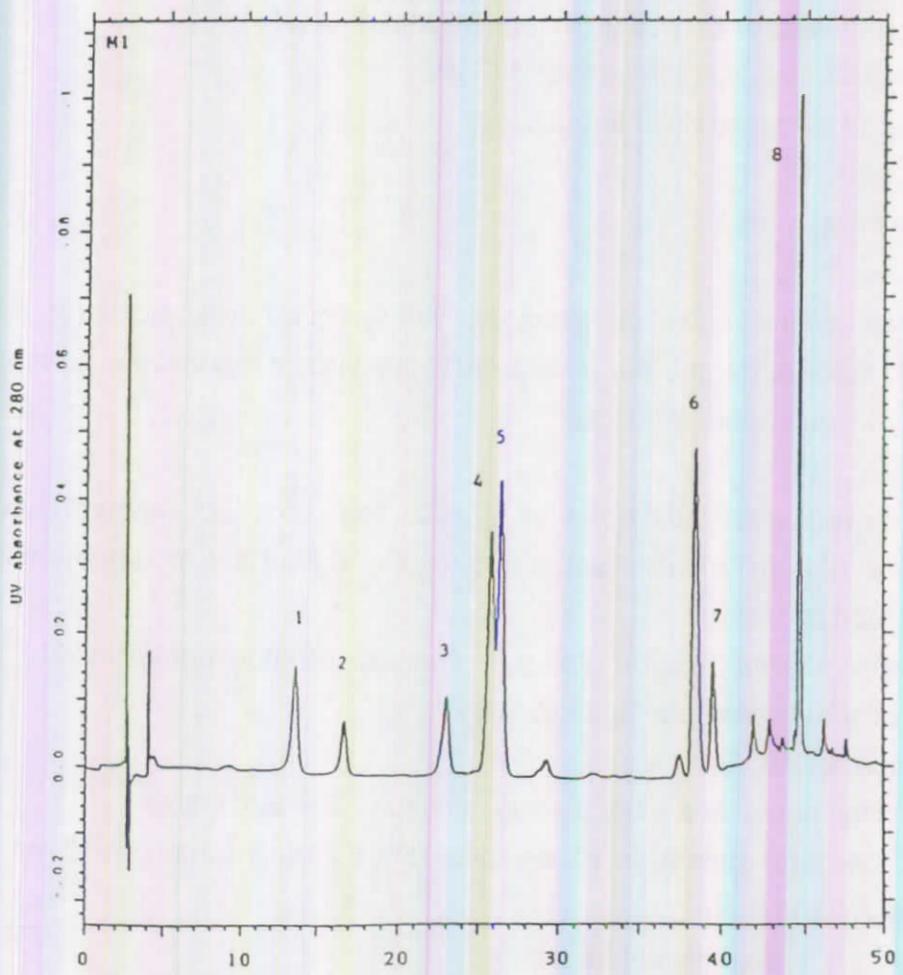


Figure 21 : Chromatogramme CLHP d'un mélange de flavane-3ols standards et leurs résidus phloroglucyls. Pics : 1 = (+)-gallocatechine-4-phloroglucinol ; 2 = (-)-épigallocatechine-4-phloroglucinol ; 3 = (+)-gallocatechine ; 4 = (-)épicatechine-4-phloroglucinol ; 5 = (+)-catéchine-4-phloroglucinol ; 6 = (-) épigallocatechine ; 7 = (+) catéchine ; 8 =(-)-épicatechine (Koupai 1992).

2.2. Hydrolyse partielle en présence du phloroglucinol

Le clivage des proanthocyanidines en milieu acide conduit à la rupture de la liaison C-C interflavanique. On obtient l'unité terminale non modifiée et des 4-flavanyl-carbocations correspondant aux unités d'extension. Ces intermédiaires peuvent être piégés par un nucléophile tel que le toluène- α -thiol pour donner des flavanyls 4-benzyl thio-éther (Hemingway *et al.*, 1982 ; Ricardo-Da-Sylva *et al.*, 1991 ; Rigaud *et al.*, 1991), ou par le phloroglucinol pour donner des flavanyls phloroglucyl éthers (Foo et Porter 1978 ; Czochanska *et al.*, 1979 a ; Foo et Karchesy 1989 ; Koupai *et al.*, 1992, 1993).

La vitesse de réaction dépend de la liaison interflavane et de la stéréochimie des sous unités. Par exemple la réaction est plus rapide pour un dimère formé de sous -unité 2,3 cis dont la liaison interflavanique est de type C4-C8 que pour un dimère formé de sous unités 2,3 trans et dont la liaison interflavanique est de type C4-C6 (Hemingway et Mc Graw 1983).

Les tannins condensés du pois et de la féverole sont basés sur 4 unités structurales : la catéchine et son isomère l'épicatéchine, la gallocatéchine et son isomère l'épigallocatéchine. La différence entre ces 2 couples concerne l'hydroxylation du noyau B : composés dihydroxylés pour le premier couple et trihydroxylés pour le second couple. Ces unités sont classiquement liées par les C4 et C8 ou C6.

Dans le cas de la procyanidine B3 (Figure 20), le traitement au phloroglucinol génère 2 dérivés : l'un correspondant à l'unité terminale de la catéchine et le second à l'unité d'extension liée au phloroglucinol. Ces composés sont facilement repérables en CLHP en présence de témoins.

Les conditions opératoires pour l'élution des composés après dégardation au phloroglucinol sont les suivantes :

- colonne Licrospher Li 100 RP-18 (5 μ m)
- solvants utilisés : A = solution aqueuse à 1% d'acide formique ; B = méthanol ;
- gradient d'élution : de 0 à 30 mn : 0 à 30% de B dans A ; de 30 à 50 mn : de 30% à 60% de B dans A et retour en conditions initiales en 10 mn.
- température ambiante, détection 280 nm et débit de 1 ml mn⁻¹.

La Figure 21 représente un profil chromatographique reconstitué d'après Koupai *et al.*, 1992.

Les temps de rétention des principaux composés de ce profil sont donnés dans le tableau 9.

N°	Nom du composé	position des OH	configuration absolue	Temps de rétention
1	(+)-Catéchine	3,4,5,3',4'	2R:3S	39,5 mn
2	(+)-Gallocatéchine	3,5,7,3',4',5'	2R:3S	23,0 mn
3	(-)-Epicatéchine	3,4,5,3',4'	2R:3R	44,7 mn
4	(-)-Epigallocatéchine	3,4,5,3',4',5'	2R:3R	38,5 mn
5	(+)-Catéchine-4- phloroglucinol	3,4,5,3',4'	2R:3S	26,5 mn
6	(+)-Gallocatéchine-4-phloroglucinol	3,5,7,3',4',5'	2R:3S	13,6 mn
7	(-)-Epicatéchine-4-phloroglucinol	3,4,5,3',4'	2R:3R	25,8 mn
8	(-)-Epigallocatéchine-4-phloroglucinol	3,4,5,3',4',5'	2R:3R	16,7 mn

Tableau 9 : Temps de rétention des principaux flavan-3-ols et de leurs résidus phloroglucinols. Conditions CLHP : colonne Lichrospher 100 R-P18. débit 1ml.mn⁻¹ détection 280 nm (Koupai *et al.*, 1992)

Nous remarquons la position de la catéchine (39,5 mn) par rapport à l'épicatéchine (44,7 mn) et celle de la gallocatéchine (23 mn) par rapport à l'épigallocatéchine (38,5 mn). En effet le type de la configuration absolue de l'hydroxyl en 3 crée une différence de temps de rétention de 5 à 15 mn respectivement pour le premier et le second couple.

Protocole : 2 mg d'extrait et 0,5 mg de phloroglucinol sont pesés dans un pilulier; 1 ml de méthanol à 1% HCl est alors ajouté et l'hydrolyse se poursuit pendant 2 heures à température ambiante. Après évaporation sous azote, le résidu sec est repris par 1 ml d'eau distillée. La solution est alors affrontée à l'acétate d'éthyle (3 x v/v), les phases organiques sont réunies et évaporées sous azote. L'hydrolysate est repris par 0,5 ml d'un mélange eau distillée méthanol (v/v), filtré sur membrane millipore 0,45 µm en vue de son passage en CLHP.

C. ISOLEMENT DES PROANTHOCYANIDINES OLIGOMÈRES

Pour isoler les proanthocyanidines, nous avons fait appel à la chromatographie liquide haute pression semi-préparative sur colonne LiChrospher Li 100 RP-18 (5 µm). Les

proanthocyanidines correspondant à chaque pic sont recueillies dans des tubes à hémolyse, évaporées à la pompe à palette en vue d'éliminer les solvants et toute trace d'acide. Les résidus secs sont stockés à l'abri de la lumière, sous azote à -18°C en vue de leur analyse .

D. METHODES D'IDENTIFICATION DES PROANTHOCYANIDINES

1. Méthodes chimiques

1.1. Méthodes de microdégradation

Le même protocole (partie B.2.2) est appliqué aux produits purs. Nous donnons en exemple (**figure 22**) le clivage de la procyanidine B2 (témoin) en présence de phloroglucinol. Le profil chromatographique révèle un pic à 11,5 mn correspondant au phloroglucinol et 2 autres pics aux temps de rétention 25,9 mn et 47,0 mn correspondant respectivement à l'épicatéchine-4-phloroglucinol (unité d'extension) et à l'épicatéchine (unité terminale). La procyanidine B2 est donc constituée de 2 sous unités épicatechiques.

1.2. Cochromatographie

Les composés purs et leurs produits d'hydrolyse sont chromatographiés sur CCM de gel de silice en présence de témoins. Les R_f sont calculés et comparés aux témoins et à ceux de la littérature flavonique.

2. Méthodes physiques : Spectrométrie de masse (ES-MS)

La spectrométrie de masse utilisant méthode d'ionisation par électrospray (ES-MS) constitue une technique de choix en raison de douceur de l'ionisation. La solution contenant la proanthocyanidine à analyser est injectée dans la source et la formation des ions a lieu lors de la volatilisation. On obtient alors un spectre présentant des pics moléculaires le plus souvent sous forme d'ions quasi moléculaires $[MH]^+$ et des fragments caractéristiques. Des ions du type $[M + \text{ion métallique}]$ tels que $[MNa]^+$, $[MK]^+$ et $[MLi]^+$ peuvent se former. Cette technique permet d'accéder à la masse moléculaire des proanthocyanidines oligomères.

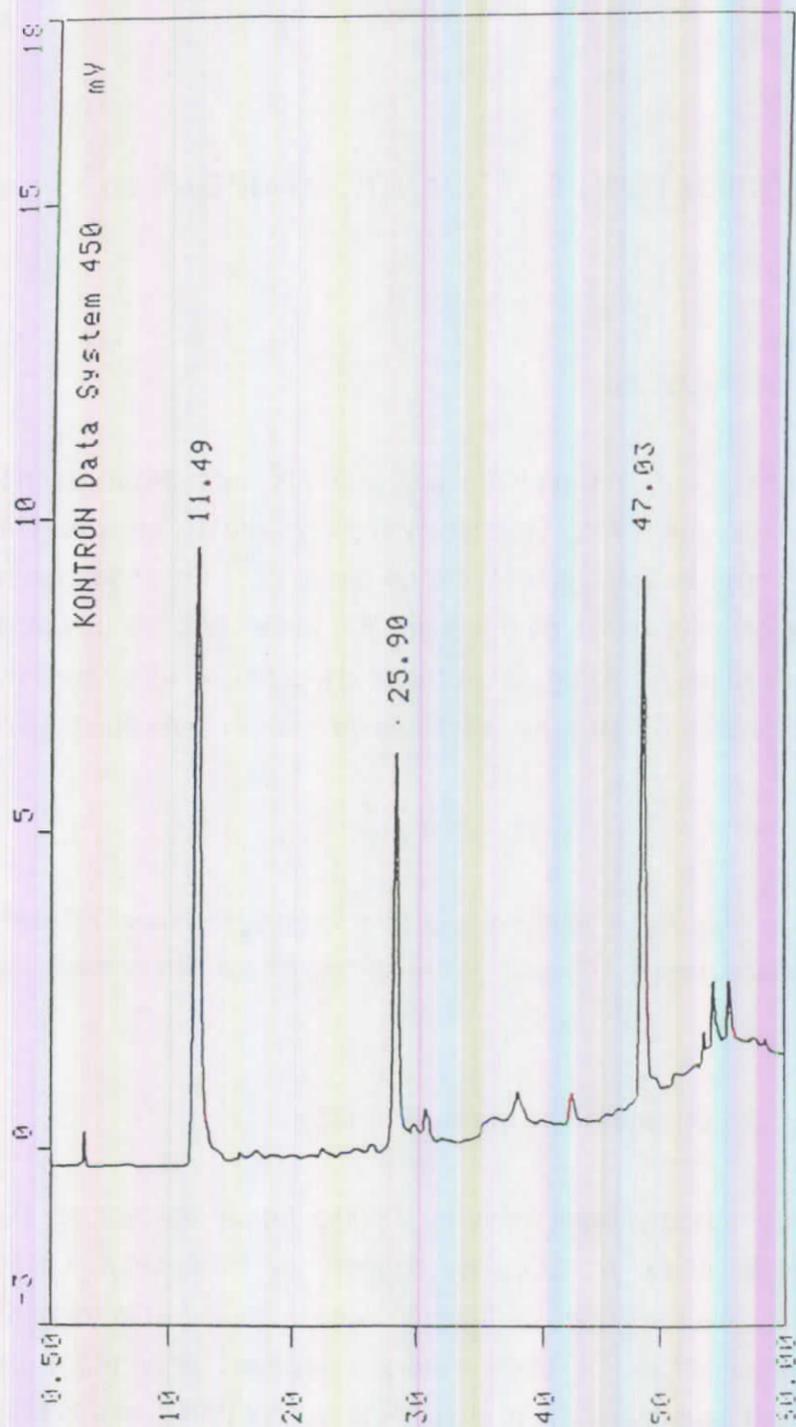
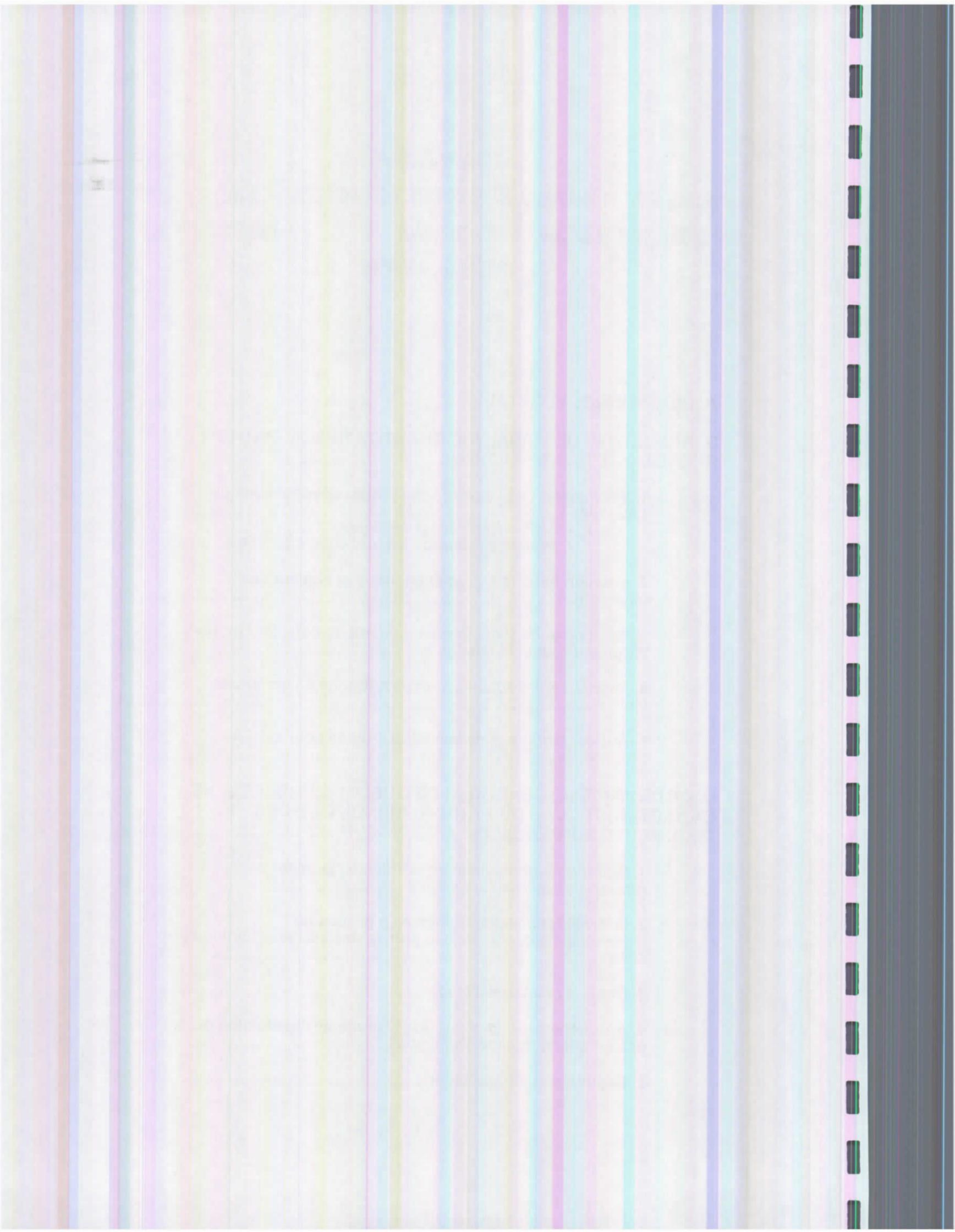


Figure 22 : Profil CLHP du clivage en présence de phloroglucinol de la procyanidine B2.

pic 1 = phloroglucinol, 2 = épicatechine-4-phloroglucinol, 3 = épicatechine.

CHAPITRE 4 :
LES FACTEURS ANTINUTRITIONNELS (F.A.N)
PHENOLIQUES CHEZ *Vicia faba* L. : DIVERSITE ET
REGULATION

A. LE MATERIEL VEGETAL	67
B. RESULTATS DE L'ANALYSE QUANTITATIVE DU PATRON PHENOLIQUE DE LA FEVEROLE	71
1. Vérification de la stabilité des patrons phénoliques de <i>Vicia faba</i> L.	73
1. 1. ACP sur données phénoliques	73
1. 2. analyse de variance à deux facteurs contrôlés	75
2. Relation entre le patron phénolique et couleur des téguments	78
3. Relation entre [fleur jaune-tégument beige], [fleur jaune-tégument rouge] et tannins :	81
4. Relation entre 2 facteurs antinutritionnels : tannins et vicine	83
5. Autres géotypes de féveroles étudiés pour le PEA programme	85
C. DETERMINISME GENETIQUE DE QUELQUES MOLECULES CARACTERISTIQUES DU PATRON PHENOLIQUE DES TEGUMENTS SEMINAUX DE LA FEVEROLE	86
1. Situation biogénétique du problème "tannins" par rapport aux autres flavonoïdes	87
2. Informations bibliographiques à propos du déterminisme génétique des principales classes chimiques citées.....	89
3. Choix du matériel d'étude	91
4. Approche expérimentale pour l'étude de l'héritabilité du patron phénolique de <i>Vicia faba</i> L.	94
5. Résultats et interprétation	94



CHAPITRE 4 : LES FACTEURS ANTINUTRITIONNELS (F.A.N) PHENOLIQUES CHEZ *Vicia faba* L. : DIVERSITE ET REGULATION

Dans ce chapitre nous présenterons et commenterons les résultats de différentes approches de l'expression des molécules phénoliques (FAN) responsables des effets antinutritionnels chez la féverole.

Ensuite à travers l'analyse chimique du contenu phénolique d'une descendance F3 de féverole, issue de croisements diallèles, nous étudierons l'héritabilité du pattern phénolique de la féverole *Vicia faba* L.

A. LE MATERIEL VEGETAL

Les génotypes de féverole proviennent de 2 sources :

- d'une part des génotypes de la station de génétique et d'amélioration des plantes de l'INRA de Dijon ;
- d'autre part des génotypes multipliés en France (INRA de Rennes, Dijon) et en Angleterre (Cambrige) ; les semences sont collectées et distribuées par le John Innes Institute (Norwich, Angleterre, PEA programme).

L'échantillonnage a été constitué à partir des récoltes 1991, 1992 et 1993. Ce matériel végétal a été retenu en fonction de certains objectifs :

1. *diversité générale du patron phénolique de la féverole* : l'ensemble de la collection
2. *déterminisme génétique de la biosynthèse des tannins* : il concerne des génotypes de féveroles récoltées en 1991. Tous ces génotypes sont homozygotes pour les gènes qui gouvernent la couleur des fleurs et des graines :
 - des génotypes, porteurs du gène n°1, 0 Tannin à fleurs blanches et graines blanches sans tannin : les populations Blandine et Albatros ; SWI, 949 OT qui sont des lignées pures,
 - des génotypes porteurs du gène n°2 (N2MA), 0 Tannin : PB-OZ et EK-0T et EE-0T, à fleurs blanches et graines blanches sans tannin (après 3 générations d'autofécondation) ;
 - des génotypes à tannins : issus au moins de 3 autofécondations successives : 245(9)(4), 893(4)(6), D(1)(4), 319 (7)(8), 1212, 1214, FD1, FD2 ; des cultivars Alfred, Ascott, Ticol, Minica, Troy, Victor ; SCI et 949T qui sont des lignées pures (récolte 1991).
 - des génotypes issus d'un croisement diallèle entre les lignées n°945T, n°893(4)(6) et n°245(9)(4) analysés au niveau F3 (récolte 1993).

n°	code Variétal	Couleur testa	Couleur fleur	Phénols totaux Bleu de Prusse	Tannins condensés (mg/g)	
					BuOH/HCl	Vanilline
1	SWI	blanc	blanche	7,2 ± 0,2	0	1,1 ± 0,1
1*	SWI*	blanc	//	7,2	0	2,0
2	Blandine	blanc	//	7,5 ± 0,6	0	0,8 ± 0,6
2*	Blandine*	blanc	//	5,3 ± 0,3	0	2,1 ± 0,1
3	Albatros	blanc	//	7,1 ± 0,7	0	1,1 ± 0,2
3*	Albatros*	blanc	//	7,0 ± 0,7	0	2,2 ± 0,1
4	PB 0T	gris	//	7,8 ± 1,0	0	0,7 ± 0,2
4*	PB 0T*	gris	//	8,8 ± 0,0	0	1,5 ± 0,1
5	949 0T	gris	//	6,6 ± 0,9	0	1,0 ± 0,2
5*	949 0T*	gris	//	6,5 ± 0,1	0	1,5 ± 0,1
6	Victor	beige	macule noir	81,2 ± 5,3	140,5 ± 3,3	87,3 ± 4,2
6*	victor*	beige	//	82,8 ± 2,3	138,5 ± 4,8	69,6 ± 2,3
7	SCI	beige	macule noir	66,5 ± 1,2	121,8 ± 5,2	58,3 ± 4,9
7*	SCI*	beige	//	74,5	115,8	59,7
8	Alfred	beige	macule noir	87,0 ± 1,8	138,1 ± 3,7	64,8 ± 0,4
8*	Alfred*	beige	//	81,3 ± 2,9	152,1 ± 6,4	63,6 ± 3,8
9	Ascott	beige	//	60,0 ± 3,7	101,8 ± 2,1	45,1 ± 4,5
9*	Ascott*	beige	//	57,5 ± 3,0	116,6 ± 6,5	50,4 ± 0,1
10	Minica	beige	//	93,7 ± 5,2	100,8 ± 3,5	29,5 ± 4,5
10*	Minica*	beige	//	69,9 ± 4,9	116,4 ± 3,3	53,3 ± 3,5
11	Troy	beige	//	92,1 ± 4,6	119,1 ± 5,3	53,5 ± 6,7
11*	Troy*	beige	//	98,9 ± 1,4	173,0 ± 4,1	78,6 ± 6,4
12	949 T	beige	macule noir	104,8 ± 3,6	170,3 ± 1,5	81,2 ± 4,1
12*	949 T*	beige	//	132,6 ± 7,5	191,5 ± 2,2	102,2 ± 5,5
13	245(9)(4)	brun	//	25,5 ± 0,7	38,9 ± 2,1	13,3 ± 0,7
13*	245(9)(4)	brun	//	24,9 ± 1,0	57,6 ± 3,1	15,7 ± 0,9
14	893(4)(6)	vert	//	45,0 ± 2,1	70,2 ± 3,3	40,7 ± 1,9
14*	893(4)(6)	vert	//	55,9 ± 3,1	80,1 ± 1,9	34,2 ± 2,5
15	EK - 0T	blanc	blanche	7,1 ± 0,3	0	1,2 ± 0,9
16	Medes	blanc	//	7,9 ± 1,1	0	0,8 ± 0,1
17	Torret	blanc	//	7,0 ± 1,1	0	1,4 ± 0,4
18	QH x VA	blanc	//	7,9 ± 1,2	0	1,3 ± 0,3
19	LPSP	beige	macule noir	82,2 ± 5,5	126,1 ± 1,4	68,8 ± 4,1
20	PBI 220	marron	//	51,7 ± 4,0	109,9 ± 5,2	59,4 ± 2,8
21	Robin	rouge	//	85,9 ± 4,0	115,3 ± 2,3	55,0 ± 1,9
22	HII	beige	//	54,8 ± 1,2	86,7 ± 2,2	36,6 ± 5,3
23	LTI	rouge	//	69,2 ± 4,9	113,4 ± 6,6	59,5 ± 4,5
24	L LECI	rouge	//	73,3 ± 5,5	116,3 ± 7,1	52,3 ± 2,7
25	Chine	beige	//	60,2 ± 0,9	104,8 ± 6,8	42,1 ± 0,6
26	AFC	beige	//	68,5 ± 4,4	88,7 ± 3,1	27,0 ± 3,0
27	(F1xF1)79(58)	beige	//	109,4 ± 4,2	125,9 ± 3,5	30,6 ± 2,5
28	1268	beige	//	72,5 ± 3,1	70,0 ± 2,0	24,8 ± 4,0
29	EK - T	beige	//	49,0 ± 0,2	82,5 ± 2,3	40,3 ± 4,5
30	106	beige	//	78,3 ± 5,8	106,0 ± 5,9	49,8 ± 3,3
31	AEC Brun	brun	macule noir	82,7 ± 2,1	145,9 ± 3,2	73,0 ± 4,6
32	AEC Fauve	fauve	macule noir	85,2 ± 6,2	129,5 ± 6,4	76,5 ± 2,3

Tableau 10. Caractéristiques variétales, teneurs en phénols totaux (éqs catéchine), tannins condensés (éqs catéchine pour le test Vanilline, mg/g d'après le E1% de Bate-Smith pour le BuOH-HCl) et pouvoir tannant (éqs ac.tannique) des téguments de graines de féverole

n°	code Variétal	Pouvoir tannant (mg/g)		Rapport	
		Hémanalyse	Gélatine	PA/Van	PT/PhT
1	SWI	11,7 ± 3,5	0	-	-
1*	SWI*	13,0	0	-	-
2	Blandine	12,3 ± 2,9	0	-	-
2*	Blandine*	17,2	0	-	-
3	Albatros	14,5 ± 2,5	0	-	-
3*	Albatros*	17,4 ± 0,4	0	-	-
4	PB 0T	15,1 ± 1,3	0	-	-
4*	PB 0T*	16,2 ± 0,3	0	-	-
5	949 0T	15,4 ± 2,4	0	-	-
5*	949 0T*	16,9 ± 0,2	0	-	-
6	Victor	90,0 ± 4,5	53,6 ± 6,5	1,6	1,1
6*	victor*	87,5 ± 1,3	56,2 ± 5,3	2,0	1,1
7	SCI	99,8 ± 2,5	60,7 ± 3,7	2,1	1,5
7*	SCI*	101,1	-	1,9	1,4
8	Alfred	120,0 ± 3,2	72,7 ± 2,4	2,1	1,4
8*	Alfred*	120,5 ± 2,4	68,7 ± 2,3	2,4	1,5
9	Ascott	85,5 ± 2,3	32,9 ± 5,5	2,3	1,4
9*	Ascott*	91,9 ± 4,1	36,6 ± 4,5	2,3	1,6
10	Minica	119,5 ± 7,1	56,8 ± 4,7	3,4	1,3
10*	Minica*	83,5 ± 1,9	35,8 ± 6,4	2,2	1,2
11	Troy	120,0 ± 2,9	45,9 ± 5,7	2,2	1,3
11*	Troy*	108,9 ± 2,2	56,0 ± 4,9	2,2	1,1
12	949 T	126,0 ± 5,1	92,2 ± 3,4	2,1	1,2
12*	949 T*	153,3 ± 1,3	110,0 ± 5,7	1,9	1,2
13	245(9)(4)	38,7 ± 1,6	17,6 ± 0,9	2,9	1,5
13*	245(9)(4)	49,2 ± 0,2	13,3 ± 1,7	3,7	2,0
14	893(4)(6)	53,5 ± 3,5	32,8 ± 1,8	1,7	1,2
14*	893(4)(6)	70,1 ± 2,6	27,0 ± 2,8	2,3	1,3
15	EK - 0T	16,8 ± 2,3	0	-	-
16	Medes	16,3 ± 2,5	0	-	-
17	Torret	12,8 ± 0,5	0	-	-
18	QH x VA	11,5 ± 1,3	0	-	-
19	LPSP	87,0 ± 0,8	47,0 ± 5,3	1,8	1,1
20	PBI 220	68,8 ± 2,5	27,3 ± 2,3	1,9	1,3
21	Robin	95,9 ± 2,5	53,8 ± 4,8	2,1	1,1
22	HII	85,9 ± 3,3	29,5 ± 6,1	2,4	1,6
23	LTI	87,0 ± 4,6	44,0 ± 0,3	1,9	1,3
24	L LECl	92,9 ± 6,1	43,4 ± 5,4	2,2	1,3
25	Chine	79,5 ± 1,5	19,3 ± 3,2	2,5	1,3
26	AFC	96,7 ± 6,7	31,6 ± 0,2	3,3	1,4
27	(F1xF1)79(58)	127,0 ± 4,4	49,3 ± 5,3	4,1	1,2
28	1268	99,9 ± 6,5	42,5 ± 1,0	2,8	1,4
29	EK - T	96,2 ± 4,5	31,3 ± 4,8	2,0	2,0
30	106	111,7 ± 4,9	38,5 ± 6,2	2,1	1,4
31	AEC Brun	95,0 ± 3,4	60,4 ± 5,8	2,0	1,1
32	AEC Fauve	92,6 ± 1,8	48,5 ± 3,9	1,7	1,1

de la collection 1991, exprimées en mg/g de matière sèche.

(*)= Géotypes analysés en 1988 (Brun N)

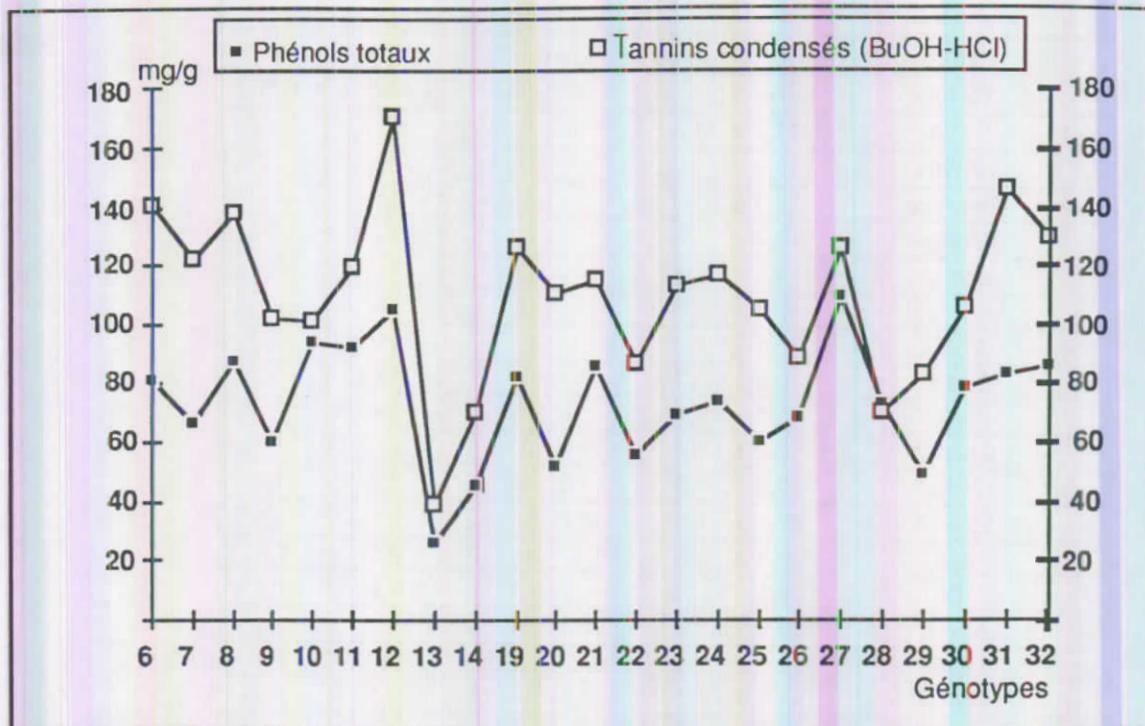


Figure 23 : Teneurs en phénols totaux et en tannins condensés (PA) des variétés colorées de la collection de féverole 1991 (en mg/g de MS).

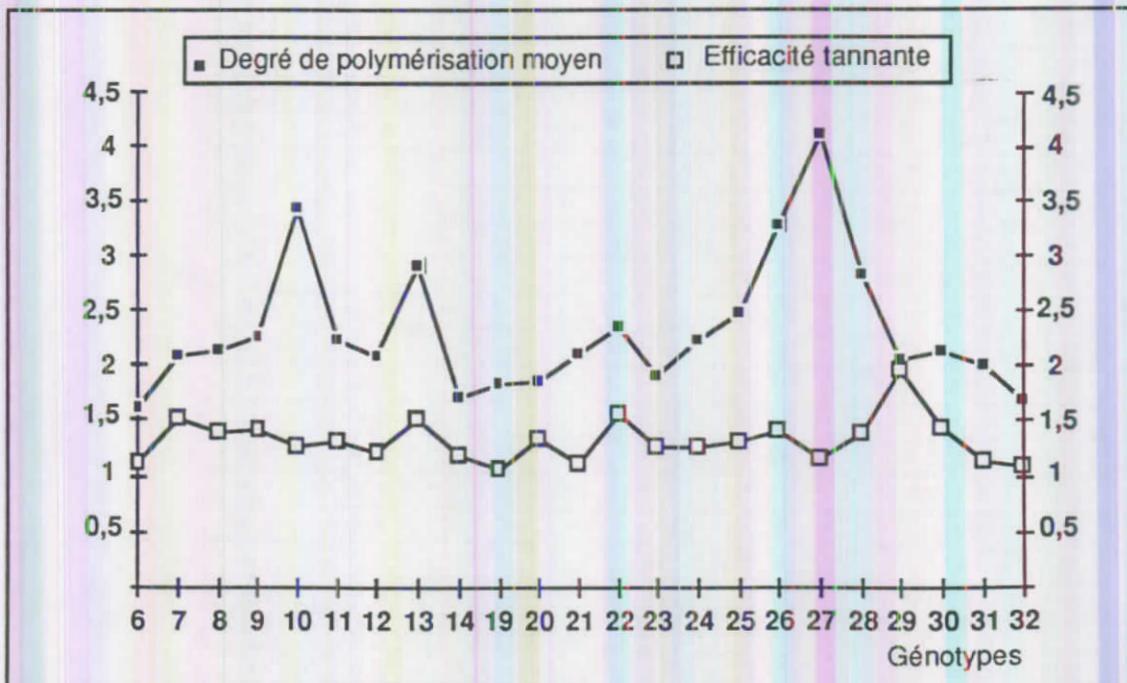


Figure 24. Comparaison des rapports PA/Van et-PT/ PhT des génotypes de féveroles de la collection 1991.

3. *Essai des combinaisons de caractères : Fleur à macule jaune-Tégument beige, Fleur à macule jaune-Tégument rouge et Tannins* : des géotypes F3 provenant des croisements diallèles (FD(1)(1), FD(1)(3), FD(1)(9), FD(1)(22), FD(2)(10), FD(2)(11), FD(2)(15), FD(2)(17), FD(4)(1), FD(4)(7), FD(4)(9) et FD(2)(8) récoltés en 1992.

4. *déterminisme de la relation entre 2 facteurs antinutritionnels , Vicine et Tannins* : deux quadruplets isogéniques EE et EB (récolte 1991) ; les formes EB sont reproduites en 1992.

B. RESULTATS DE L'ANALYSE QUANTITATIVE DU PATRON PHENOLIQUE DE LA FEVEROLE (Tableau 10)

L'échantillonnage des variétés et des lignées recouvre à peu près l'ensemble des couleurs de tégument de graine : blanc, gris, vert, marron, fauve, rouge, beige et brun. Sur ces couleurs de fond peuvent se superposer des taches vertes ou des macules noires.

Pour les phénols totaux et pour l'année 1991, l'amplitude de variation des teneurs se situe entre 6‰ et 104 ‰ équivalents catéchine par gramme de matière sèche.

Les propriétés tannantes de cette collection sont rendues quantitativement par le dosage des proanthocyanidines en milieu BuOH-HCl à chaud avec des teneurs comprises entre 0 à 170‰ ; qualitativement et par hémanalyse, les pouvoirs tannants varient de 12‰ à 126‰ équivalents acide tannique par gramme de matière sèche.

La **figure 23** présente, en superposition pour les 23 variétés à fleurs colorées, les teneurs en phénols totaux et en tannins condensés. Ces profils dévoilent la richesse polyphénolique des téguments de féveroles et montrent que la majorité des phénols détectés sont des proanthocyanidines ; La corrélation semble effet assez bonne entre les 2 familles de composés.

En ce qui concerne les variations entre les géotypes, on relève une large gamme de valeurs :

- des géotypes qui présentent des teneurs fortes en proanthocyanidines parmi lesquels le n°12 (lignée 949T) avec 170 mg/g, et à un degré moindre les géotypes n° 31 (AEC brun), n°6 (Victor) et le n°8 (Alfred) avec des valeurs avoisinant les 140 mg/g de MS ;

- des géotypes présentant des teneurs en tannins condensés les plus faibles : c'est le cas du n° 13 à tégument brun (géotype 245), du n°28 à tégument beige (géotype 1268) et le n° 14 à tégument vert (géotype 893) avec respectivement 57, 70 , 80 mg de proanthocyanidines par g de matière sèche ;
- et enfin entre ces 2 groupes des variétés à teneurs moyennes en proanthocyanidines comme les n° 9, 10, 22, et 26 avec des teneurs voisines de 95 mg/g de matière sèche.

La **figure 24** donne les résultats d'une approche plus fonctionnelle reposant sur le degré de polymérisation moyen des proanthocyanidines et sur l'efficacité tannante :

- dans le premier cas, le degré de polymérisation est rendu par le rapport des teneurs en proanthocyanidines (PA) et les valeurs du test vanilline (Van)
- dans le deuxième cas, l'évaluation de l'efficacité tannante est faite par le rapport des teneurs du pouvoir tannant estimé par hémanalyse (PT) et des teneurs en phénols totaux (PhT).

Au sein de cette collection, comme le montre la **figure 24**, le degré de polymérisation moyen calculé varie de 1,6 à 4,1 soit de 1 à 3 alors que l'efficacité tannante varie du simple au double. Les variations de ces rapports traduisent en réalité la présence de classes de proanthocyanidines différentes selon les géotypes étudiés. A titre d'exemple la collection 1991 fait ressortir quelques types chimiques bien caractérisés :

- géotypes présentant à la fois un haut degré de polymérisation et une faible efficacité tannante (géotype n°27 (F1xF1)79(58) et n° 10 Minica) traduisant la présence dans les téguments de très hauts polymères catéchiques, moins efficaces pour complexer les protéines ;
- géotypes à faible rapport PA/Van et faible efficacité tannante (n° 6 Victor, n°19 LPSP, n° 20 PBI 220) ; ils représentent un type chimique riche en oligomères et monomères catéchiques ;
- géotype à efficacité tannante forte et à degré de polymérisation moyen (n°29 EK-T) ; il forme un type chimique riche en oligomères catéchiques dont l'efficacité à complexer les protéines est reconnue.

Cas des représentants à gènes zéro tannins (0T)

Tous les géotypes à fleurs blanches présentent une teneur faible en phénols totaux, de l'ordre de 7 mg./g équivalents catéchine. Malgré l'absence de Proanthocyanidines, leurs

extraits phénoliques présentent une légère réactivité vis-à-vis de l'hémoglobine donc un pouvoir tannant mesurable.

Ce qu'il faut surtout noter c'est la forte ressemblance d'expression des gènes n° 1 et n° 2. En effet le dosage des phénols totaux ou l'estimation du pouvoir tannant par l'hémanalyse ne montrent pas de différence entre l'expression de ces 2 gènes. Mais il faut être prudent car même si le phénotype phénolique final apparaît identique, cela ne veut pas dire que les voies de biosynthèse soient les mêmes ou soient soumises à la même régulation métabolique. Il faudrait travailler à un niveau plus fin d'analyses chimiques et expertiser quelques intermédiaires de biosynthèse (dihydroflavonol ou dihydroflavone) avant le phénomène de polymérisation conduisant à formation des tannins. Ceci pourrait se réaliser par l'analyse de téguments avant maturité et par le suivi de l'évolution du contenu phénolique jusqu'aux stades de récolte.

1. Vérification de la stabilité des patrons phénoliques de *Vicia faba*

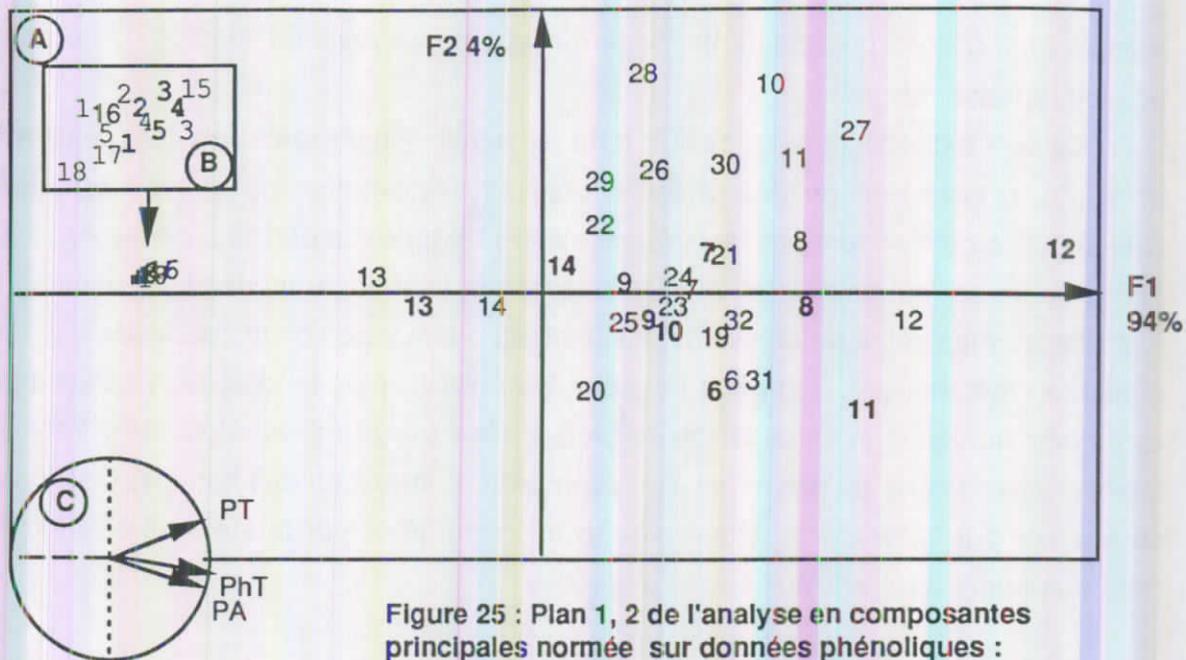
Cette étude a porté sur 14 variétés récoltées au moins 2 fois comme cela a été montré dans la description de la collection.

Sur cette base, une analyse en composantes principales (ACP) des génotypes de 1991 a été réalisée à partir des résultats des 3 dosages : phénols totaux (bleu de Prusse), tannins condensés (production d'anthocyanidines), et pouvoir tannant (hémanalyse). A l'ACP normée des génotypes de la collection 91, nous avons ensuite projeté les "parents" analysés en 1988 en tant qu'individus supplémentaires.

1. 1. ACP sur données phénoliques

La **figure 25** présente la carte factorielle des variétés et le cercle de corrélation obtenu avec les variables citées plus haut.

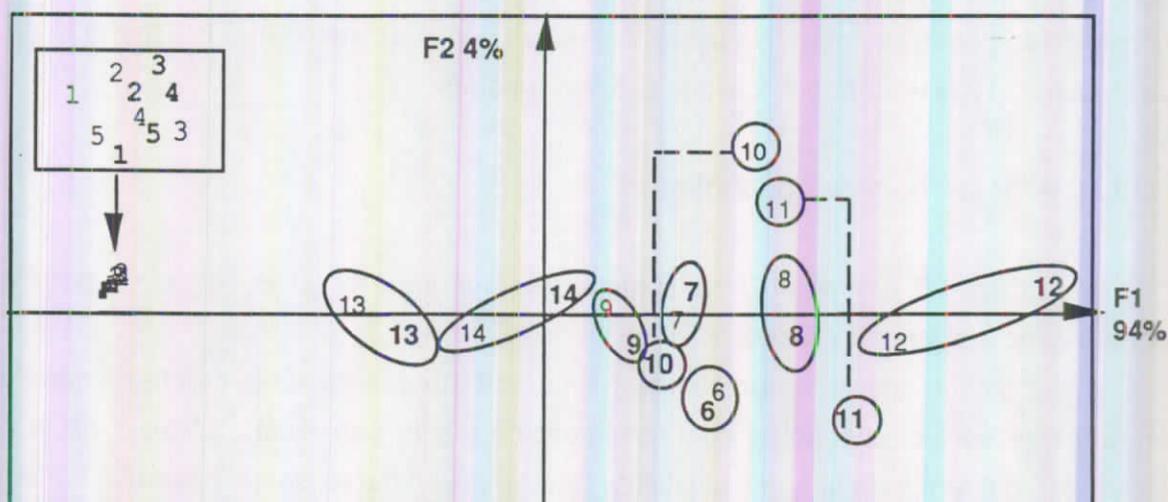
L'orientation des vecteurs les uns par rapport aux autres sur le cercle de corrélation montre que les trois variables sont fortement corrélées entre elles. L'axe 1 de la carte factorielle, qui remporte la quasi totalité de l'inertie (94%) fait ressortir l'opposition graines à tannins et graines sans tannins : les génotypes riches en tannins condensés ont des coordonnées positives alors que les génotypes sans tannins ont des coordonnées négatives. Nous remarquerons la position de transition des génotypes n°13 et 14 correspondant respectivement aux génotypes 245(9)(4) et 893(4)(6).



A : carte factorielle des génotypes de 1991 ; les parents analysés en 1988 ont été superposés en individus supplémentaires (en gras)

B : aggrandissement de la zone correspondant aux génotypes sans tannins .

C : cercle de corrélation des variables



Le dépouillement de la carte factorielle des individus en ne prenant en compte que les 14 génotypes analysés en 1988 et confrontés à leur réplique de 1991 est illustré dans la **figure 26**. Il ressort que :

- pour les variétés sans tannins la superposition est quasi parfaite
- pour les variétés à tannins, elles se répartissent le long de l'axe 1 (94% de la variance). Les variations entre récolte 1988 et récolte 1991 pour une même variété sont mineures sur l'axe 1 ; leur variation est relativement faible au moins en ce qui concerne le chémotype phénolique ; cependant 3 couples de points semblent diverger de manière plus marquée, il s'agit des génotypes 10, 11 et 12 ; soulignons toutefois que pour les 2 premiers, la divergence porte sur l'axe 2 dont la signification statistique est nulle. En réalité la seule variation phénotypique apparemment "recevable" est celle du génotype 12 qui est une lignée pure. La variation mesurée ne peut être due qu'à un effet de l'environnement.

L'analyse de variance va nous permettre de confirmer l'importance de la stabilité intergénotypique et de montrer que la variation phénolique entre 1988 et 1991 n'est pas significative.

1. 2. analyse de variance à deux facteurs contrôlés

L'analyse de la variance à 2 facteurs contrôlés (la variété et l'année de récolte) réalisée sur chacune des 3 variables phénoliques montre que pour ces 3 variables (planche 1) :

- la variabilité intergénotypique est très hautement significative par rapport à la variation interannée et l'interaction génotype x année.
- le facteur année n'est pas significatif (même pour le génotype 12)

Le test de NEWMAN-KEULS complète l'analyse de variance. Il permet de classer les moyennes génotypiques les unes par rapport aux autres pour chacune des 3 variables analysées. Ce traitement permet de constituer des groupes de génotypes non significativement différents par rapport à la variable étudiée.

C'est ainsi que par rapport à la variable "Phénols totaux", les variétés se répartissent en 5 groupes :

- le groupe (A) constitué par les génotypes (12 = 949 T) présentant des teneurs élevées en phénols totaux est significativement différent de tous les autres groupes ;
- à l'opposé les variétés à faibles teneurs représentées par la lettre (E) forment également un groupe homogène significativement différent ;

ANALYSE DE VARIANCE

Nombre d'observations : 28

Nombre de variables : 5

N° et noms des variables: 1 = numéro ; 2 = année ; 3 = Phénols totaux (PHT) ;

4 = Proanthocyanidines (PA) ; 5 = Pouvoir tannant (PT).

DISPOSITIF DE L'ESSAI : FACTORIEL 2 FACTEURS

FACTEUR 1 = 14 numéros

1 = SWI (1) 2 = BLANDINE (2) 3 = ALBATROS (3) 4 = PBO7 (4) 5 = 949 OT (5)
 6 = VICTOR (6) 7 = SCI (7) 8 = ALFRED (8) 9 = ASCOTT (9) 10 = MINICA (10)
 11 = TROY (11) 12 = 949 T (12) 13 = 245(9)(4) (13) 14 = 893(4)(6) (14)

FACTEUR 2 = 2 ANNÉES

1 = 1988 (88) 2 = 1991 (91)

ANALYSE DE LA 1 ère VARIABLE : PHENOLS TOTAUX (PHT)

ANALYSE DE LA VARIANCE

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTALE	41424,64	27	1534,25				
VAR.FACTEUR 1	40615,76	13	3124,29	51,24	0,000		
VAR.FACTEUR 2	16,23	1	16,23	0,27	0,6194		
VAR.RESIDUELLE1	792,64	13	60,97			7,81	15,6%

ANALYSE DE LA 2e VARIABLE : PROANTHOCYANIDINES (PA)

ANALYSE DE LA VARIANCE

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTALE	113348,59	27	4198,1				
VAR.FACTEUR 1	106298,44	13	8176,8	15,13	0,000		
VAR.FACTEUR 2	22,98	1	22,98	0,04	0,8340		
VAR.RESIDUELLE1	7027,17	13	540,55			23,25	32,6%

ANALYSE DE LA 3e VARIABLE : POUVOIR TANNANT (PT)

ANALYSE DE LA VARIANCE

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTALE	56748,73	27	2101,8				
VAR.FACTEUR 1	55429,37	13	4263,84	42,76	0,000		
VAR.FACTEUR 2	22,45	1	22,45	0,23	0,6469		
VAR.RESIDUELLE1	1296,41	13	99,72			9,99	15,0%

Planche 1 : Résultats de l'analyse de variance à 2 facteurs contrôlés réalisée sur les génotypes de féverole (collection 1988 et 1991)

Test de NEWMAN-KEULS- seuil = 5%

1 ère VARIABLE : PHENOLS TOTAUX (PHT)

F1	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES			
12	12	118,68	A			
11	11	95,51		B		
8	8	84,14		B	C	
6	6	82,02		B	C	
10	10	81,82		B	C	
7	7	70,49			C	D
9	9	58,77				D
14	14	50,43				D
13	13	25,21				E
4	4	8,27				E
1	1	7,19				E
3	3	7,07				E
5	5	6,57				E
2	2	6,36				E

Test de NEWMAN-KEULS- seuil = 5%

2 e VARIABLE : PROANTHOCYANIDINES (PA)

F1	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES					
12	12	180,88	A					
11	11	146,05		B				
8	8	145,08		B				
6	6	139,51		B	C			
7	7	118,78		B	C			
9	9	109,18			C			
10	10	108,6			C			
14	14	75,15				D		
13	13	48,24					E	
5	5	0						F
4	4	0						F
3	3	0						F
2	2	0						F
1	1	0						F

Test de NEWMAN-KEULS- seuil = 5%

3e VARIABLE : POUVOIR TANNANT (PT)

F1	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES					
12	12	139,63	A					
8	8	120,22	A	B				
11	11	114,43	A	B				
10	10	101,51		B				
7	7	100,43		B				
6	6	88,72		B				
9	9	88,68		B				
14	14	61,81			C			
13	13	43,93			C			
5	5	16,14				D		
6	6	15,94				D		
4	4	15,66				D		
2	2	14,73				D		
1	1	12,34				D		

- entre ces 2 extrêmes, se répartissent 3 groupes B, C et D disjoints constitués de génotypes à contenu phénolique moyen.

Le traitement appliqué à la variable "Proanthocyanidines" révèle que ce descripteur est plus sélectif et fait ressortir les génotypes 949T (n°12) dans le groupe (A), les génotypes 893(4)(6) (n°14) dans le groupe (D), les génotypes 245(9)(4) (n°13) dans (E). Les génotypes dépourvus de tannins condensés forment un groupe significativement différent (F).

Le traitement statistique à l'aide de la variable "Pouvoir tannant" répartit les génotypes de féverole en 4 groupes :

- le groupe des génotypes à forts pouvoirs tannants désignés par la lettre (A) qui se chevauche avec des génotypes du groupe B
- les 2 autres groupes concernent les génotypes de faibles pouvoirs tannants.

De cette analyse nous retiendrons que la stabilité, d'une année sur l'autre, du pattern quantitatif phénolique des génotypes étudiés est tout à fait "correcte"

2. Relation entre le patron phénolique et couleur des téguments

Une étude réalisée par Brun 1991, sur les relations entre la composition phénolique des téguments de la graine et la couleur estimée à l'oeil nu (avec toutes les erreurs d'appréciation que cela peut entraîner en particulier pour les plus foncées) avait montré que la corrélation entre la coloration des enveloppes de la graine et leurs teneurs phénoliques est très faible. Afin de mieux appréhender cette relation nous avons mis en oeuvre une méthode d'analyse de la couleur par spectrocolorimétrie (analyse spectrocolorimétrique de la lumière réfléchiée par les téguments). Nous avons choisi parmi les génotypes de notre collection quelques cultivars caractérisant la gamme de couleurs rencontrée chez *Vicia faba* L..

Parmi les indices colorimétriques calculés, la clarté définie par (L^* = Lightness) est apparue comme la variable montrant le maximum d'amplitude et en outre la mieux corrélée avec la sensation visuelle de l'objet graine ; il était donc opportun de vérifier son degré de corrélation avec les caractères chimiques de ces téguments de graines : le graphe (figure 27) illustre ce point de vue en comparant les pouvoirs tannants évalués par hémanalyse et la clarté (L^*) déterminée par colorimétrie.

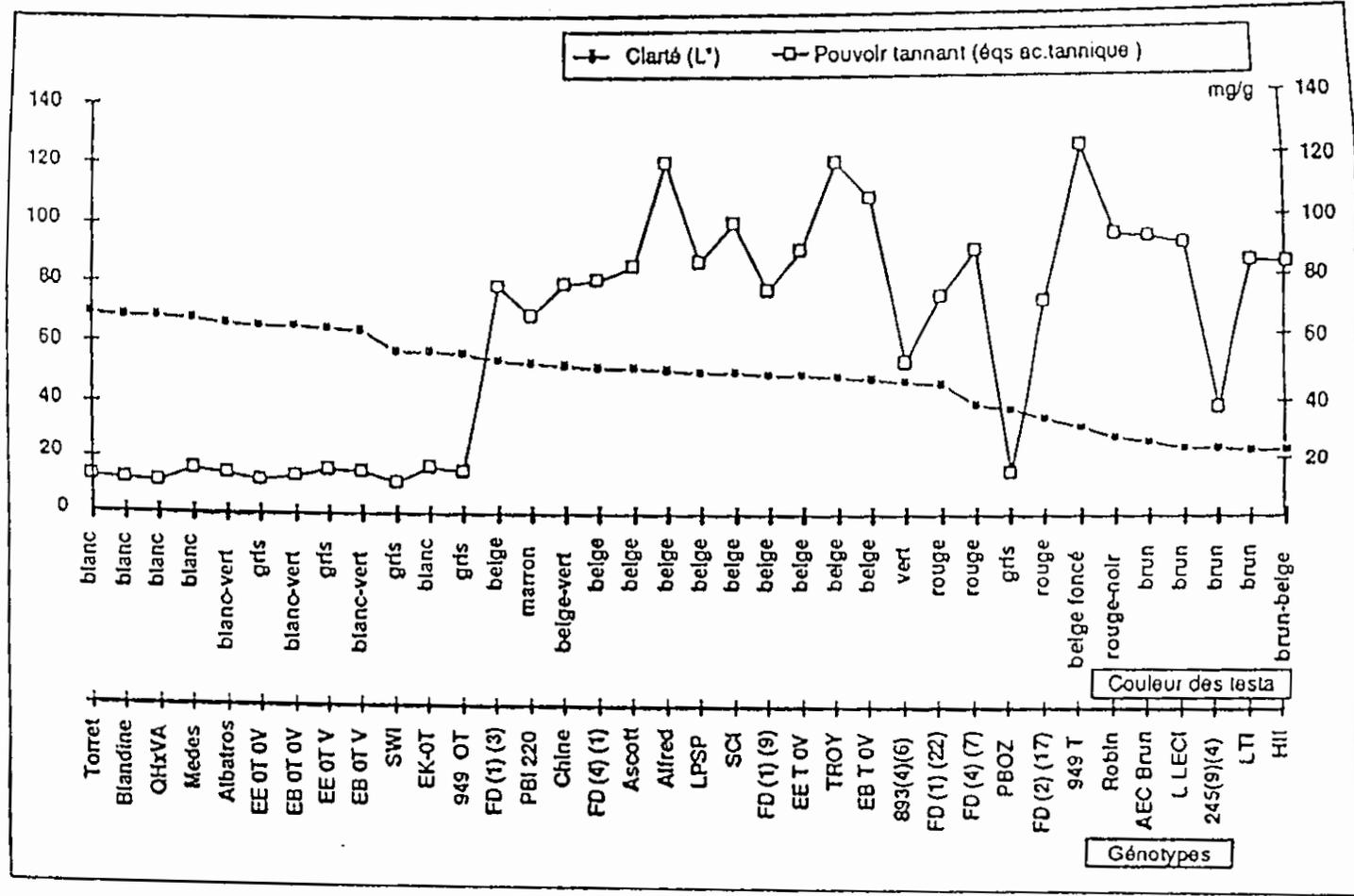


Figure 27 : Corrélation entre la clarté(L*) et le pouvoir tannant de quelques génotypes de féveroles de la collection 1991.

Génotype	Couleur	Phénols totaux fleur* - testa Bleu de Prusse	Tannins condensés (mg/g)		Pouvoir tannant (mg/g)	
			BuOH/HCl	Vanilline	Hémanalyse	Gélatine
FD (1) (1)	N* - rouge	53,6 ± 5,5	147,1 ± 4,2	50,6 ± 6,1	92,6 ± 4,9	48,4 ± 4,5
FD (1) (3)	N* - belge	43,9 ± 2,4	145,3 ± 6,8	57,1 ± 3,8	80,9 ± 3,2	35,9 ± 2,4
FD (1) (9)	J* - beige	44,6 ± 5,4	117,6 ± 7,0	38,0 ± 2,8	76,8 ± 2,8	28,1 ± 4,6
FD (1) (22)	J* - rouge	47,5 ± 3,2	119,3 ± 1,8	64,4 ± 2,1	75,0 ± 3,4	39,8 ± 3,0
FD (2) (10)	N* - beige	38,5 ± 2,7	113,5 ± 1,5	56,3 ± 2,1	61,5 ± 3,2	24,5 ± 4,9
FD (2) (11)	N* - rouge	45,7 ± 2,2	132,5 ± 6,2	56,8 ± 5,0	82,0 ± 3,2	36,7 ± 4,4
FD (2) (15)	J* - beige	48,7 ± 3,9	90,7 ± 3,6	45,0 ± 4,2	78,4 ± 3,2	26,0 ± 2,8
FD (2) (17)	J* - rouge	45,0 ± 0,9	114,0 ± 4,1	39,5 ± 3,9	73,3 ± 6,7	37,0 ± 4,2
FD (4) (1)	N* - beige	45,5 ± 5,3	104,0 ± 4,5	27,5 ± 3,5	81,0 ± 3,0	28,0 ± 3,2
FD (4) (7)	N* - rouge	50,4 ± 3,1	105,5 ± 5,8	38,2 ± 6,5	90,4 ± 5,6	27,8 ± 2,6
FD (4) (9)	J* - rouge	48,9 ± 1,9	107,5 ± 6,2	35,1 ± 3,1	80,5 ± 3,4	37,5 ± 2,2
FD (2) (8)	J* - beige	52,2 ± 2,9	110,0 ± 2,82	44,1 ± 1,4	100,6 ± 2,6	37,8 ± 3,9

Tableau 11 : Caractéristiques variétales, teneurs en phénols totaux (éqs catéchine), tannins condensés (en mg/g d'après le E1% de Bate-Smith pour le BuOH-HCl et en éqs catéchine pour le test vanilline), pouvoir tannant (en éqs ac.tannique) des descendants F3 du croisement diallèle pour l'étude du déterminisme Fleur jaune-Tégument beige, Fleur jaune-Tégument rouge. (*) N* = normale, J* = jaune.

Pour les géotypes sans tannins, la clarté (L^*) est généralement supérieure à 55 sur une échelle allant de 0 (noir) à 100 (blanc parfait) ; à l'exception du géotype PB0Z (tégument gris à faible pouvoir tannant). Inversement, les géotypes à téguments colorés et pouvoir tannant mesurable montrent une clarté inférieure à 50. Parmi ces cas :

1. les téguments beiges, marrons (couleur de fond) présentent une clarté (L^*) allant de 54 à 48 pour un pouvoir tannant de 70 à 120 mg. g⁻¹ éqs acide tannique ;
2. la clarté des téguments rouges varie de 46 à 28 pour un pouvoir tannant moyen de l'ordre de 73 à 90 mg/g équivalents acide tannique. Dans cette zone de clarté, se situe également le géotype 949T caractérisé par son très fort pouvoir tannant (126 mg. g⁻¹ éqs ac.tannique).
3. dans la zone inférieure à 27, la clarté (L^*) des cultivars à téguments noirs est associée à un fort pouvoir tannant sauf le n° 245(9)(4) qui présente une faible teneur en tannins.
4. Le géotype 893(4)(6) à tégument vert présente un pouvoir tannant moyen associé à une clarté (L^*) est de l'ordre de 47.

De cette étude, il en ressort que la clarté (L^*) peut être un indice intéressant pour rendre compte du niveau de teneur des molécules tannantes dans les téguments. La prudence restera de mise car il y a des exceptions tel que le n° PB0T. Mais en aucune façon la corrélation ne peut être utilisée entre cet indice et la quantité de tannins.

3. Relation entre [fleur jaune-tégument belge], [fleur jaune-tégument rouge] et tannins :

Les résultats de l'analyse chimique sont donnés dans le **tableau 11** .

Les géotypes FD1 et FD2 isogéniques (obtention INRA Dijon) à fleur ponctuée jaune-graine à tégument beige et fleur ponctuée jaune-graine à tégument rouge respectivement semblent avoir un contenu phénolique équivalent, ce qui diffère des résultats de Cabrera et Martin (1989) qui détectent sur leur propre matériel génétique une diminution de 50 à 70% du contenu tannique chez les géotypes à fleur maculée jaune - tégument rouge.

Cette différence d'expression des gènes qui gouvernent le phénotype phénolique final peut être expliquée de diverses manières :

	Génotype	Couleur testa	Couleur fleur	Phénols totaux Bleu de Prusse	Tannins condensés		Pouvoir tannant	
					BuOH/HCl	Vanilline	Hémanalyse	Gélatine
Année 91	EE 0T 0V	blanc	blanche	6,8 ± 1,0	0	0,7 ± 0,1	12,5 ± 1,5	0
	EE 0T V	blanc	//	6,8 ± 0,2	0	1,0 ± 0,2	16,0 ± 0,8	0
	EE T 0V	fauve	macule noire	54,9 ± 1,0	88,9 ± 3,2	31,2 ± 1,5	90,8 ± 2,6	31,0 ± 1,8
	EE T V	fauve	//	48,6 ± 3,0	94,2 ± 6,6	44,9 ± 1,5	83,2 ± 4,3	20,5 ± 2,1
	EB 0T 0V	blanc	blanche	7,7 ± 0,6	0	0,9 ± 0,0	14,1 ± 4,2	0
	EB 0T V	blanc	//	7,5 ± 0,6	0	0,6 ± 0,1	15,5 ± 3,6	0
	EB T 0V	fauve	macule noire	60,8 ± 2,5	102,7 ± 5,1	42,1 ± 5,7	108,2 ± 3,8	47,0 ± 5,9
	EB T V	fauve	//	48,4 ± 0,4	95,1 ± 4,2	44,9 ± 4,0	88,5 ± 7,0	26,3 ± 3,6
Année 92	EB 0T 0V	beige	blanche	7,4 ± 0,3	0	1,6 ± 0,2	16,4 ± 0,8	/
	EB 0T V	beige	//	6,8 ± 0,1	0	1,5 ± 0,1	13,4 ± 1,3	/
	EB T 0V	fauve	macule noire	84,8 ± 3,5	124,8 ± 5,3	85,4 ± 0,6	122,5 ± 4,3	/
	EB T V	fauve	//	75,7 ± 1,4	86,94 ± 3,2	65,9 ± 3,7	102,7 ± 2,3	/

Tableau 12 : Caractéristiques variétales, teneurs en phénols totaux (éqs catéchine), tannins condensés (éqs catéchine pour le test vanilline, en mg.g⁻¹ d'après leE1% de Bate-Smith pour le BuOH-HCl), pouvoir tannant (éqs ac. tannique) des graines de Féverole EE et EB (91)et (92)pour les formes EB exprimées en mg.g⁻¹de matière sèche

- soit que l'influence dans la régulation du gène fleur ponctuée jaune sur le gène graine rouge, est différente dans le matériel génétique des deux origines : Espagne, France.
- soit que les gènes graines rouges sont différents ;
- soit que les deux matériels génétiques ont un même gène fleur ponctuée jaune et un même gène graine rouge, mais les fonds génétiques sur lesquels ils travaillent sont très différents.

4. Relation entre 2 facteurs antinutritionnels : tannins et vicine

Outre les facteurs antitrypsiques, les cotylédons des graines de féverole contiennent aussi la vicine (2,4-Diamino-6-oxypyrimidine-5-(β -D-glucopyranoside) et la convicine (6-Amino-5-(β -D-glucopyranosyloxy) uracil). Ces glycosides sont des facteurs antinutritionnels entre autre impliqués dans le favisme, l'anémie hémolytique humaine et la baisse du poids des œufs chez la volaille (Marquardt, 1989 ; Bjerg *et al.*, 1984). La structure chimique des deux inhibiteurs est donnée dans la **figure 28**.

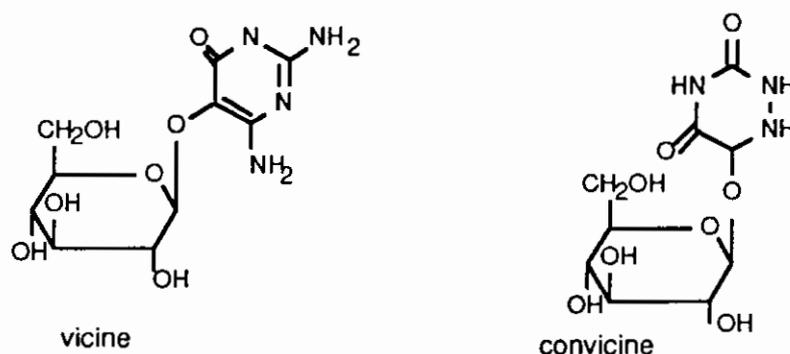


Figure 28 : Structure chimique de la vicine et de la convicine.

Les deux quadruplets isogéniques EE et EB appartenant à la collection 1991 sont analysés du point de vue de leur teneur en composés polyphénoliques et de leur pouvoir tannant. En outre, Les formes EB ont été cultivées sur deux années successives. Les résultats sont présentés dans le **tableau 12**.

La forme EE-T (avec tannins) est moins tannante que EB-T (avec tannins) ; ces deux formes doivent posséder un fond génétique différent qui autorise une biosynthèse plus forte en tannins condensés chez les formes EB. La différence en pouvoir tannant est d'environ 10 % en faveur de cette dernière.

La présence de vicine semble sans incidence sur les teneurs en phénols des génotypes sans tannins. Par contre la présence de vicine dans les génotypes tannants s'accompagne uniquement pour les génotypes EB d'une chute d'efficacité en pouvoir tannant d'environ 20%, confirmée pour les 2 années de récoltes 1991 et 1992 (ce qui lève l'ambiguïté d'un effet de l'environnement).

n°	code Variétal	Couieur tégument	Phénols totaux (mg/g)		Tannins condensés (mg/g)		Pouvoir tannant (mg/g)	Rapport	
			cotylédon	tégument	tégument		tégument	PA / Van	PT / PhT
			bieu de Prusse	bieu de Prusse	BuOH/HCl	Vanilline	Hémanalyse		
Année 1991									
1	PB1 608	beige	4,9 ± 0,4	77,1 ± 2,8	104,2 ± 5,2	56,5 ± 3,4	97,5 ± 1,6	1,8	1,3
2	PB1 611	blanc	4,1 ± 0,1	5,9 ± 0,3	0	0,8 ± 0,1	18,5 ± 0,5		
3	PB1 635	beige	6,0 ± 0,1	76,8 ± 1,2	121,5 ± 4,0	54,6 ± 4,1	82,0 ± 2,8	2,2	1,1
4	PB1 642	marron	4,8 ± 0,3	56,6 ± 2,4	89,3 ± 5,7	43,1 ± 0,6	84,5 ± 2,1	2,1	1,5
5	PB1 646	rouge	5,6 ± 0,1	103,8 ± 2,1	134,0 ± 4,3	66,0 ± 2,1	103,3 ± 3,6	2,0	1,0
6	PB1 647	blanc	6,3 ± 0,2	7,0 ± 0,8	0	0,9 ± 0,2	15,9 ± 2,1		
7	PB1 648	marron-beige	6,5 ± 0,0	50,7 ± 3,0	93,8 ± 6,6	45,1 ± 3,0	100,9 ± 4,4	2,1	2,0
8	PB1 682	beige	4,0 ± 0,2	63,6 ± 3,4	108,5 ± 3,2	34,3 ± 3,2	77,7 ± 3,7	3,2	1,2
9	PB1 683	blanc-noir	4,3 ± 0,1	5,7 ± 1,2	0	1,0 ± 0,6	16,5 ± 0,6		
Année 1992									
10	F 646 C 2	rouge	6,0 ± 0,4	93,8 ± 3,8	145,0 ± 6,4	53,5 ± 5,0	128,9 ± 3,5	2,7	1,4
11	F 662 C 2	blanc	5,3 ± 0,1	5,8 ± 0,1	0	1,2 ± 0,1	17,3 ± 0,5		
12	F 665 C 2	blanc	5,6 ± 0,3	6,5 ± 0,2	0	1,2 ± 0,3	15,6 ± 1,5		
13	F 666 C 2	blanc	6,5 ± 0,0	6,9 ± 0,3	0	1,0 ± 0,4	18,0 ± 1,2		
14	F 667 C 2	marron	5,6 ± 0,1	55,0 ± 3,9	90,8 ± 4,4	43,8 ± 1,4	90,3 ± 1,4	2,1	1,6
15	F 668 C 2	marron	5,0 ± 0,4	62,2 ± 3,1	76,9 ± 3,5	38,4 ± 3,4	78,0 ± 3,4	2,0	1,3
Année 1993									
16	F 611 F 3	blanc	4,2 ± 0,2	7,6 ± 0,5	0	1,6 ± 0,2	15,3 ± 1,1		
17	F 613 F 3	beige	4,4 ± 0,1	59,7 ± 5,7	129,4 ± 6,7	61,3 ± 6,1	89,6 ± 7,1	2,1	1,5
18	F 615 F 3	beige	5,9 ± 0,0	80,6 ± 1,4	119,0 ± 2,9	68,8 ± 3,0	93,9 ± 3,1	1,7	1,2
19	F 617 F 3	blanc-noir	6,3 ± 0,1	7,4 ± 0,4	0	1,6 ± 0,1	15,6 ± 0,5		
20	F 629 F 3	blanc-noir	6,5 ± 0,1	6,3 ± 0,1	0	1,2 ± 0,1	15,4 ± 1,1		
21	F 630 F 3	beige	5,6 ± 0,1	55,4 ± 1,8	99,1 ± 2,9	35,7 ± 3,1	77,6 ± 2,5	2,8	1,4

Tableau 13 : Caractéristiques variétales, teneurs en phénols totaux (éq. catéchine), tannins condensés (éq. catéchine pour le test vanilline, d'après le E1% de Bate-Smith pour le BuOH-HCl) et pouvoir tannant (éq. acide tannique) de féveroles de la collection PEA programme exprimées en mg g⁻¹ de matière sèche.

Conclusion

Cet aperçu global de la diversité phénotypique de la collection de féverole fait ressortir quelques éléments importants qui pourraient servir de base à la recherche de nouveaux génotypes présentant les caractéristiques escomptées : Proanthocyanidines à un niveau de teneur acceptable et non facteurs antinutritionnels (FAN).

Le faible contenu phénolique des téguments bruns et à un degré moindre celui des téguments verts par rapport aux téguments de couleur beige, marron et rouge nous conduit à approfondir l'héritabilité relative à ce pattern phénolique pour tenter d'établir les bases de la relation génétique entre la couleur des téguments et le contenu polyphénolique (voir plus loin).

5. Autres génotypes de féveroles étudiés pour le PEA programme

Les résultats des échantillons de féverole du PEA Programme sont rassemblés dans le **tableau 13**. Ils concernent des génotypes récoltés en 1991, 1992 et 1993. Le décryptage, le type et le lieu de production sont donnés en annexe 1.

Les cotylédons présentent, quelle que soit la couleur des téguments, des teneurs en phénols totaux de l'ordre de 5,4 mg équivalents catéchine par g de matière sèche.

Les génotypes à téguments blanc ou blanc-noir sont totalement dépourvus de tannins condensés ; ils présentent néanmoins des teneurs faibles en phénols totaux et en pouvoir tannant. Parmi ces génotypes, des types "Hiver" Zéro tannin : le n° 611 (Glacier) analysé en 1991 et en 1993, le n° 647 (SWI) qui est une variété de Printemps et des isogéniques n° 662, 665 et 666 correspondant aux formes EE et EB déjà analysés précédemment (Cf partie B 4).

En revanche, les génotypes à téguments colorés présentent un contenu polyphénolique important :

- les cultivars n° 646 (Robin) à tégument rouge présentent des teneurs fortes en tannins condensés de l'ordre de 140 mg d'anthocyanidines par g de matière sèche ;
- les génotypes à tégument beige représentés par Victor (635), Bourdon (608 et 613) et Fabiola (615) présentent des teneurs en tannins avoisinant les 120 mg.g⁻¹.
- des génotypes à tégument marron (LPSP n° 642) ou marron-beige (SCI n° 648) type "Printemps" présentent des teneurs en tannins condensés de l'ordre de 90 mg.g⁻¹.

L'étude des rapports PA/Van et PT/PhT traduisant respectivement le degré de polymérisation et l'efficacité tannante montre que :

- le génotype 682 présente le plus fort rapport PA/Van de la collection ; cependant il présente une efficacité tannante faible ce qui se traduit par la présence de tannins condensés de type haut polymères dans les téguments ;
 - le génotype 648 présente un rapport PA/Van moyen alors que l'efficacité tannante est maximale ; ces rapports traduisent la présence de tannins oligomères, très efficaces pour précipiter les protéines ;
 - les génotypes 608 et 615 présentent des rapports PA/Van et PT/Pht faibles ; ils traduisent vraisemblablement la présence simultanée de tannins condensés oligomères et hauts polymères.
- Enfin les cultivars 646 récoltés 2 années successives ne montrent pas de différence au niveau de leur contenu polyphénolique.

C. DETERMINISME GENETIQUE DE QUELQUES MOLECULES CARACTERISTIQUES DU PATRON PHENOLIQUE DES TEGUMENTS SEMINAUX DE LA FEVEROLE

La coloration des téguments des graines des Légumineuses résulte essentiellement d'un mélange de molécules telles que anthocyanidines, les tannins condensés modifiés en phlobaphènes et mélanines. C'est évidemment les tannins condensés ou proanthocyanidines qui ont été les plus étudiés.

Nozzolillo *et al.*, 1989 travaillant sur l'ensemble de la voie de biosynthèse des flavonoïdes, aboutissent à une proposition de contrôle génétique de la synthèse des phénols chez *Vicia faba*, dans laquelle l'ensemble des génotypes peut être repéré par rapport à quatre principales classes de flavonoïdes :

- les flavones dont le principal aglycone est l'apigénine, sont présentes significativement dans les téguments violets, beiges, verts et rouges, et à un degré moindre dans les téguments noirs.
- Les flavonols dont le principal aglycone est la myricétine se trouvent surtout dans les téguments verts et rouges, accessoirement dans les téguments bruns.
- Les anthocyanines sont présentes dans les téguments violets avec prédominance de 4 aglycones : délphinidine, cyanidine, malvidine et pétunidine.
- les tannins condensés ou proanthocyanidines sont présents dans la plupart des génotypes de *Vicia faba* L à l'exception des téguments blancs.

1. Situation biogénétique du problème "tannins" par rapport aux autres flavonoïdes

L'élucidation des phénomènes concernant les relations entre la présence de tannins et certains caractères morphologiques tels que la couleur des fleurs et celle des téguments passe par la compréhension des mécanismes génétiques responsables de la biosynthèse de ces molécules.

Le schéma général de biosynthèse proposé par Forkmann 1992 est donnée dans la **figure 29**.

La première étape spécifique dans l'élaboration de ces composés du métabolisme secondaire, réside dans la condensation de 3 molécules d'Acétyl-CoA *via* le malonyl-CoA avec le 4-coumaroyl-CoA issu du métabolisme des phénylpropanoïdes sous l'influence de l'enzyme **PAL** (Phényl Ammonia Lyase).

Les principales voies contribuant à l'expression de la couleur sont celles qui conduisent essentiellement à la formation des flavonols, des anthocyanidines et des tannins condensés.

La chalcone synthase (**CHS**) assemble la première molécule de la voie et constitue le point de départ de la synthèse des flavonoïdes.

La chalcone isomérase (**CHI**) est à l'origine de la première molécule à noyau phénylchromone C-15 de la voie : la flavanone. Ce composé a plusieurs destinées parmi lesquelles celles conduisant aux flavones ou aux dihydroflavonols

Une enzyme microsomale à NADPH (**Flavone synthase**) par désaturation de la flavanone conduit à la formation de la flavone.

La flavanone 3 hydroxylase (**FHT**) catalyse l'hydroxylation de la position -3 de la flavanone en dihydroflavonol : le dihydrokaempférol. Cette molécule charnière représente un substrat accessible aux enzymes conduisant à des formes moléculaires qui ont un rôle capital dans l'expression de la couleur.

La flavonol synthase (**FLS**) catalyse la formation de la double liaison entre les carbonnes C2 et C3 des dihydroflavonols et oriente vers l'élaboration des flavonols.

Les flavonoïde 3'-hydroxylase (**F3'H**) et flavonoïde 3',5'-hydroxylase (**F3',5'H**) catalysent, respectivement , l'hydroxylation sur le noyau B des positions -3' et 3', 5'.

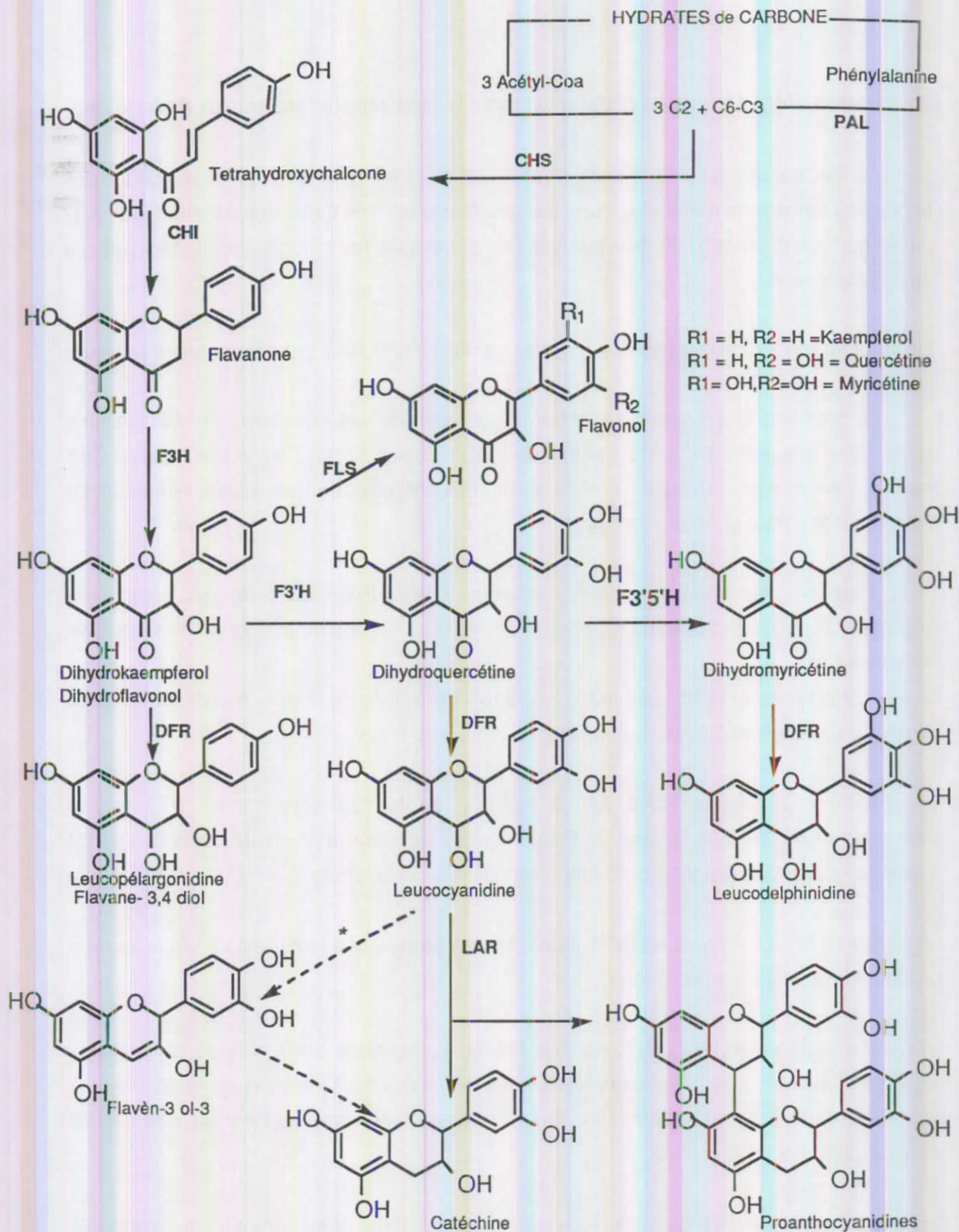


Figure 29 : Biosynthèse des proanthocyanidines d'après Forkmann 1992.

Enzymes : Chalcone synthase (CHS), chalcone isomèrese (CHI), flavanone 3-hydroxylase (F3H), flavonol synthase (FLS), dihydroflavonol-4-réductase (DFR), flavonoïde-3'-hydroxylase (F3'H), Flavonoïde-3'5'-hydroxylase (F3'5'H), leucoantocyanidine réductase (LAR).

Les dihydroflavonols sont les précurseurs directs de la formation des flavane-3,4-diols. Ces derniers constituent les intermédiaires-clé de la biosynthèse des anthocyanidines, des catéchines et des proanthocyanidines.

La dihydroflavonol 4-réductase (**DFR**) est l'enzyme qui catalyse la réduction des dihydroflavonols en flavane-3,4-diols ou leucoanthocyanidines. L'activité de la DFR a été démontrée par rapport à la formation et des catéchines et des proanthocyanidines et des anthocyanidines.

Les **leucoanthocyanidines** sont les précurseurs immédiats de la synthèse des catéchines et proanthocyanidines. La réaction qui aboutit à la formation de la catéchine à partir de la leucoanthocyanidine est catalysée par une leucoanthocyanidine 4-réductase (**LAR**). Le contrôle génétique de l'activité de cette enzyme (**LAR**) a été mis en évidence chez l'orge. Les proanthocyanidines sont probablement formées par condensation des catéchines et des leucoanthocyanidines, mais la nature et la spécificité de l'enzyme condensante ne sont pas, à l'heure actuelle, totalement élucidées.

D'après Stafford 1988, la conversion des flavane-3,4 diols en flavane-3-ols et leurs proanthocyanidines oligomères est une réaction NADPH dépendante, elle constitue le point de départ de la biosynthèse de tannins condensés.

Selon HASLAM (1989), la molécule charnière, la flavèn-3-ol-3 peut être issue directement de la chalcone ou bien d'un flavan-3,4-diol (leucoanthocyanidine). Cette flavèn-3 ol-3 peut à son tour être à l'origine des anthocyanidines ou des flavane-3 ols tels que la catéchine ou l'épicatéchine. La formation de ces dernières nécessitent l'addition d'un proton pour donner un cation hybride, ce cation génère soit une catéchine (ou épicatechine) grâce à l'intervention d'un NADPH, soit un C4 benzylcarbonium. La formation du dimère procède d'une substitution électrophile du carbone C8 de la catéchine ou de l'épicatéchine par ce benzylcarbonium. Ce mécanisme peut être étendu à la formation des oligomères.

2. Informations bibliographiques à propos du déterminisme génétique des principales classes chimiques citées.

Dans le schéma général, les voies qui président à la production de diverses molécules qui contribuent à la couleur des téguments sont gérées par des gènes codant les enzymes de biosynthèse .

Allèle	Etape de biosynthèse contrôlée
A ^S (tacheté)	Synthèse de flavonols (kaempférol) aux dépens de flavones Synthèse de phlobaphènes dans les taches
a ^V (violet)	Flavonols ----> anthocyanines réduction de l'hydroxylation des flavonols
a ^Y (vert)	biosynthèse des flavanols
a ^B (brun)	réduction de la synthèse des flavonoides
b ^B (brun)	synthèse des polymères de couleur brune
b (beige, tacheté, violet)	synthèse et polymérisation des tannins condensés
b ^Y (vert)	polymérisation des tannins
b ^{sc} (noir)	synthèse des phlobaphènes
b ^r (rouge)	synthèse des phlobaphènes augmentation générale de la biosynthèse des flavonoides.

Locus a: A^S> a^V> a^Y> a^B>a

Locus b : b^B> b> b^Y>bsr=br

bsr et br sont épistasiques sur le locus a

Tableau 14 : Allèles et Etapes de biosynthèse des phénols des téguments de féverole (Nozzolillo et al., 1989)

Selon Picard (1976), les mécanismes génétiques responsables de la synthèse des phénols chez *Vicia faba* dans le cas de téguments dépourvus de tannins condensés sont contrôlés par 2 gènes récessifs complémentaires. Ils bloquent la chaîne de biosynthèse des tannins condensés au niveau de la formation des dihydroflavonols ; ce blocage aboutit à la formation du caractère fleur blanche chez *Vicia faba*.

D'après Nozzolillo *et al.*, 1989, l'étape de biosynthèse de ces composés polyphénoliques repose sur un système de contrôle génétique à deux loci **a** et **b** ; le locus **a** est responsable de la synthèse des molécules élémentaires de flavonoïdes et le locus **b** gère les phénomènes de polymérisation c'est-à-dire principalement la formation de tannins condensés. Le rôle des différents allèles des locis **a** et **b** dans la biosynthèse des phénols des téguments de *Vicia faba* est précisé dans le **tableau 14**:

Le schéma général de biosynthèse prend toute son importance si l'on s'intéresse aux relations existantes entre la teneur en tannins condensés et la couleur du tégument de la graine. En effet, en l'absence d'expression la chalcone synthase, enzyme qui détermine l'orientation du métabolisme sur les flavonoïdes, l'enveloppe sera dépourvue de tannins condensés mais aussi de tout pigment flavonique. Par contre l'activation des différents complexes enzymatiques mis en jeu dans cette voie de biosynthèse oriente, au niveau tégumentaire, la production de proanthocyanidines et des flavonoïdes, incluant les anthocyanidines en plus ou moins grandes quantités.

3. Choix du matériel d'étude

Le tableau 15 résume l'information chimique acquise sur les téguments des graines de Féverole. On reconnaît :

- le caractère très homogène des féveroles à fleurs blanches et graines à téguments blancs représentées par Blandine, albatros pour le gène 1 et EK-0T et EE-0T pour le gène 2.
- le caractère moyennement homogène des féveroles à fleurs ponctuée jaune (génotypes 1212, 1214, FD1 et FD2)
- le caractère très hétérogène des féveroles à fleurs ponctuée noir et qui regroupent :
 - les génotypes à fort pouvoir tannant : tégument violet, rouge et beige auxquels se rapproche le génotype 949T lignée fixée

Génotype	Couleur testa	Couleur fleur	Phénols totaux	Pouvoir tannant	Tannins condensés	
			Bleu de Prusse	Hémanalyse	BuOH-HCl	Vanilline
Blandine, gène 1	blanc	Blanche	5,3 ± 0,3	17,2 ± 0,2	0	2,1 ± 0,1
Albatros, gène 1	blanc	Blanche	7,0 ± 3,4	17,4 ± 0,4	0	2,2 ± 0,1
EK-0T, gène 2	blanc	Blanche	6,2 ± 0,5	16,2 ± 0,3	0	1,5 ± 0,0
EE-0T, gène 2	gris	Blanche	6,3 ± 0,2	17,3 ± 0,6	0	1,2 ± 0,2
Alfred	Beige	ponctuée noir	81,3 ± 2,8	120,5 ± 2,4	152,1 ± 6,4	63,6 ± 3,7
Ascott	Beige	ponctuée noir	57,5 ± 3,0	91,9 ± 4,1	116,6 ± 6,5	50,4 ± 0,1
949 T	Beige	ponctuée noir	132,6 ± 7,5	153 ± 1,3	191,5 ± 2,2	102,2 ± 5,5
Ticol	Beige	ponctuée noir	118,4 ± 3,4	113,4 ± 3,4	191,1 ± 5,0	104,0 ± 6,2
245 (9) (4)	brun	ponctuée noir	24,9 ± 0,3	49,2 ± 0,1	57,6 ± 1,5	15,7 ± 0,9
893 (4) (6)	vert	ponctuée noir	55,9 ± 3,0	70,0 ± 2,6	80,1 ± 4,7	34,2 ± 2,5
D (1) (4)	rouge	ponctuée noir	106,2 ± 2,3	129,7 ± 1,5	150,5 ± 10,9	82,3 ± 3,6
319 (7) (8)	Violet	ponctuée noir	65,6 ± 1,3	99,1 ± 0,4	111,7 ± 6,8	30,5 ± 0,7
1212	Beige	ponctuée jaune	95,7 ± 0,5	127,8 ± 1,8	124,1 ± 0,9	55,0 ± 4,0
1214	Beige	ponctuée jaune	83,7 ± 2,8	103,0 ± 0,2	126,5 ± 5,8	46,3 ± 1,6
FD1 isogénique	Beige	ponctuée jaune	45,6 ± 5,4	80,2 ± 6,8	113,6 ± 6,8	44,7 ± 4,9
FD2 isogénique	rouge	ponctuée jaune	48,5 ± 5,3	82,4 ± 6,0	121,1 ± 7,0	47,5 ± 6,5

Tableau 15 : Caractéristiques variétales, teneurs en phénols totaux (en éqs catéchine), tannins condensés (en éqs catéchine p test vanilline, en mg/g d'après le E1% = 150 de Bate-Smith pour le BuOH-HCl), et pouvoir tannant (en éqs ac. tannique), des téguments des graines de féverole de la collection 1988, exprimées en mg/g de matière sèche.

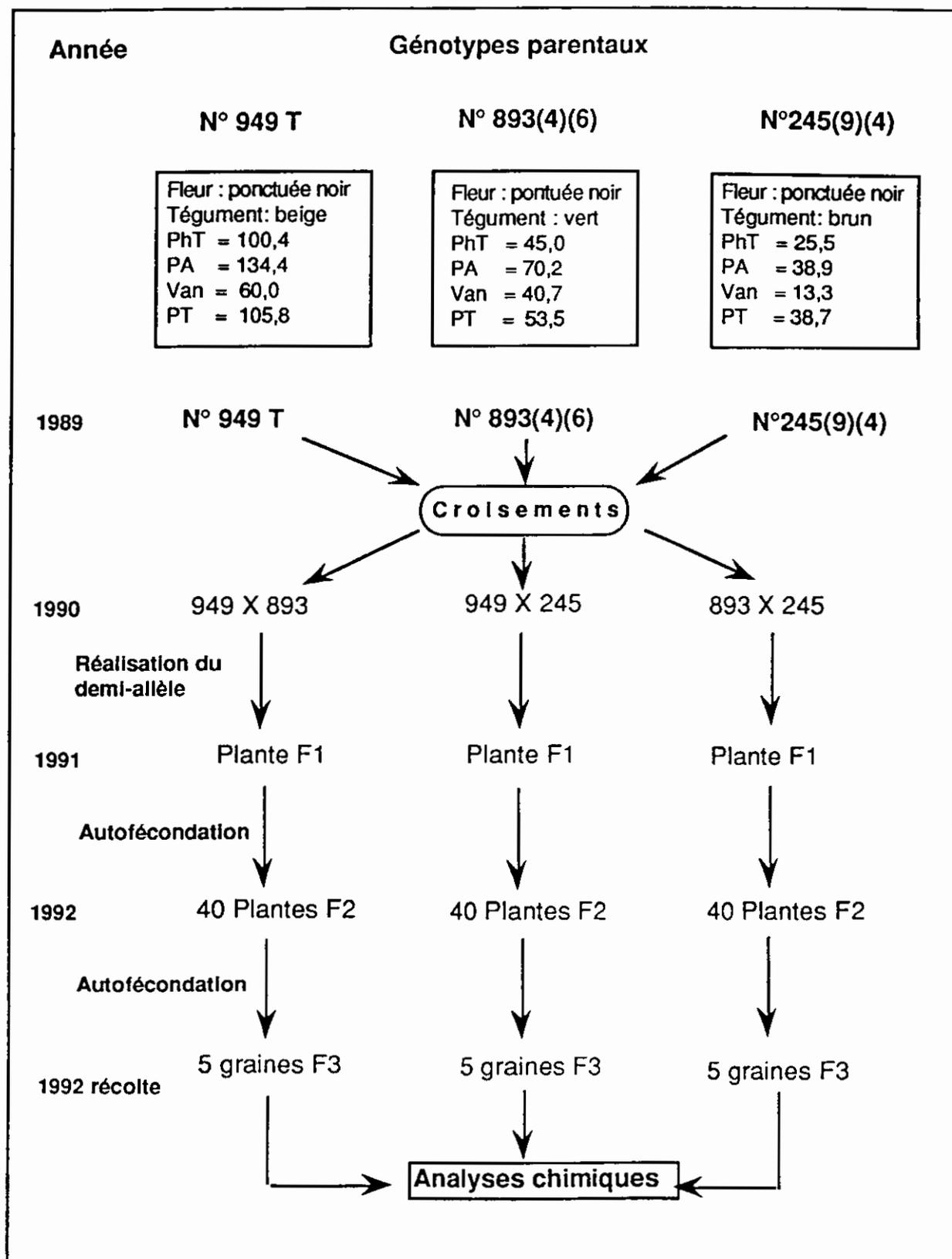


Figure 30 : schéma de l'expérimentation mise en place pour l'étude de l'hérédité du patron polyphénolique chez *Vicia faba* L. (INRA de Dijon).

- les génotypes à pouvoir tannant moyen : tégument vert représenté par 893(4)(6)
- les génotypes à faible pouvoir tannant : tégument brun représente par 245 (9)(4).

En définitive ces trois lignées, 949T, 893(4)(6) et 245(9)(4) seront réservées pour appréhender le déterminisme génétique des tannins dans les téguments de cette espèce.

4. Approche expérimentale pour l'étude de l'héritabilité du patron phénolique de *Vicia faba* L.

Pour cette étude, les 3 plantes mères précitées montrent les caractéristiques suivantes :

- génotype 949T à fleur ponctuée noir et tégument beige très tannant,
- génotype 893(4)(6) à fleur ponctuée noir et tégument vert et pouvoir tannant intermédiaire,
- génotype 245 (9)(4) à fleur ponctuée noir et tégument noir, très peu tannant.

Le génotype 949T est considéré comme une lignée fixée (les variations chimiques d'ordre quantitatif ne peuvent être dues qu'aux seules pressions de l'environnement). Les autres génotypes sont issus de 3 cycles d'autofécondation. Les expérimentations ont été conduites à l'INRA de DIJON.

Le schéma expérimental est récapitulé dans la figure 30.

5. Résultats et Interprétation

Dans les descendants F3 de ces croisements, nous avons analysé dans une première étape les ségrégeants beige, vert, brun.

Les résultats des différentes méthodes de dosages, à savoir, phénols totaux, tannins condensés par BuOH-HCl ou par le test vanilline, et le pouvoir tannant par l'hémanalyse, éprouvées sur la progénie F3 sont positivement corrélés entre eux avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,87 ($p < 0,001$).

Les résultats de l'analyse de variance (test F) sur la descendance F3 du croisement diallèle sont donnés dans le tableau 16

Génotypes parentaux	949	893(4)(6)		245 (9)(4)			
	<i>testa beige</i>	<i>testa vert</i>		<i>testa brun</i>			
949T	<i>beige (1)</i>	<i>beige (3)</i>	<i>vert(1)</i>	<i>brun (3)</i>	<i>beige(1)</i>		
Phénols totaux	100,4	66,1	47,3**	36,6**	81,2		
BuOH-HCl	134,4	89,1	65,5**	60,5**	106,8		
Vanilline	60,0	48,2	39,7 NS	32,1**	56,6		
Hémanalyse	105,8	71,9	56,1**	51,4**	84,2		
893(4)(6)		<i>vert(1)</i>		<i>brun (9)</i>	<i>brun-vert(3)</i>	<i>beige (3)</i>	<i>vert (1)</i>
Phénols totaux		45,0		30,4**	28,6**	50,2	47,7 NT
BuOH-HCl		70,2		42,8**	39,3**	70,0	62 NT
Vanilline		40,7		21,3*	17,3**	31,9	35,1NT
Hémanalyse		53,5		40,7*	39,5*	54,1	52,2 NT
245(9)(4)				<i>brun (1)</i>			
Phénols totaux				25,5			
BuOH-HCl				38,9			
Vanilline				13,3			
Hémanalyse				38,7			

Probabilité d'être différent de la couleur beige testée par le test F, (*) significatif à 5%, (**) significatif à 1%, (NS) non significatif et (NT) non testé.

Tableau 16 : Résultats du croisement diallèle des génotypes 949T, 893(4)(6) et 245(9)(4); Génotypes analysés au niveau de la descendance F3.

La couleur des graines de la descendance F3 est maternellement déterminée et la répartition observée à partir des plantes mères s'accorde bien au rapport MENDELIEN déjà publiée par Picard (1963).

- vert est monogénique et récessif par rapport à la couleur beige
- brun est monogénique et dominant par rapport à la couleur beige
- vert et brun ont des loci indépendants, ce qui conduit aux génotypes suivants :

bb,gg

BB,GG

bb,GG

et BB,gg

respectivement pour la couleur verte, brune, beige et tégument vert-brun.

En considérant les caractéristiques tannantes du contenu phénolique des téguments de cette descendance F3, on détecte des différences significatives entre la couleur beige et les autres couleurs : en général la teneur en phénols totaux, en tannins condensés et le pouvoir tannant sont respectivement réduits de 36, 34, 27, et 28% chez les téguments verts. Cette réduction est plus accentuée chez les téguments bruns avec des valeurs inférieures de 51, 45, 46, et 38 % respectivement.

Ces résultats montrent l'existence, dans le cas de la féverole, de génotypes à fleur ponctuée noir présentant des teneurs intermédiaires en tannins . En effet nous quittons les fortes teneurs reconnues chez la lignée 949T et atteignons des teneurs intermédiaires entre Alfred (beige) et Blandine (blanche).

Dans aucun cas, nous n'avons détecté de plants F3 ayant une forte teneur en tannins condensés pour des téguments de couleur verte ou brune ou inversement des téguments beiges à capacité tannante faible.

A ce stade d'étude, nous ne pouvons établir si ce rapport résulte des effets pléiotropiques des gènes contrôlant la couleur des graines, ou de "linkage" entre gènes codant la couleur des graines et gènes responsables de la biosynthèse des tannins condensés. Des études portant sur une plus large descendance pourraient apporter des réponses statistiques supplémentaires à ces questions.

En prenant en compte le potentiel génétique et les caractéristiques détectées chez les graines de féverole *Vicia faba* à téguments bruns et verts, il serait intéressant de voir le comportement de tels génotypes du point de vue nutritionnel. Parallèlement une étude pathologique devra estimer la résistance de tels génotypes par rapport aux pathogènes du sol.

CHAPITRE 5

LES FACTEURS ANTINUTRITIONNELS (F.A.N)

PHENOLIQUES CHEZ *Pisum sativum* L. :

DIVERSITE ET REGULATION

A. PRESENTATION DE LA COLLECTION DE POIS	99
1. Liste des géotypes	99
2 . Protocole d'échantillonnage des graines de pois	99
3 . Commentaires généraux sur la collection.....	100
B. RESULTATS et INTERPRETATIONS	105
1. Géotypes lisses et géotypes ridés	105
2. Géotypes à fleurs blanches et téguments non colorés	105
3. Géotypes à fleurs et téguments colorés	106
4. Reproductibilité et stabilité.....	107
5. Corrélation entre les divers descripteurs des FAN phénoliques:.....	109
6. Colorimétrie , teneurs en phénols totaux et pouvoirs tannants.....	111
7. Signification des résultats	111
7.1. Le rapport PA/Van ou degré de polymérisation moyen.....	113
7.2. Le rapport PT / PhT ou efficacité tannante.....	113
7.3. Conclusion à propos du déterminisme génétique des composés flavoniques chez le pois.....	115

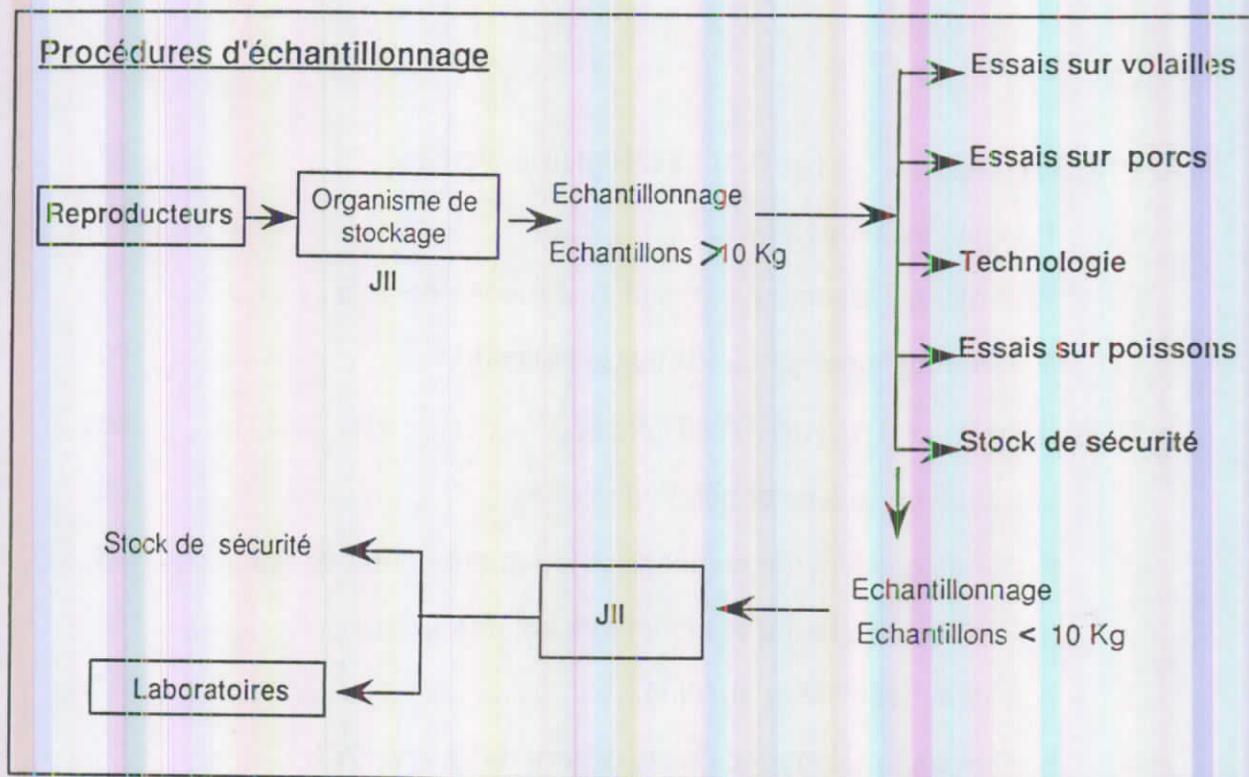


Figure 31 : Protocole d'échantillonnage des lots de semences au sein du PEA Programme.

CHAPITRE 5 : LES FACTEURS ANTINUTRITIONNELS (F.A.N) PHENOLIQUES CHEZ *Pisum sativum* L. : DIVERSITE ET REGULATION

A. PRESENTATION DE LA COLLECTION DE POIS

1. Liste des géotypes

Cette étude concerne 3 types de pois : des variétés, des exotiques et des isolignées. L'identification de chaque géotype est réalisée au moyen du code suivant : Type de pois / Numéro / Localité / Année de multiplication.

Le tableau en annexe 2, donne les principales caractéristiques morphologiques et le décryptage de tous les géotypes de pois étudiés.

2 . Protocole d'échantillonnage des graines de pois

Le schéma d'organisation de l'échantillonnage est présenté dans la figure 31 :

L'échantillonnage résulte d'une action concertée de plusieurs partenaires dont :

- les sélectionneurs chargés de la reproduction des échantillons dans diverses localités en France et en Espagne dans la cas du pois ;
- les organismes de stockage des récoltes, de contrôle, et de distribution des échantillons.

La production et la multiplication du pois s'est effectuée durant 3 années consécutives :

- la première année 1991, les productions de pois sont effectuées essentiellement en Espagne pour les variétés et les exotiques (matériels sauvages). La production des isolignées s'est faite soit en Espagne soit en France dans les localités codées comme suit : CAMBIER : A ; SERASEM : B ; BLANDEAU : C ; NIKERSON : D ; FLORIMOND : E.; F = FRANCE (en général) incluant INRA de Versailles ; S = Espagne.

- la deuxième année 1992, les pois sont multipliés en France (région de Mons) ;
- la troisième année 1993, la multiplication des pois a concerné un nombre restreint de génotypes, dans la région de Mons (France) .

Les récoltes sont stockées par Sanders (France) dans des chambres froides à 4°C en humidité contrôlée (20-25%) puis acheminées vers le JII (John Innes Institute, Norwich, Angleterre). Cet organisme coordonne la distribution des échantillons à travers tous les laboratoires concernés. L'échantillonnage à valeur statistique est effectué par l'intermédiaire du B.I.P.E.A (Bureau Inter Professionnel d'Études Analytiques) afin que l'analyse d'un échantillon soit représentative du lot complet.

Dès réception des graines au niveau du laboratoire, elles sont stockées en chambre froide à 4°C dans des dessiccateurs en présence de gel de silice.

3 . Commentaires généraux sur la collection

Trois types de génotypes sont illustrés dans notre collection :

- des isolignées qui sont des génotypes sélectionnés après stabilisation de certains caractères. Elles sont représentées par 44 échantillons, les numéros I 267 C1, I 360 S1 et I 360 C1 sont des génotypes à fleurs et téguments colorés. Le reste de la collection est représentée par des génotypes à téguments non colorés.
- des variétés également appelées cultivars correspondant à des lignées de provenances diverses et qui sont génétiquement encore hétérogènes. Elles sont représentées par 98 échantillons dont 90 % sont des variétés à fleurs blanches et téguments non colorés. Huit génotypes sont colorés parmi lesquels on note le V 139 S1 à fleur blanche et tégument coloré jaune ;
- du matériel exotique qui sont des types sauvages incluant les formes primitives originaires d'Afghanistan, d'Éthiopie, de Turquie et de Chine. Dix neuf échantillons illustrent cette collection de pois, parmi eux 12 génotypes sont à fleurs et téguments colorés.

n°	code Variétés	Phénols totaux		Tannins condensés		Pouvoir tannant
		cotylédon	tégument	tégument		tégument
		bleu de Prusse		BuOH/HCl	Vanilline	Hémanalyse
1	V 009 S1	2,0 ± 0,8	5,4 ± 0,8	0	0,8 ± 0,1	4,6 ± 0,4
2	V 012 S1	2,1 ± 0,1	5,2 ± 0,9	0	0,7 ± 0,1	6,7 ± 0,3
3	V 015 S1	4,9 ± 0,0	6,1 ± 0,1	0	0,7 ± 0,1	6,0 ± 0,4
4	V 024 S1	2,8 ± 0,0	5,9 ± 0,7	0	0,6 ± 0,1	12,6 ± 1,3
5	V 030 S1	4,4 ± 0,4	53,8 ± 3,9	97,7 ± 5,5	53,5 ± 3,7	68,4 ± 6,2
6	V 031 S1	6,3 ± 0,5	6,3 ± 0,5	0	1,1 ± 0,2	8,1 ± 0,6
7	V 045 S1	3,2 ± 0,5	6,8 ± 1,1	0	0,9 ± 0,2	12,1 ± 1,2
8	V 047 S1	3,4 ± 0,0	4,9 ± 0,5	0	0,7 ± 0,1	4,9 ± 0,1
9	V 050 S1	4,6 ± 0,4	5,6 ± 0,9	0	0,6 ± 0,1	10,7 ± 0,9
10	V 060 S1	5,0 ± 0,6	6,4 ± 0,7	0	0,7 ± 0,1	8,8 ± 0,0
11	V 067 S1	5,0 ± 0,3	6,0 ± 0,7	0	0,9 ± 0,1	6,4 ± 0,6
12	V 086 S1	5,5 ± 0,4	6,1 ± 1,0	0	0,9 ± 0,1	10,3 ± 0,6
13	V 091 S1	4,2 ± 0,2	5,6 ± 0,6	0	0,8 ± 0,2	5,7 ± 0,5
14	V 096 S1	4,2 ± 0,3	5,7 ± 0,1	0	0,9 ± 0,1	6,2 ± 0,7
15	V 102 S1	4,0 ± 0,5	5,2 ± 0,4	0	0,7 ± 0,1	5,8 ± 0,2
16	V 108 S1	3,0 ± 0,5	5,0 ± 0,4	0	0,6 ± 0,1	7,8 ± 1,5
17	V 109 S1	5,9 ± 0,4	6,6 ± 0,8	0	0,5 ± 0,1	6,5 ± 0,3
18	V 111 S1	4,2 ± 0,5	4,0 ± 0,2	0	0,6 ± 0,2	3,6 ± 0,7
19	V 113 S1	3,4 ± 0,5	5,4 ± 0,4	0	1,1 ± 0,2	11,0 ± 1,8
20	V 117 S1	5,7 ± 0,7	54,5 ± 4,9	81,0 ± 5,6	40,6 ± 1,9	69,6 ± 2,8
21	V 120 S1	4,1 ± 0,5	5,0 ± 0,6	0	0,6 ± 0,1	10,1 ± 0,4
22	V 134 S1	4,4 ± 0,4	5,5 ± 0,4	0	0,6 ± 0,2	4,6 ± 0,8
23	V 135 S1	5,4 ± 0,3	6,5 ± 0,3	0	0,9 ± 0,2	6,7 ± 1,0
24	V 139 S1	4,3 ± 0,5	18,0 ± 1,3	10,9 ± 0,9	7,0 ± 0,9	18,2 ± 2,7
25	V 141 S1	5,2 ± 0,4	44,9 ± 3,5	94,2 ± 4,3	41,3 ± 4,0	56,4 ± 4,6
26	V 155 A2	2,3 ± 0,8	4,2 ± 0,5	0	0,6 ± 0,1	8,6 ± 0,7
27	V 163 B3	2,6 ± 0,6	68,5 ± 3,1	105,24 ± 7,1	59,9 ± 2,9	86,3 ± 3,8
28	V 164 B3	2,1 ± 0,0	48,1 ± 3,9	81,7 ± 4,3	42,5 ± 5,1	68,0 ± 3,1
29	V 165 S1	4,3 ± 0,6	6,5 ± 0,4	0	0,8 ± 0,1	13,6 ± 0,6
30	V 171 S1	4,3 ± 0,4	56,2 ± 2,6	105,65 ± 3,4	51,1 ± 4,7	78,0 ± 2,4
31	V 172 S1	4,5 ± 0,4	6,8 ± 0,8	0	0,9 ± 0,1	9,0 ± 0,4
32	V 173 S1	5,3 ± 0,4	5,3 ± 0,5	0	0,8 ± 0,2	9,5 ± 0,8
33	V 176 S1	3,0 ± 0,6	6,8 ± 0,4	0	0,7 ± 0,1	7,7 ± 0,6
34	V 178 S1	5,8 ± 0,4	6,8 ± 1,0	0	0,6 ± 0,1	4,7 ± 0,1
35	V 199 S1	4,5 ± 0,4	6,4 ± 0,5	0	0,6 ± 0,2	9,1 ± 0,3
36	V 200 D2	1,9 ± 0,9	4,5 ± 0,7	0	0,8 ± 0,1	10,4 ± 1,3
37	V 206 S1	2,5 ± 0,5	5,9 ± 0,2	0	0,6 ± 0,1	8,0 ± 1,5
38	V 209 S1	3,5 ± 0,1	6,1 ± 0,9	0	1,0 ± 0,1	8,2 ± 1,0
39	V 210 S1	4,6 ± 0,2	6,3 ± 0,4	0	0,8 ± 0,2	10,9 ± 1,9
40	V 211 S1	3,0 ± 0,5	4,7 ± 0,8	0	0,6 ± 0,1	7,9 ± 1,3
41	V 214 S1	3,0 ± 0,4	5,3 ± 0,9	0	0,6 ± 0,1	7,0 ± 0,6

Tableau 17

n°	code Variétés	Phénols totaux		Tannins condensés		Pouvoir tannant
		cotylédon	tégument	tégument		tégument
		sulte 1	bleu de Prusse	BuOH/HCl	Vanilline	Hémanalyse
42	V 219 S1	2,0 ± 0,3	6,9 ± 0,7	0	0,7 ± 0,0	12,0 ± 1,4
43	V 227 S1	2,7 ± 0,5	5,1 ± 0,9	0	0,6 ± 0,1	7,9 ± 0,8
44	V 233 S1	3,8 ± 0,7	5,8 ± 0,1	0	0,8 ± 0,2	8,8 ± 0,5
45	V 234 S1	3,4 ± 0,6	6,5 ± 0,9	0	0,7 ± 0,1	12,0 ± 0,4
46	V 241 C3	1,8 ± 0,8	4,1 ± 0,1	0	0,6 ± 0,1	8,3 ± 0,8
47	V 242 S1	4,3 ± 0,6	4,9 ± 0,3	0	0,4 ± 0,2	11,7 ± 1,9
48	V 244 S1	4,3 ± 0,1	51,3 ± 2,9	98,7 ± 4,1	39,1 ± 3,9	78,9 ± 4,8
49	V 245 S1	4,3 ± 0,8	5,1 ± 0,5	0	0,6 ± 0,1	5,2 ± 1,5
50	V 248 S1	4,2 ± 0,6	5,6 ± 0,8	0	0,8 ± 0,2	4,6 ± 0,7
51	V 250 S1	2,5 ± 0,5	5,7 ± 0,2	0	0,5 ± 0,1	4,9 ± 0,1
52	V 251 E3	2,3 ± 0,0	67,2 ± 4,1	105,2 ± 5,1	58,3 ± 3,4	78,8 ± 3,8
53	V 254 S1	2,9 ± 0,4	6,1 ± 0,3	0	0,6 ± 0,1	8,7 ± 1,3
54	V 256 S1	2,4 ± 0,1	78,6 ± 2,1	121,0 ± 4,1	33,7 ± 2,2	90,5 ± 2,6
55	V 268 S1	2,0 ± 0,5	5,5 ± 0,7	0	0,6 ± 0,1	10,7 ± 1,2
56	V 276 S1	5,4 ± 0,7	5,4 ± 0,6	0	0,8 ± 0,2	8,9 ± 0,8
57	V 278 S1	4,1 ± 0,6	5,3 ± 0,4	0	0,6 ± 0,1	10,8 ± 1,1
58	V 280 S1	2,8 ± 0,7	6,8 ± 0,4	0	0,7 ± 0,2	6,4 ± 0,6
59	V 281 S1	2,5 ± 0,8	4,6 ± 0,8	0	0,6 ± 0,1	8,4 ± 1,0
60	V 282 S1	3,0 ± 0,3	5,0 ± 0,4	0	0,6 ± 0,2	5,4 ± 1,2
61	V 283 S1	2,7 ± 0,5	4,8 ± 0,1	0	0,7 ± 0,1	10,7 ± 1,2
62	V 285 S1	2,4 ± 0,5	4,6 ± 0,5	0	0,6 ± 0,1	8,3 ± 1,3
63	V 292 S1	2,5 ± 0,1	5,1 ± 0,2	0	0,6 ± 0,1	4,6 ± 0,7
64	V 294 S1	2,4 ± 0,0	5,9 ± 0,6	0	0,9 ± 0,1	12,5 ± 1,9
65	V 297 S1	3,4 ± 0,5	5,7 ± 0,6	0	0,8 ± 0,2	6,3 ± 1,4
66	V 307 S1	3,0 ± 0,2	6,0 ± 0,0	0	0,6 ± 0,1	8,3 ± 2,2
67	V 314 S1	4,7 ± 0,3	5,5 ± 0,6	0	0,7 ± 0,2	8,8 ± 1,9
68	V 327 S1	4,8 ± 0,6	4,6 ± 0,2	0	0,7 ± 0,1	6,0 ± 0,4
69	V 329 C1	2,5 ± 0,0	58,8 ± 6,9	67,8 ± 8,5	40,9 ± 1,2	75,14 ± 1,84
70	V 333 S1	2,5 ± 0,1	4,5 ± 0,7	0	0,6 ± 0,1	4,8 ± 0,2
71	V 338 S1	3,1 ± 0,7	5,4 ± 0,9	0	0,7 ± 0,1	12,0 ± 1,1
72	V 341 S1	3,7 ± 0,6	5,4 ± 0,8	0	0,7 ± 0,2	5,6 ± 0,9
73	V 345 S1	2,3 ± 0,1	6,9 ± 0,1	0	0,9 ± 0,2	5,2 ± 1,5
74	V 355 S1	2,0 ± 0,7	5,8 ± 0,1	0	0,9 ± 0,2	7,8 ± 1,5
75	V 358 S1	3,0 ± 0,4	6,3 ± 0,1	0	1,0 ± 0,2	10,9 ± 1,2
76	V 365 S1	2,9 ± 0,6	4,8 ± 0,5	0	0,7 ± 0,3	7,9 ± 1,4
77	V 374 S1	2,3 ± 0,4	4,9 ± 0,6	0	0,7 ± 0,1	6,7 ± 0,8
78	V 375 S1	3,6 ± 0,0	5,1 ± 0,6	0	0,7 ± 0,1	6,8 ± 0,1
79	V 380 S1	2,7 ± 0,4	6,2 ± 0,6	0	0,7 ± 0,2	5,9 ± 0,2
80	V 382 S1	2,3 ± 0,9	6,1 ± 0,1	0	0,7 ± 0,1	6,4 ± 0,6
81	V 383 S1	3,2 ± 0,7	5,0 ± 0,1	0	0,6 ± 0,1	5,6 ± 0,7
82	V 395 S1	4,0 ± 0,9	4,7 ± 0,3	0	0,7 ± 0,2	6,4 ± 0,7

Tableau 17 suite

n°	code Variétés	Phénols totaux		Tannins condensés		Pouvoir tannant
		cotylédon	tégument	tégument		tégument
	suite 2	bleu de Prusse		BuOH/HCl	Vanilline	Hémanalyse
83	C 403 F1	4,6 ± 0,8	6,2 ± 0,6	0	0,9 ± 0,1	11,7 ± 1,9
84	C404 F1	4,0 ± 0,5	5,7 ± 1,0	0	0,7 ± 0,1	13,2 ± 0,2
85	C405 F1	3,6 ± 0,1	5,8 ± 0,5	0	0,8 ± 0,1	13,4 ± 1,0
86	C 408 F1	3,0 ± 1,3	4,7 ± 0,9	0	0,8 ± 0,1	11,5 ± 0,9
87	C 409 F1	3,5 ± 0,8	5,0 ± 0,5	0	1,2 ± 0,2	14,1 ± 2,7
88	C415 F1	2,9 ± 0,3	4,6 ± 0,4	0	1,0 ± 0,1	13,6 ± 3,4
89	C 417 F1	3,0 ± 0,3	4,3 ± 0,3	0	0,9 ± 0,1	14,4 ± 1,1
90	C 420 F1	2,9 ± 0,1	7,1 ± 0,7	0	1,1 ± 0,2	13,6 ± 0,7
91	C424F1	3,6 ± 0,0	5,4 ± 0,8	0	1,0 ± 0,3	14,1 ± 3,1
92	C 443 F1	3,2 ± 0,6	5,8 ± 0,3	0	1,2 ± 0,1	8,4 ± 0,1
93	V 460 D3	1,5 ± 0,1	3,9 ± 0,1	0	0,6 ± 0,1	8,3 ± 0,8
94	V 461 D3	1,8 ± 0,6	3,5 ± 0,1	0	1,0 ± 0,3	7,3 ± 1,3
95	V462 D3	1,3 ± 0,2	4,1 ± 0,3	0	0,9 ± 0,1	6,3 ± 0,3
96	V 463 C3	1,5 ± 0,6	4,3 ± 0,1	0	0,9 ± 0,1	6,4 ± 1,1
97	V 464 H3	2,5 ± 0,5	4,2 ± 0,3	0	1,0 ± 0,1	7,3 ± 1,8
98	V465 H3	2,6 ± 0,5	4,6 ± 0,6	0	1,7 ± 0,3	7,5 ± 0,6

Tableau 17 : Teneurs en phénols totaux (éqs catéchine), tannins condensés (éqs catéchine pour le test vanilline en mg/g d'après le E1% = 150 de Bate-Smith pour le BuOH-HCl), et pouvoir tannant (éqs ac. tannique) des cotylédons et téguments de *Pisum sativum* (Variétés), exprimées en mg/g de matière sèche.

n°	code Exotiques	Phénols totaux		Tannins condensés		Pouvoir tannant
		cotylédon	tégument	tégument		tégument
		bleu de Prusse		BuOH/HCl	Vanilline	Hémanalyse
1	E007 S1	4,2 ± 0,7	6,2 ± 0,3	0	0,80 ± 0,1	8,8 ± 0,70
2	E 065 S1	2,7 ± 0,9	35,0 ± 3,3	88,7 ± 6,1	44,9 ± 6,4	66,8 ± 5,4
3	E 069 S1	2,4 ± 0,8	42,5 ± 4,9	61,8 ± 5,9	26,5 ± 4,3	55,0 ± 2,6
4	E 089 E1	5,2 ± 0,5	45,0 ± 2,7	84,6 ± 3,03	23,7 ± 1,5	63,1 ± 0,8
5	E 101 S1	5,1 ± 0,8	6,3 ± 0,2	0	1,1 ± 0,1	12,5 ± 2,1
6	E 121 S1	2,3 ± 0,3	52,5 ± 4,2	90,3 ± 6,0	21,8 ± 1,6	80,3 ± 3,3
7	E 132 S1	2,1 ± 0,9	5,8 ± 0,1	0	0,8 ± 0,1	6,2 ± 0,5
8	E 150 S1	3,7 ± 0,4	5,9 ± 0,4	0	0,9 ± 0,1	6,1 ± 0,2
9	E 170 B2	3,6 ± 0,1	43,1 ± 1,3	57,2 ± 7,6	42,6 ± 3,6	75,6 ± 3,1
10	E 186 S1	2,6 ± 0,5	27,6 ± 6,9	66,7 ± 1,7	39,7 ± 4,1	52,9 ± 5,7
11	E 228 S1	5,5 ± 0,7	39,6 ± 4,4	66,7 ± 6,5	40,0 ± 5,8	55,5 ± 1,8
12	E 277 S1	5,7 ± 0,6	5,5 ± 0,2	0	0,9 ± 0,1	7,3 ± 0,8
13	E 288 S1	3,5 ± 0,7	37,0 ± 3,8	44,9 ± 3,6	18,0 ± 3,4	41,6 ± 0,9
14	E 295 S1	2,0 ± 0,8	5,1 ± 0,3	0	0,8 ± 0,1	7,8 ± 1,2
15	E 325 S1	4,6 ± 0,3	35,4 ± 4,0	70,4 ± 4,4	37,0 ± 4,1	71,3 ± 7,6
16	E 337 S1	5,0 ± 0,5	36,2 ± 1,2	86,5 ± 7,1	43,8 ± 3,8	63,0 ± 1,4
17	E 342 S1	2,7 ± 0,8	39,8 ± 1,1	79,2 ± 9,1	42,6 ± 5,1	73,0 ± 4,6
18	E 357 S1	2,6 ± 0,9	20,7 ± 2,3	11,1 ± 0,7	5,8 ± 0,5	20,0 ± 2,1
19	E 367 S1	5,4 ± 0,2	5,1 ± 0,3	0	0,7 ± 0,1	5,6 ± 1,5

Tableau 18 : Teneurs en phénols totaux (éqs catéchine), tannins condensés (éqs catéchine pour le test vanilline en mg/g d'après le E1% = 150 de Bate-Smith pour le BuOH-HCl), et pouvoir tannant (éqs ac. tannique) des cotylédons et téguments de *Pisum sativum* (Exotiques), exprimées en mg/g de matière sèche.

n°	code	Phénols totaux		Tannins condensés		Pouvoir tannant	
		Isolignées	cotylédon	tégument	tégument		tégument
					BuOH/HCl	Vanilline	Hémanalyse
		bleu de Prusse					
1	I 006 A1	3,6 ± 0,8	5,5 ± 0,9	0	0,8 ± 0,1	11,2 ± 2,2	
2	I 016 E1	4,4 ± 0,4	5,3 ± 0,4	0	0,7 ± 0,3	11,1 ± 1,6	
3	I 019 C1	4,6 ± 0,5	4,6 ± 0,4	0	0,8 ± 0,1	8,3 ± 1,1	
4	I 021 C1	3,3 ± 0,2	4,2 ± 0,7	0	0,6 ± 0,1	6,6 ± 1,1	
5	I 029 C1	4,2 ± 0,4	5,1 ± 0,3	0	0,9 ± 0,2	6,7 ± 1,4	
6	I 034 C1	4,7 ± 0,1	5,5 ± 0,6	0	0,8 ± 0,2	7,1 ± 2,2	
7	I 047 A1	5,6 ± 0,3	6,2 ± 0,8	0	0,7 ± 0,3	10,9 ± 1,0	
8	I 048 B1	2,6 ± 0,5	5,8 ± 0,2	0	0,7 ± 0,1	8,7 ± 0,7	
9	I 074 E1	4,6 ± 0,2	5,3 ± 1,0	0	0,7 ± 0,1	16,3 ± 1,1	
10	I 099 A1	3,7 ± 0,2	6,3 ± 0,7	0	0,7 ± 0,1	9,6 ± 1,4	
11	I 110B1	3,1 ± 0,4	4,3 ± 0,7	0	0,7 ± 0,1	7,7 ± 0,6	
12	I 128 E1	5,5 ± 0,4	4,8 ± 1,0	0	0,8 ± 0,1	9,4 ± 0,7	
13	I 133 S1	4,2 ± 0,5	5,6 ± 0,3	0	0,7 ± 0,1	5,7 ± 2,2	
14	I 136 E1	5,7 ± 0,3	5,7 ± 0,8	0	0,6 ± 0,1	7,1 ± 1,4	
15	I 147 C1	5,2 ± 0,1	6,6 ± 0,1	0	0,9 ± 0,1	8,0 ± 1,6	
16	I 159 C1	3,1 ± 0,5	5,7 ± 0,9	0	0,7 ± 0,2	13,6 ± 0,7	
17	I 167 A1	3,7 ± 0,2	5,9 ± 0,1	0	0,5 ± 0,1	10,9 ± 0,6	
18	I 168 B1	4,2 ± 0,3	5,1 ± 0,3	0	0,6 ± 0,1	5,7 ± 0,8	
19	I 177 E1	5,1 ± 0,5	5,4 ± 0,5	0	0,8 ± 0,1	10,4 ± 0,8	
20	I 215 E1	5,8 ± 0,2	5,5 ± 0,4	0	0,5 ± 0,0	7,6 ± 0,2	
21	I 224 D1	3,7 ± 0,4	4,5 ± 0,7	0	0,8 ± 0,3	8,8 ± 1,1	
22	I 226 C1	5,8 ± 0,4	5,5 ± 0,4	0	0,5 ± 0,1	12,0 ± 1,1	
23	I 229 A1	3,7 ± 0,1	5,6 ± 1,0	0	0,5 ± 0,1	7,3 ± 0,9	
24	I 242 C1	2,4 ± 0,5	5,8 ± 0,6	0	0,6 ± 0,1	11,2 ± 1,5	
25	I 242 E1	4,0 ± 0,3	5,0 ± 0,5	0	0,6 ± 0,0	11,2 ± 0,1	
26	I 267 C1	4,5 ± 0,5	44,3 ± 3,0	62,5 ± 5,4	49,5 ± 1,0	71,2 ± 2,6	
27	I 272 A1	6,0 ± 0,4	5,4 ± 0,1	0	0,8 ± 0,0	5,5 ± 0,6	
28	I 279 C1	4,5 ± 0,3	5,8 ± 0,1	0	0,7 ± 0,1	9,4 ± 2,3	
29	I 306 E1	4,3 ± 0,3	4,8 ± 0,3	0	1,0 ± 0,1	8,9 ± 1,7	
30	I 312E1	4,0 ± 0,3	4,9 ± 0,4	0	0,8 ± 0,1	6,8 ± 0,5	
31	I 315 E1	4,9 ± 0,2	4,8 ± 0,2	0	0,6 ± 0,0	7,3 ± 2,2	
32	I 318 E1	3,3 ± 0,3	5,7 ± 0,6	0	1,1 ± 0,1	10,8 ± 2,6	
33	I 324 E1	2,4 ± 0,4	6,1 ± 0,8	0	1,0 ± 0,2	11,4 ± 2,2	
34	I 326C1	2,0 ± 0,4	5,9 ± 0,3	0	0,7 ± 0,1	9,7 ± 1,0	
35	I 360 C1	4,9 ± 0,2	52,3 ± 7,0	77,1 ± 4,3	47,6 ± 4,7	82,1 ± 6,2	
36	I 360 S1	3,4 ± 0,0	55,6 ± 1,6	80,6 ± 6,6	55,2 ± 3,1	86,8 ± 2,9	
37	I 363 C1	2,9 ± 0,2	4,5 ± 0,3	0	1,0 ± 0,0	7,4 ± 0,9	
38	I 366 B1	2,9 ± 0,3	5,0 ± 0,2	0	0,7 ± 0,1	9,9 ± 1,6	
39	I 369 S1	5,0 ± 0,3	5,0 ± 0,8	0	0,6 ± 0,1	5,7 ± 1,1	
40	I 369 A1	2,5 ± 0,3	6,8 ± 0,8	0	0,6 ± 0,0	11,4 ± 0,4	
41	I 376 D1	2,9 ± 0,0	5,5 ± 0,6	0	0,6 ± 0,1	6,2 ± 2,0	
42	I 386 E1	3,2 ± 0,1	4,9 ± 0,4	0	0,6 ± 0,1	10,3 ± 1,0	

Tableau 19 : Teneurs en phénols totaux (éqs catéchine), tannins condensés (éqs catéchine pour le test vanilline en mg/g d'après le E1% = 150 de Bate-Smith pour le BuOH-HCl), et pouvoir tannant (éqs ac. tannique) des graines de *Pisum sativum* (Isolignées), exprimées en mg/g de matière sèche.

B. RESULTATS et INTERPRETATIONS

L'expertise de la collection de pois pour sa richesse en facteurs antinutritionnels phénoliques a été réalisée par application d'un protocole analytique regroupant les méthodes de dosages suivantes déjà décrites :

- des phénols totaux par la méthode au bleu de Prusse couplée à l'adsorption sur PVPP pour la rendre plus sélective ;
- des tannins condensés :
 - par oxydation au BuOH-HCl à chaud qui conduit à la production d'anthocyanidines (PA) et dénombre toutes les unités catéchiques des seules polymères
 - par le test vanilline qui est sensible aux unités terminales des tannins condensés ainsi qu'aux monomères catéchiques libres ;
- par la mesure du pouvoir tannant par hémanalyse, caractéristique des proanthocyanidines mais aussi d'autres molécules phénoliques tannantes.

1. Génotypes lisses et génotypes ridés

La classification par rapport à ce descripteur est donnée dans l'annexe 2 et le tableau suivant qui extrait quelques exemples significatifs montre que l'apparence de la graine lisse ou ridée ne semble pas avoir un effet sur le contenu phénolique des téguments de graines de pois.

Génotype	Apparence de la graine	Phénols totaux	Tannins condensés	Pouvoir tannant
		bleu de Prusse	BuOH/HCl	Hémanalyse
I 306	Lisse	4,8 ±0,3	0	8,9 ±1,7
I 312	Lisse	4,9 ±0,4	0	6,8 ±0,5
V 139	Lisse	17,0 ±1,3	10,9 ±0,9	18,2 ±2,7
E 325	Lisse	35,4 ±4,0	70,4 ±4,4	71,3 ±7,6
E 069	Lisse	42,5 ±4,9	61,8 ±5,9	55,0 ±2,6
I 021	Ridée	4,2 ±0,7	0	6,6 ±1,1
I 034	Ridée	5,5±0,6	0	7,1 ±2,2
E 357	Ridée	20,7 ±2,3	11,1 ±0,7	20,0 ±2,1
I 267	Ridée	44,3 ±3,0	62,5 ±5,4	71,2 ± 2,6
I 360	Ridée	52,3 ±7,0	77,1 ± 4,3	82,1 ±6,2

Tableau 20: Teneurs en phénols totaux (éqs catéchine), tannins condensés (mg.g^{-1}) et pouvoir tannant (éqs ac. tannique) de quelques génotypes de pois exprimées en mg.g^{-1} de ms.

2. Génotypes à fleurs blanches et téguments non colorés (tableaux 17, 18 et 19)

La teneur en phénols totaux des cotylédons est très faible et pratiquement constante de l'ordre de 4 mg.g^{-1} équivalents catéchine quel que soit le type de pois considéré. Cette partie de la graine, essentiellement protéique et glucidique, est totalement dépourvue de

tannins condensés mais également de monomères catéchiques puisque nous ne détectons aucune réactivité même minime par le test vanilline.

Au niveau tégumentaire, malgré l'absence totale de tannins condensés au sens strict du terme, il semble que le métabolisme phénolique produise de métabolites secondaires différents de ceux que l'on détecte au niveau du cotylédon. En effet même si la teneur en phénols totaux reste faible de l'ordre de $5,8 \text{ mg.g}^{-1}$ équivalents catéchine, nous détectons une très faible réactivité au test vanilline se traduisant par la présence d'unités catéchiques monomères. Les téguments présentent également une faible réactivité vis-à-vis de l'hémoglobine que l'on attribue à des molécules non proanthocyaniques.

3. Génotypes à fleurs et téguments colorés (tableaux 17, 18 et 19)

Les cotylédons de pois à fleurs et téguments colorés présentent les mêmes caractéristiques que ceux des graines non colorées et la réactivité détectée par le dosage au bleu de Prusse pourrait être notamment attribuée à la présence de composés comme les acides aminés phénoliques localisés dans cette partie de la graine, ainsi qu'aux acides phénoliques simples.

Par contre les téguments sont nettement mieux pourvus en phénols totaux et tannins condensés et présentent un pouvoir tannant conséquent vis-à-vis des protéines testées. Parmi ces échantillons, on remarquera :

- chez les isolignées, les génotypes I 267 C1, I 360 C1 et I 360 S1 dont les teneurs en phénols totaux peuvent atteindre plus de 45 mg/g équivalents catéchine ;
- chez les variétés, les numéros V 030 S1, V 141 S1, V 163 B3, V 171 S1, V251 E3 et le V 256 S1 sont des génotypes présentant d'après le test d'oxydation, de fortes teneurs en tannins condensés. Le génotype V 139 S1 présente quant à lui des teneurs intermédiaires en phénols totaux, pouvoir tannant, et tannins condensés ;
- enfin chez les formes exotiques qui représentent une collection plus ou moins variée, on distingue un génotype à contenu phénolique intermédiaire, le numéro E 357 S1. Les autres génotypes à fleurs et téguments colorés contiennent des tannins condensés en quantité non négligeable, le minimum étant de 4,5 % (E 288 S1).

Cette vision globale de la collection montre qu'au sein du genre *Pisum* se définissent 3 classes de génotypes sur la base de la composition chimique de leurs téguments séminaux : les génotypes à faible contenu phénolique (< à 10%, dépourvus de tannins

condensés), des génotypes intermédiaires, et enfin des génotypes présentant de fortes teneurs en proanthocyanidines et pouvoir tannant (>30%)

4. Reproductibilité et stabilité

Cette étude a concerné 43 génotypes ayant fait l'objet de multiplication en Espagne en 1991 et puis en France en 1992. Le tableau en **annexe n° 3** donne les résultats des dosages. L'année 1993 permettra de compléter l'information sur une partie de l'échantillonnage avec les génotypes E312 E3, I 089 A3 et V329 E3 repris pour la troisième fois cette année là.

Une analyse factorielle discriminante sur ces génotypes de Pois, délimite 3 classes distinctes dont les valeurs moyennes des descripteurs chimiques pour les deux années de récolte sont données (**tableau 21**).

	CLASSE 1				CLASSE 2				CLASSE 3			
	Zéro tannin				Contenu tannique moyen				Contenu tannique élevé			
	PhT	PA	Van	PT	PhT	PA	Van	PT	PhT	PA	Van	PT
An 91	5,7	0	0,7	8,2	19,3	11,1	6,4	19,1	48,5	84,4	40,1	71,1
An 92	4,5	0	0,5	8,7	16,5	11,4	6,2	26,8	55,1	81,1	50,8	74,5

Tableau 21: valeurs moyennes des différentes classes rencontrées chez le pois durant les 2 années de récolte. (PhT = Phénols totaux ; PA = Proanthocyanidines ; Van = Vanilline ; PT = Pouvoir tannant).

- la classe n°1 concerne les génotypes totalement dépourvus de tannins condensés et présentant des valeurs faibles en phénols totaux ;
- la classe 2 est une classe intermédiaire ;
- la classe 3 englobe les génotypes qui présentent des teneurs élevées en proanthocyanidines et de forts pouvoirs tannants.

La comparaison des teneurs en phénols totaux des 43 génotypes relatifs aux deux années de récoltes (1991 et 1992) ainsi que celles des 3 génotypes de l'année 1993 est donnée par la superposition des graphes (**Figure 32**).

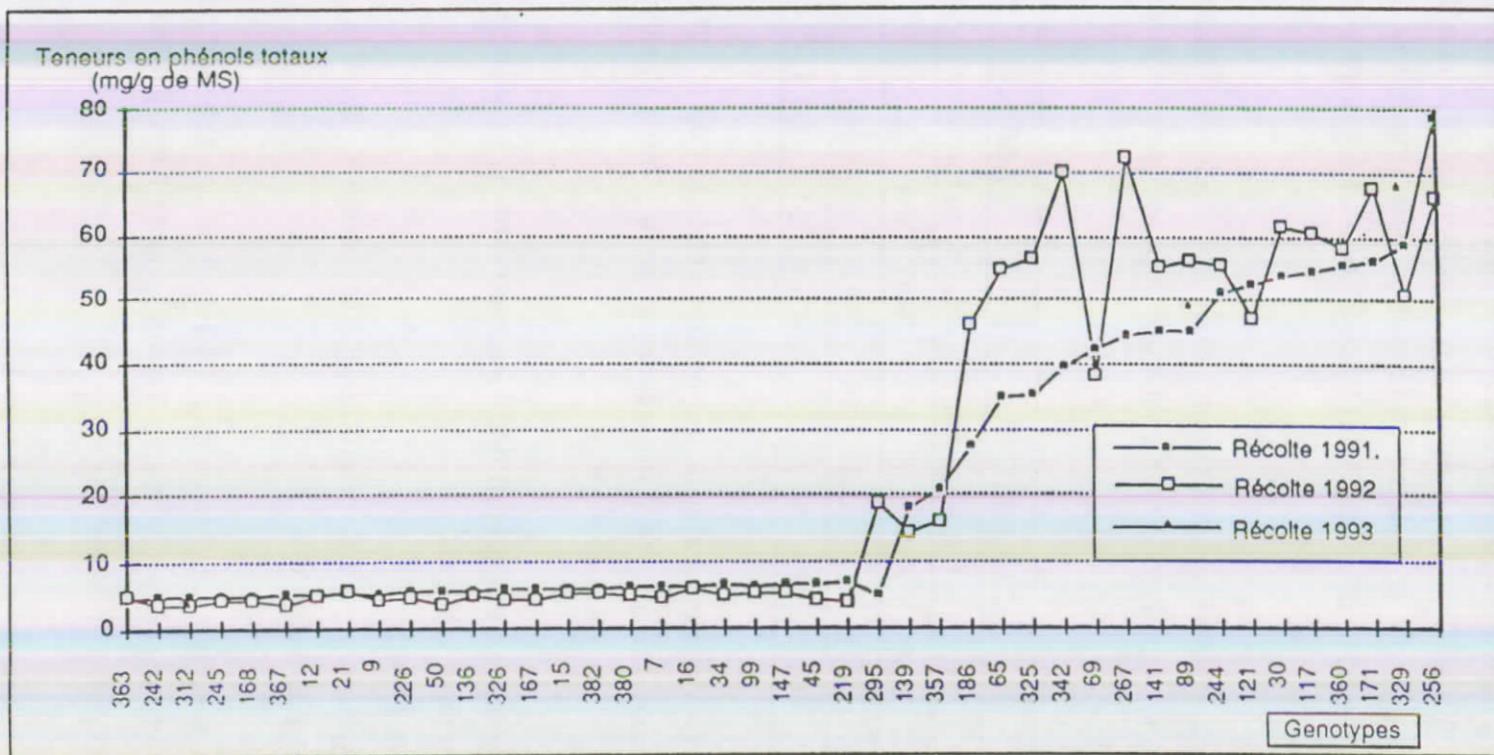


Figure 32 : Comparaison des teneurs en phénols totaux des 2 réplifications des génotypes de pois *Pisum sativum* classés par ordre croissant du contenu phénolique. (*) 3 génotypes de la l'année 1993.

Si nous acceptons les trois classes chimiques précédemment décrites, nous observons une stabilité acceptable du métabolisme phénolique chez la plupart des génotypes analysés. Une exception est à noter : le E295 E2 qui appartenait à la classe 1 en 1991 est passé dans la classe 2 en 1992 ; nous essayerons d'élucider ce point plus tard.

Pour apporter plus de précision dans cette comparaison inter-année nous avons opéré une analyse de variance à un facteur : elle fait ressortir l'importance de la variabilité entre année de récolte par rapport à la variabilité interne à chaque année. Les résultats des génotypes colorés riches en tannins des 2 années successives montrent une interaction génotype-milieu plus forte que l'effet milieu.

L'analyse des variables montre que ces différences ne sont pas significatives comme en témoigne les valeurs du test F donné au tableau suivant pour 1 et 36 degrés de liberté.

Variable	F(1/36)	
Phénols totaux	1,9	NS à 5%
Proanthocyanidines	0,01	NS à 5%
Pouvoir tannant	0,72	NS à 5%

Tableau 22 : Analyse de variance pour chacune des variables : résultats du test F (1/ 36). NS = non significatif à 5% de risque.

5. Corrélation entre les divers descripteurs des FAN phénoliques:

Les corrélations calculées entre les résultats des différentes procédures analytiques sont données dans le **tableau 23**.

	Ph.T	PA	Van	PT
Ph.T	1,000	0,976	0,946	0,975
PA		1,000	0,960	0,976
Van			1,000	0,963
PT				1,000

Tableau 23 : Coefficients de corrélations entre méthodes chimiques (Pht = phénols totaux ; PA = production d'anthocyanidines ; Van = test vanilline ; PT = pouvoir tannant).

Ce **tableau 23** traduit la bonne concordance des résultats des différentes méthodes chimiques appliquées à notre collection de Pois. Chaque dosage ayant néanmoins une signification particulière, des indices peuvent être calculés tels que :

- le rapport entre la production d'anthocyanidines (PA) et le test vanilline (Van), appelé indice de polymérisation moyen des tannins condensés ;
- le rapport entre le pouvoir tannant estimé par hémanalyse et les phénols totaux (bleu de Prusse) appelé efficacité tannante.

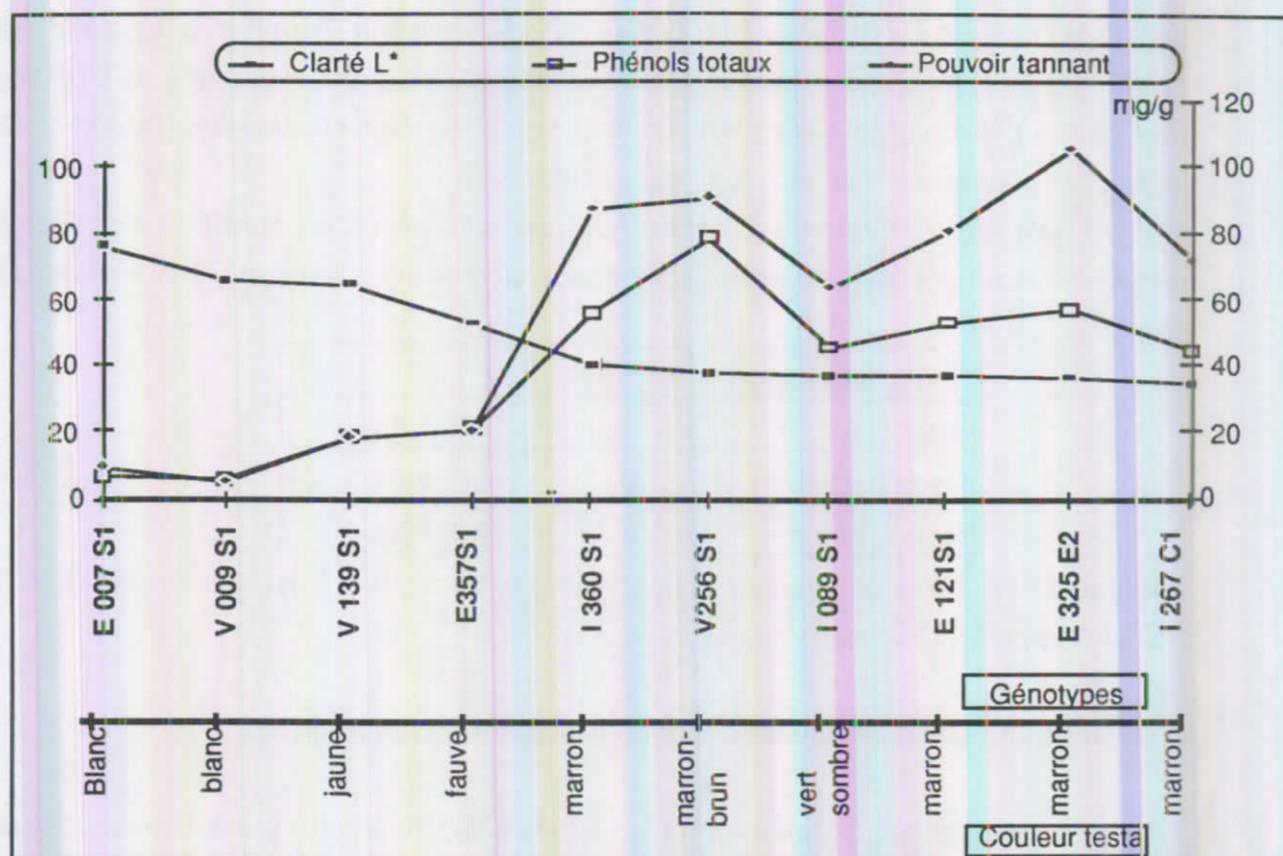


Figure 33 Clarté (L*), teneurs en phénols totaux (éqs catéchine) et pouvoir tannant (éqs acide tannique) exprimées en mg/g de matière sèche de quelques génotypes de pois.

6. Colorimétrie , teneurs en phénols totaux et pouvoirs tannants

Comme nous l'avons fait pour la féverole, nous avons cherché si une corrélation existait entre l'indice colorimétrique et les dosages chimiques.

La **figure 33** illustre la comparaison entre la clarté L^* , les teneurs en phénols totaux et pouvoirs tannants de quelques représentants de la collection de pois.

La mesure de la couleur des graines par cette méthode physique, montre que :

- les graines de couleur blanche donnent des valeurs de clarté (L^*) proches de **70**. Ces graines correspondent à des graines de génotypes dépourvus de tannins condensés et présentant des valeurs faibles en phénols totaux.
- la couleur jaune (représentée par le génotype V 139) réfléchit aussi bien la lumière que la couleur blanche, néanmoins le contenu phénolique de ce génotype est différent de celui de la graine de couleur blanche.
- les couleurs plus sombres réfléchissent beaucoup moins la lumière ; c'est ainsi que pour les génotypes à téguments colorés (vert sombre, marron, marron-brun, fauve) la clarté (L^*) s'échelonne de **34** à **53**. Ces variétés sont généralement riches en tannins condensés.

Ce graphique dévoile également la grande variabilité du contenu phénolique des génotypes à téguments colorés. Ainsi pour une clarté (L^*) de l'ordre de **35**, la teneur en phénols totaux peut varier du simple au triple.

Même si, dans une certaine mesure la clarté semble être corrélée aux résultats des dosages chimiques, ce test ne peut à lui seul rendre compte parfaitement de l'importance du contenu phénolique des graines de pois .

7. Signification des résultats

Le **tableau 24** regroupe les caractéristiques morphologiques et les principaux patrons phénoliques rencontrés chez le pois.

Code géotype	Couleur fleur (F) testa (T)	Phénols totaux	Tannins condensés		Pouvoir tannant	Rapport	
			PA	Van		PA/Van	PhT/Pt
E 007 S1	(F)et(T) non colorés	6,2	0	0,8	8,8		
V 009 S1	(F)et(T) non colorés	5,4	0	0,8	4,6		
V 139 S1	(F)et(T) colorés	18,0	11,0	7,0	18,2	1,6	1,0
E357 E2	(F)et(T) colorés	20,7	11,1	5,8	20,0	1,9	0,9
I 267 C1	(F)et(T) colorés	44,3	62,5	46,5	71,2	1,3	1,6
I 089 E1	(F)et(T) colorés	45,0	84,6	23,7	63,1	3,6	1,4
E 121S1	(F)et(T) colorés	52,5	90,3	21,8	80,3	4,2	1,5
I 360 S1	(F)et(T) colorés	55,6	80,6	55,2	86,8	1,5	1,6
E 325 E2	(F)et(T) colorés	56,5	72,9	50,2	105,3	1,5	1,9
V256 S1	(F)et(T) colorés	78,6	121,0	33,6	90,5	3,6	1,2

Tableau 24 : Caractéristiques morphologiques, teneurs en phénols totaux (éqs catéchine), tannins condensés (mg.g^{-1} pour le BuOH-HCl et éqs catéchine pour le test vanilline), pouvoir tannant (éqs acide tannique), exprimées en mg.g^{-1} de MS et rapports PA/Van et PT/PhT des principaux géotypes de la collection de Pois.

7.1. Le rapport PA/Van ou degré de polymérisation moyen

Ce rapport permet de rendre compte du degré de la polymérisation des tannins condensés présents dans les téguments des graines de pois et diffère, selon les génotypes, du simple au quadruple (de 1,2 à 4).

Les génotypes E121, V 256 et l'isolignée I 089 semblent être bien pourvus en tannins condensés de haut poids moléculaire ; en effet le rapport PA/Van calculé pour ces génotypes est le plus fort de la collection.

A l'opposé, certains génotypes montrent un rapport PA/Van faible, avoisinant 1,5 qui traduirait la présence, dans les téguments, de molécules peu polymérisées ; c'est le cas des génotypes I 267, I 360 et E 325 , V 139 et E 357.

Le degré de polymérisation n'est pas directement lié à la teneur en polyphénols. Ainsi l'isolignée I 089 dont les proanthocyanidines sont sans doute parmi les plus polymérisées (degré de polymérisation 3,6) montre des teneurs en phénols totaux relativement faibles. A l'inverse I 267 possède les mêmes teneurs en phénols totaux mais le plus faible indice de polymérisation.

7.2. Le rapport PT / PhT ou efficacité tannante

Ce rapport est calculé à partir des teneurs en phénols totaux et des teneurs du test protéique le mieux adapté qui, dans notre cas, est la complexation des tannins par l'hémanalyse. Il varie globalement du simple au double et traduit quant à lui l'efficacité tannante des substances polyphénoliques.

Si nous prenons le cas du génotype V 256 dont la teneur en phénols totaux est la plus importante du groupe, le rapport PT / PhT est le plus faible. Cela pourrait signifier que plus une plante est riche en phénols, moins ceux-ci sont efficaces pour la complexation des protéines.

Les génotypes V 139 et E 357 dont le rapport est pratiquement égal à 1 sont des génotypes présentant des valeurs faibles en phénols et également en proanthocyanidines.

Le génotype E 325 (déjà signalé pour son faible rapport PA/Van) montre une efficacité tannante importante . Le génotype E 325 apparaît donc riche en tannins condensés peu

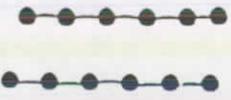
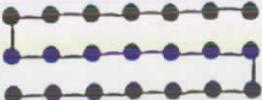
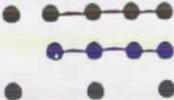
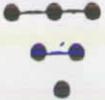
Type chimique	1	2	3	4
PA/Van	fort	fort	moyen	faible
Efficacité tannate	forte	moyenne	moyenne	faible
Polymérisation moyenne				
Génotypes	E 121 S1 I 089 E1	V256 S1	I 360 S1 E 325 E2 I 267 C1	V 139S1 E 357 E2

Tableau 25 : Caractéristiques et représentants des types chimiques révélés par l'étude des rapports PA/Van et PT/PhT.

polymérisés et les plus efficaces car la fonction tannante dépend non seulement de la quantité mais également de la taille des molécules mises en jeu.

Cette approche de la connaissance de la diversité phénolique au sein du Pois fait ressortir diverses possibilités de type chimique, sachant bien entendu qu'il peut exister des intermédiaires entre ces types. Le **tableau (25)** illustre les principaux cas observés :

- le type 1 est représenté par les génotypes E 121 et I 089, ils présentent aussi des teneurs moyennes en phénols totaux ;
- le seul représentant du type 2 est le génotype V 256 déjà signalé pour sa forte teneur en tannins condensés ;
- le type 3 regroupe 3 génotypes : E 325 et 2 isolignées I 360 et I 267 ;
- le type 4 illustré par les génotypes V 139 et E 357 qui sont par ailleurs des génotypes à faible contenu tannique.

7.3. Conclusion à propos du déterminisme génétique des composés flavoniques chez le pois

D'après Statham (1972), le déterminisme génétique, chez *Pisum*, met en jeu six gènes majeurs. Le gène **A** est nécessaire pour la production de flavonoïdes en général et aussi d'anthocyanidines au niveau florale. Les gènes **B** et **Cr** modifient la structure des anthocyanes mais n'ont aucun effet sur les autres classes flavoniques ; le gène **B** contrôle apparemment l'hydroxylation du noyau B des anthocyanes alors que **Cr** contrôle les méthylations. Par contre les 3 autres gènes **Am**, **Ar**, et **Ce** contrôlent le degré d'accumulation des molécules.

Stickland (1982) constate que les tannins condensés sont présents dans les téguments qui contiennent également des anthocyanidines. Cet auteur rappelle que l'absence d'anthocyanidine est principalement due à l'homozygotie du gène récessif **a**.

Cas du génotype E 295

En ce qui concerne le génotype E 295, la modification du contenu phénolique tégumentaire par rapport à la première année de récolte, peut être d'ordre génétique et les informations fournies par le John Innes Institute (Ambrose, communication personnelle) semblent concorder avec nos mesures.

En effet le génotype E 295 est une lignée porteuse de 2 gènes récessifs. D'une manière générale, les génotypes à fleurs blanches sont récessifs pour le locus **a** tandis

que les fleurs colorées sont **A** dominant. La lignée E 295 est génétiquement **A**, mais la présence des deux gènes **b** et **am**, réduit l'intensité de la pigmentation des fleurs au point qu'elles apparaissent phénotypiquement blanches. Le génotype E 295 est également porteur du gène **mp** connu pour réduire la teneur des composés phénoliques (tannins condensés entre autres) au niveau des téguments. Cette teneur intermédiaire résulterait par conséquent des effets de ces gènes récessifs et de leurs possibles interactions.

Cas des variétés n° 139 et 357

Les génotypes V 139 et E 357 présentent des valeurs similaires à celles observées chez la lignée E 295 multipliée à Mons en 1992. Bien que leur arrière plan génétique n'enregistre pas la présence de gènes **am** et **mp**, il est très probable que le gène **mp**, soit présent ce qui pourrait expliquer les résultats enregistrés chez ces 2 variétés.

Le développement de la coloration jaune au niveau des téguments des génotypes V 139 et E 295 serait probablement du, chez ces génotypes récessifs, au blocage de l'activité de la chalcone-flavanone isomérase, ce qui permet l'accumulation de la chalcone glycosylée et, avec elle, le développement de la couleur jaune. Toutefois l'absence de Chalcone-flavanone isomérase n'empêche pas totalement l'engagement du précurseur dans la voie des flavonols et des anthocyanes car il se produit toujours une certaine isomérisation spontanée non enzymatique entre chalcone et flavanone (Forkman et Dangelmayr, 1981).

CHAPITRE 6 :
CORRELATION ENTRE LES METHODES PHYSIQUES
NON DESTRUCTIVES ET METHODES CHIMIQUES

1. Introduction.....	119
2. Présentation de la collection de Pois (récolte 1992)	119
3. Détermination de la corrélation entre clarté et pouvoir tannant	121
4. Spectrométrie proche infra rouge.....	123
5. Conclusion	123

N°	Codes des Géotypes	Tannins condensés BuOH-HCl	Pouvoir tannant Hémanalyse	Phénols totaux Bleu de Prusse/PVP
1	V 045 E2	0	6,9 ± 1,2	3,8 ± 0,5
2	V 009 E2	0	6,9 ± 2,5	4,0 ± 0,9
3	V 357 E2	9,3 ± 1,8	38,3 ± 4,6	25,9 ± 4,3
4	V 295 E2	12,6 ± 3,4	40,1 ± 5,2	20,7 ± 3,5
5	V 273 E2	65,1 ± 9,9	54,1 ± 11,1	45,5 ± 7,5
6	V 171 E2	82,0 ± 6,6	62,8 ± 7,9	55,9 ± 6,6
7	V 325 E2	85,0 ± 9,0	83,1 ± 5,6	65,4 ± 7,3
8	V 256 E2	109,5 ± 11,4	102,4 ± 10,9	77,3 ± 9,8
9	V 305 E2	128,7 ± 13,2	94,6 ± 12,4	90,8 ± 12,4

Tableau 26 : Valeurs moyennes des teneurs en tannins condensés (mg.g^{-1}), pouvoir tannant (éqs ac. tannique) et en phénols totaux (éqs catéchine) des téguments de pois (analysés par graines individuelles) exprimées en mg.g^{-1} de MS

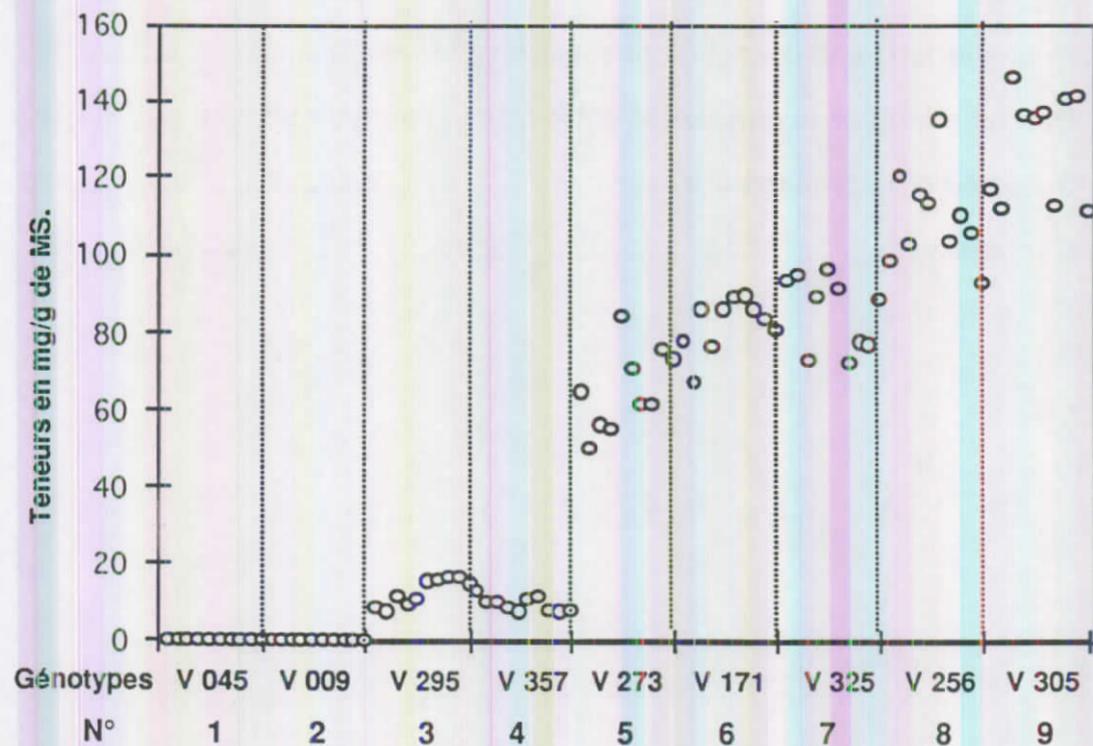


Figure 34: Teneurs en tannins condensés (mg.g^{-1} de MS) des géotypes de la collection 1992 de pois analysée graine à graine.

CHAPITRE 6 : CORRELATION ENTRE LES METHODES PHYSIQUES NON DESTRUCTIVES ET METHODES CHIMIQUES

1. Introduction

Depuis 20 ans maintenant, le suivi classique des molécules parfois appelées facteurs antinutritionnels (F.A.N) phénoliques fait appel à des dosages chimiques bien connus dont les plus utilisés sont : le dosage des phénols totaux par la méthode au bleu de Prusse (Brun, 1991), des tannins condensés par production d'anthocyanidines par oxydation au BuOH-HCl (Bate-Smith, 1973) et par le test vanilline (Price *et al.*, 1978) et enfin l'estimation du pouvoir tannant par hémanalyse (Porter *et al.*, 1984). Ces méthodes montrent une bonne corrélation entre elles et permettent le calcul d'indices chimiques qui caractérisent les tannins condensés des téguments. En revanche, elles sont très coûteuses en temps et si elles peuvent être appliquées pour l'expertise de la matière première en industrie agro-alimentaire, elles sont par contre totalement inefficaces dès qu'elles doivent accompagner la démarche d'analyse du sélectionneur d'autant plus qu'elles détruisent les parties vitales de la graine.

Pour répondre à cette démarche nous avons tenté la mise au point d'une méthode d'évaluation que l'on souhaiterait non destructive (donc sur graine entière), très rapide (quelques secondes pour la mesure et quelques secondes pour l'évaluation quantitative) de façon à pouvoir cribler les génotypes d'une descendance par exemple. Nous nous sommes adressés pour cela à deux techniques physiques : la spectrophotométrie et la spectrométrie proche infra rouge. Des résultats ponctuels ont d'ailleurs déjà été discutés dans les chapitres précédents à propos de la colorimétrie.

2. Présentation de la collection de pois (récolte 1992)

La collection de pois analysée est présentée dans le **tableau 26** pour son contenu phénolique, sa teneur en tannins condensés et l'efficacité tannante des extraits de téguments de graines. Chaque génotype a été expertisé au niveau de 10 graines et chaque graine a été analysée individuellement .

Les résultats sont également présentés dans la **figure 34** pour les tannins condensés.

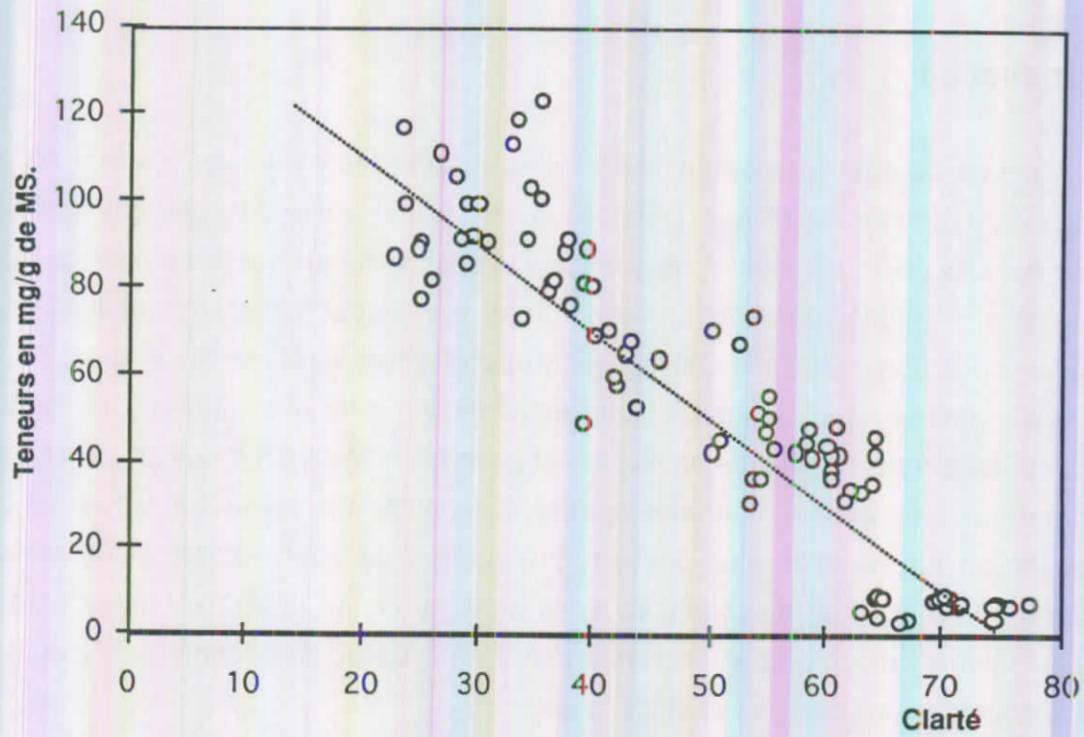


Figure 35 : Corrélation entre pouvoir tannant et Clarté (L*) des génotypes de pois (collection 92) analysés graine à graine.

Compte tenu de la connaissance acquise dans le chapitre 5, nous avons fixé comme objectif d'illustrer 7 classes équiprobables de teneurs en tannins condensés couvrant la gamme de 0 à 140 ‰. L'objectif a été atteint avec 9 géotypes soit un géotype par classe pour les n°5 à 9 et deux géotypes par classe pour les n°1, 2 et 3, 4 respectivement.

L'analyse de variance à 1 facteur (annexe 4), montre que la variation intergénotypique est très hautement significative. Le test de Newman-Keuls appliqué à cette collection de pois permet en effet de répartir les géotypes, par rapport aux variables Phénols totaux et Pouvoir tannant en 7 groupes distincts correspondant aux classes précitées.

3. Détermination de la corrélation entre clarté et pouvoir tannant

La **figure 35** montre qu'il existe une corrélation négative hautement significative entre la clarté et le pouvoir tannant ($r = -0,93$; $p < 0,001$).

Même si l'indice est acceptable, une analyse fine de la distribution sur la **figure 35** montre que, pour une valeur de clarté de l'ordre de 35-40, le pouvoir tannant peut varier de 45 à 120 mg/g. Il s'ensuit qu'une telle mesure colorimétrique ne peut servir valablement la cause du sélectionneur désirant trier une collection sur la base du caractère chimique.

On peut illustrer d'une autre manière, et à l'échelle variétale, les limites des indices colorimétriques. En effet, si, dans la **figure 36**, l'exemple traduit par le géotype 256 illustre le cas de figure d'une faible variation colorimétrique associée à une forte variation chimique, le cas inverse apparaît dans l'exemple du géotype 325 où une faible variation des teneurs est associée à une forte variation de l'indice colorimétrique.

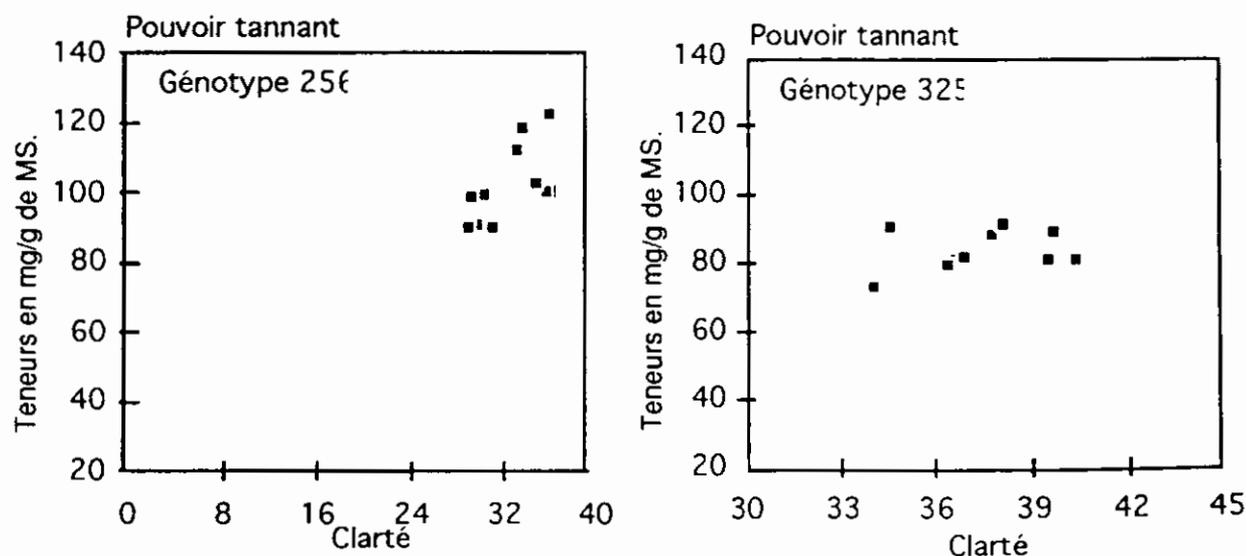


Figure n°36 : Clarté (L*) et pouvoir tannant des géotypes 256 et 325 analysés graine à graine.

Critères	SEC	R2C	SECV	R2V	SD/SECV
Clarté(L*)	3,12	0,96	4,65	0,91	3,4
Phénols totaux	4,69	0,97	6,14	0,95	5,0
Tannins condensés	7,23	0,98	9,66	0,96	5,0
Pouvoirs tannants	6,90	0,96	9,67	0,91	3,5

Tableau 27 : Performances des équations de calibration en mode réflexion (1100-2500 nm)

SEC = Erreur standard de calibration ; R2C et R2V = Coefficient de calibration et de validation

SECV = Erreur standard de calibration de validation croisée ; SD/SECV = rapport de l'écart-type de la population étudiée sur l'erreur standard de calibration de validation croisée.

Critères	SEC	R2C	SECV	R2V	SD/SECV
Clarté(L*)	5,97	0,86	6,41	0,84	2,5
Phénols totaux	12,89	0,81	13,58	0,79	2,3
Tannins condensés	20,95	0,80	22,59	0,77	2,1
Pouvoirs tannants	13,50	0,83	14,25	0,81	2,4

Tableau 28 : Performances des équations de calibration en mode transmission (850-1050nm).

4. Spectrométrie proche infrarouge

Les tableaux 27 et 28 reprennent les résultats des équations de calibration obtenues sur les échantillons mesurés d'une part en mode de réflexion, et d'autre part en mode de transmission, sur les 90 graines entières.

Ces résultats montrent que :

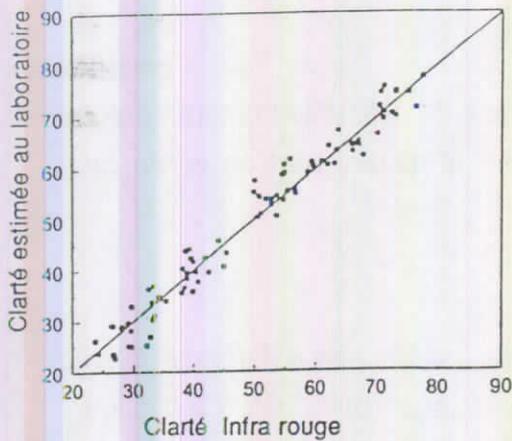
- la spectrométrie dans le proche infrarouge en mode de réflexion est particulièrement bien adaptée aux dosages des tannins sur graines individuelles de pois ($SD/SEC V > 3,0$) ; les critères prédits avec la meilleure précision sont : la teneur en phénols totaux et la teneur en tannins condensés.
- les résultats en mode de transmission présentent une précision moindre, d'une part compte tenu de la gamme spectrale mise en oeuvre (850 - 1050 nm), et d'autre part compte tenu du fait que les calibrations sont établies sur des spectres bruts sans aucun traitement mathématique. Le mode transmission permet néanmoins un classement des graines en catégories ;

La représentation graphique des 2 modes (réflexion et transmission) en relation avec 3 descripteurs des facteurs antinutritionnels (FAN) phénoliques est donnée dans la figure 37 et confirme la précision de prédiction beaucoup plus importante en mode réflexion qu'en mode transmission

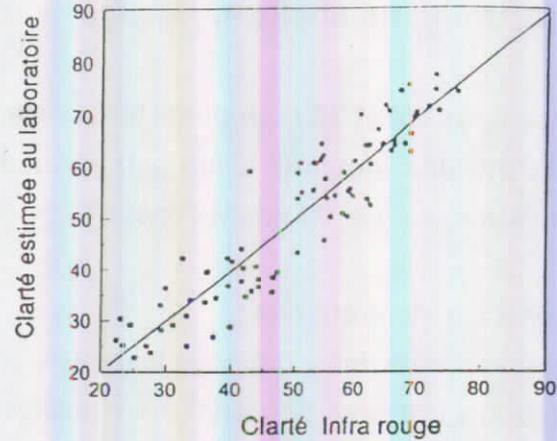
5. Conclusion

Ces résultats confirment ce qui avait été pressenti probablement lors de l'étude particulière soit du Pois soit de la Féverole, il apparaît que la description colorimétrique peut très difficilement se substituer à l'analyse chimique pour le tri d'un collectionneur de graines dans un programme d'amélioration génétique. Il en est de même avec la spectrométrie infrarouge en mode transmission.

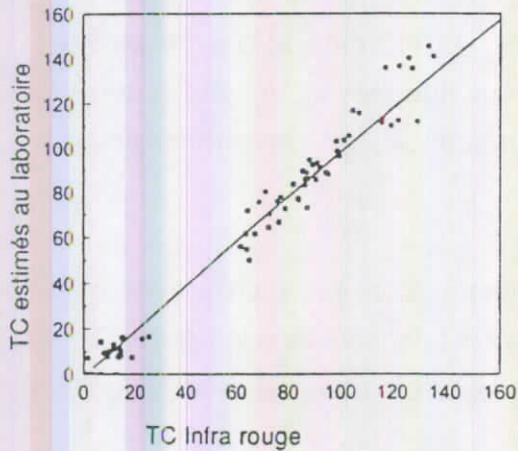
Par contre en mode réflexion le proche infrarouge semble fournir une approche quantitative rapide, fiable et non destructive.



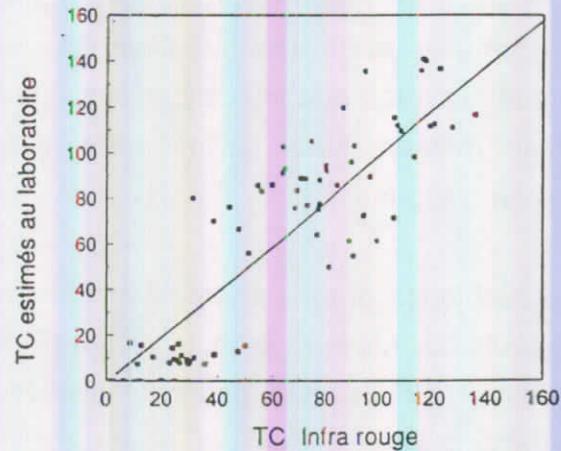
Clarté : Relation entre les valeurs prédites par SPIR en mode réflexion et les valeurs obtenues au laboratoire



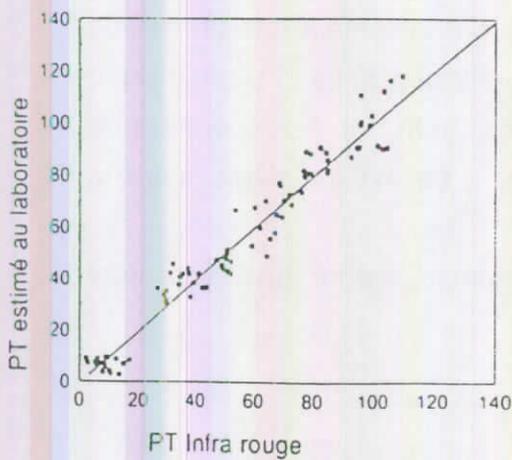
Clarté : Relation entre les valeurs prédites par SPIR en mode transmission et les valeurs obtenues au laboratoire



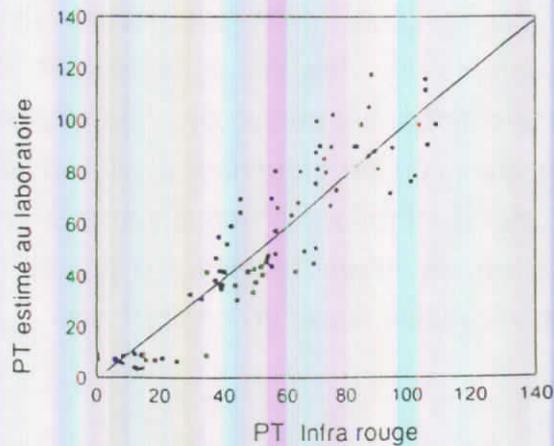
Tannins condensés : Relation entre les valeurs prédites par SPIR en mode réflexion et les valeurs obtenues au laboratoire



Tannins condensés : Relation entre les valeurs prédites par SPIR en mode transmission et les valeurs obtenues au laboratoire



Pouvoir tannant : Relation entre les valeurs prédites par SPIR en mode réflexion et les valeurs obtenues au laboratoire



Pouvoir tannant : Relation entre les valeurs prédites par SPIR en mode transmission et les valeurs obtenues au laboratoire

Figure 37 : Représentation graphique de la relation entre les valeurs prédites par la SPIR et les valeurs obtenues par analyses chimiques (Tannins condensés et Pouvoir tannant) et par spectrophotométrie (Clarté)

CHAPITRE 7 :
ETUDE PARTICULIERE DES PRINCIPALES
MOLECULES PHENOLIQUES DES TEGUMENTS DE
LA FEVEROLE ET DU POIS.

A. EXPERTISE ANALYTIQUE DES PROANTHOCYANIDINES SUR LA
BASE D'UN FRACTIONNEMENT PAR PARTITION ENTRE SOLVANTS

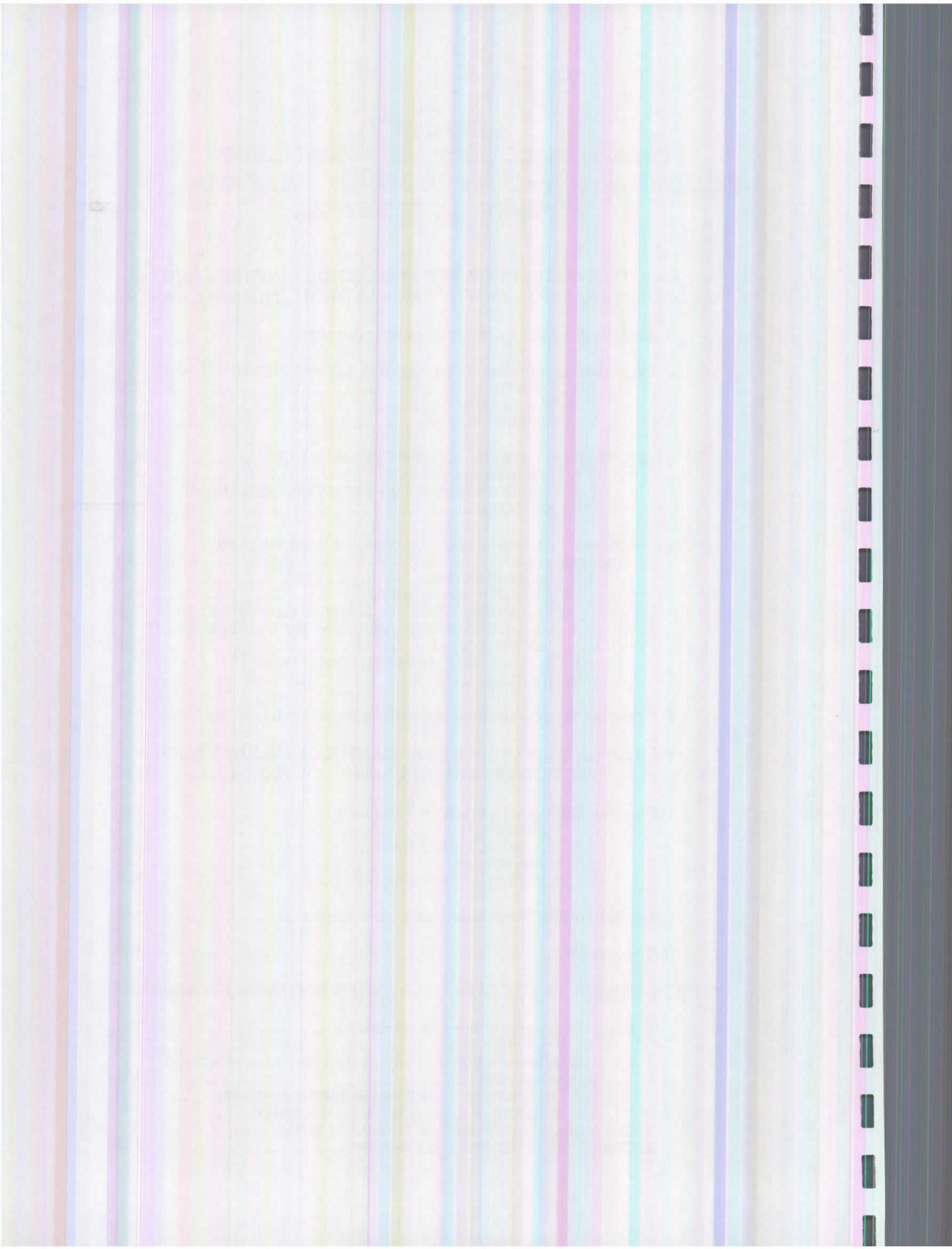
1. Bref rappel de la méthode de préfractionnement	126
2. Expertise quantitative de l'extrait A et des fractions B, C, C' et D.	128
2. 1. <i>Vicia faba</i>	128
2. 2. <i>Pisum sativum</i>	128
2. 3. Conclusion.....	130
3. Expertise des fractions B, C, D à l'aide de la CCM.	130
3.1. Molécules natives et Silice.....	130
3.2. Produits de dégradation hydrolytique et Cellulose	
microcristalline.....	132
4. Expertise à l'aide de la CLHP couplée aux techniques de	
microdégradation	134
4.1. Cas de <i>Vicia faba</i> :	134
4.1.a. Oxydation totale	134
4.1.b. Dégradation en présence de phloroglucinol.	136
4.1.c. Extension du protocole aux fractions B, C, D	
de <i>Vicia faba</i> L.	136
4.2. Expertise CLHP de l'extrait global (A) de	
<i>Pisum sativum</i>	140
5. Comparaison du contenu phénolique de la féverole et du pois....	144

B. EXPERTISE ANALYTIQUE DES PROANTHOCYANIDINES SUR LA
BASE D'UN FRACTIONNEMENT SUR TAMIS MOLECULAIRE..... 144

1. Fraction Méthyléthylcétone de <i>Vicia faba</i>	146
1.1. Elution EtOH	146
1.2. Elution EtOH-MeOH(v/v)	146
1.3. Elution MeOH	149
1.4. Elution MeOH-Acétone (70-30)	149
2. Fraction méthyléthylcétone de <i>Pisum sativum</i>	149
3. Conclusion	150

C. DETERMINATION DES STRUCTURES DES PROANTHOCYANIDINES

1. Les proanthocyanidines de <i>Vicia faba</i> L.	153
1.1. Produits Isolés	153
1.2. Détermination du poids moléculaire et du degré de	
polymérisation.....	154
1.3. Détermination des liaisons Interflavaniques	154
1.4. Proposition de structures et conclusion	158
2. Les proanthocyanidines de <i>Pisum sativum</i> L.....	159
3. Commentaire général et conclusion	166



CHAPITRE 7 : ETUDE PARTICULIERE DES PRINCIPALES MOLECULES PHENOLIQUES DES TEGUMENTS DE LA FEVEROLE ET DU POIS.

Les objectifs visés par cette approche sont les suivants :

- séparation des molécules simples (ou monomères) des polymères ;
- fractionnement des polymères en groupes de composés en fonction de leur poids moléculaire.
- isolement et détermination structurale de quelques composés majeurs.

Pour cela, nous mettons en oeuvre 2 méthodes globales :

- extraction par partition entre solvants spécifiques
- passage sur tamis moléculaire.

Outre les dosages classiques déjà appliqués, nous développons dans cette partie, d'autres outils de contrôle telles que la chromatographie liquide haute performance et la chromatographie sur couches minces.

A. EXPERTISE ANALYTIQUE DES PROANTHOCYANIDINES SUR LA BASE D'UN FRACTIONNEMENT PAR PARTITION ENTRE SOLVANTS

1. Bref rappel de la méthode de préfractionnement

Elle consiste à ajouter de l'acétone à l'extrait global (A) et à saturer le mélange en NaCl (Jones *et al* 1976, Brun 1991) ; ceci entraîne la formation de 2 phases:

- une phase inférieure aqueuse riche en sucres et composés non tanniques
- une phase supérieure acétonique riche en proanthocyanidines polymères. Cette dernière phase est retenue pour la poursuite des opérations ; elle est évaporée puis reprise par 100ml d'eau distillée sur laquelle est réalisée l'extraction liquide liquide. Celle-ci opère selon le mode successif suivant :
- fraction éther diéthylique (B = Et₂O)
- fraction acétate d'éthyle (C' = EtOAc) ou fraction méthyléthylcétone (C = MeCOEt)
- fraction aqueuse résiduelle (D = H₂O).

Tableau (a)

	Phénols totaux bleu de Prusse / PVP	Tannins condensés BuOH/HCl	Pouvoir tannant Hémoglobine	Efficacité tannante
				Hém/PhT
Extrait global (A)	84,5 ± 2,2	138,6 ± 3,5	120,3 ± 4,2	1,4
Hypophase acétone -eau	11,6 ± 0,4	10,6 ± 0,5	—	
Fraction Et ₂ O (B)	4,5 ± 0,2	0	9,4 ± 1,4	
Fraction AcOEt (C)	11,8 ± 0,3	10,7 ± 0,5	22,7 ± 1,0	1,9
Fraction H ₂ O (D)	55,1 ± 3,6	101,4 ± 3,1	70,5 ± 4,5	1,3

Tableau 29 a : Teneurs en phénols totaux(éqs catéchine), tannins condensés (en mg.g⁻¹) et pouvoir tannant (éqs acide tannique) des différentes fractions de l'extrait phénolique des téguments de *Vicia faba* (Alfred) exprimées en mg.g⁻¹ de matière sèche.

Tableau (b)

	Phénols totaux bleu de prusse/ PVP	Tannins condensés BuOH/HCl	Pouvoir tannant Hémoglobine	Efficacité tannante
				Hém/PhT
Extrait global (A)	84,5 ± 2,2	138,6 ± 3,5	120,3 ± 4,2	1,4
Hypophase acétone -eau	11,6 ± 0,4	10,6 ± 0,5	—	
Fraction Et ₂ O (B)	4,5 ± 0,2	0	9,4 ± 1,4	
Fraction MeCOEt (C)	22,7 ± 0,8	40,3 ± 1,6	43,6 ± 2,3	1,9
Fraction H ₂ O (D)	42,7 ± 2,3	84,3 ± 2,8	53,8 ± 0,8	1,3

Tableau 29 b : Teneurs en phénols totaux(éqs catéchine), tannins condensés (en mg.g⁻¹) et pouvoir tannant (éqs acide tannique) des différentes fractions de l'extrait phénolique des téguments de *Vicia faba* (Alfred) exprimées en mg.g⁻¹ de matière sèche.

Tableau (c)

	Phénols totaux bleu de Prusse/PVP	Tannins condensés BuOH/HCl	Pouvoir tannant Hémoglobine	Efficacité tannante
				Hém/PhT
Extrait global (A)	75,5 ± 2,9	118,6 ± 4,7	86,9 ± 2,5	1,2
Hypophase acétone -eau	8,7 ± 0,6	11,5 ± 0,8	—	
Fraction Et ₂ O (B)	4,8 ± 0,8	0	7,7 ± 1,3	
Fraction MeCOEt (C)	18,9 ± 0,3	27,5 ± 1,2	33,8 ± 0,2	1,8
Fraction H ₂ O (D)	41,3 ± 2,3	72,5 ± 1,8	42,6 ± 1,3	1,0

Tableau 29 c : Teneurs en phénols totaux(éqs catéchine), tannins condensés (en mg.g⁻¹) et pouvoir tannant (éqs acide tannique) des différentes fractions de l'extrait phénolique des téguments de *Pisum sativum* (V256S1) exprimées en mg.g⁻¹ de matière sèche.

2. Expertise quantitative de l'extrait global A et des fractions B, C, C' et D

2. 1. *Vicia faba*

Nous avons contrôlé le contenu phénolique de chaque fraction en mesurant les teneurs en phénols totaux, en tannins condensés et le pouvoir tannant vis-à-vis de l'hémoglobine. Les résultats sont donnés dans le **tableau 29 a et 29 b**. On peut observer que l'hypophase acétone-eau retient de l'extrait global A 14% des phénols totaux et 8 % des proanthocyanidines ; la présence de NaCl en saturation, ne permet pas l'application du test de précipitation de l'hémoglobine à cette fraction. Par conséquent la majeure partie de la fraction phénolique est soutirée avec l'épiphase lors de ce premier affrontement.

La fraction **B** ne montre pas de réactivité vis-à-vis du dosage au butanol -HCl ; ceci apporte la preuve que les composés solubles dans l'éther diéthylique ne sont pas des proanthocyanidines.

En ce qui concerne les fractions **C** et **C'**, il ressort que la MeCOEt s'avère beaucoup plus sélective et efficace que l'acétate d'éthyle. En effet comme le montrent les résultats des **tableaux 29 a et 29 b** l'efficacité de la MeCOEt est de 3 à 4 fois plus importante que celle de l'EtOAc. Alors que l'acétate d'éthyle (**C'**) ne solubilise guère plus de 8 % de tannins condensés de l'extrait (**A**), la méthyléthylcétone (**C**) solubilise quant à elle plus de 29% des proanthocyanidines du même extrait ; en outre l'efficacité tannante estimée par le rapport du pouvoir tannant sur la teneur en phénols totaux est importante (PT/PhT égal à 1,9), ce qui sous entend que cette fraction est riche en composés tannants.

Les dosages montrent que la fraction aqueuse résiduelle (**D**) garde la plus grande partie des tannins condensés (plus de 60 %). En revanche l'efficacité tannante semble être moins importante que celle de la fraction (**C**).

2. 2. *Pisum sativum*

Chez le pois, **tableau 29 c**, l'hypophase acétone-eau retire à l'extrait global **A** 11,5 % de phénols totaux et 9,6% de proanthocyanidines

La fraction **B** est dépourvue de proanthocyanidines ;

La fraction **C** soutire plus de 23% de proanthocyanidines ; elle présente également une forte efficacité tannante (1,8).

La fraction aqueuse (**D**) entraîne elle aussi la plus grande partie des proanthocyanidines .Elle présente un efficacité tannante inférieure à celle de la fraction **C**.

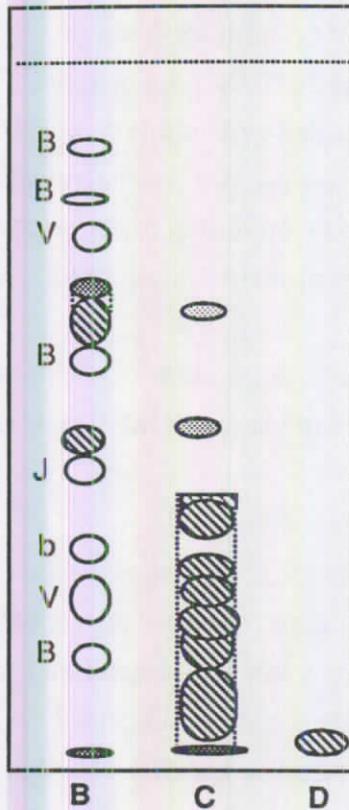
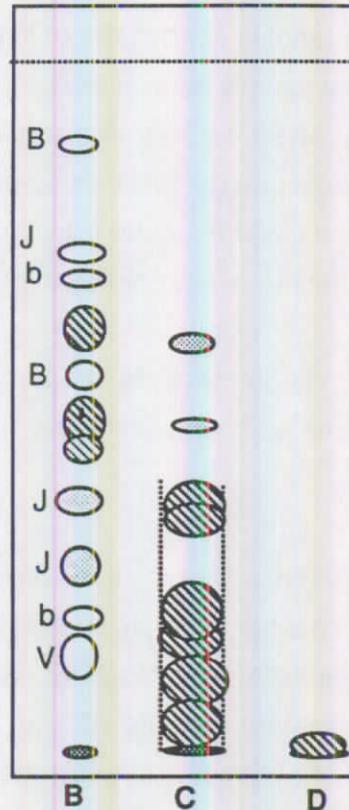
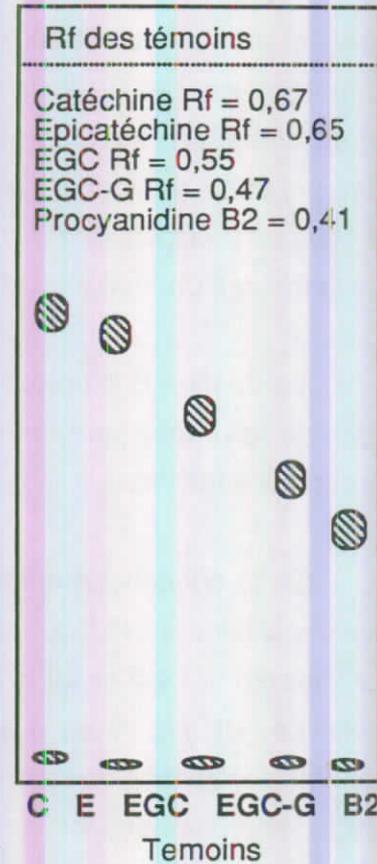
Figure 38a *Vicia faba*Figure 38b *Pisum sativum*

Figure 38: Chromatographie couches minces sur gel de silice des extraits B, C, D des téguments de la féverole et du pois. Solvant de migration : Toluène, acétone, acide formique : 6/6/1.

En effet, l'efficacité tannante dépend des teneurs en tannins condensés et de leur degré de polymérisation. Elle commence à s'exprimer à partir des dimères puis augmente progressivement avec la taille des molécules (Bate-Smith, 1973). A partir d'une certaine taille, la capacité à complexer les protéines devient stationnaire (Porter et Woodruffe, 1984). L'efficacité tannante finit même par faiblir pour les polymères de très haut poids moléculaire (Jones *et al.*, 1976).

2. 3. Conclusion

Pour les 2 espèces, la majorité des polyphénols des fractions **C** et **D** sont des tannins condensés ; ils représentent la majeure partie des composés phénoliques initiaux et sont les principaux responsables du pouvoir tannant.

3. Expertise des fractions B, C, D à l'aide de la CCM.

3.1. Molécules natives et support chromatographique de gel silice

La chromatographie couches minces sur gel de silice permet la séparation des proanthocyanidines en fonction de leur degré de polymérisation. Le solvant de migration est constitué de toluène-acétone-acide formique dans les proportions (60,60,10 ,v/v/v). La révélation au réactif vanilline-HCl permet de mettre en évidence ce type de composés.

cas de la féverole

La **figure 38 a** montre la chromatographie couches minces sur gel de silice des 3 fractions **B**, **C**, et **D**.

Les observations en lumière de Wood de la fraction (**B**) permettent de détecter la présence de composés de couleur bleu (B), violet (V), jaune (J) et blanc (b). La révélation au réactif vanilline-HCl montre 3 taches de couleur rouge dont 2 correspondent à des monomères de flavan-3-ols : catéchine $R_f = 0,67$ et épicatechine $R_f = 0,66$. La tache de $R_f = 0,55$ correspond soit à l'épigallocatechine ou à son isomère, la gallocatechine.

La révélation de la fraction (**C**) montre des composés qui réagissent avec le réactif vanilline-HCl.

La révélation de la fraction (**D**) confirme la présence de proanthocyanidines certainement de haut poids moléculaire vu leur très faible R_f . Ces composés se colorent en rouge intense après chauffage.

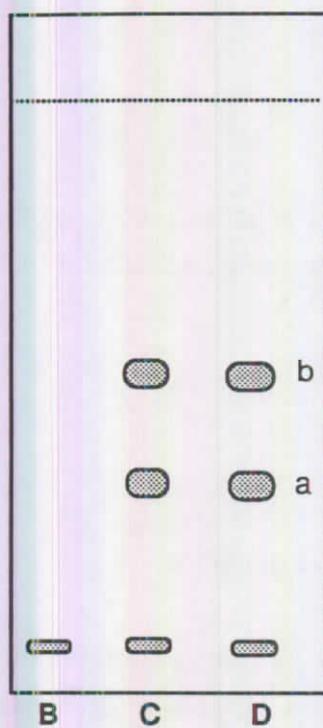
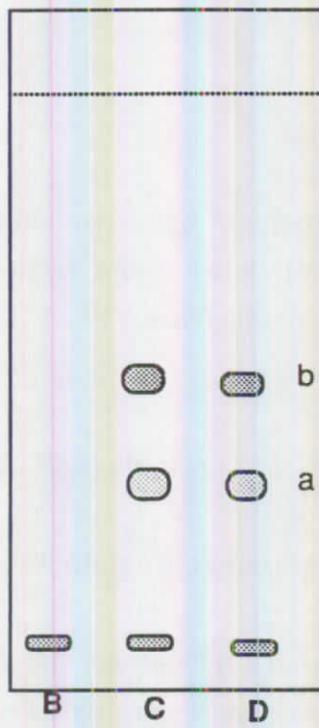
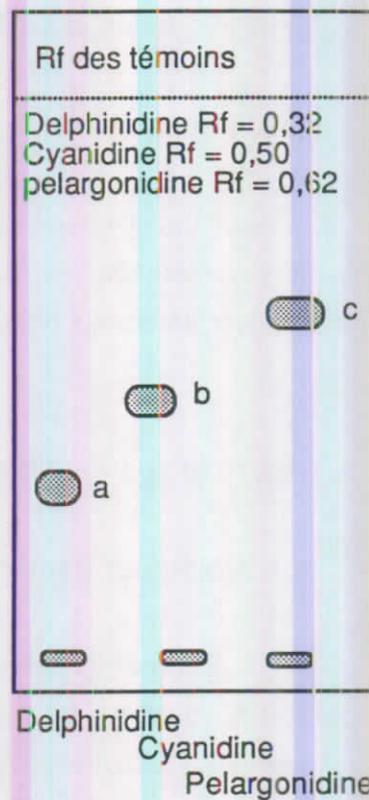
Figure 39 a *Vicia faba*Figure 39 b *Pisum sativum*

Figure 39 : Chromatographie couches minces sur cellulose des hydrolysats des extraits B, C et D. Solvant de migration : Forestal (Acide acétique, HCl, H₂O : 30,3,10)

Cas du pois

L'observation en lumière de Wood de la fraction éther (figure 38 b) révèle également la présence de composés de couleur bleu, jaune, blanc et violet. La révélation par la vanilline-HCl fait réagir 3 produits : un produit dont le $R_f = 0,66$ correspond soit à l'épicatéchine soit à son isomère et 2 produits mal séparés de $R_f = 0,55$ correspondant à l'épigallocatechine et à la galocatechine. La fraction éther diéthylique concerne donc essentiellement les flavane-3-ols monomères.

La révélation de la fraction (C) montre surtout des composés réagissant positivement au réactif vanilline-HCl, et des R_f compris entre 0 et 0,44.

La révélation de la fraction (D) confirme sa richesse en proanthocyanidines de haut poids moléculaire vu la très faible affinité pour la phase mobile.

Conclusion

Bien que la chromatographie sur couches minces de gel de silice ne permette pas de bien séparer tous les composés flavaniques présents dans les divers extraits, elle peut néanmoins témoigner de l'efficacité de l'extraction liquide-liquide mise au point pour fractionner l'extrait global et de l'importance des proanthocyanidines dans les fractions (C) et (D).

3.2. Produits de dégradation hydrolytique et Cellulose microcristalline

L'hydrolyse acide peut nous renseigner sur le degré d'hydroxylation des noyaux B des molécules de type flavan-3-ol participant à la formation des proanthocyanidines.

L'analyse des hydrolysats des fractions B, C et D de la féverole sur CCM de cellulose (figure 39a) dans le solvant de migration acide acétique, acide chlorhydrique et eau (30.3.10 ; V/V/V) montre que :

- la fraction B est dépourvue de proanthocyanidines ;
- les fractions C et D, présentent 2 taches facilement identifiées à :
 - la delphinidine, rouge violacé, $R_f = 0,32$
 - la cyanidine, rouge , $R_f = 0,50$

L'analyse des hydrolysats des fractions de pois (figure 39 b) montre les mêmes résultats. Ces anthocyanidines ont pour formules :

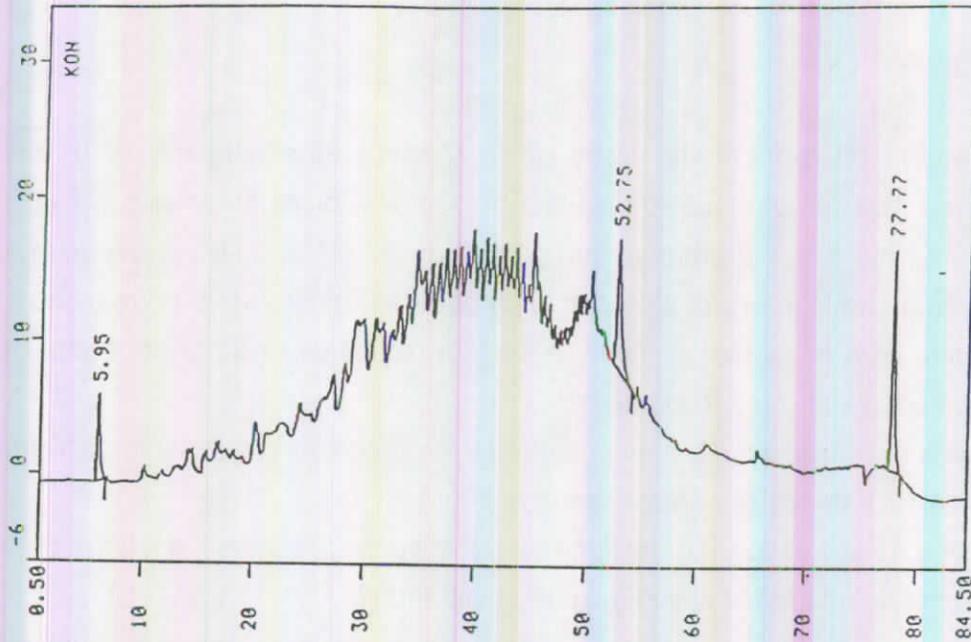
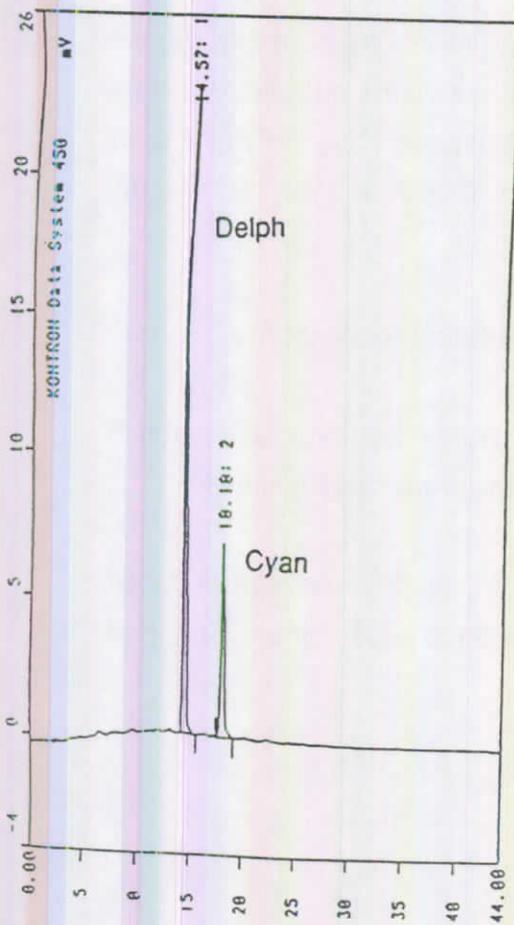
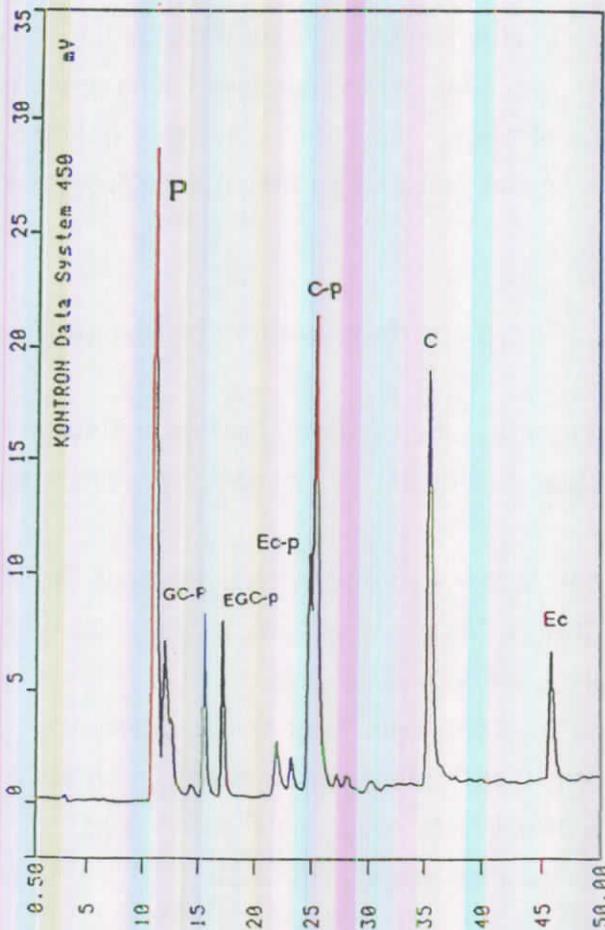


Figure 40 (1). Chromatogramme de l'extrait global (A) de *Vicia faba* (Alfred)



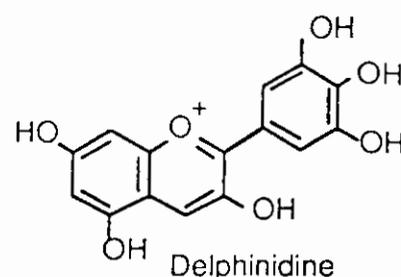
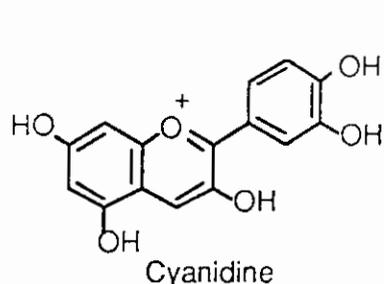
(2). Chromatogramme de l'extrait global (A) de *Vicia faba* après hydrolyse totale.

Delph = delphinidine
Cyan = cyanidine

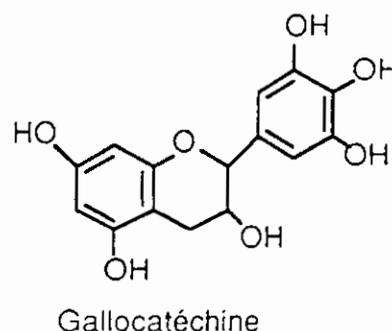
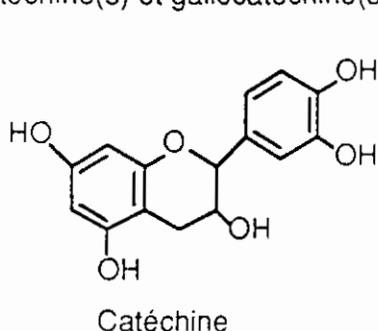


(3). Chromatogramme de l'extrait global (A) de *Vicia faba* après dégradation partielle en présence de phloroglucinol.

P = phloroglucinol ; GC-p = gallocatéchine-4-phloroglucinol ;
EGC-p = épigallocatéchine-4-phloroglucinol ; G = gallocatéchine ;
Ec-p = épicatechine-4-phloroglucinol ; C-p = catéchine-4-
-phloroglucinol ; C = catéchine ; Ec = épicatechine .



Ces résultats montrent donc que pour la synthèse de proanthocyanidines, chez *Vicia faba* ou chez *Pisum sativum*, les voies de biosynthèse fournissent les flavane-3-ols c'est à dire catéchine(s) et gallocatéchine(s).



4. Expertise à l'aide de la CLHP couplée aux techniques de microdégradation

4.1. Cas de la féverole :

Le profil général de l'extrait initial (A) montre la complexité du mélange de molécules présentes (figure 40, profil 1) et la difficulté de la CLHP à opérer une séparation de qualité.

4.1.a. Oxydation totale

L'objectif est d'identifier des sous-unités flavanes participant à la construction des polymères de proanthocyanidines par un suivi à 525 nm après oxydation complète par HCl 2N. Le profil 2 (figure 40) montre 2 pics aux temps de rétention de 14,23 mn et 18,23 mn. Par chromatographie de témoins d'anthocyanidines, les 2 pics ont été identifiés à la delphinidine pour le premier et la cyanidine pour le second. Ceci confirme ce que nous avons observé sur couches minces de cellulose microcristalline. De plus, cette méthode est quantitative et permet de pondérer la présence des deux types de monomères soit 1 unité de procyanidine pour 3 unités de prodélphinidines.

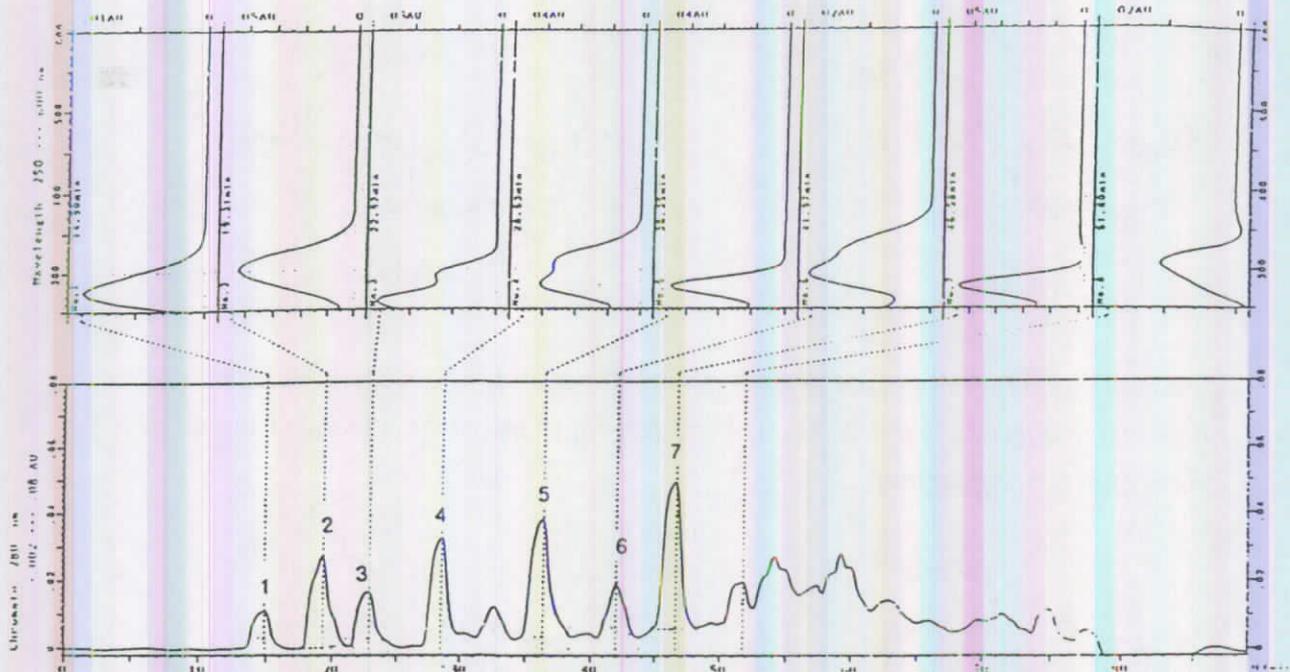
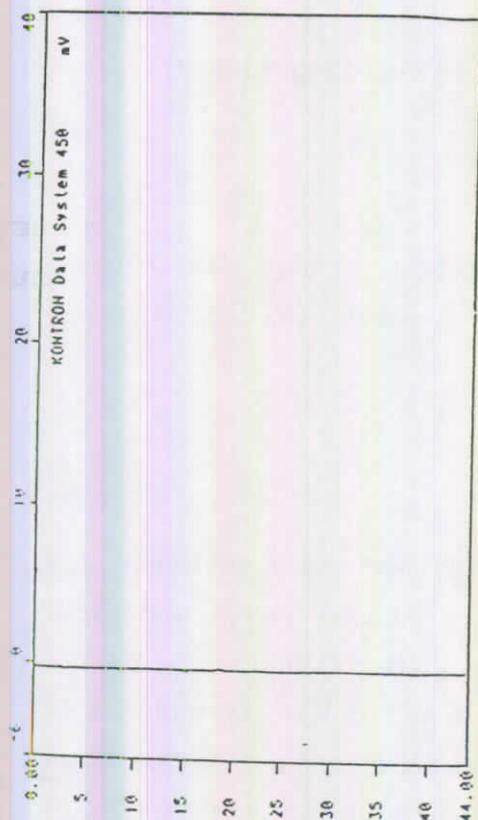
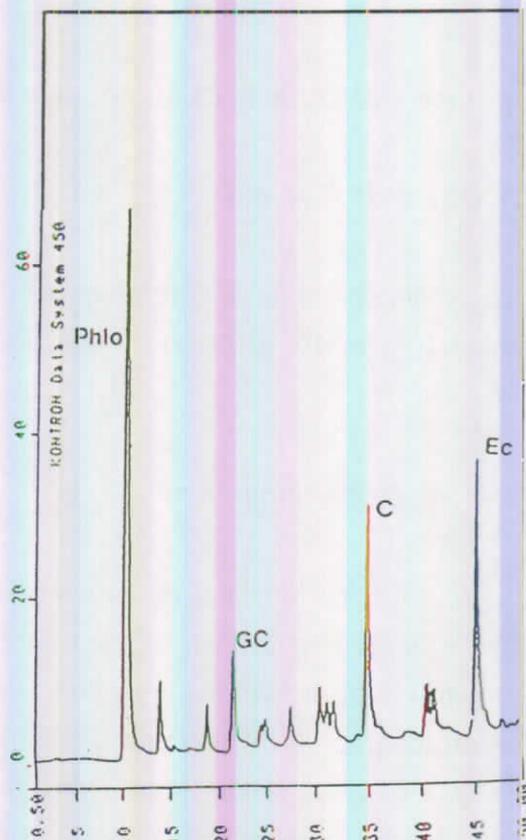


Figure 41 : 1 . profil CLHP et spectre d'absorption des principaux pics (détection à la barrette de diode) de la fraction native B (éther diéthylique) de *Vicia faba* .



2. Profil de la fraction B de *Vicia faba* après hydrolyse totale.



3. Profil de la fraction B de *Vicia faba* après dégradation en présence de phloroglucinol.

Phlo = phloroglucinol ; GC = Gallocatéchine ;
C = Catéchine ; Ec = Epicatéchine.

4.1.b. Microdégradation en présence de phloroglucinol

Ce traitement permet de caractériser les unités terminales et les unités d'allongement des polymères de proanthocyanidines.

Le **profil 3 (figure 40)** de la dégradation partielle de l'extrait global de *Vicia faba* en présence de phloroglucinol livre essentiellement 7 pics répartis ainsi :

- 2 pics de moyenne intensité (Tr 16 mn et Tr 18 mn) correspondant respectivement aux résidus phloroglucyls de la gallocatéchine et de l'épigallocatéchine ;
- la gallocatéchine à 23 mn ;
- 2 pics mal séparés qui correspondent aux résidus phloroglucinols de l'épicatéchine et de la catéchine (Tr 25 mn et Tr 26 mn) ;
- enfin 2 pics bien individualisés aux temps de rétention 36 mn et 46 mn correspondant respectivement à la catéchine et à l'épicatéchine.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Foo et Karchesy 1989, Koupai *et al.*, 1992 et 1993, à savoir que chez *Vicia faba* L., il a 3 types d'unités terminales : catéchine et épicatechine et à un degré moindre la gallocatéchine et 4 types d'unités d'allongement : gallocatéchine et épigallocatéchine d'une part, catéchine et épicatechine d'autre part.

4.1.c. Extension du protocole aux fractions B, C et D de *Vicia faba* L.

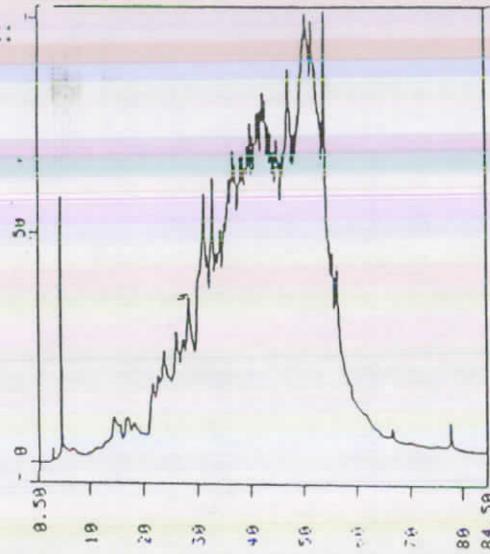
Trois profils chromatographiques permettent de décrire le contenu de la fraction **B**.

a. Le profil 1 (**figure 41**) de la fraction native présente 7 pics. Les spectres fournis par la multidétection permettent d'attribuer les pics 3, 5, 7 aux temps de rétention (22,93 mn, 36,3 mn et 46,6 mn) respectivement à la classe des flavan-3-ols monomères.

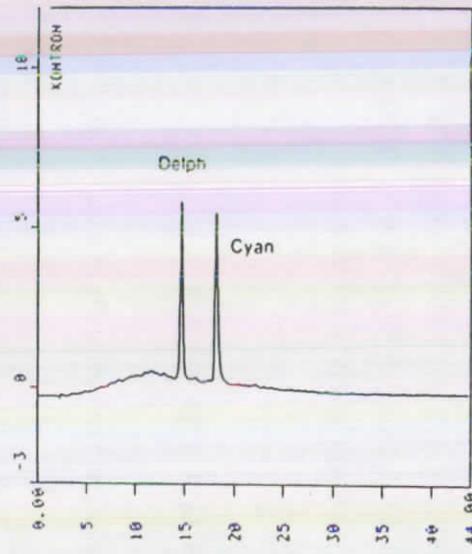
b. Le suivi par CLHP (**profil 2**) de l'oxydation totale de la fraction **B** ne détecte pas delphinidine ni cyanidine ; ceci confirme l'absence de proanthocyanidines polymères dans cette fraction.

c. Le **profil 3** après dégradation partielle en présence de phloroglucinol confirme l'absence totale de proanthocyanidines dans cette fraction. On détecte des flavan-3-ols terminaux aux Tr = 23, 36 et 46 mn qui en fait comme cela est indiqué précédemment sont des unités libres.

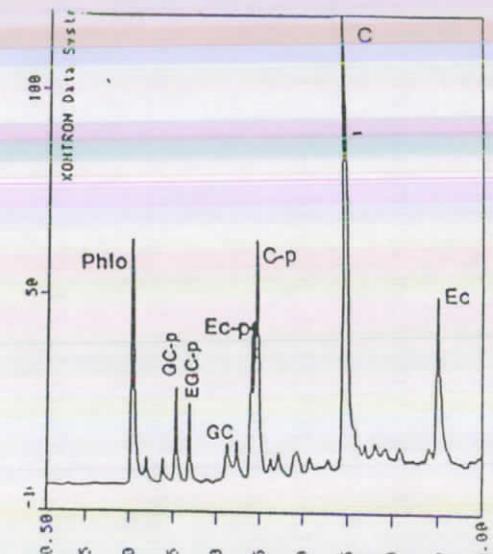
Figure 42:



1. Profil natif de la fraction C de *Vicia faba*.

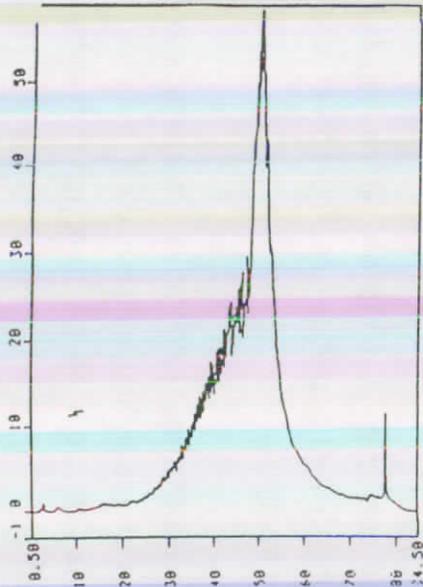


2. Profil de la fraction C de *Vicia faba* après hydrolyse totale .

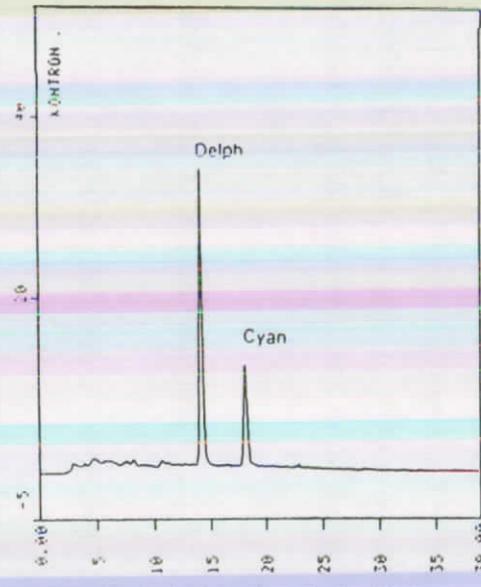


3. Profil de la fraction C de *Vicia faba* après dégradation en présence de phloroglucinol.

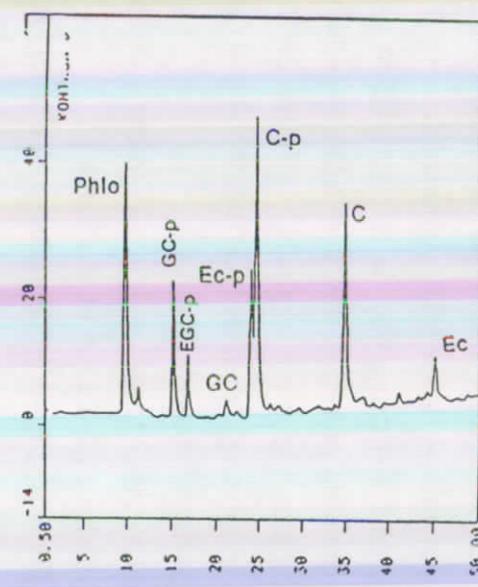
Figure 43



1. Profil natif de la fraction D de *Vicia faba*.



2. Profil de la fraction D de *Vicia faba* après hydrolyse totale.



3. Profil de la fraction D de *Vicia faba* après dégradation en présence de phloroglucinol.

La fraction C native montre un **profil 1** (figure 42) mal résolu ; les propriétés de la colonne phase inverse étant inappropriées à ce type de molécules.

Le **profil 2** après oxydation complète en milieu acide révèle la présence de 2 pics aux Tr 15 mn et 18 mn. Ils correspondent respectivement à la delphinidine et à la cyanidine provenant des proanthocyanidines homologues. Ces 2 composés présentent un rapport de surface pratiquement égal à 1.

Le clivage des proanthocyanidines de la fraction MeCOEt de *Vicia faba* en présence de phloroglucinol (**profil 3**) génère 2 types de composés dont les temps de rétention sont les suivants :

	Composé libre (unité terminale)	Composé lié au phloroglucinol (unité d'allongement)
Gallocatéchine (GC)	23 mn	16 mn
Epigallocatéchine(EGC)	...	18 mn
Catéchine (C)	36 mn	26 mn
Epicatéchine(Ec)	46 mn	25 mn

Le profil CLHP montre que les unités terminales et les unités d'allongement sont essentiellement de type catéchiques.

Le chromatogramme de la fraction D native (figure 43. 1) est un profil caractéristique des proanthocyanidines hautement polymérisées.

L'oxydation complète de cette fraction (**profil 2**) génère 2 pics correspondant respectivement à la delphinidine (Tr 14,5 mn) et à la cyanidine (Tr 18,1 mn) avec un rapport de surface de 3.

Le clivage des proanthocyanidines de la fraction D en présence de phloroglucinol montre un **profil 3** sur lequel s'individualisent les pics correspondant aux unités flavanes terminales GC, C, Ec (aux Tr 23, 36 et 46 mn) mais également les pics des unités d'extension qui correspondent aux résidus phloroglucyls GC-p, EGC-p, Ec-p et C-p aux Tr 16, 18, 25 et 26 mn.

Conclusion

La comparaison des profils de dégradation partielle des fractions C et D de *Vicia faba*, montre que les résidus d'allongement (résidus phloroglucyls), sont plus importants dans la fraction D que dans la fraction C. Ceci prouve que :

- la fraction D contient des composés de haut poids moléculaire ;
- la fraction C semble retenir surtout les oligomères de proanthocyanidines.

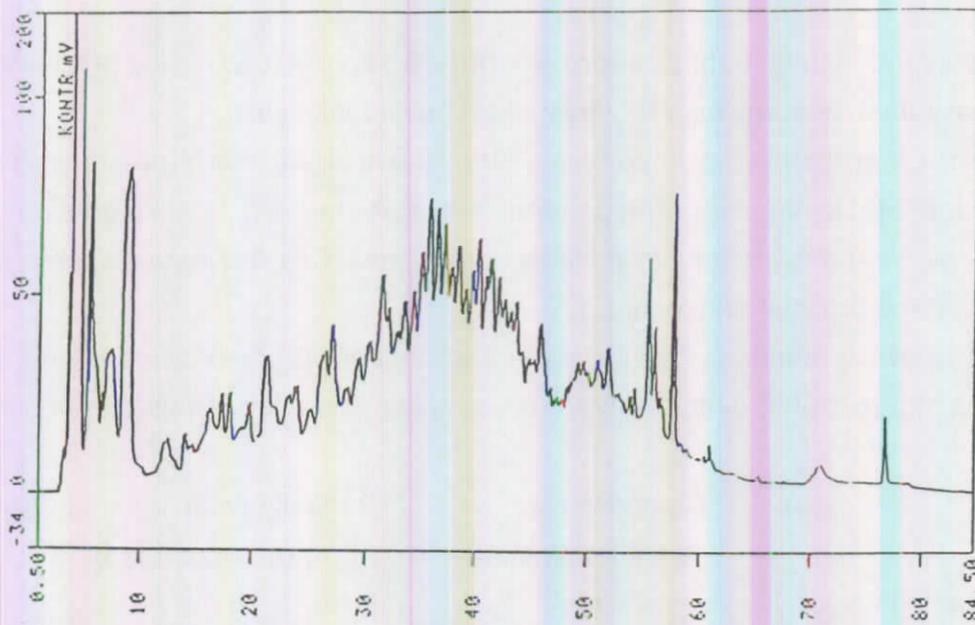
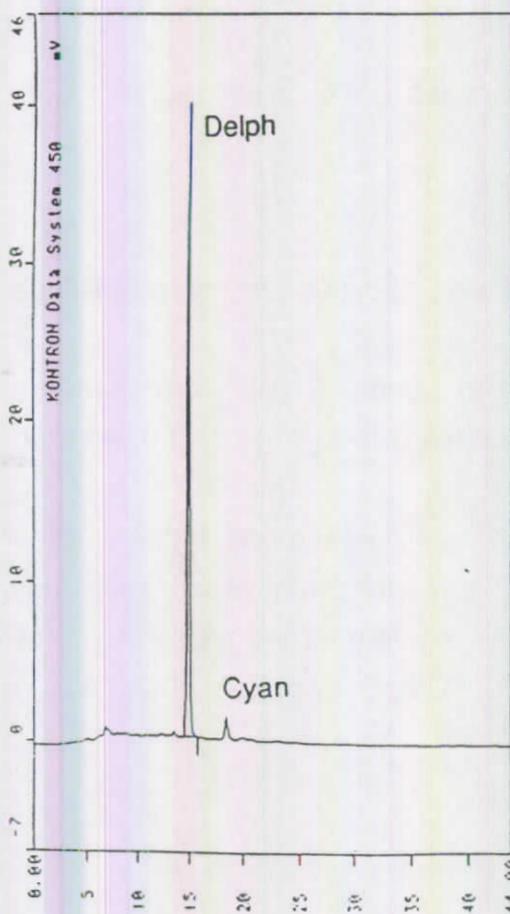
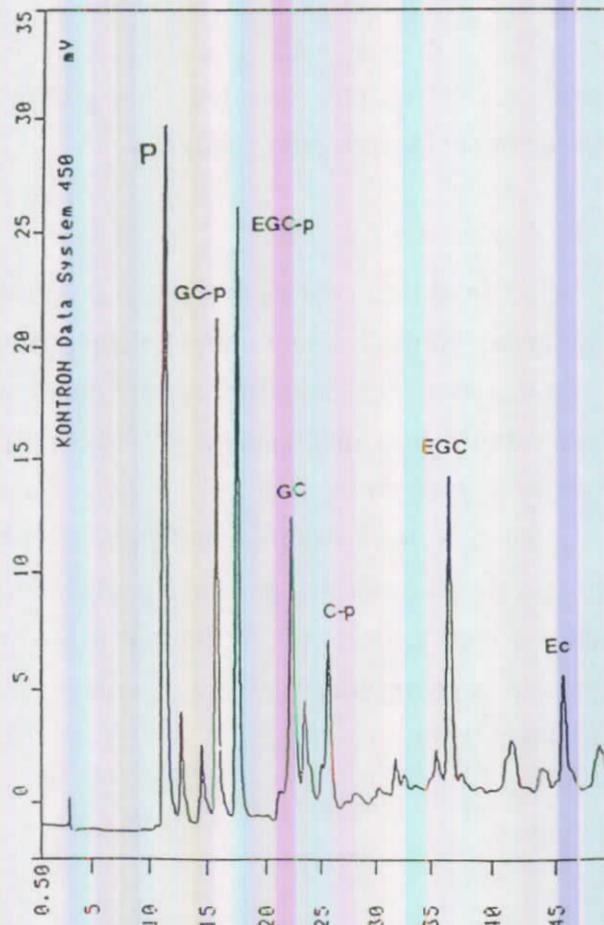


Figure 44 (1). Chromatogramme de l'extrait global (A) de *Pisum sativum* (V 256 S1)



(2). Chromatogramme de l'extrait global (A) de *Pisum sativum* après hydrolyse totale.



(3). Chromatogramme de l'extrait global (A) de *Pisum sativum* après dégradation partielle en présence de phloroglucinol.

Delph = delphinidine
Cyan = cyanidine

P= phloroglucinol ; GC-p = gallocatéchine-4-phloroglucinol ;
EGC-p = épigallocatéchine-4-phloroglucinol ; G = gallocatéchine ;
Ec-p = épicatechine-4-phloroglucinol ; C-p = catechine-4-
phloroglucinol ; EGC= épigallocatéchine ; Ec = épicatechine .

4.2. Expertise CLHP de l'extrait global (A) de *Pisum sativum*

Ce chromatogramme (**figure 44, 1**) montre également la complexité du mélange de molécules présentes dans l'extrait global des téguments de pois.

4.2.a. Dégradation totale

Le **profil 2** après oxydation complète présente 2 pics : la delphinidine (Tr 14,8 mn) et la cyanidine (Tr 18 mn) ; ceci met en évidence la présence de composés trihydroxylés (prodelphinidines) et dihydroxylés (procyanidines) dans les téguments de *Pisum* avec une dominance très forte de composés trihydroxylés (98%).

4.2.b. Microdégradation en présence de phloroglucinol

La dégradation partielle de l'extrait global de *Pisum sativum* montre un **profil 3** caractéristique des fractions riches en proanthocyanidines et livre :

- 2 pics de grande importance (Tr 16 mn et Tr 18 mn) qui correspondent respectivement aux résidus phloroglucyls de la gallocatéchine et épigallocatéchine ;
- 2 pics de faible importance, mal séparés, correspondant aux résidus phloroglucinols de l'épicatéchine et de la catéchine (Tr 25 mn et Tr 26 mn) ;
- 3 pics bien individualisés aux temps de rétention : 23, 37, et 46 mn correspondant respectivement à la gallocatéchine, l'épigallocatéchine et à l'épicatéchine (unités terminales).

L'examen de ce profil confirme l'importance du point de vue quantitatif des prodelphinidines (sous-unités trihydroxylées) par rapport aux procyanidines (sous-unités dihydroxylées).

4.2.c. Analyse des fractions B ,C, et D de *Pisum sativum*

La fraction native **B** livre 7 pics dont les spectres fournis par la multidétection sont présentés dans la **figure 45: 1**. On reconnaît au temps de rétention 21,3 et 40,1 mn (pics 2 et 4) .les spectres classiques des flavan-3-ols monomères.

L'oxydation complète (**profil 2**) en milieu acide confirme bien l'absence totale de proanthocyanidines dans cette fraction.

Le **profil 3** de la microdégradation en présence de phloroglucinol fait ressortir essentiellement 3 composés aux Tr 23 mn, 37 mn et 46 mn correspondant respectivement

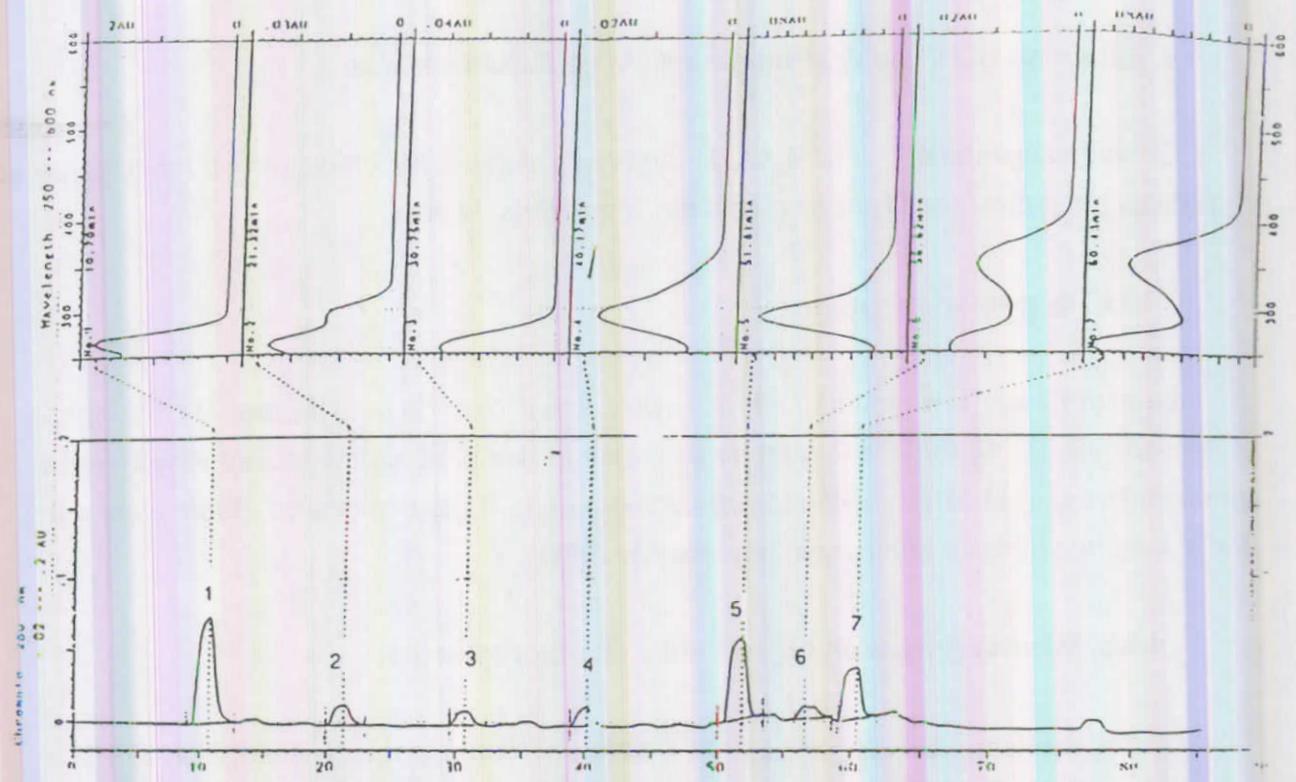
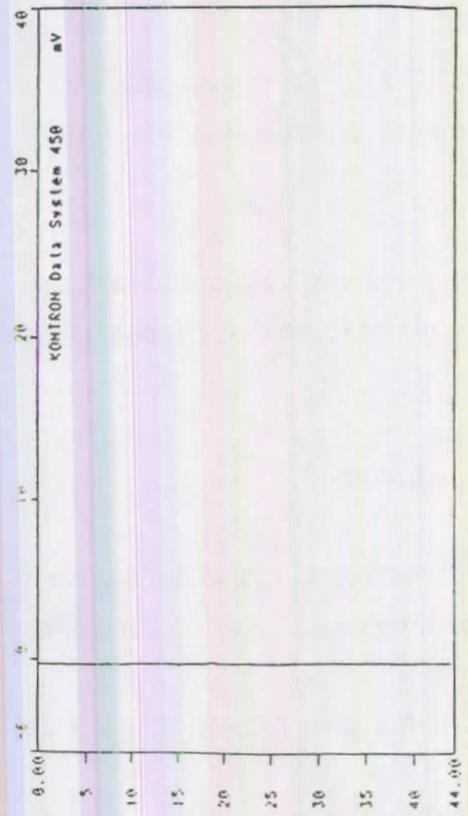
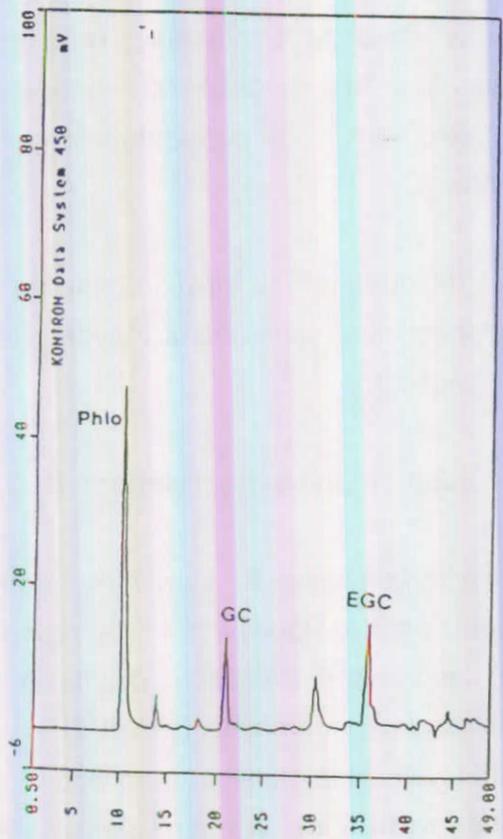


Figure 45 : 1. profil CLHP et spectre d'absorption des principaux pics (détection à la barrette de diode) de la fraction native B (éther diéthylique) de *Pisum sativum*.



2. Profil de la fraction B de *Pisum sativum* après hydrolyse totale.



3. Profil de la fraction B de *Pisum sativum* après dégradation en présence de phloroglucinol.

Phlo = phloroglucinol ; GC = Gallocatéchine ;
EGC = Epigallocatéchine

aux temps de rétention de la (+)-gallocatéchine, (-)-épigallocatéchine et (-)-épicatéchine, existant dans la fraction B comme monomères libres.

Le **profil 1** de la fraction native **C** (**figure 46**) est également mal défini.

Le **profil 2** après oxydation complète montre 2 pics. La delphinidine (Tr 15 mn) représente plus de 90 %, la cyanidine (Tr 18 mn) ne représentant guère que 9,5% du total ; ceci met en évidence, comme il a été signalé précédemment, la dominance de prodelphinidines.

Le suivi CLHP après dégradation partielle de cette fraction montre un **profil 3** caractérisé par :

- 2 pics (Tr 16 et 18 mn) qui correspondent respectivement aux résidus phloroglucyls de la gallocatéchine et épigallocatéchine ;
- la gallocatéchine à 23 mn ;
- 2 pics mal séparés qui correspondent aux résidus phloroglucinols de l'épicatéchine et de la catéchine (Tr 25 mn) ;
- enfin 2 pics bien individualisés aux temps de rétention 37 mn et 46 mn correspondant respectivement à l'épigallocatéchine et à l'épicatéchine.

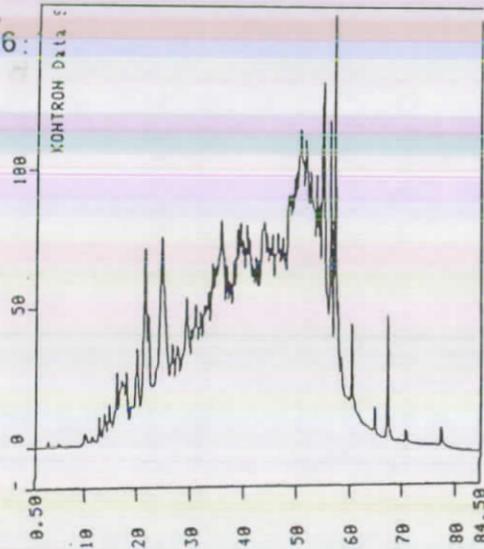
Le **profil 1** de la fraction native **D** (**figure 47**) est également mal résolu et témoigne de la présence de molécules hautement polymérisées.

L'oxydation totale (**profil 2**) produit essentiellement 2 composés : la delphinidine et la cyanidine dans les proportions de 96,2% et 3,8 %.

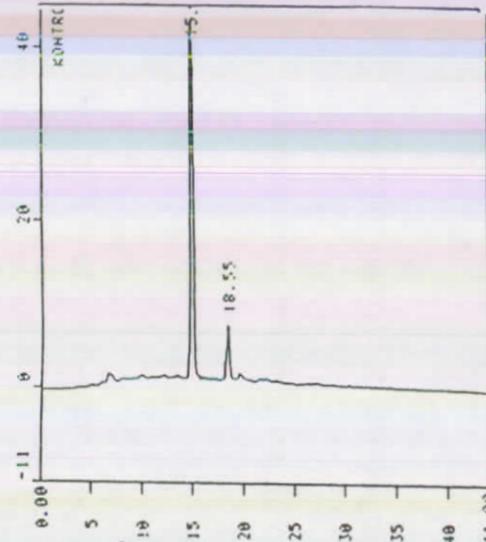
La fraction **D** dégradée en présence de phloroglucinol présente un **profil 3** caractéristique des fractions riches en prodelphinidines. Ce chromatogramme fait ressortir:

- 2 pics majeurs (Tr 16 et 18 mn) correspondants aux dérivés phloroglucyls de la gallocatéchine et l'épigallocatéchine;
- 3 pics correspondant aux unités d'extension probables, parmi lesquels l'épigallocatéchine (37 mn) et 2 autres pics mineurs correspondant à la gallocatéchine (23 mn) et l'épicatéchine (46 mn).

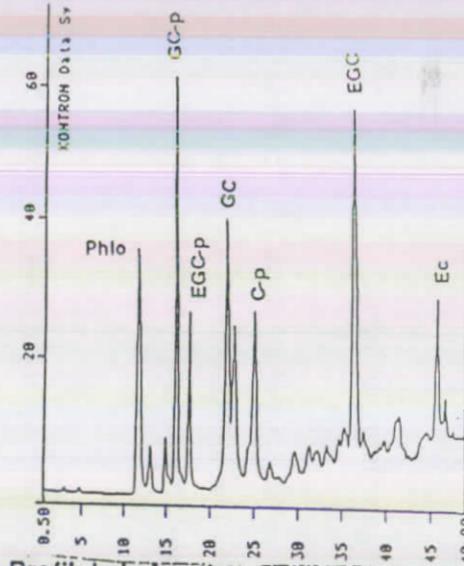
Figure 46 :



1. Profil natif de la fraction C de *Pisum sativum* .

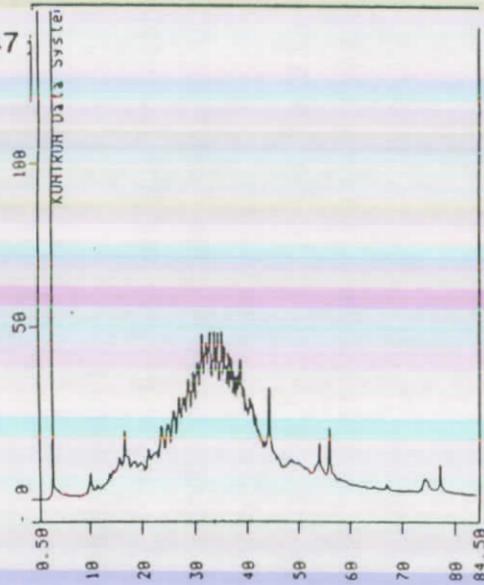


2. Profil de la fraction C de *Pisum sativum* après hydrolyse totale.

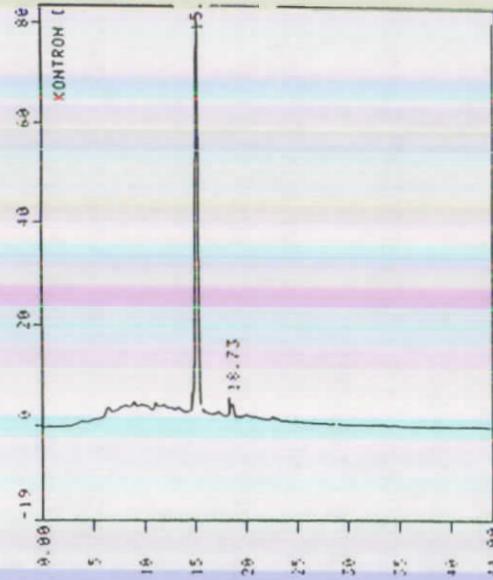


3. Profil de la fraction C de *Pisum sativum* après dégradation en présence de phloroglucinol.

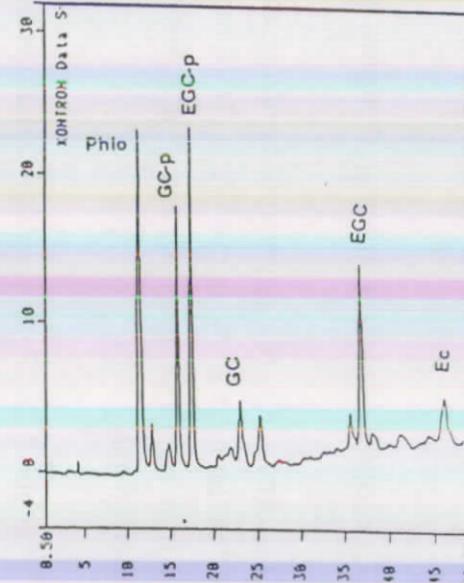
Figure 47 :



1. Profil natif de la fraction D de *Pisum sativum* .



2. Profil de la fraction D de *Pisum sativum* après hydrolyse totale .



3. Profil de la fraction D de *Pisum sativum* après dégradation en présence de phloroglucinol.

5. Comparaison du contenu phénolique des fractions de la féverole et du pois

Parmi les différents traitements que nous avons appliqués pour élucider la nature des tannins condensés chez le pois et la féverole, il apparaît que le traitement au phloroglucinol apporte des éléments qui permettent une comparaison objective entre les deux espèces, rendue dans le **tableau 30**.

	Fractions de <i>Vicia faba</i>			Fractions de <i>Pisum sativum</i>		
	B	C	D	B	C	D
GC-p	-	+	+	-	++	++
EGC-p	-	+	+	-	+	++
Ec-p	-	+	+	-	+	trace
C-p	-	++	+++	-	+	trace
GC	+	trace	trace	+	++	+
EGC	-	-	-	+	+++	++
C	+	+++	+	-	-	-
Ec	+	+	+	+	+	+

Tableau 30 : Comparaison du contenu flavanique des fractions B, C et D de la féverole et du pois. GC=gallocatéchine, C=catéchine, Ec=épicatéchine, EGC=épigallocatéchine, -p = phloroglucinol (- absence, trace, + = présence, ++ important, +++ très important).

Chez *Pisum sativum ssp arvense*, la voie de synthèse et d'accumulation des tannins condensés privilégie la production de prodelphinidines alors que *Vicia faba* privilégie la production des procyanidines.

B. EXPERTISE ANALYTIQUE DES PROANTHOCYANIDINES SUR LA BASE D'UN FRACTIONNEMENT SUR TAMIS MOLECULAIRE

L'étude précédente nous a montré que l'extrait méthyléthylcétone était le plus intéressant pour l'isolement de proanthocyanidines de degré de polymérisation moyen.

La technique de séparation appliquée fait appel à la chromatographie sur colonne de Sephadex LH 20 mise en œuvre avec succès par de nombreux auteurs dans le cadre de la séparation des proanthocyanidines (Hussein *et al.*, 1990, Porter *et al.*, 1991, Helsper *et al.*, 1993, Rigaud *et al.*, 1993).

L'élution se déroule en 4 étapes :

- élution à base d'éthanol qui entraîne les composés simples ;
- élution au mélange éthanol - méthanol (v/v) pour les formes les moins polymérisées ;
- élution au méthanol 100% pour solubiliser d'avantage les composés polymérisés ;
- le mélange méthanol - acétone pour entraîner les formes les plus polymérisées.

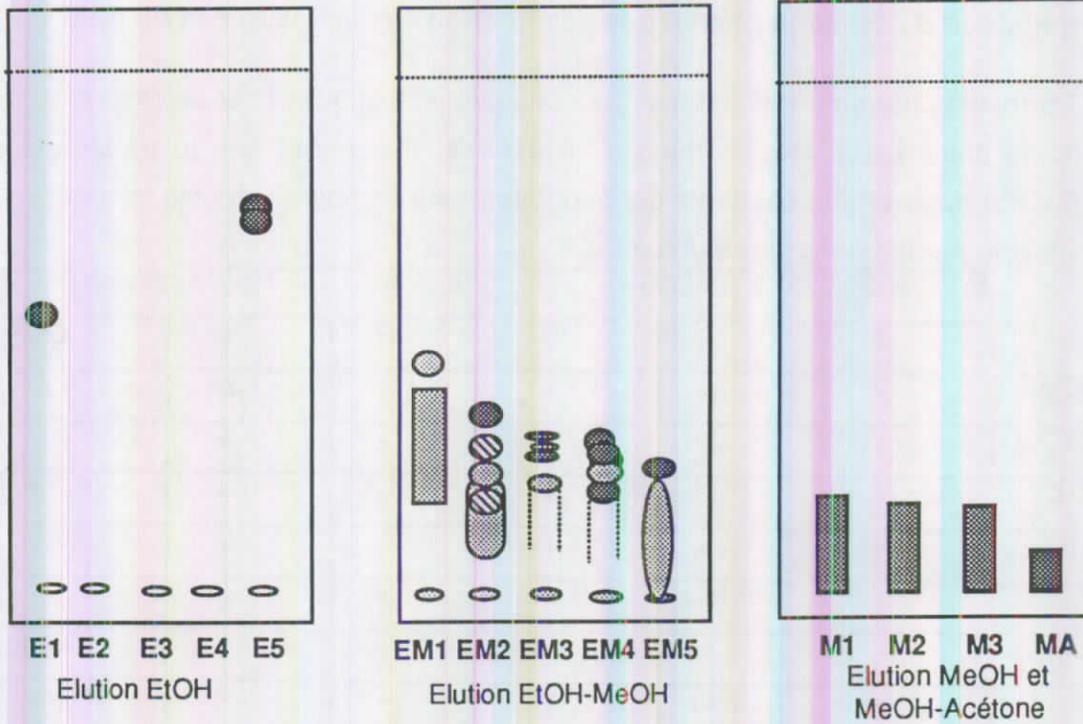


Figure 49 a : Diagnostic des fractions Sephadex LH 20 de *Vicia faba* sur gel de silice. Solvant de migration : toluène-acide acétique-acide formique : 60-60-10.

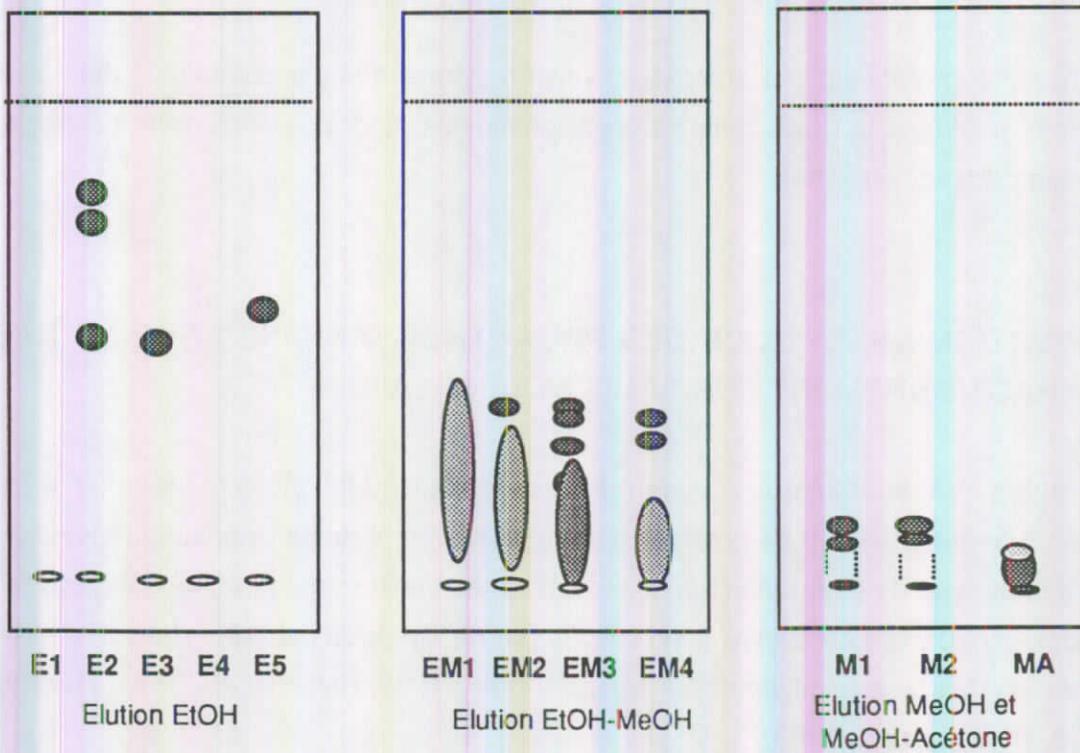


Figure 49 b : Diagnostic des fractions Sephadex LH-20 de *Pisum sativum* sur gel de silice. Solvant de migration : toluène-acide acétique-acide formique : 60-60-10.

La présence des divers composés dans les fractions éluées est mise en évidence par la CCM sur gel de silice (après révélation au réactif vanilline-HCl) et CLHP couplée à un détecteur à barrette de diodes.

1. Fraction Méthyéthylcétone de *Vicia faba*

1.1. Elution EtOH

Le profil (48a) de l'élution éthanolique est scindé en 5 fractions que nous identifierons par VE1, VE2, VE3, VE4 et VE5.

La fraction VE1 comprend 1 composé majeur ayant pour temps de rétention 24 mn, λ max. 279 nm et comme Rf 0,53. Ce produit pourrait correspondre à la gallocatéchine.

Les fractions VE2, VE3, VE4 contiennent chacune au moins un composé majeur, présentant respectivement des temps de rétention de 52,8 mn, 43,1 mn et 50,8 mn. Leur suivi CLHP couplé au multidétecteur nous oriente vers des composés types flavonoïdes (λ max. : 271-334 nm). Ceci est également confirmé par CCM sur silice où aucun produit n'est révélé au réactif vanilline-HCl alors qu'à la lumière de Wood leur fluorescence est violette. (figure 49a)

Le suivi CLHP de la fraction VE5 montre 2 composés ayant un maximum d'absorption à 278 nm respectivement aux temps de rétention 36 et 47 mn. La CCM confirme la présence de molécules réagissant au réactif vanilline-HCl ayant un Rf de ~ 0,66 sur gel de silice. Ces composés correspondent à des flavan-3-ols.

1.2. Elution EtOH-MeOH(v/v)

Le profil d'élution à l'éthanol-méthanol (v/v) est présenté dans la figure 48 b.

Il comprend 5 fractions : VEM1, VEM2, VEM3, VEM4, VEM5. Les temps de rétention des principaux composés majeurs sont donnés dans le tableau 31 :

Elution EtOH-MeOH	Temps de rétention des principaux composés(mn)				
	A	B	C	D	E
	16,1	32,8	35,6	39,5	52
VEM1	.+		.+		.++
VEM2	.+		.+++	.+	.+
VEM3		.++	.+++		.++
VEM4		.++		.+++	
VEM5					+

Tableau 31: Temps de rétention des principaux composés de l'élution éthanol-méthanol de la fraction C de *Vicia faba* (+ = faible importance ; ++ = moyen ;+++ = important).

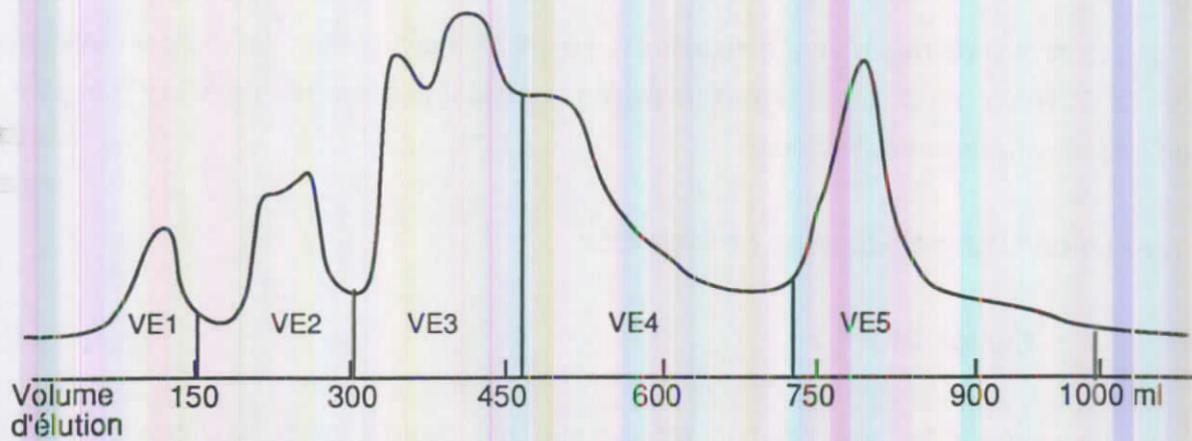


Figure 48 a : Profil d'élution éthanolique sur Sephadex de la fraction méthyléthylcétone de *Vicia faba* (Alfred).

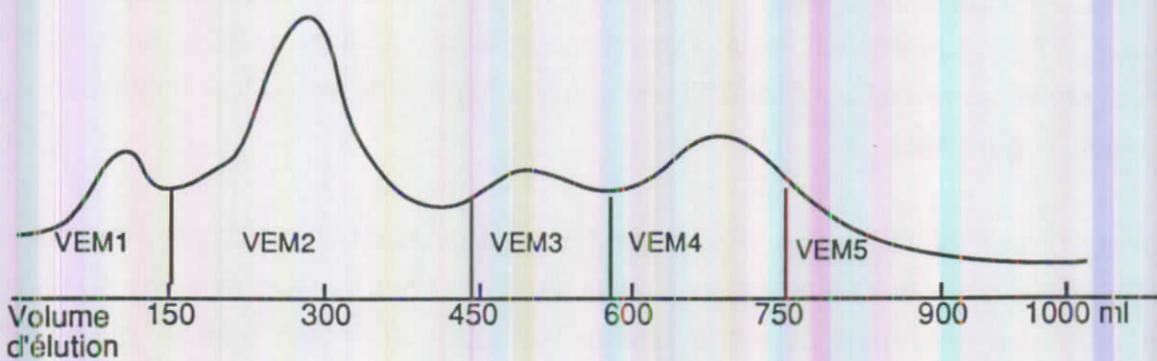


Figure 48 b : Profil d'élution EtOH-MeOH sur Sephadex de la fraction méthyléthylcétone de *Vicia faba* (Alfred).

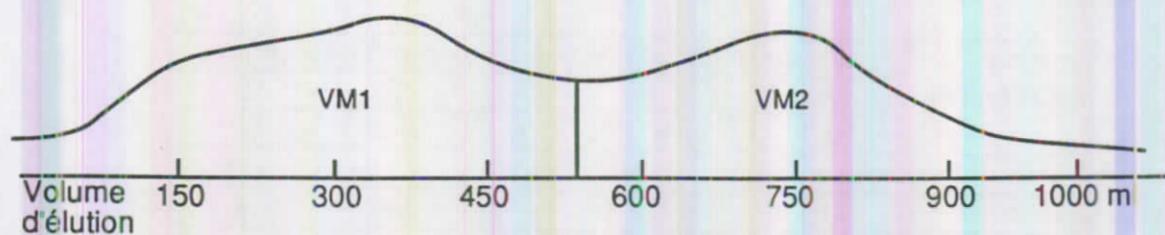


Figure 48 c : Profil d'élution MeOH sur Sephadex de la fraction méthyléthylcétone de *Vicia faba* (Alfred).

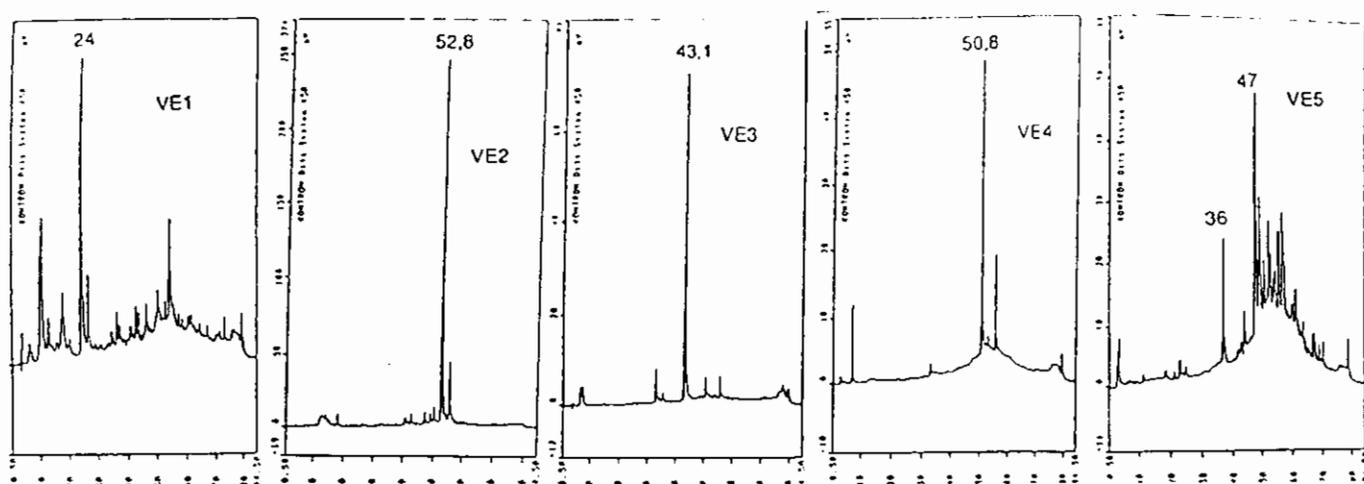


Figure 48 a' : Chromatogrammes CLHP des fractions correspondantes (élution EtOH de la fraction MeCOEt) de *Vicia faba* (Alfred).

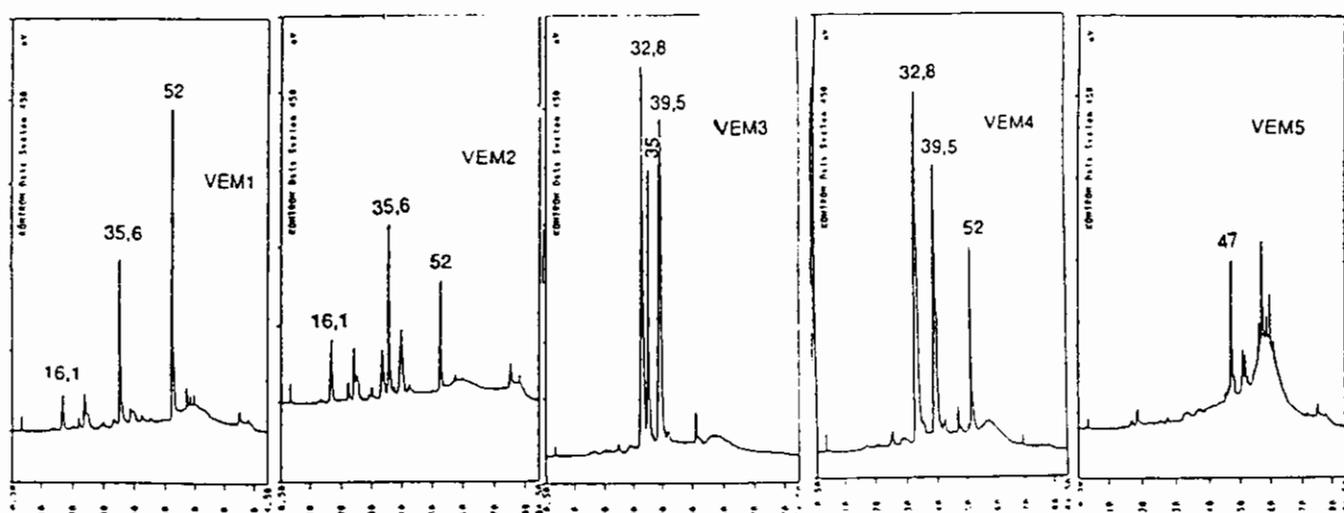


Figure 48 b' : Chromatogrammes CLHP des fractions correspondantes (élution EtOH-MeOH) de la fraction MeCOEt) de *Vicia faba* (Alfred).

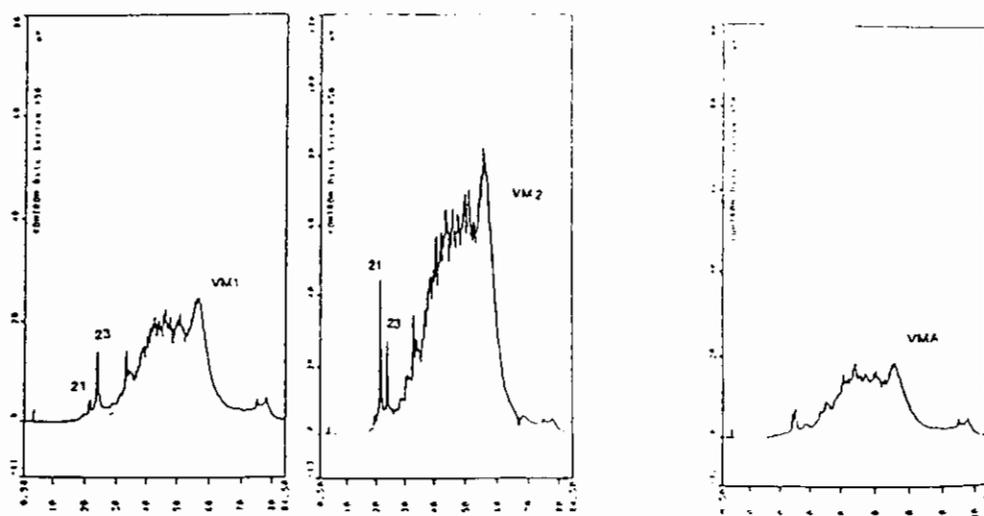


Figure 48 c' : Chromatogrammes CLHP des fractions correspondantes (élution MeOH et MeOH-Acétone de la fraction MeCOEt) de *Vicia faba* (Alfred).

Le suivi CLHP de ces composés montre des spectres présentant un pic unique dont le maximum d'absorption se situe à 279-280 nm. Le diagnostic sur CCM après révélation au réactif vanilline-HCl confirme bien l'appartenance de ces composés au groupe des proanthocyanidines.

1.3. Elution MeOH

Le profil d'éluion au méthanol est représenté par la figure 48 c. Il est scindé en 3 fractions VM1, VM2, V M3. L'analyse CLHP de ces fractions présente des chromatogrammes typiques de composés hautement polymérisés. 2 Pics de faible intensité s'individualisent aux temps de rétention 21 et 23 mn dans la fraction VM2. La chromatographie couches minces sur gel de silice révèle la présence de composés réagissant fortement au réactif vanilline-HCl et présentant des R_f relativement bas. (Figure 49a)

1.4. Elution MeOH-Acétone (70-30)

L'éluion au méthanol-acétone (70-30) permet de rompre les liaisons flavanols-Sephadex et entraîne les composés les plus polymérisés (proanthocyanidines). L'analyse par CLHP de cette fraction (VMA) montre un chromatogramme caractéristique d'une fraction fortement tannique ; ceci est également confirmé par la CCM sur gel de silice.

2. Fraction méthyléthylcétone de *Pisum sativum*

2.1. Elution EtOH

L'éluion éthanolique de l'extrait C de *Pisum sativum* est présentée dans la figure 50a. Le profil est scindé en 5 fractions PE1, PE2, PE3, PE4, PE5.

L'analyse CLHP montre la présence de composés monomères de type flavan-3-ols dans PE2, PE3, et PE5. Le diagnostic CCM (figure 49b) confirme la présence de monomères de flavane-3-ols dans ces mêmes fractions. Le fraction PE5 montre un seul pic majeur identifié à l'épigallocatechine (Tr 37 mn, R_f 0,66.)

2.2. Elution EtOH-MeOH

Le profil d'éluion à l'éthanol-méthanol (v/v) est présenté dans la figure 50 b. Il est scindé en 4 fractions : PEM1, PEM2, PEM3 et PEM4.

Le diagnostic CCM révèle la réactivité de ces fractions vis-à-vis du réactif vanilline-HCl.

L'analyse par CLHP montre des composés majeurs dont les temps de rétention sont donnés dans le **tableau 32**:

Elution	Temps de rétention des principaux composés(mn)							
	15,3	18,3	21,9	25,9	27,1	29,9	34,8	39,5
EtOH-MeOH	15,3	18,3	21,9	25,9	27,1	29,9	34,8	39,5
PEM1							.+	
PEM2							.+	. +
PEM3	.+		.++		.++	.++		
PEM4		.+		.+++				

Tableau 32 : Temps de rétention des principaux composés de l'élution EtOH-MeOH de la fraction C de *Pisum sativum* (V256 S1). (+ = peu important , ++ moyen, +++ = important).

2. 3. Elution MeOH

L'élution au méthanol est représentée par la figure 50 c. Le profil Sephadex LH-20 a été scindé en 2 fractions : PM1 et PM2. L'analyse par CLHP de ces fractions montre que la fraction PM2 livre essentiellement 2 composés majeurs à 20,7 et 21,9 mn respectivement.

2. 4. Elution MeOH-Acétone

Le suivi classique par CLHP et CCM de la fraction éluee au méthanol-acétone (70-30) PMA montre le caractère polymérique des composés présents dans cette fraction.

3. Conclusion

Les résultats du suivi de la séparation des proanthocyanidines montrent que le processus d'élution appliqué permet de séparer les molécules simples des autres composés polymères et de scinder ces polymères en fonction de leurs poids moléculaires.

Dans la mesure où nous envisageons d'isoler les proanthocyanidines oligomères par chromatographie liquide haute performance semi préparative, seules les fractions qui présentent des profils bien définis seront utilisées.

Il semble que, les composés les plus accessibles sont ceux élués à EtOH-MeOH. Nous essayerons également d'isoler les composés issus de l'élution MeOH qui semblent à priori plus polymérisés.

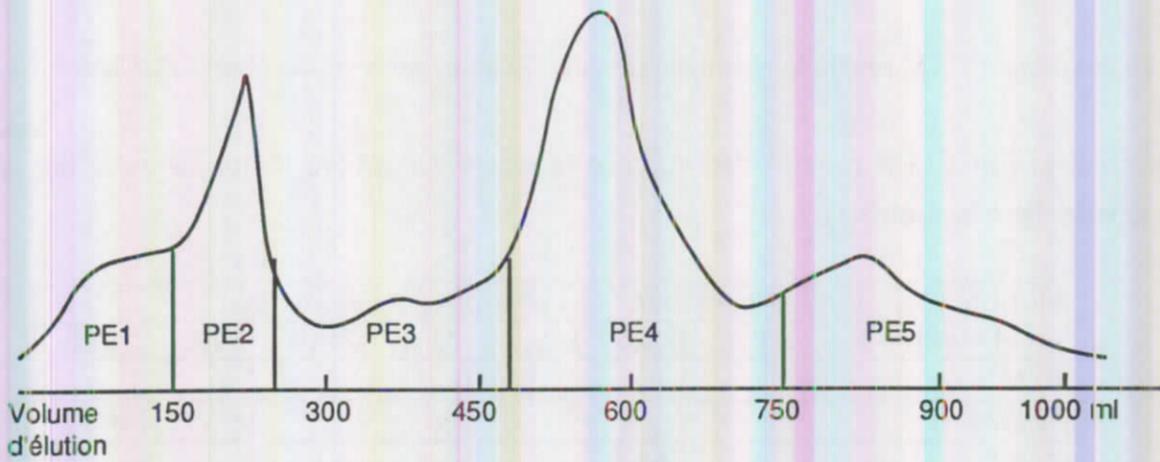


Figure 50 a : Profil d'élution éthanolique sur Sephadex de la fraction méthyléthylcétone de *Pisum sativum* (V 256 S1).

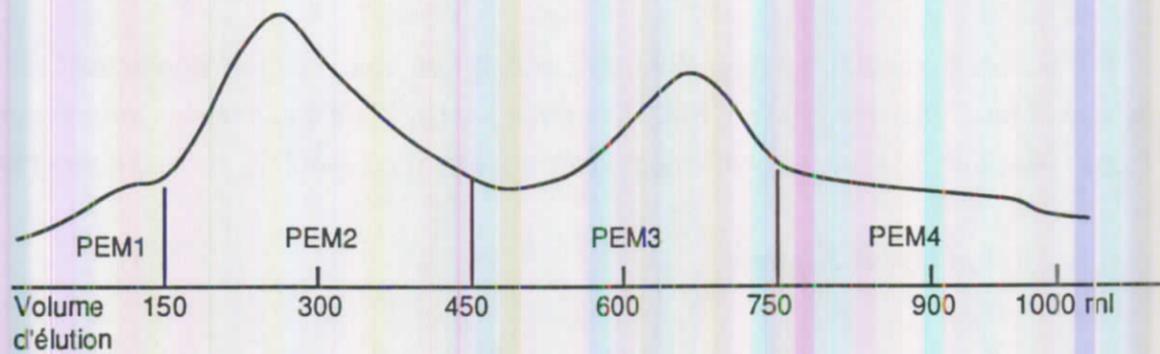


Figure 50 b : Profil d'élution EtOH-MeOH sur Sephadex de la fraction méthyléthylcétone de *Pisum sativum* (V 256 S1).

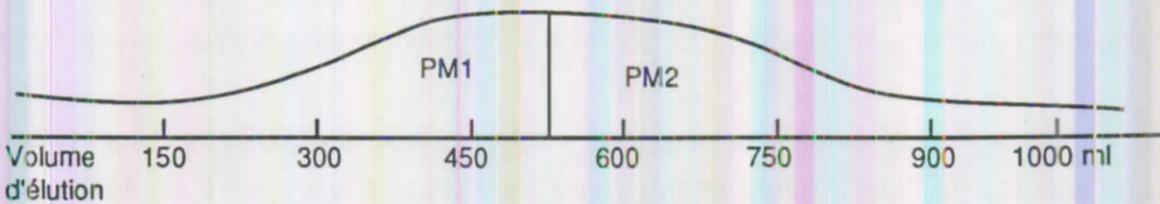


Figure 50 c : Profil d'élution MeOH sur Sephadex de la fraction méthyléthylcétone de *Pisum sativum* (V 256 S1).

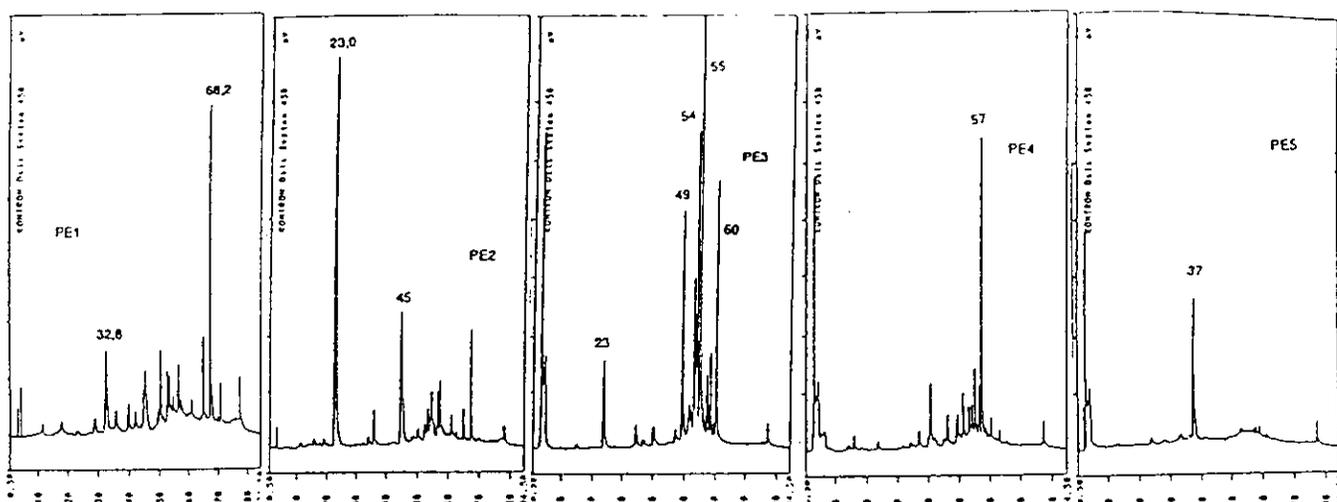


Figure 50a' : Chromatogrammes CLHP des fractions correspondantes (élution EtOH de la fraction MeCOEt) de *Pisum sativum* (V 256 S1).

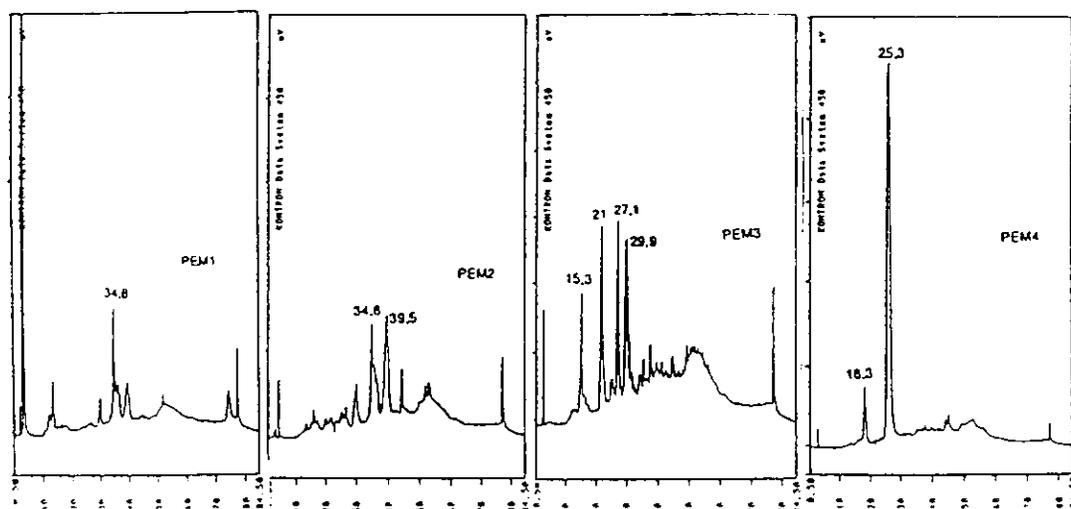


Figure 50b' : Chromatogrammes CLHP des fractions correspondantes (élution EtOH-MeOH) de la fraction MeCOEt) de *Pisum sativum* (V 256 S1).

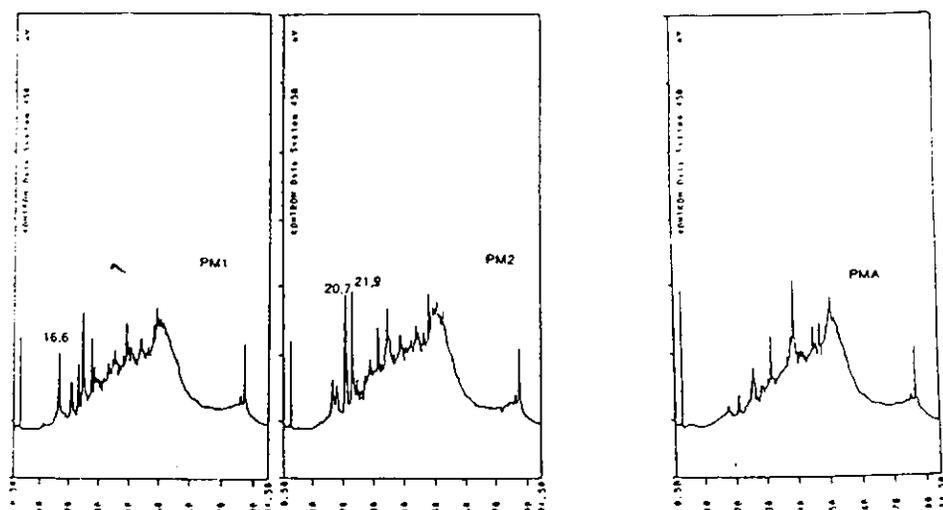


Figure 50c' : Chromatogrammes CLHP des fractions correspondantes (élution MeOH et MeOH-Acétone de la fraction MeCOEt) de *Pisum sativum* (V 256 S1).

Dans le cas de *Vicia faba*, 5 molécules de la fraction éluée par le mélange EtOH-MeOH et une molécule de l'élué au méthanol 100% semblent être accessibles.

Dans le cas de *Pisum sativum* les fractions PEM3 et PEM4 montrent respectivement 4 et 2 composés bien séparés que nous tenterons d'isoler. Nous essayerons de purifier également 2 composés élués au méthanol.

C.DETERMINATION DES STRUCTURES DES PROANTHOCYANIDINES

1. Les proanthocyanidines de *Vicia faba* L.

La purification finale des différentes proanthocyanidines est réalisée par CLHP semi-préparative sur colonne Lichrospher.

Les composés A, B, C, D et E sont isolés à partir des fractions éluées par le mélange EtOH-MeOH tandis que le composé F est issu de la fraction VM2 éluée au méthanol 100%.

1.1. Produits isolés

Nous présentons dans le **tableau 33** les principales caractéristiques chromatographiques des composés isolés de la féverole

Composés isolés	Temps de rétention en mn	Rf (silice) 60/60/10*	spectres UV λ . max.	ordre de grandeur mg
A	16,1	0,44	279	0,1
B	32,8	0,40	279	0,2
C	35,6	0,40	279	0,2
D	39,5	0,37	279	0,1
E	52,2	0,43	280	0,1
F	21,2	0,22	279	0,1

Tableau 33: Caractéristiques chromatographiques des proanthocyanidines de *Vicia faba*.

L.(*) Toluène, acétone, acide formique (60/60/10).

1.2. Détermination du poids moléculaire et du degré de polymérisation

Pour déterminer le poids moléculaire, nous avons utilisé la spectrométrie de masse en mode évaporation ionique (Electrospray) (ES/MS). C'est une méthode à ionisation douce qui convient à ce type de molécules.

Les spectres ES/MS des produits isolés sont donnés dans la figure 51.

Les principaux pics moléculaires des composés isolés sont récapitulés dans le tableau 34.

Composés	[M Na] ⁺	M	Nombre d'unité
A	599,5	576	2
B	601,5	578	2
C	601,5	578	2
D	601,5	578	2
E	599,7	576	2
	[M Na] ⁺	M	
F	889,4	866	3

Tableau 34 : Degré de polymérisation, poids moléculaire des procyanidines de *Vicia faba*.L

Les composés A, B, C, D, et E sont des procyanidines dimères alors que le composé F est une procyanidine trimère. Ces molécules sont construites sur la base de flavan-3-ols dihydroxylés.

1.3. Détermination des liaisons interflavaniques

La RMN du ¹³C constitue sans doute un outil sans équivoque pour la détermination des liaisons interflavaniques. Malheureusement la faible quantité des produits isolés dont nous disposons, ne peut pas être utilisée pour la détermination des liaisons interflavaniques existantes.

Nous avons tenter d'analyser nos composés par une autre méthode très sensible déjà présentée : l'hydrolyse partielle des produits en présence de phloroglucinol. En effet le clivage en présence du phloroglucinol permet d'identifier l'unité terminale ainsi que les unités d'extension constitutives de la molécule de proanthocyanidine.

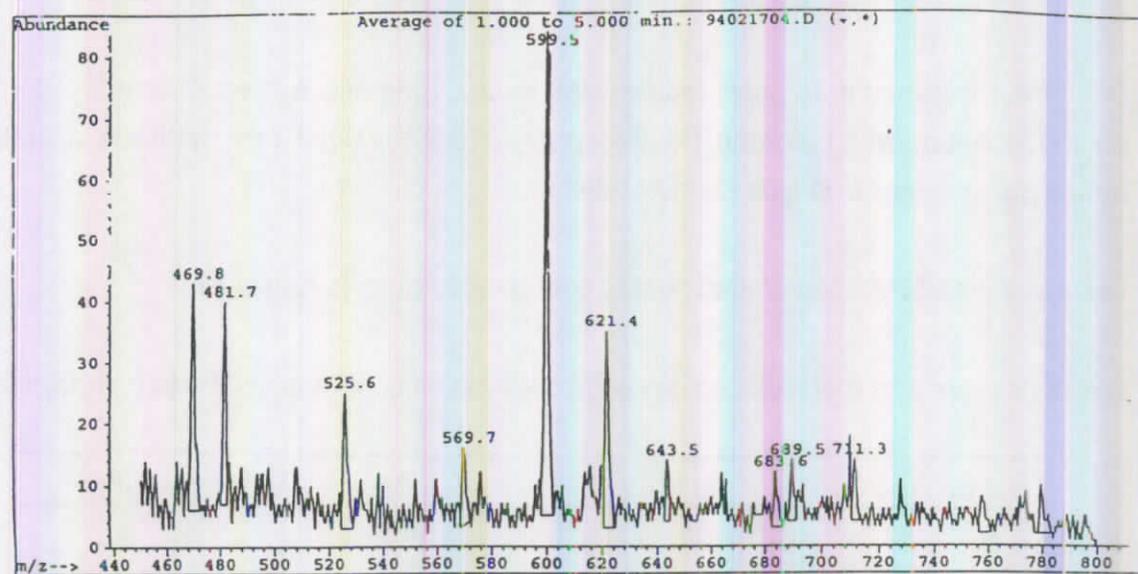


Figure 51 a : spectre de masse ES/MS du composé A = Procyanidine dimère de type A

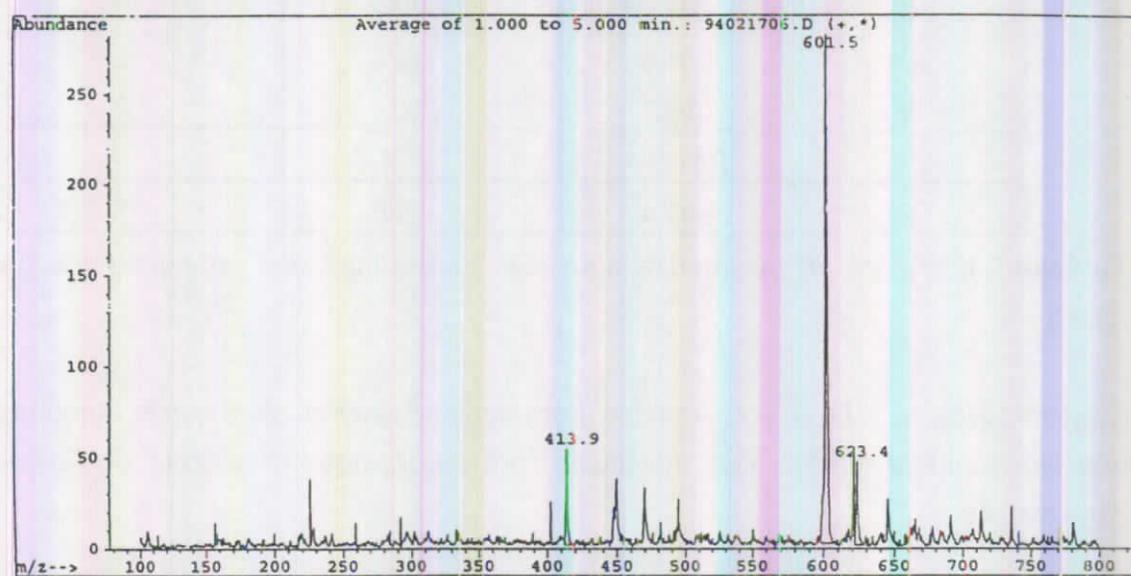


Figure 51 b : spectre de masse du composé B = Procyanidine dimère : Catéchine-Catéchine.

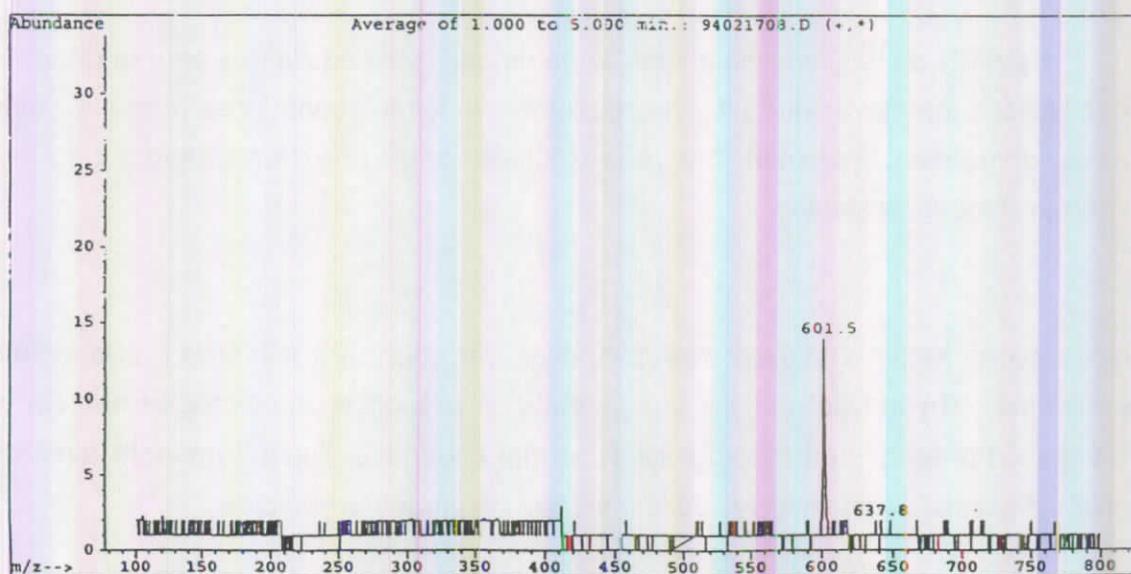


Figure 51 c : spectre de masse du composé C = Procyanidine dimère : Epicatechine-catéchine.

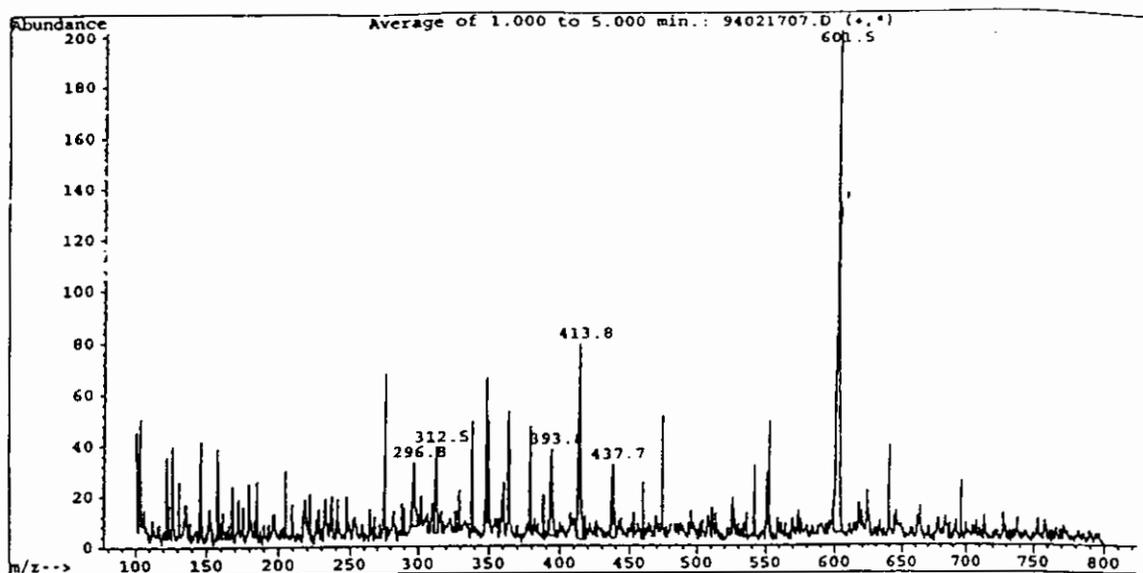


Figure 51 d : spectre de masse du composé D = Procyanidine dimère : Epicatèchine -Epicatèchine.

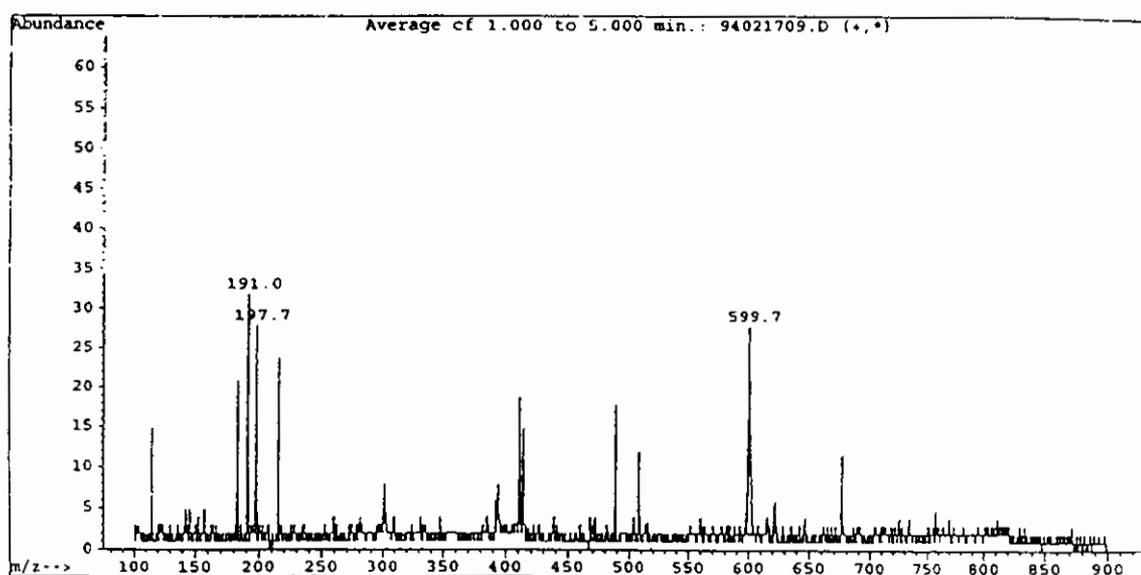


Figure 51 e : spectre de masse du composé E = Procyanidine dimère de Type A

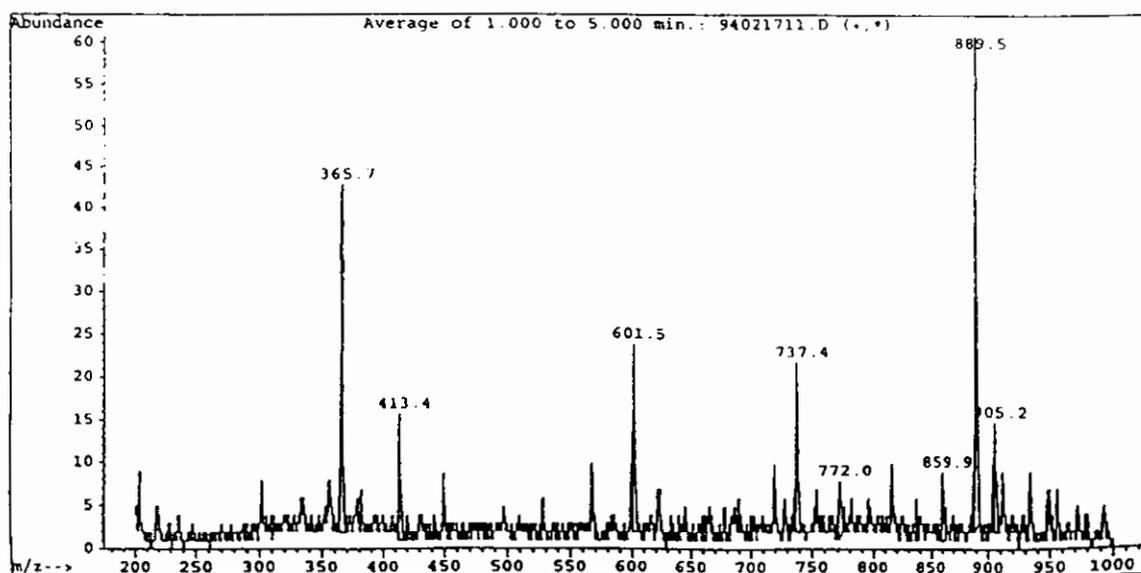


Figure 51 f : spectre de masse du composé F = Procyanidine trimère :

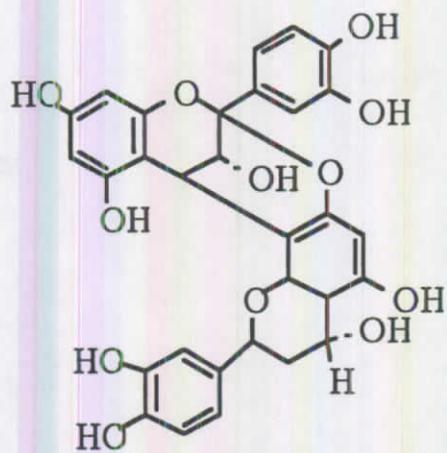


Fig a, e : Composés A et E

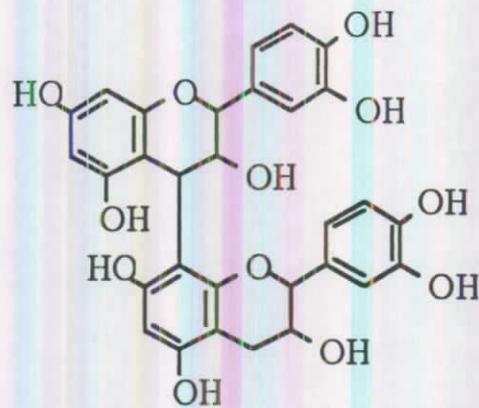


Fig b : Composé B



Fig c : Composé C

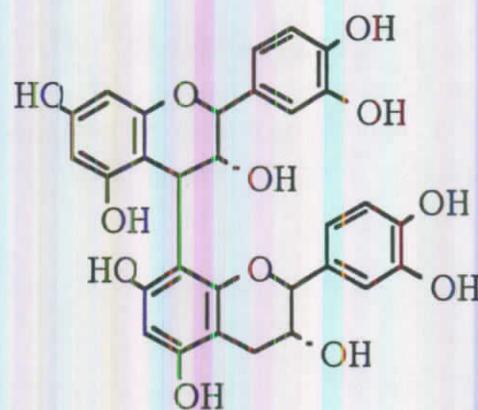


Fig d : Composé D

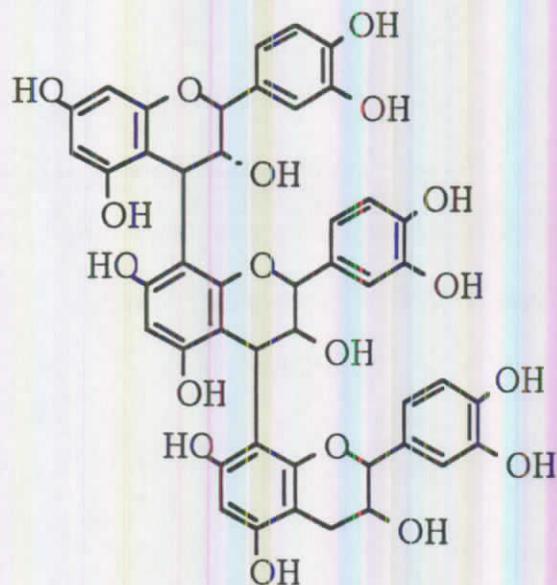


Fig f : Composé F

Figure 52 : Structures proposées pour les composés isolés de *Vicia faba* L.

Nous avons hydrolysé les 5 procyanidines dimères et le trimère. L'analyse par CLHP des produits d'hydrolyse conduit aux résultats suivants:

composés isolés	nature	sous unité flavane d'extension	sous unité flavane terminale
A	dimère	?	?
B	dimère	catéchine	catéchine
C	dimère	épicatechine	catéchine
D	dimère	épicatechine	épicatechine
E	dimère	?	?
F	trimère	épicat. et cat.	catéchine

Tableau 35 : Nature des unités constitutives des procyanidines isolées de *Vicia faba* L.

1.4. Proposition de structures et conclusion

Composé A

Le clivage par le phloroglucinol est sans effet sur le composé A. Le poids moléculaire (M = 576) nous oriente vers un dimère catéchique possédant une double liaison de type éther-oxyde caractérisant les procyanidines dimères de types A. En effet les liaisons éthers oxydes, comme cela a été déjà signalé par plusieurs auteurs (Porter et Chan, 1991 ; Kolodziej *et al.*, 1991 ; Helsper *et al.*, 1993) ne sont pas rompues par l'hydrolyse au phloroglucinol.

Le R_f de ces composés en CCM sur gel de silice est supérieur à celui des 3 autres dimères ainsi qu'au R_f de la procyanidine B2 (témoin).

La structure de ce type de composé est donnée dans la **figure 52 a**.

Composé B

Le composé **B** (M = 578) correspond à un dimère catéchique. L'hydrolyse libère 2 sous-unités identifiées à la catéchine. Le composé B est donc une procyanidine dimère de type **B** de structure : **catéchine - catéchine**.

Selon Foo et Porter 1982, Haslam 1987, la liaison interflavanique C4-C8 est généralement favorisée ; ce qui n'exclut pas que ces molécules peuvent être liées par des liaisons C4-C6. Nous proposons comme structure probable : **catéchine (4 β -8)-catéchine (fig 52 b)**.

Composé C

Le composé **C** (M = 578) libère après hydrolyse une unité d'extension (épicatéchine) et une unité terminale (catéchine). Il correspond également à une procyanidine de type **B** et a comme structure probable : **épicatéchine (4 β -8)?-catéchine (fig 52 c)**

Composé D

Le dimère **D** (M = 578) correspond à une procyanidine **B** et de formule probable : **épicatéchine- (4 β -8)?-épicatéchine (fig 52 d).**

Composé E

Le composé **E** présente les mêmes caractéristiques que le composé **A**. Il n'est pas hydrolysé en présence de phloroglucinol et présente un PM de 576 ; ceci nous oriente également vers un dimère catéchique doublement lié par des liaisons de type éther-oxyde

L'hydrolyse acide en présence de phloroglucinol des dimères **B**, **C** et **D** fournit les 2 sous-unités constitutives de ces procyanidines ; ce qui contribue à montrer la fragilité de la liaison interflavanique par rapport à la résistance de la liaison ester (cas des composés **A** et **E**).

Composé F

Le composé **F** (M = 866) est une procyanidine trimère.

Nous ne pouvons malheureusement pas lui attribuer une structure définitive car la dégradation en présence de phloroglucinol permet d'identifier l'unité terminale (catéchine) mais ne permet pas de préciser la position des 2 résidus phloroglucyls dans la molécule. Nous proposons comme structure probable pour ce composé **F** : **-épicatéchine-(4 β -8)?-catéchine-(4 β -8)?-catéchine (figure 52 f).**

2. Les proanthocyanidines de *Pisum sativum*

Les principaux composés du Pois sont purifiés de la même manière que précédemment. Au total 6 produits ont été isolés de la fraction éluée par le mélange EtOH/MeOH et 2 produits de la fraction éluée par le méthanol.

2.1. Produits Isolés

Le tableau 36 donne les caractéristiques chromatographiques des molécules isolées.

fraction Sephadex	Produits isolés	Tr en mn	Rf (silice) 60/60/10	spectres UV λ . max.	Ordre de grandeur mg
P EM3	a	15,3	0,45	279	0,1
	b	21,9	0,45	279	0,2
	c	27,1	0,47	279	0,2
	d	29,9	0,43	279	0,3
P EM4	e	18,3	0,45	278	0,1
	f	25,9	0,32	279	1
P M	g	17,3	0,22	280	0,1
	h	22,1	0,22	280	0,1

Tableau 36 : Temps de rétention Tr, Rf, et λ max. des proanthocyanidines de Pois purifiées par CLHP. (*) toluène, acétone, acide formique.

2.2. Détermination du poids moléculaire et du degré de polymérisation

La spectrométrie de masse en mode évaporation ionique (ES-MS) est également utilisée pour la détermination du poids moléculaire de ces composés.

Les spectres ES/MS des produits isolés sont donnés dans la figure (figure 53).

Le degré de polymérisation et le poids moléculaire sont donnés dans le **tableau 37**.

Composés isolés	[MNa] ⁺	M	degré de polymérisation
a	633,4	611	2
b	633,4	611	2
c	633,4	611	2
d	675,5	653	2
e	804,0	782	2
f	937,4	915	3
g	1041,0	1019	3
h	1241,3	1219	4

Tableau 37 : Spectrométrie de masse des proanthocyanidines des téguments de *Pisum sativum*

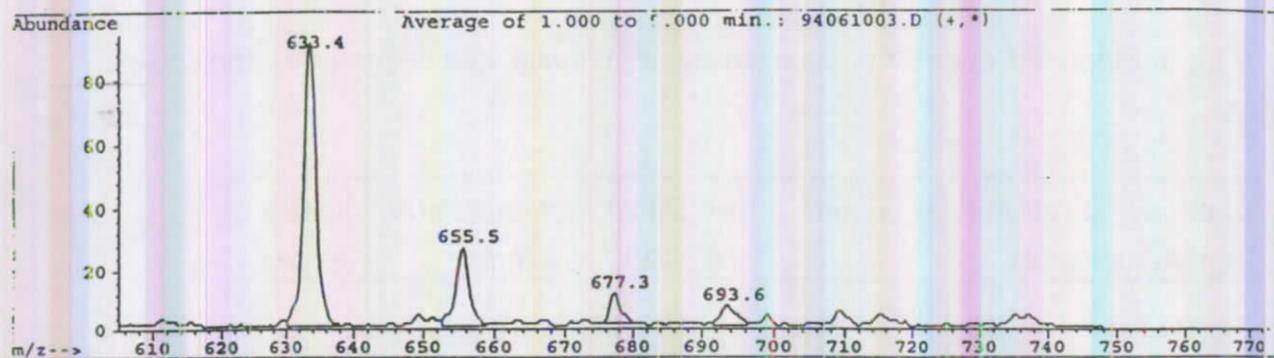


Figure 53 a : spectre de masse ES/MS du composé a = Prodelphinidine dimère : Gallo catechine-Gallo catechine.

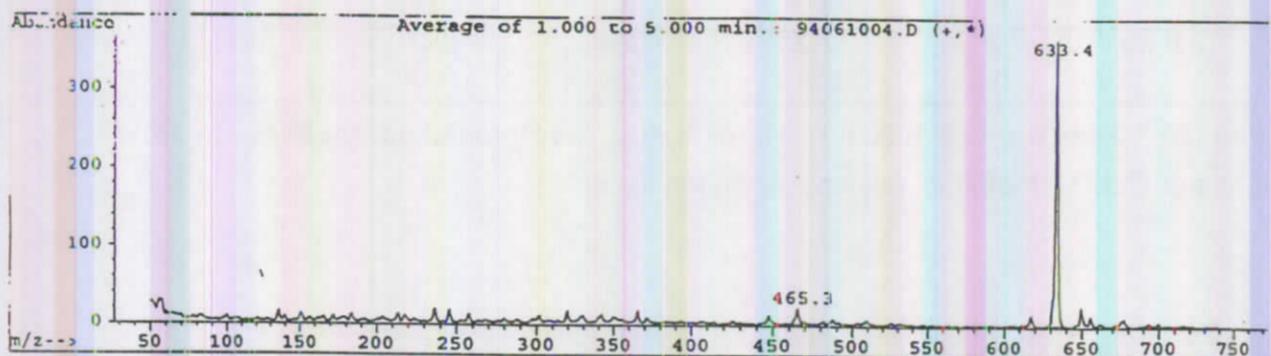


Figure 53 b : spectre de masse ES/MS du composé b = Prodelphinidine dimère : Epigallo catechine-Epigallo catechine.

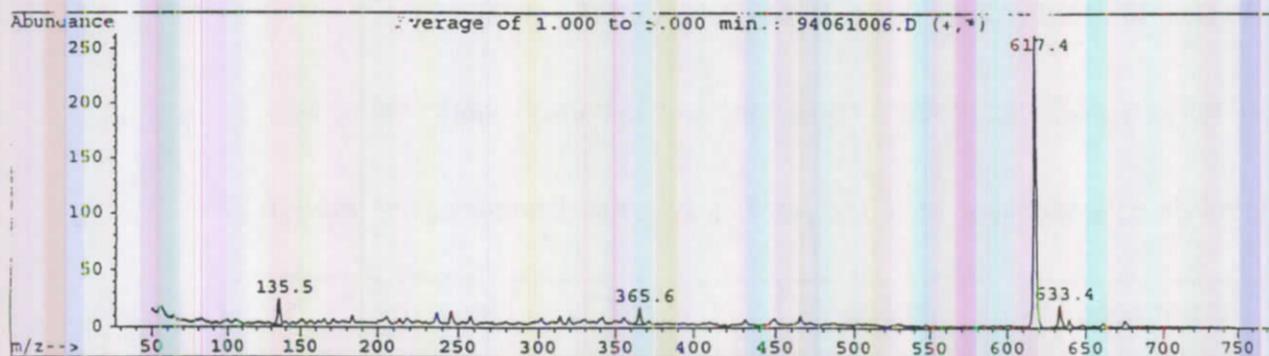


Figure 53 c : spectre de masse ES/MS du composé c = Prodelphinidine dimère : Gallo catechine-Epigallo catechine.

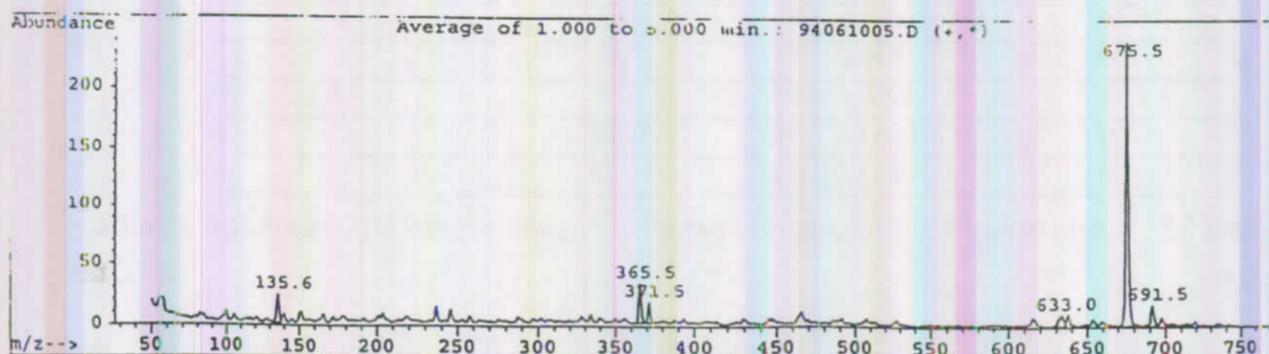


Figure 53 d : spectre de masse ES/MS du composé d = Prodelphinidine dimère : Gallo catechine-Gallo catechine-acetate.

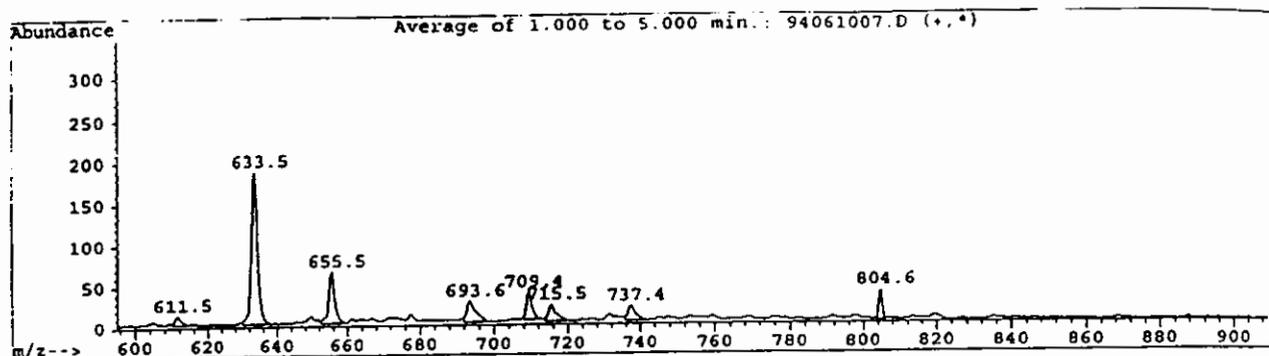


Figure 53 e : spectre de masse ES/MS du composé e = Prodelphinidine dimère : Gallic acid-gallic acid-gallate.

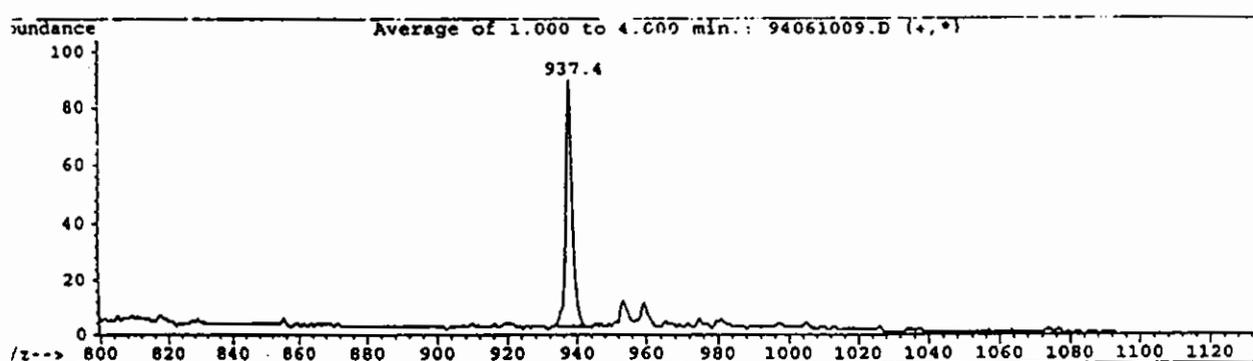


Figure 53 f : spectre de masse ES/MS du composé f = Prodelphinidine trimère : (Gallic acid-epigallocatechin)-epigallocatechin.

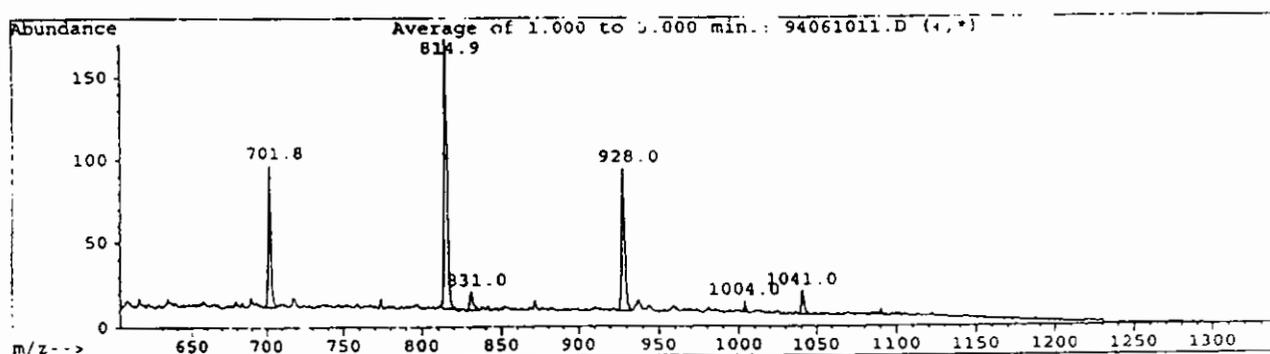


Figure 53 g : spectre de masse ES/MS du composé g = Prodelphinidine trimère : (Gallic acid-epigallocatechin)-epigallocatechin-gallate

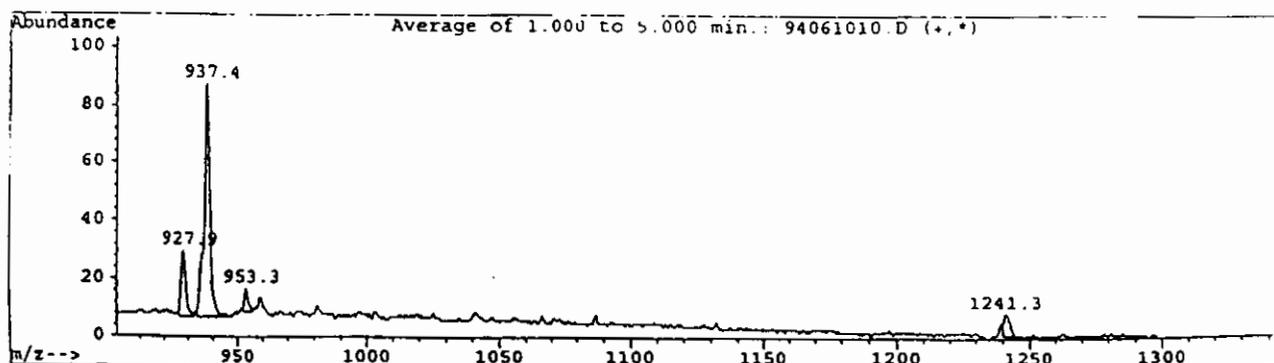


Figure 53 h : spectre de masse ES/MS du composé h = Prodelphinidine tétramère : (Gallic acid-epigallocatechin-epigallocatechin)-epigallocatechin.



Fig a : Composé a

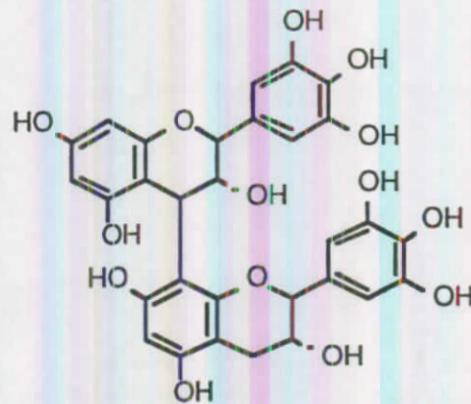


Fig b : Composé b



Fig c : Composé c

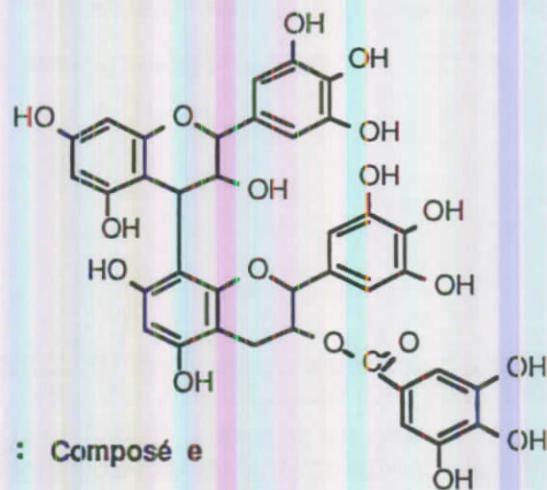


Fig d : Composé e

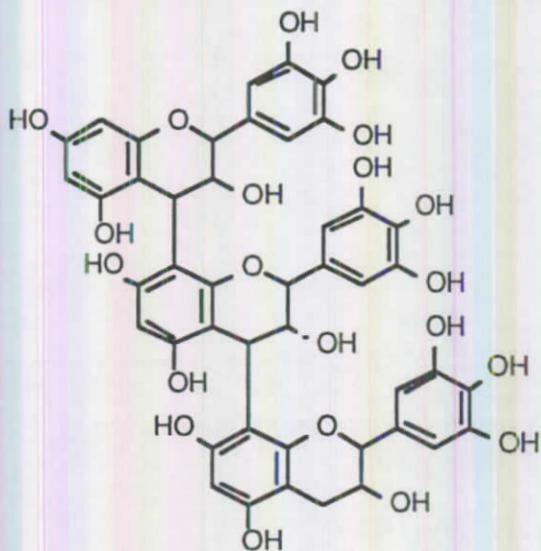


Fig e : Composé f

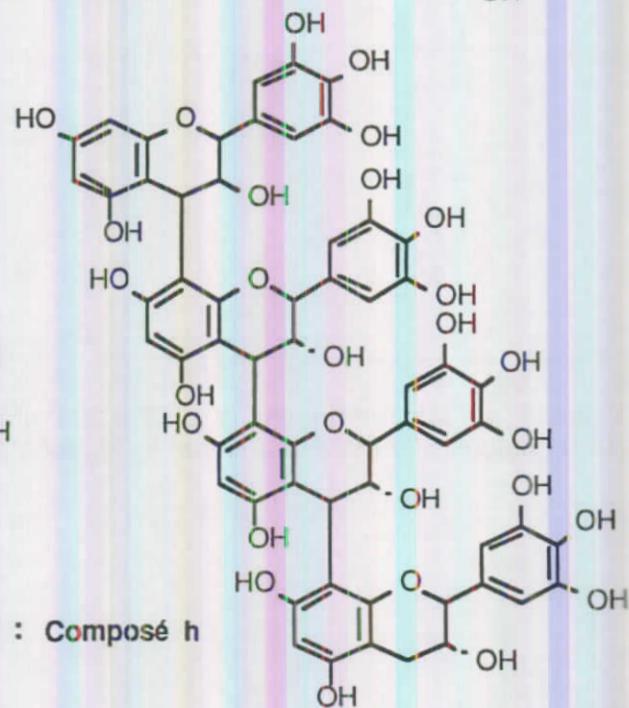


Fig f : Composé h

Figure 54 : Structures proposées pour les proanthocyanidines isolées de *Pisum sativum*.

Ces molécules sont construites sur la base de flavane-3-ols trihydroxylés. 5 molécules correspondent à des dimères, 2 à des trimères et la dernière à une prodelphinidine tétramère.

2.3. Détermination de la liaison interflavanique et conjugaison

Le traitement des 8 composés au phloroglucinol et leur suivi CLHP donne les résultats suivants :

Composés isolés	nature	sous unité flavane d'extension	sous unité flavane terminale
a	dimère	GC	GC
b	dimère	EGC	EGC
c	dimère	GC	EGC
d	dimère+acétate	GC	GC
e	dimère + gallate	GC	GC
f	trimère	(GC et EGC)	EGC
g	trimère -O-gallate	(GC et EGC)	EGC
h	tétramère	(GC et EGC)	EGC

Tableau 38 : Nature des unités constitutives des prodelphinidines isolées de *Pisum sativum*. GC= Gallocatéchine, EGC = Epigallocatéchine.

2.4. Propositions de structures et conclusion

Composé a :

Le poids moléculaire [M = 611] nous oriente vers un composé dimère construit sur la base de flavane-3-ols trihydroxylés. La dégradation partielle du produit **a** livre 2 sous unités gallocatéchines.

Le composé **a** est donc une prodelphinidine dimère et la structure proposée est : **GC-GC** (fig 54 a)

Composé b

Ce composé [M = 611] est construit sur la même base de flavan-3-ols trihydroxylés. Le composé **b** correspond à la prodelphinidine dimère et a pour formule probable : **EGC-EGC** (fig 54 b).

Composé c

Le composé **c** [$M = 611$] correspond à la prodelphinidine dimère. La structure proposée est: **GC-EGC**. (fig 54 c).

Composé d

Le composé **d** présente un ion quasi moléculaire $[MNa]^+$ de 675,5. Il correspond à un dimère estérifié par une unité acétate. A ce stade d'analyse nous ne pouvons, pour le composé **d**, préciser la position de l'acétate sur la molécule flavanique et proposons comme structure probable : **GC-GC-acétate**.

Composé e

Le composé **e** $[MNa]^+ = 804,0$ correspond à une prodelphinidine dimère estérifiée en position 3 par l'acide gallique. Nous ne pouvons malheureusement établir la position du groupement galloyl sur l'un des noyaux flavanes, ce qui aurait pu être obtenu par le spectre RMN. Les résultats précédents nous permettent néanmoins d'attribuer au composé **e** la structure : **GC- GC-(3)? O-gallate** (fig 54 d).

Composé f

Le composé **f** $[MNa]^+ = 937,4$ nous oriente vers un trimère construit sur la base de flavan-3-ols trihydroxylés. La microdégradation libère 2 molécules d'extension (sous-unité gallocatéchine et sous-unité épigallocatéchine) ; une sous-unité épigallocatéchine terminale. Le composé **f** correspond à une prodelphinidine trimère et les structures probables proposées sont : **GC-EGC-EGC** (fig 54 e) ou **EGC-GC-EGC**.

Composé g

Le composé **g** présente un ion quasi moléculaire $[MNa]^+ = 1041,0$. Il correspond à un trimère estérifié par de l'acide gallique. Nous proposons comme structure probable pour ce composé : **(GC-EGC)-EGC -(3)?-O-gallate**.

Composé h

Le composé **h** $[MNa]^+ = 1241$ nous oriente vers une prodelphinidine tétramère. La dégradation partielle du tétramère **h** permet d'identifier l'unité terminale qui est une épigallocatéchine, alors que les unités d'extension sont constituées de résidus

épigallocatechine et gallocatechine ; nous ne pouvons malheureusement pas identifier la séquence exacte de ce tétramère et proposons comme structure probable :



3. Commentaire général sur le contenu phénolique du pois et de la féverole

Le **tableau 39**, récapitule les différents composés phénoliques isolés des téguments du pois et de la féverole.

Procyanidines de <i>Vicia faba</i>		Prodelphinidines de <i>Pisum sativum</i>	
Dimère B1	Ec-C	Dimère	GC-GC
Dimère B2	Ec-EC	Dimère	EGC- EGC
Dimère B3	C-C	Dimère	GC-EGC
Dimère A		Dimère	GC-GC-Acétate
Dimère A		Dimère	GC-GC-gallate
Trimère C	(Ec-C)-C	Trimère	GC-EGC-EGC
		Trimère	(GC-EGC)-EGC-Gallate
		Tetramère	(EGC,GC,EGC)-EGC.

Tableau 39 : Proanthocyanidines de *Vicia faba* et de *Pisum sativum*. (C = Catéchine ; Ec = Epicatechine ; GC = Gallocatechine ; EGC = Epigallocatechine)

Les 6 molécules isolées de la féverole sont construites sur la base de flavanes dihydroxylées. Rappelons que nous nous sommes adressés aux composés les plus accessibles, et il n'est pas exclu que les formes trihydroxylées de la féverole se trouvent dans ces mêmes fractions en faible quantité et dans les fractions éluées par le mélange méthanol-acétone formant ainsi des molécules plus polymérisées et inaccessibles.

Par contre, chez le pois, la voie de la trihydroxylation est privilégiée par rapport à la dihydroxylation ceci confirme les résultats déjà acquis par l'oxydation complète. Il semblerait que l'enzyme (phényl hydroxylase F3'5'H) soit très active chez cette espèce. Nous notons également la présence de structures galloylées mettant en oeuvre une activité acyl transférase importante. Ces molécules montrent une forte réactivité vis-à-vis des protéines (Ricardo-Da-silva *et al.*, 1991).

Le schéma (**figure 55**) récapitule les différentes étapes de purification qui nous ont conduit à l'isolement et à l'identification des proanthocyanidines des téguments de la féverole et du pois.

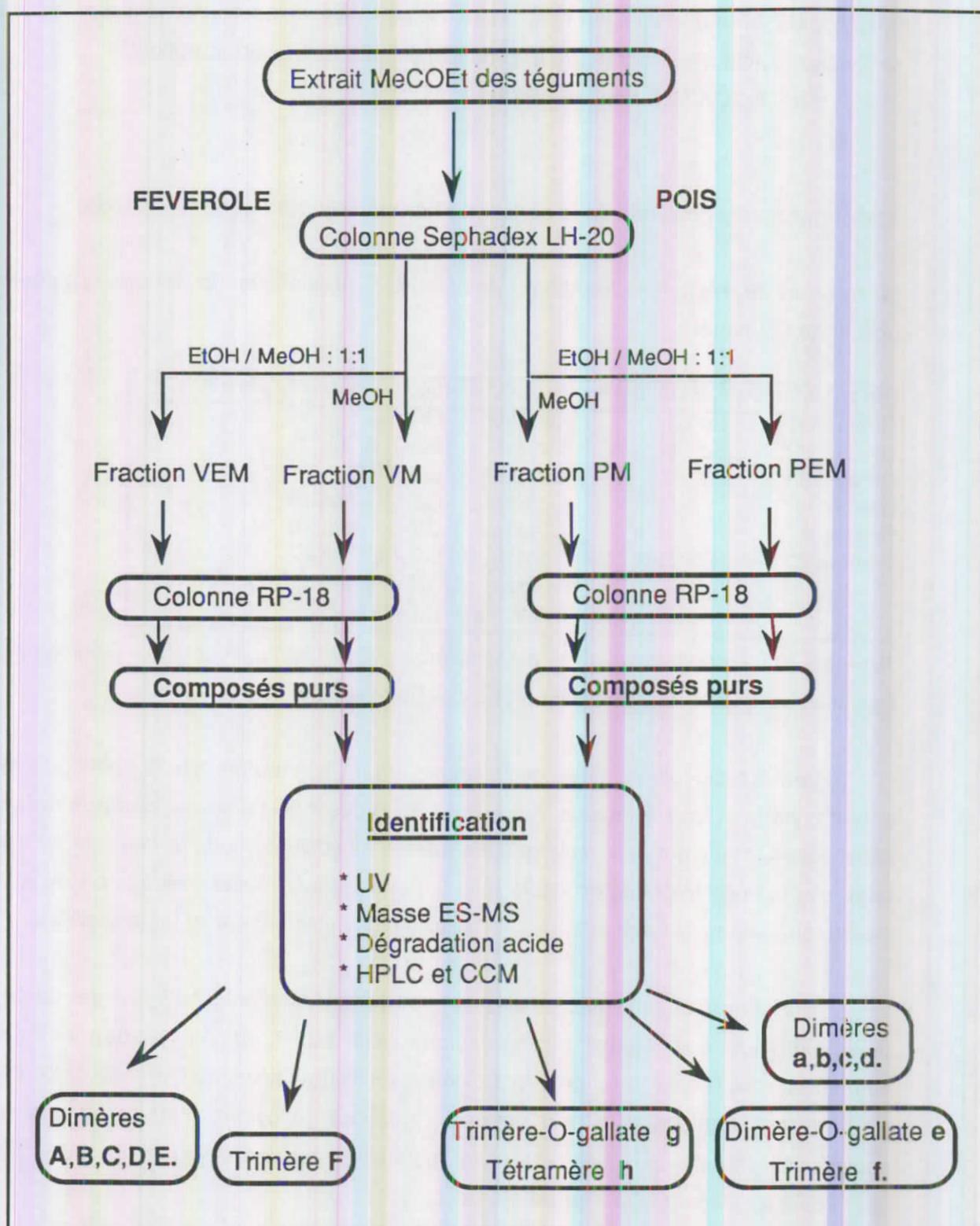


Figure 55 : schéma récapitulatif des principales étapes pour l'obtention et l'identification des proanthocyanidines des téguments de pois et de féverole .

Conclusion

Pour la connaissance approfondie du contenu phénolique des graines des 2 Légumineuses (pois et féverole) la procédure utilisée se résume en 4 points.

a. Le contenu polyphénolique a été fractionné par partition entre solvants spécifiques ; l'analyse de chaque fraction montre que :

- l'éther diéthylique entraîne les flavonoïdes et monomères catéchiques ou gallocatéchiques ;
- la méthyléthylcétone solubilise les oligomères ;
- et finalement l'eau qui solubilise les composés les plus polymérisés.

b. L'élution de la fraction oligomérique sur tamis moléculaire (gel de Sephadex LH-20) par des solvants à base d'éthanol, de méthanol et d'acétone a permis la séparation du contenu tannique en fonction de la taille des molécules. Le **tableau 40** donne la nature des composés phénoliques élués.

Solvants	Hydrolyse acide	Nature des composés
Ethanol	0	phénols simples, flavonoïdes, flavan-3-ols monomères
Ethanol-Méthanol	+	flavan-3-ols dimères, trimères
Méthanol	++	trimères, tétramères,...
Méthanol-acétone 7/3	+++	proanthocyanidines oligomères

Tableau 40 : Nature des composés phénoliques élués par chromatographie sur Sephadex LH-20 des extraits "méthyléthylcétone" des 2 Légumineuses (pois et féverole) .

c. La purification finale des proanthocyanidines a été effectuée par CLHP semi-préparative sur colonne Licrospher 100 RP-18.

d. L'étude structurale proprement dite des diverses proanthocyanidines du pois et de la féverole a été poursuivie par l'application d'une "stratégie" faisant appel à l'utilisation de la spectrométrie de masse, de la microdégradation en présence de phloroglucinol et à l'analyse par CLHP couplée à la barrette de diodes.

Dans le cas de la féverole, les dimères identifiés sont des procyanidines :

- 3 correspondent à des procyanidines de type B constituées de catéchine et de son isomère l'épicatéchine : composés B, C et D ;
- les 2 autres sont de type A: le composé A et E.

Nous avons également isolé une procyanidine trimère. Ces molécules ont été déjà signalées par Helsper 1993.

Dans le cas de pois, les molécules isolées et étudiées pour leur structure correspondent à :

- 4 prodelphinidines dimères construites sur la base gallocatéchine et épigallocatéchine (composés **a, b, c, d**),
- une prodelphinidine dimère galloylée (**e**),
- une prodelphinidine trimère (**f**),
- une prodelphinidine trimère galloylée (**g**)
- et enfin une prodelphinidine tétramère(**h**).

Ces molécules sont tout a fait originales. Il s'agit en effet de premières citations pour le genre *Pisum*.



CONCLUSIONS GENERALES

CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail avait pour principaux objectifs :

- l'expertise de la diversité et la variabilité du métabolisme phénolique des graines de Légumineuses (pois et féverole) ;
- l'étude de la variation génétique des caractéristiques tannantes des graines de féveroles (*Vicia faba* L.) et leur relation avec la couleur des téguments ;
- et enfin la connaissance de façon plus approfondie des molécules responsables de l'activité tannante.

L'application d'un protocole analytique des composés polyphénoliques à une collection de féveroles a pu dévoiler les potentialités génétiques des phénotypes étudiés. Cette approche suivie d'une étude statistique confirme la stabilité du contenu phénolique chez les génotypes de *Vicia faba* L..

L'étude du déterminisme génétique des molécules tannantes en relation avec la couleur des téguments a montré à travers l'analyse phytochimique des génotypes de la descendance F3 que :

- l'obtention des génotypes intermédiaires en contenu phénolique était possible en effectuant des croisements entre génotypes appropriés ;
- la teneur en composés polyphénoliques est essentiellement lié des caractères propres de la couleur des téguments ;
- les génotypes à fleur maculée noir pouvaient présenter des teneurs intermédiaires en tannins condensés.

Dès lors que le potentiel génétique apparaît "maîtrisable" il serait judicieux de tester le comportement de tels génotypes en alimentation afin de voir leurs effets du point de vue nutritionnel. Une étude pathologique devra estimer leur résistance par rapport aux pathogènes du sol.

L'expertise d'une large collection d'isolignées, de matériels sauvages, et des variétés de pois a mis en évidence la diversité chimique au niveau des facteurs antinutritionnels phénoliques chez cette espèce. De même que pour la féverole, les génotypes de pois à fleur blanche sont dépourvus de tannins condensés alors que les génotypes à fleurs colorées peuvent présenter au niveau tégumentaire des teneurs

importantes en tannins condensés. Les informations obtenues à partir de l'ensemble des méthodes analytiques autorisent la formulation d'hypothèses" quant aux modèles structuraux de tannins présents dans le contenu phénolique de chaque matériel végétal. L'étude statistique portant sur les données analytiques des génotypes de pois confirme également la stabilité de la composition phénolique et montre une interaction génotype-milieu supérieure à l'effet milieu.

La prédiction des facteurs antinutritionnels phénoliques à l'aide de méthodes physiques non destructives a montré les limites d'utilisation de la spectrocromimétrie par rapport à la spectrométrie dans le proche infra rouge. Alors que la SPIR en mode transmittance permet le classement des graines en catégories, la spectrométrie dans le proche infrarouge en mode réflectance semble être un outil performant pour le dosage des facteurs antinutritionnels phénoliques des graines entières individuelles de pois. Ces méthodes physiques non destructives constitueront pour les sélectionneurs un moyen rapide de screening des génotypes engagés dans un programme de recherche.

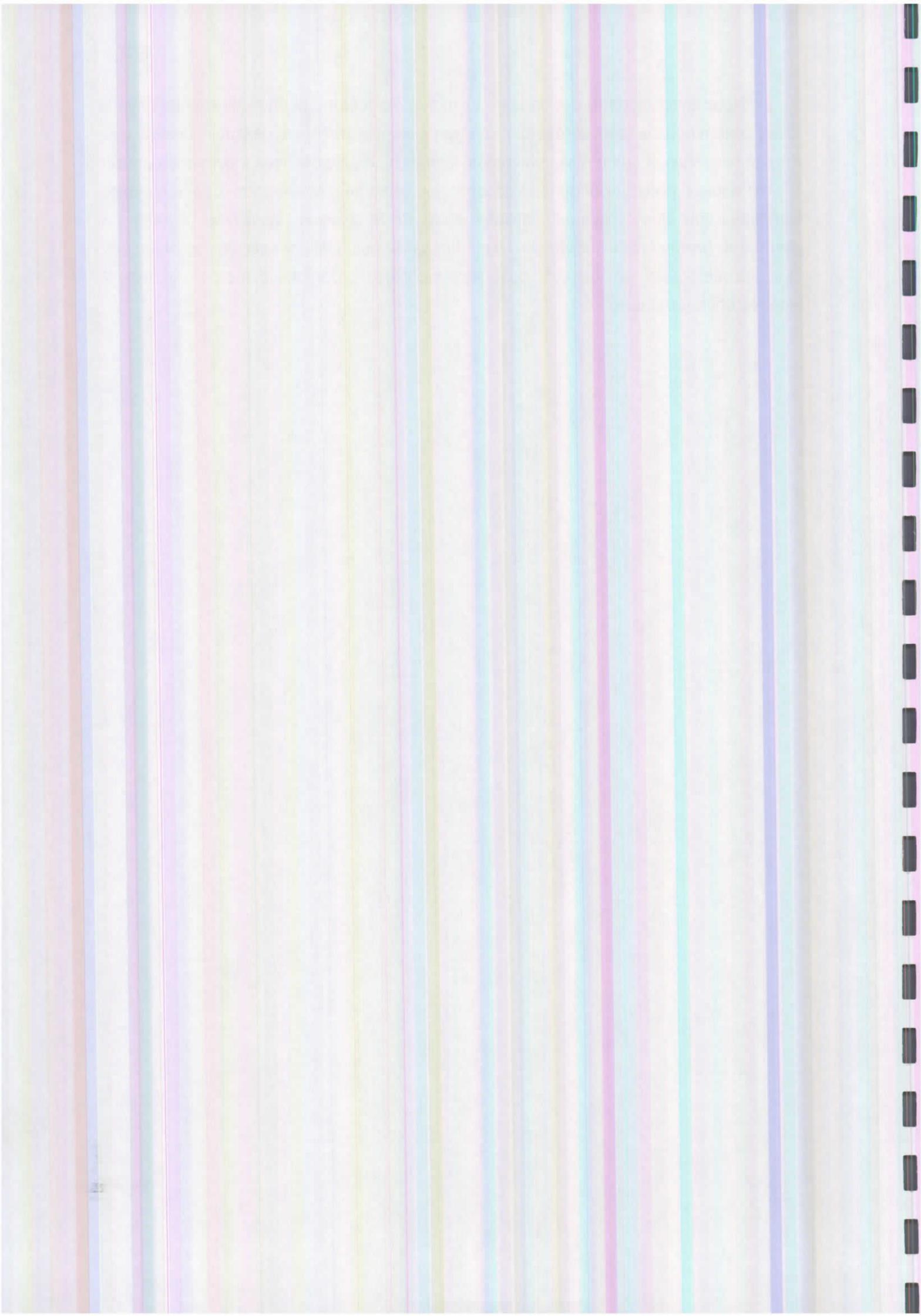
Un schéma méthodologique a été conçu dans le but d'obtenir une vision détaillée de la composition tannique des extraits phénoliques de féveroles et de pois afin de fournir un support biochimique solide aux effets observés *in vivo* chez les animaux.

Les extraits phénoliques des téguments de la féverole et du pois ont été fractionnés par partition entre solvants et le pool tannique a été scindé en classes en fonction de la taille des molécules, par passage sur colonne Sephadex LH-20.

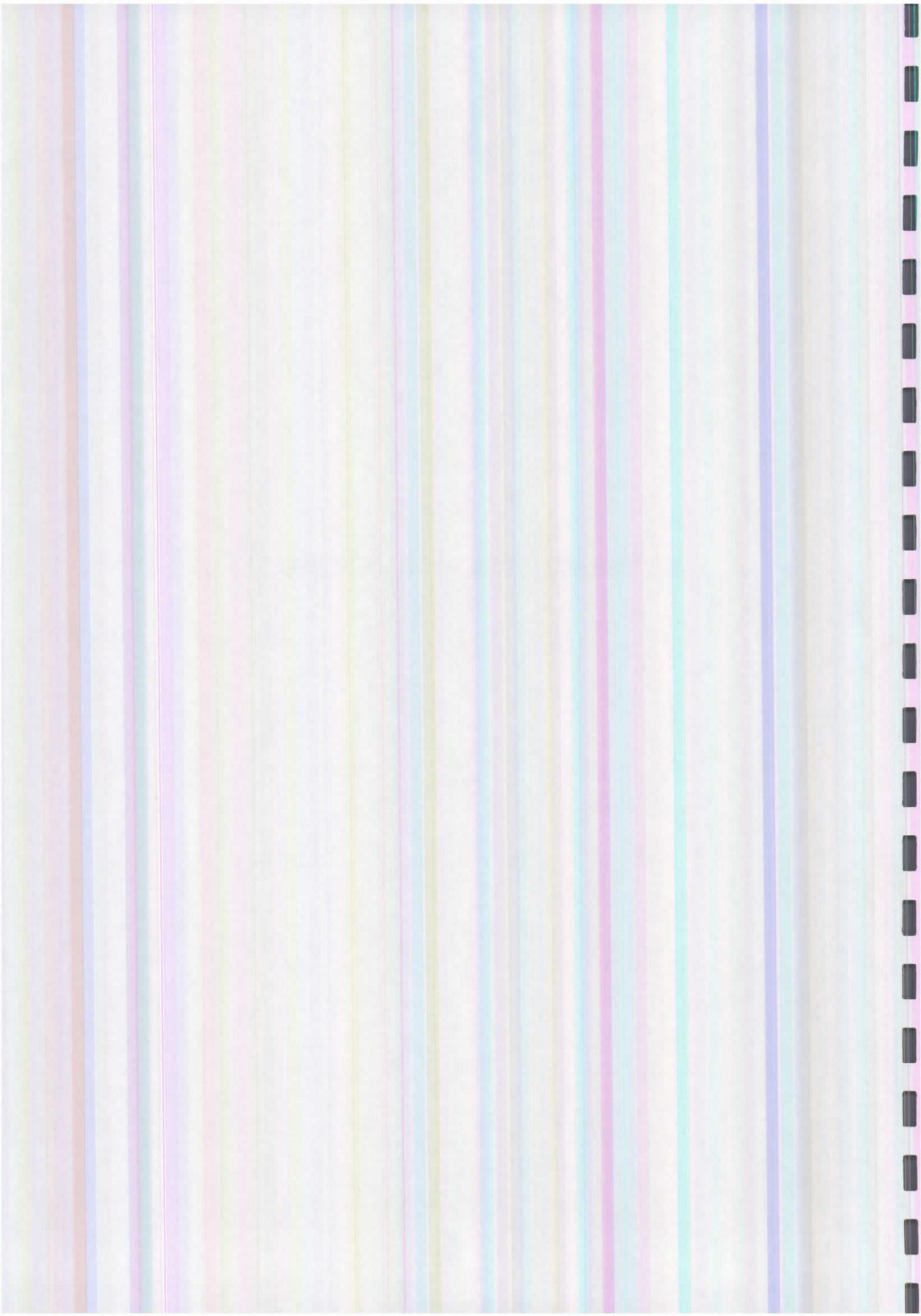
La purification des proanthocyanidines a été effectuée par CLHP semi préparative et la détermination des poids moléculaires par spectrométrie de masse.

L'identification est complétée par la dépolymérisation des proanthocyanidines en présence de phloroglucinol qui conduit à la formation d'un flavane-3-ol et de 4-phloroglucinol-flavan-3-ols. Alors que la dégradation partielle en présence de phloroglucinol est une méthodologie condamnable pour la recherche de la liaison interflavanique, cette même réaction apporte, dans le cadre d'une dégradation partielle, d'importantes informations sur la structure des dimères, des trimères ou oligomères. Elle permet en effet de mettre en évidence le degré d'hydroxylation des sous-unités aussi bien d'extension que terminales des tannins condensés de chaque matériel végétal. Cette méthode nous a permis également de repérer les catéchines, les oligomères et les polymères de flavanols avec plus de rigueur que ne le permettent les dosages globaux ou l'estimation des indices de polymérisation.

Nous avons montré que la base chimique du contenu phénolique des téguments des 2 Légumineuses (pois et féverole) reposait essentiellement sur des molécules de type Proanthocyanidines ou tannins condensés. L'analyse structurale nous a permis d'identifier 14 molécules polyphénoliques s'accumulant dans les téguments. Les molécules identifiées sont des procyanidines dans le cas de la féverole (*Vicia faba* "Alfred") : 5 dimères et un trimère. En revanche, dans le cas du pois (*Pisum sativum ssp arvense* V 256) les molécules isolées sont essentiellement des prodelphinidines : 5 dimères, 2 trimères et un tétramère.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



- ARPENTINE G., FERNAEDEZ Y., BOURZEIX M., MITCHAVILA S., 1992. Relation entre la structure d'une serie de proanthocyanidols et elur capacité à piéger le radical superoxyde. **Proceedings of the XVI th International Conference of Groupe Polyphenol** 16(1) 237-240.
- ASANO K., SINAGAWA K., HASHIMOTO N., 1982. Characterisation of haze-forming protein of beer and their roles in chill haze formation. **Americans Society of Brewing Chemists. Inc**, 40, 4, 147-154.
- ASQUITH T.N., BUTLER L.G., 1985. Use of dye-labeled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin, **J. Chem. Ecology**, 11, 1535-1544.
- ASQUITH T.N., BUTLER L.G., 1986. Interactions of condensed tannins with selected proteins, **Phytochemistry**, 25, 1591-1593.
- ASQUITH T.N., UHLIG J., MEHANSHO H., PUTMAN L., CARLSON D.M., BUTLER L., 1987. Binding of condensed tannins to salivary proline-rich glycoproteins : the role of carbohydrate, **J. Agrlc. Food Chem.**, 35, 331-334.
- BABLE A.M., PIETERS L A., WRAY V., 1991. Dimeric and trimeric proanthocyanidins possessing a doubly linked structure from *Pavetta owariensis*. **Phytochemistry** , 30, 2, 4129-4135.
- BAE Y.S., BURGER J.F.W., STEYNBERG J.P., FERREIRA., HEMINGWAY R.W., 1994. Flavan and procyanidin glycosides from the bark of blackjack oak. **Phytochemistry**, 35,2,473-478.
- BALAS L., 1992. Tannins catéchiques : isolement , hémisynthèse et analyse structurale par RMN 2D homo- et hétéro-nucléaire. Contribution à l'étude des tannins du raisin et de vins de Bordeaux. Thèse Université Bordeaux.
- BANIEL A., GUEGUEN J., BERTRAND D., 1992. Variability of protein composition in pea seeds by high performance liquid chromatography. In **1ère Conférence Européenne sur les protéagineux**. Angers. AEP Eds., 409-410.
- BARTOLOME B., BENGOCHEA M.L., GALVEZ M.C, PEREZ-ILZARBE F.J., HERNADEZ T., 1993. Photodiode array detection for elucidation of the structure of phenolic compounds. **Journal of Chromatography A**, 655, 119-125.
- BATE-SMITH E.C., 1973 a. Haemanalysis of tannins : the concept of relative astringency, **Phytochemistry**, 12, 907-912.
- BATE-SMITH E.C., 1973 b. Tannins of herbaceous Leguminosae, **Phytochemistry**, 12, 1809-1812.
- BATE-SMITH E.C., 1981. Astringent tannins of the leaves of *Geranium* species. **Phytochemistry**, 20, 211-216.
- BATE-SMITH E.C., 1975. Phytochemistry of proanthocyanidins. **Phytochemistry**, 14, 1107-1113.
- BILLOT J., 1983. Evolution des composés phénoliques au cors dela croissance de la poire Passe-Crassane. **Physiol. Vég**, 16, 693-714
- BISTON R., DARDENNE P., SINNAEVE G., 1992. Prediction of the quality and feeding value of grain legumes by Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS). **1ère Conférence Européenne sur les protéagineux**, Angers-France, 387-388.
- BJERG B., EGGUM B.O., OLSEN O., SORENSEN H., 1984,. Antinutritional and favism inducing factors in *Vicia faba* L. : nutritional value of fababeans, (metabolism and properties of vicine, convicine, and dopa-glucoside), **World Crops : Prod., Util. Descr.**, 10, 287-296.

- BLYTT H.J., GUSCAR T.K., BUTLER L.G., 1988. Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannins may not be due to binding and inhibiting digestive enzymes, *J. Chem. Ecology*, **14**, 1455-1466.
- BOND D A., TOYNBEE-CLERKE G., POPE M., HALL J A., 1986. Comparison between white and colored flower plants and between near-isogenic tannin free and tannin containing lines of *Vicia faba*. *Vortrage für plansenzuchtung*, **1**, 137-150.
- BOND D A., SMITH T.K., 1989. Possibilities for the reduction of antinutritional factors in rain legumes. In : *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds* (Huisman J, A.F.B. Van der Poel and I.E. Liener, Editors) PUDOC Wageningen, The Netherlands, 285-296.
- BOUKHARTA M., 1988. Etude des flavonoïdes de *Vitis vinifera* : Structure des proanthocyanidines des pépins de raisin, de sarmentts et de feuilles de vigne. Thèse Docteur Institut National Polytechnique de Lorraine.
- BOURZEIX M., WEYLAND D., HEREIDA N., DESFEUX C., 1986. Etude des catéchines et des proanthocyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull. de l'OIV.*, (669-670), 1171-1254.
- BROADHURST R.B., JONES W.T., 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin, *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 788-794.
- BRUN N., 1991. Les tannins de la féverole (*Vicia faba* L., *Leguminosae*) : Diversité chimique et variétale. Thèse de Doctorat Université Lyon France.
- BRUN N., JAY M., MERGHEM M., 1992. A proposition for the study of phenolic and legumes. **1ère Conférence Européenne sur les protéagineux**, Angers-France, 393-394.
- BUCKLEY K.E., DEVLIN T.J., MARQUARD R.R., 1983. Factors affecting in vitro rumen digestion of faba bean cultivars, *Can. J. Anim. Sci.*, **63**, 89-96.
- BUTLER L.G., 1982. Relative degree of polymerisation of sorghum tannin during seed development and maturation, *J. Agric. Food Chem.*, **30**, 1090-1094.
- BUTLER L.G., PRICE M.L., BROTHERTON J.E., 1982. Vanillin assay fo proanthocyanidins (condensed tannins) : modification of the solvent for estimation of the degree of polymerisation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **30**: 1087-1089.
- BUTLER L.G., MOLE S., 1988. Salivary proline-rich tannin binding proteins as a defense against dietary tannins, *Journées Internationales du Groupe Polyphénol*, St. Catharines, Ontario, Canada, 111-114.
- BUTLER L.G., 1989. Effects of condensed tannins on animal nutrition. In : HEMINGWAY R W., KARCHESY J J ., BRANHAM Susan J., Eds, *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*, 391-402, Plenum Press, New York.
- BUTLER L.G., 1992. Protein-polyphenol interaction : nutritional aspects. *Journées Internationales du Groupe Polyphénol.*, Portugal, 11-18.
- BUTLER L.G. and ROGLER J.C., 1992. Biochemical mechanisms of the antinutritional effects of tannins. **202nd National Meeting of the American Chemical Society**, New York.
- BRESSANI R., HERNANDEZ E., BRAHAM J.E., 1988. Relationship between content and intake of bean polyphenolics and protein digestibility in humans. *Plant Foods Human Nutrition*, **38** : 5-21.
- CABRERA A., MARTIN A., 1986. Variation in tannin content in *Vicia faba* L., *J. Agric. Sci.*, **106**, 377-382.

- CAI Y., EVANS F.J., PHILLIPSON J.D., ZENK M.H., GLEDAS Y.Y., 1991. Polyphenolic compounds from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*, **30**, 6, 2033-2040.
- CANSFIELD P.E., MARQUART R.R., CAMPBELL L.D., 1980. Condensed proanthocyanidins of Faba beans. *Journal of the Science Food and Agriculture* **31**, 802-812.
- CARBONARO M., MARLETTA L., CARNOVALE E., 1992. Factors affecting cystine reactivity in proteolytic digests of *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **40** (2) 169-174.
- CASEY.R., DOMONEY C., 1992. The protein composition of legume seeds- its variability and potential . In : **Première Conférence Européenne sur les Protéagineux**. Angers . AEP Eds., 381-396.
- CIE., 1986. Colorimétrie , Ed. 2, Publication N° 15-2 ; Illuminants Colorimétriques normalisés CIE, Publication N° S001 ; Observateurs de référence colorimétriques CIE, Publication N° S002 ; Bureau Central de la CIE, Vienne.
- CSOCHANSKA.Z., FOO L.Y., PORTER L.J., 1979a. Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry*, **18**, 1819-1822.
- CSOCHANSKA.Z., FOO L.Y., NEWMAN R.H., PORTER L.J., 1980. Polymeric proanthocyanidins stereochemistry, structural units, and molecular weight. *J. Chem. Soc. Comm.*, 375-377.
- CROFTS H.J., EVANS L.E., Mc VETTY P.B.E., 1980. Inheritance, characterization and selection of tannin-free faba beans, *Can. J. Plant Sci.*, **60**, 1135-1140.
- DAIBER K.L., 1975. Enzymic inhibition by polyphenols of sorghum grain and malt. *J. Sci. Food. Agric.* **26**, 1399-1411.
- DARDENNE P., 1990. Contribution à l'utilisation de la spectrométrie dans le proche infrarouge pour l'étude de critères de qualité des céréales et des fourrages, Thèse doctorat en Sciences Agronomiques Gembloux (Belgique)
- DARDENNE P., SINAËVE G., BISTON R., LECOMTE P.H., 1991. NIT evaluation for predicting fresh forage quality. *Proceedings of the 4th ICNIRS conference*, Aderdeen-Ecosse, 227-283.
- DESHPANDE S.S. et PATIL A.D., 1981. Flavanoids of *Acacia catechu* heartwood. *Indian J. Chem.*, **20 B**, 628.
- DESHPANDE S.S., CHERYAN M., SALUNKE D.K., 1986. Tannin analysis of food products. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , **24** : 401-449.
- DESHPANDE S.S., CHERYAN M., 1987, Determination of phenolic compounds of dry beans using vanillin, redox and precipitation assays, *J. Food Sci.*, **52**, 332-334.
- DOUGLAS F.B., 1989. FAB-MS applications in the elucidation of proanthocyanidin structures. In : *Chemistry and significance of condensed tannins*. Edited by R W Hemingway and J J Karchesy.
- DUC G., BRUN N., MERGHEM R., JAY M., 1994. Genetic variation in tanning related characters of faba bean seeds (*Vicia faba* L.) and their relationship with seed coat colour (Plant Breeding in press).
- EUROSTAT., 1991. Agricultural Statistical Yearbook. Luxembourg.
- EGGUM B.O ., 1980. Factors affecting the nutritional value of field beans(*Vicia faba*). In : *Vicia faba : Feeding value , Processing and Viruses* (D A Bond, Editor). Martinus Nijhoff, The Hague, The Netherlands, 107-123.

- FLETCHER A.C., PORTER L.J., HASLAM E and GUPTA R.K., 1977. Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. *J. C. S. Perkin Trans I* 7, **125**, 1628-1637.
- FORKMANN G., 1992. Structure and biosynthesis of flavonoïds. *Proceedings of the XVIth International Conference of Groupe Polyphenol*, 16(1) 19-27.
- FORKMANN G., 1993. Genetic of the flavonoïds. In : *The flavonoïds : Advances in research since 1986*. Edited by HARBORNE
- FOO L.Y., PORTER L.J., 1980, The phytochemistry of proanthocyanidin polymers, *Phytochemistry*, **19**, 1747-1757.
- FOO L.Y., JONES W.T., PORTER L.J., WILLIAMS V.M., 1982, Proanthocyanidin polymers of fodder legumes, *Phytochemistry*, **21**, 933-936.
- FOO L.Y., KARCHESY J.J., 1989, Procyanidin polymers of Douglas fir bark : structure from degradation with phloroglucinol, *Phytochemistry*, **28**, 3185-3190.
- FOO L.Y., KARCHESY J.J., 1989. Procyanidin dimers and trimers from douglas fir bark. *Phytochemistry*, **28**, 1743-1747.
- FREUDERBERG K and WEIGNES K., 1960. Classification and nomenclature of the flavonoïds. *Tetrahedron* , **8** , 336-349.
- GUEGUEN J., QUEMENER B., VALDEBOUZE P., 1980. Elimination des facteurs antinutritionnels de la féverole *Vicia faba* L et du pois *Pisum sativum* L au cours de la préparation des isolats protéiques. *Lebens. Wiss. Technol.*, **16**, 72-77.
- GUEGUEN J., BARBOT J., 1988. Quantitative and qualitative variability of pea protein composition. *J. Sci. Food Agric.*, **42**, 209-224.
- GUEGUEN J., 1990. Perspectives d'amélioration de la fraction protéique du pois. In *Qualité des céréales, des oléagineux et des protéagineux français pour l'alimentation animale* AGPM-CETIOM-ITCF-ONIDOL-UNIP Eds.Paris,87-92.
- GRIFFITHS D.W.,1979. The inhibition of digestive enzymes by extracts of field bean(*Vicia faba*) *J. Sci. Food Agric.*,**30**, 458-462 .
- GRIFFITHS D.W. and MOSELY G .,1980. The effect of diets containing field beans high or low polyphenolic content on the activity of digestive enzymes in the intestines of rats. *J. Sci. Food Agrl* ,**31**, 255-259 .
- GRIFFITHS D.W.,1981. The polyphenolic content and enzyme inhibitory activity of testas from bean (*Vicia faba*) and pea (*Pisum spp.*) varieties.*J. Sci. Food Agric.*, **32** : 797-804.
- GRIFFITHS D.W.,1986. The inhibition of digestive enzyme by polyphenolic compounds. *Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in foods* : 509-515 .Ed by Mendel Friedman .
- GROSJEAN F., 1985. Combining pea for animal feed. In *The Pea Crop*.Hebblethwaite P.D., Heath M.C., Dawkins T. C. K., Eds., Butterworths. 453-462.
- HAGERMAN A.E., BUTLER L.G., 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins, *J. Agric. Food Chem.*, **26**, 809-812.
- HAGERMAN A.E., BUTLER L.G.,1980a. Determination of protein in tannin-protein precipitates, *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 944-947.

- HAGERMAN A.E., BUTLER L.G., 1980b. Condensed tannin purification and characterization of tannin-associated proteins, *J. Agric. Food Chem.*, **28**, 947-952.
- HAGERMAN A.E., BUTLER L.G., 1981. Specificity of proanthocyanidins-protein interactions, *J. Biol. Chem.*, **256**, 4494-4497.
- HAGERMAN A.E., KLUCHER K.M., 1986. Tannin-protein interactions, *Prop. Clin. Biol. Res.*, **213**, 67-76.
- HASLAM E., 1977. Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry, *Phytochemistry*, **16**, 1625-1640.
- HASLAM E., 1989. Plant polyphenols. Vegetable tannins revised. Eds Cambridge University Press, New York, New Rochelle.
- HASHIMOTO F., NONAKA G., NISHIOKA I. 1989. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 611.
- HAROLD J.BYTT, TIMOTHY K. GUSCAR, and LARRY G. BUTLER. 1988 Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannins may not be due to binding and inhibiting digestive enzymes. *Journal of chemical ecology* **14**(6), 1455-1465.
- HEBRERO E., SANTOS-BUELGA C., and RIVAS-GONZALO., 1988. High performance liquid chromatography-diode array spectroscopy identification of anthocyanidins of *Vitis vinifera* variety Tempranillo. *Am. L. Enol. Vitic.*, **39**, 3, 227-233.
- HELSPER J.P.F.G., KOLODZIEJ H., HOOGENDIJK M.J., NOREL A.V., 1993. Characterisation and trypsin inhibitor activity of proanthocyanidin from *Vicia faba*. *Phytochemistry*, **34**, 5, 1255-1260.
- HERNANDEZ E., 1979. Significado de la presencia de taninos y polifenole asociados en la digestibilidad de las proteíns de fríjol en humanos. Thesis CESNA/INCAP.
- HEMINGWAY R.W., KARCHESY J.J., 1988. Chemistry and significance of condensed tannins, Plenum Press, New York, London.
- HORIGOME T., KUMAR R., OKAMOTO K., 1988. Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes in vitro and in the intestine of rats. *British Journal of Nutrition*, **60**, 275-285.
- HOLT et SOSULKI., 1981. in UNIP-ITCF.1993. POIS. Utilisation en alimentation animale.
- HUISMAN J., VAN DER POEL T.F.B, LIENER I.E., 1988 Recent advances of reseach in antinutritional factors in legume seeds. **Proceedings of the First International Workshop on 'Antinutritional Factors (ANF) in legume seeds'**, Nov 23-25, 1, Wageningen, The NETHERLANDS.
- HUISMAN J., 1990. Antinutritional efectos of legume seeds in piglets, rats and chickens. PhD Thesis, Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- HUISMAN J., JANSMAN A.J.M., 1991. Dietary effects and some analytical aspects of antinutritional factors in peas (*Pisum sativum*), common beans (*Phaseolus vulgaris*) and soybeans (*Glycine max* L.) in monogastric animals. **Nutrition Abstracts and Reviews**, Series B **61** : 901-921.
- HUSSEIN L., MOHY A.F., EZZILDIN S., 1990. Characterisation of pure proanthocyanidins isolated from the hulls of faba beans. *J. Agric Food Chem*, **39**, 1, 95-98.
- JACQUES D.J., HASLAM E., 1974 : Plant proanthocyanidins part II. Proanthocyanidins A2 and its derivattes. *J.C.S. (Perkin I)* : 2663-2671.

- JAY M., BIOLLEY J.P., CHAPOUTIER L., RAYMOND O., 1993. Study of the genotypic diversity of a rose-garden by means of biochemical markers (secondary metabolism). *C.R. Acad. Agric. Fr.*, **79**, 4, 43-54.
- JERUMANUS., 1979. Séparation et identification des flavonoïdes par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). *Proc. European Brewery convention*, 309-319.
- JONES W.T., BROADHURST R.B., LYTTLETON J.W., 1976. The condensed tannins of pasture legume species, *Phytochemistry*, **15**, 1407-1409.
- KASHIWADA Y., NONAKA G.I., NISHIOKA I., 1986. Tannins and related compounds XLVIII, Rhubarb (7). Isolation and characterization of new dimeric and trimeric procyanidins. *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 4086-4091.
- KLEIBER D., 1990. Les tannins du sorgho : accumulation dans la graine et évaluation de leur pouvoir antinutritionnel. Thèse de Doctorat. INP Toulouse.
- KOUPAI A.M.R., McCALLUM J., BOHN B A .1992. Identification of the constituent flavanoid units in sainfoin proanthocyanidins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, **594**, 117-123.
- KOUPAI A.M.R., MUIR A.D, BOHM B.A, TOWERS G.H.N., GRUBER M.Y., 1993. The proanthocyanidin polymers in some species of *Onobrychis*. *Phytochemistry*, **34**, 1,113-117.
- KOŁODZIEJ H., 1990. Oligomeric flavan-3-ols from medicinal *Willow* bark. *Phytochemistry*, **29**, 3, 955-960.
- KOŁODZIEJ H., SAKAR M K., BURGER J F W., ENGELSHOWE R., FERREIRA D., 1991. A-type proanthocyanidins from *Prunus spinosa*. *Phytochemistry*, **30**, 2041-204.
- KOSSA A., 1977. Structure chimique des tannins condensés ou proanthocyanidines de la féverole graine (*Vicia faba*). Importance sur la valeur nutritive de la féverole chez la volaille. Thèse Doctorat. Dijon.
- KUMAR R., SINGH M., 1984 Tannins : their adverse role in ruminant nutrition. *J.Agric.Food chem.* **32** : 447-453.
- LAURENA A.C., GARCIA V.V MENDOZA E.T., 1984. Effet of soaking in aqueous acidic and alkali solutions on removal of polyphenols and in vitro digestibility of pea. *Plant Foods for Human Nutrition.*, **36**, 107-118.
- LEA A G H., 1978. The phenolics of ciders : oligomeric and polymeric procyanidins. *J. Sci. Food . Agric.*, **29**, 471-477.
- LEA A.G.H., BRIDLE P ., TIMBERLAKE C.F., SINGLETON V.L., 1979. The procyanidins of white grapes and wines., *Am J Enol Vitic*, **30**, 289-300.
- LETERME P., BECKERS Y., BAUDART D., 1990. Trypsin inhibitors in peas : varietal effect and influence on digestibility of crude protein by growing pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **29**, 45-55.
- LIENER I E., 1989. Antinutritional factors in legume seeds : State of the art. In : *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds* (J. Huisman, A F B , Van Der Poel and I E Liener). PUDOC, Wageningen, The Netherlands, 66-13.
- LOOMIS W.D., BATTAILE J., 1966, Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes, *Phytochemistry*, **5**, 423-438.

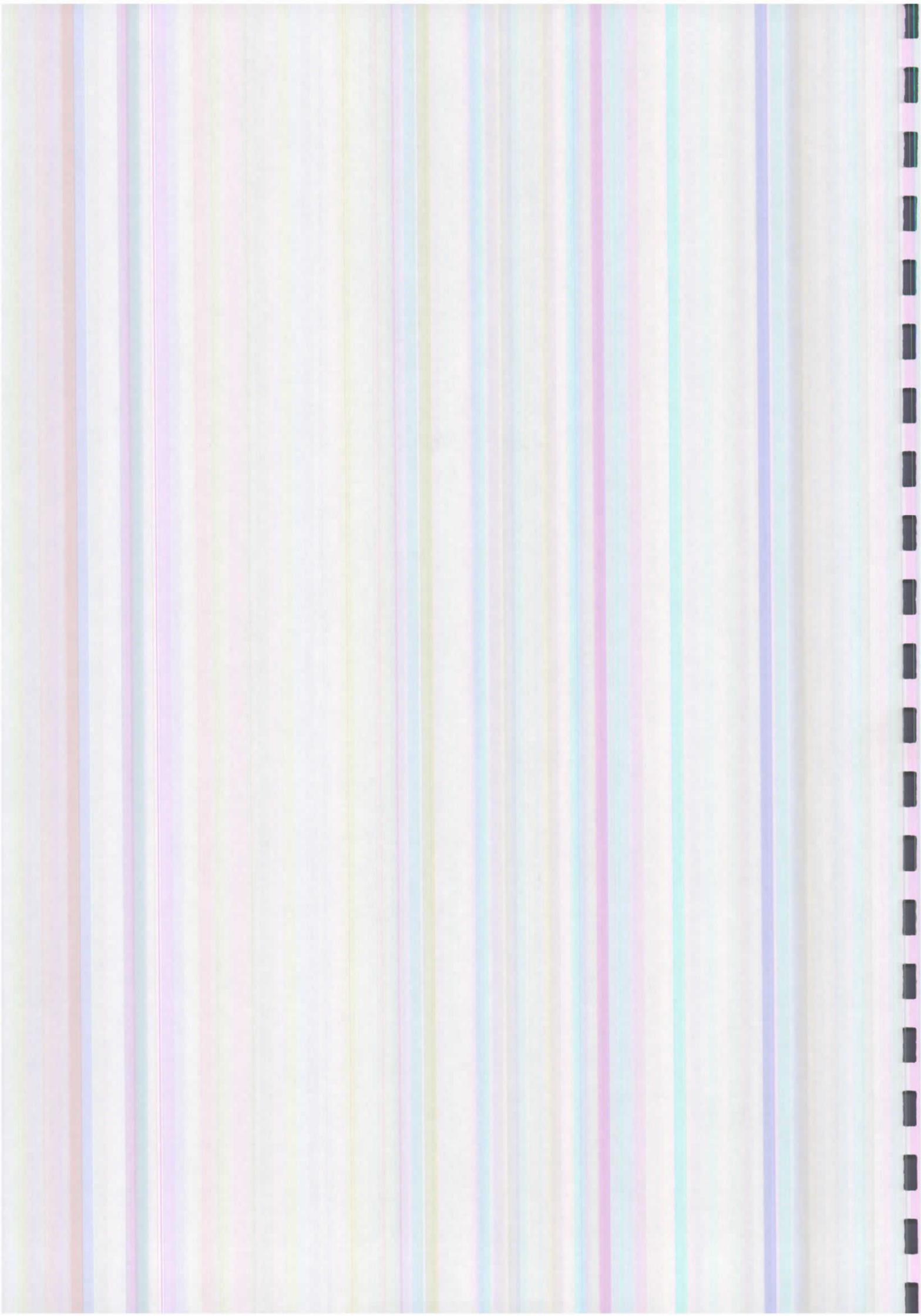
- MAGNOLATO D., GUJER R., SELF R., 1986. Identification de nouveaux constituants dans le sorgho, **Journées Internationales du Groupe Polyphénol**, Montpellier, 513-517.
- MAKKAR H.P.S., DAWRA R.K., SINGH B., 1987. Protein precipitation assay for quantification of tannins : determination of protein in tannin-protein complex, **Anal. Biochem.**, **166**, 435-439.
- MAKKAR H.P.S., SINGH H., NEGI S.S., 1990. Tannin levels and their degree of polymerisation and specific activity in somme agro-industrial by-products. **Biological Wastes**, **31**, 137-144.
- MARIGO G., 1973. Sur une méthode de fractionnement et d'estimation des composés phénoliques chez les végétaux, **Analisis**, **2**, 10-110.
- MARQUARDT R.R., WARD A.T., EVANS L.E., 1978. Comparative properties of tannin-free and tannin-containing cultivars of faba beans (*Vicia faba*), **Can. J. Plant Sci.**, **58**, 753-760.
- MARQUART R.R., WARD A.T., CAMPBELL L.D., CANSFIELD P.E., 1977. Purification, identification and characterization of a growth inhibitor in faba beans (*Vicia faba* L var. minor) .**J . Nutr.** **107**, 1313-1324.
- MARQUARDT R.R., 1989. Dietary effects of tannins, vicine and convicine. In : Recent Advances of research on Antinutritional Factors in Legume Seeds. Ed. By J. Huisman, A.F.B Van Der Poel , I E Liener : Pudoc 141-155.
- MARTIN-TANGUY J., GUILLOME J., KOSSA A., 1977. Condensed tannins of horse bean seeds : chemical structure and apparent effects on poultry. **J. Sci. Food Agric.** **28**, 757-765.
- MARTIN Y.C., SPENCER C.M., LILLEY T.H., and HASLAM .E., 1990. Polyphenol complexation. **XVème Journées Internationales du groupe polyphenols**. 304-318.
- MATTICE W.L., PORTER L.J., 1984. Molecular weight averages and ¹³C NMR intensities provide evidence for branching in proanthocyanidin polymers, **Phytochemistry**, **23**, 1309-1311.
- MITCHAVILA S., CARRERA G., et DERACHE P., 1971. Etude de la toxicité de l'acide tannique admiistré avec les aliments. **Toxicologie Experimentale** **4** : 300-309.
- MERGHEM R., BRUN N., JAY M., 1992. Tanning power from pea and faba bean extracts. **Proceedings of the XVI th International Conference of Groupe Polyphenol**, **16** (2) 178-181.
- METCHE M., 1980. Tannins, nature et propriétés, **Journées Internationales du Groupe Polyphénol**, Neuchâtel, Suisse, 11-32.
- MOLE S., BUTLER L.G. and IASON G., 1990. Defense against dietary tannin in herbivores: a survey for proline rich salivary proteins in mammals. **Biochemical Systematic and ecology** **18**(4) : 287-293.
- MOLE S., WATERMAN P.G., 1987a. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies : I. Techniques for chemically defining tannins, **Oecologia (Berl.)**, **72**, 137-147.
- MOLE S., WATERMAN P.G., 1987b. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies : II. Techniques for biochemically defining tannins, **Oecologia (Berl.)**, **72**, 148-156.
- MOLE S., BUTLER L.G., IASON G., 1990a. Defense against dietary tannin in herbivores : a survey for proline rich salivary proteins in mammals. **Biochem. System. Ecology**, **18**, 287-293.

- MOLE S., Rogler J.C., BUTLER L.G., 1990. Use of labeled protein to determine the effect of dietary tannin on the relative abundance of endogenous and dietary protein in deces. **Proc. Groupe Polyphenols. XVth International Conference**, , Strasbourg.
- MORIMOTO S., NONAKA G.I., NISHIOKA I., 1986. Tannins and related compounds.XXXVIII. Isolation and characterization of flavan-3-ol glucosides and procyanidin oligomers from cassia bark. **Chem .Pharm. Bull.**, **34**, 633-642.
- MOSSE J., 1990. Acides aminés de 16 céréales et protéagineux : variation et clés de calcul de la composition en fonction du taux d'azote des graines. **Productions animales**, **3**, 103-109.
- MUELLER H., McALLAN A.B. Tannins : their biochemistry and nutritional properties, **Advences in Plant Cell Biochemistry and Biotechnology.**,**1**,151-217.
- MULKAY P., TOUILLAUX R., JERUMANIS J., 1981. Proanthocyanidins of barley : separation and identification, **J. Chromatog.**, **208**, 419-423.
- NITSCH J.P., 1970. Hormonal factors in growth development. In : The Biochemistry of fruits and their products, Hulme A. C. Eds., **Academic Press, Londres.** **1**, 427-472.
- NONAKA G.I., KANAHARA O., and NISHIOKA I., 1983. Tannins and related compounds. XV : A new class of dimeric flavan-3-ol gallates, theasinensin A and B, and proanthocyanidin gallates from gen tea leaf. **Chem. Pharm. Bull.**, **31**, 3906-3914.
- NOZZOLILLO C., RICCIARDI L., LATTANZIO V., 1989. Flavonoïds constituents of seed coat of *Vicia faba* (Fabaceae) in relation to genetic control of their color, **Can. J. bot.**, **67**, 1600-1604.
- Office International de la Vigne et du Vin., 1989. De la composition du raisin et du vin et des effets de leur consommation. **2ième Rencontre Internationale**, Coursan, Aude(Languedoc), France.
- OH H.I. and HOFF J.E. 1986. Effect of condensed grape tannins on the in vitro activity of digestive proteases and activation of their zymogens.**J .Food.Sci.** **51(3)** : 577-580.
- OKUDA T.,NORI K., HATANO T., 1985. Relationship of the structures of tannins to the binding activities with hemoglobin and methylene blue. **Chem. Pharm. Bull.**, **33**, **4**, 1424-1433.
- OKUDA T., YOSHIDA T., and HATANO T., 1989. New methods of analyszing tannins. **Journal of natural products.**, **52**, 1-31.
- OZAWA T., LILLEY T.H., HASLAM E., 1987. Polyphenol interactions : astringency and the loss of astringency in ripening fruit, **Phytochemistry**, **26**, (11) 2937-2942.
- PETERSON U., SHULTZ E., 1980. Comparative evaluation of home grown protein feeding stuffs for growing -finishing pigs : *Vicia faba* L., *Lupinus luteus* L., and *Brassica napus* L. var. napus . In : *Vicia faba* : Feeding value, Proceeding and Viruses (D A Bond , editor). Martinus Nijhoff, The Hague , The Netherlands, 45-65.
- PAPADOPOULAS C.H., TSAFTARIS A.S., ROUPAKIAS D.G.,1985. Correlation between tannin content and testa color in faba beans, **Fabis Newsl.**, **13**, 38-40.
- PICARD J., 1976. Aperçu sur l'hérédité du caractère absence de tanins dans les graines de féverole, **Ann. Amélior. Plantes**, **26**, 101-106.
- PORTER L.J., 1974. Extractives of *Pinus radiata* bark. **New Zealand J. Sci.**, **17**, 213-218.
- PORTER L.J., WOODRUFFE J., 1984. Hemanalysis : the relative astringency of proanthocyanidin polymers, **Phytochemistry**, **23**, 1255-1256.

- PORTER L.J., HRSTICH L.N., CHAN B.G., 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin, **Phytochemistry**, **25**, 223-230.
- PORTER L.J., CHAN B.G., 1991. Cacao procyanidins : major flavanoids and identification of some minor metabolites. **Phytochemistry**, **30**, 5, 1657-1663.
- PORTER L.J., 1993. Flavans and proanthocyanidins : In : the flavonoids : Advances in research since 1986. Edited by J B Harbone. Chapman & Hall, London.
- PRIEUR C., RIGAUD J., CHENIER V., MOUTOUNET M., 1994. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. **Phytochemistry**, **36**,3,781-784.
- PRICE M.L., BUTLER L.G., 1977. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain, **J. Agric. Food Chem.**, **25**, 1268-1273.
- PRICE M.L., VAN SCOYOC S., BUTLER L.G., 1978. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in *Sorghum* grain, **J. Agric. Food Chem.**, **26**, 1214-1218.
- RAMOS T., BOURZEIX M., KOVAC V., HEREDIA N., 1988. Détermination et dosage des proanthocyanes du vin rouge par chromatographie en phase liquide à haute performance, **Journées Internationales du Groupe Polyphénol**, St. Catharines, Ontario, Canada, 314-315.
- REDDY N.R., PIERSON M.D., SATHE S.K., SALUNKE D.K., 1985. Dry bean tannins : a review of nutritional implications, **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **62**, 541-549.
- RICARDO DA SILVA J.M., DARMON N., FERNADEZ Y., MITCHAVILA S., 1991a. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds, **J. Agric. Food Chem.**, **39**, 1549-1552.
- RICARDO DA SILVA J.M., CHEYNIER V., SOUQUET J.M., MOUTOUNET M., 1991b. Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. **J. Sci. Food. Agric.**, **57**, 11-125
- RICARDO DA SILVA J.M., RIGAUD J., CHEYNIER V., CHEMINAT A., MOUTOUNET M., 1991c. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. **Phytochemistry**, **30**, 1259-1264.
- RICARDO DA SILVA J.M., BELCHIOR A.P., SPANGER M.I., BOURZEIX M., 1992. Oligomeric procyanidins of three grapevine varieties and wines from Portugal. **Sciences des aliments.**, **12**, 223-237.
- RIGAUD J., ESCRIBANO-BAILON M.T., PRIEUR C., SOUQUET J.M., CHEYNIER V., 1993. Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. **Journal of Chromatography A**, **654**, 255-260.
- RIGAUD J., PEREZ-ILZARBE J., RICARDO DA SILVA J.M., CHENIER V., 1991. Micro method for identification of proanthocyanidin using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography.**, **540**, 401-405.
- RIBEREAU-GAYON P., 1968. Les tannins, **Les composés phénoliques des végétaux**, Dunod, Paris, **Chap. VII**, 173-201.
- ROBBINS C.T., MOLE S., HAGERMAN A.E., HANLEY T.A., 1987. Role of tannins in defending plants against ruminants : reduction in dry matter digestion ?, **Ecology**, **68**, 1606-1615.
- ROGLER J.C., GANDUGLIA H.R., ELKIN R.G., 1985. Effects of nitrogen source and level on the performance of chicks and rats fed low and high tannin sorghum. **Nutrition Research**, **5**, 1143-1151.

- ROUX D.G., 1971. Recent advances in the chemistry and chemical utilization of the natural condensed tannins. *Phytochemistry*, **11**, 1219-1230.
- SALUNKHE D.K., CHAVAN J.K., KADDAM S.S., 1990. Dietary Tannins : Consequences and Remedies, **CRC Press, Inc, Boca Raton, FL**.
- SINGH U., 1984. The inhibition of digestive enzymes by polyphenols of chickpea (*Cicer arietinum L.*) and pigeonpea (*Cajanus cajan L.*). *Nurition reports International*, **29** (3) : 745-753.
- SHENK J., WESTERHAUS M., 1993. Monograph analysis of agriculture and food products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy. **Infrasoft International, Port Matilda, PA-USA, 103p**.
- SPENCER C.M., CAI Y., MARTIN R., GAFFNEY S.H., GOULDING P.N., MAGNOLATO D., LILLEY T.H., HASLAM E., 1988. Polyphenol complexation : some thoughts and observations, *Phytochemistry*, **27**, 2397-2409.
- STAFFORD H.A., 1988. The enzymology of proanthocyanidin biosynthesis . In : Chemistry and Significance of Condensed Tannins. Edited by R W HEMINGWAY & J J KARSHESY.
- STICKLAND R.G., 1984. Condensed tannins of pea seeds. *Plant Science Letters*, **34**, 403-410.
- STATHAM C.M., CROWDEN R.K., HARBORNE R., 1972. Biochemical genetics of pigmentation in *Pisum sativum*. *Phytochemistry*, **11**, 1083-1088.
- SWAIN T., HILLIS W.E., 1959. Phenolic constituents of *Prunus domestica*. I : the quantitative analysis of phenolic constituents, *J. Agric. Food Chem.*, **10**, 63-68.
- UNIF-ITCF., 1993. POIS. Utilisation en alimentation animale.
- VALDEBOUZE P., BERGERON E., GABORIT T., DELORT L.P., 1980. Content and distribution of trypsin inhibitors and hemagglutinins in some legume seeds. *Can. J. Plant Sci*, **60**, 685-701
- VALDEBOUZE P., et GABORIT T., 1985. Activité antitrypsique des graines de Légumineuses. *Revue de l'alimentation*, nov, 45-47.
- VANDE CASTEELE K., GEIGER.H., DE LOOSE R., VAN SUMERE C.F., 1983. Separation of some anthocyanidins, anthocyanins, proanthocyanidins and related substances by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatog.*, **259**, 291-300.
- VERCAUTREN J., 1994. Do proanthocyanidins and NMR spectroscopists make an irreversible complexation. **Proc. Groupe Polyphenols. International Conference, Espagne, 1-10**.
- WILLIAMS.P., SOBERING D., 1992. Wole-seed grain analysis by near infrared transmittance and reflectance. **Proceeding of the 5th ICNIRS conference, Haugesund-Norvège, 441-446**.

ANNEXES



ANNEXE 1

Génotype	code	lieu de production	Type
----------	------	--------------------	------

Année 1991

Bourdon	PB1 608	Cambrige	Hiver
Galcier	PB1 611	//	//
Victor	PB1 635	INRA Dijon	Printemps
LPSP	PB1 642	//	//
Robin	PB1 646	//	//
SWI	PB1 647	//	//
SCI	PB1 648	//	//
	PB1 682		
	PB1 683		

Année 1992

Robin	F 646 C 2	INRA Dijon	Printemps
EE-OT-OV	F 662 C 2	//	//
EB-OT-V	F 665 C 2	//	//
EB-OT-OV	F 666 C 2	//	//
EB-T-V	F 667 C 2	//	//
EB-T-OV	F 668 C 2	//	//

Année 1993

Galcier	F 611 F 3	Cambrige	Hiver
Bourdon	F 613 F 3	//	//
Fabiola	F 615 F 3	INRA Rennes	Hiver
selection OT	F 617 F 3	//	//
Isogénique OT	F 629 F 3		//
Isogénique T	F 630 F 3		//

Annexe 1: Type et lieu de production des génotypes analysés pour le PEA programme.

ANNEXE 2

N°	Code Variétal	Types	couleur fleur	couleur tégument	apparence de la graine
1	E 007 S 1	exotique	1	1	1
2	V 009 S1	cultivar	1	1	1
3	V 012 S1	cultivar	1	1	1
4	I 015 S1	cultivar	1	1	1
5	I 016 E1	isolignée	1	1	2
6	I 019 C1	isolignée	1	1	1
7	I 021 C1	isolignée	1	1	2
8	V 024 S1	cultivar	1	1	1
9	I 029 C1	isolignée	1	1	2
10	V 030 S1	cultivar	2	2	2
11	V 031 S1	cultivar	1	1	2
12	I 034 C1	isolignée	1	1	2
13	V 045 S1	cultivar	1	1	2
14	V 047 S1	cultivar	1	1	2
15	I 048 B1	isolignée	1	1	1
16	V 050 S1	cultivar	1	1	1
17	V 060 S1	cultivar	1	1	1
18	E 065 S1	exotique	2	4	2
19	V 067 S1	cultivar	1	1	2
20	E 069 S1	exotique	2	2	1
21	I 074 E1	isolignée	1	5	2
22	V 086 S1	cultivar	1	5	2
23	I 089 E1	isolignée	2	1	2
24	V 091 S1	cultivar	1	1	1
25	V 096 S1	cultivar	1	1	2
26	I 099 A1	isolignée	1	1	2
27	E 101 S1	exotique	2	1	2
28	V 102 S1	cultivar	1	1	2
29	V 108 S1	cultivar	1	1	2
30	V 109 S1	cultivar	1	1	2
31	I 110 B1	isolignée	1	1	1
32	V 111 S1	cultivar	1	1	1
33	V 113 S1	cultivar	1	1	1
34	V 117 S1	cultivar	2	2	2
35	V 120 S1	cultivar	1	1	1
36	E 121 S1	exotique	2	1	2
37	I 128 E1	isolignée	1	2	1
38	E 132 S1	exotique	1	1	1
39	I 133 S1	isolignée	1	1	1
40	V 134 S1	cultivar	1	1	2
41	V 135 S1	cultivar	1	1	1
42	I 136 E1	isolignée	1	1	1
43	V 139 S1	cultivar	1	1	1
44	V 141 S1	cultivar	2	2	1
45	I 147 C1	isolignée	1	1	1
46	E 150 S1	exotique	1	1	1
47	I159 C1	isolignée	1	1	1
48	V 165 S1	cultivar	1	1	2
49	I167 A1	isolignée	1	1	1
50	I 168 B1	isolignée	1	1	1

N°	Code	Types	couleur	couleur	apparence de
suite 1	Varlétal		fleur	tégument	la graine
51	V 171 S1	cultivar	2	1	2
52	V 172 S1	cultivar	1	1	2
53	V 173 S1	cultivar	1	1	2
54	V 176 S1	cultivar	1	1	1
55	I 177 E1	isolignée	1	4	1
56	V 178 S1	cultivar	1	1	1
57	E 186 S1	exotique	2	2	2
58	V 199 S1	cultivar	1	1	1
59	V 206 S1	cultivar	1	1	2
60	V 209 S1	cultivar	1	1	2
61	V 210 S1	cultivar	1	1	1
62	V 211 S1	cultivar	1	1	1
63	V 214 S1	cultivar	1	1	1
64	I 215 E1	isolignée	1	4	2
65	V 219 S1	cultivar	1	1	1
66	I 224 D1	isolignée	1	1	2
67	I 226 C1	isolignée	1	1	2
68	V 227 S1	cultivar	1	2	2
69	E 228 S1	exotique	2	3	1
70	I 229 A1	isolignée	1	1	1
71	V 233 S1	cultivar	1	1	2
72	V 234 S1	cultivar	1	1	1
73	V 242 S1	cultivar	1	2	2
74	V 244 S1	cultivar	2	1	2
75	V 245 S1	cultivar	1	1	1
76	V 248 S1	cultivar	1	1	1
77	V 250 S1	cultivar	1	1	1
78	V 254 S1	cultivar	1	1	2
79	V 256 S1	cultivar	2	4	2
80	I 267 C1	isolignée	2	4	2
81	V 268 S1	cultivar	1	1	1
82	I 272 A1	isolignée	1	1	1
83	V 276 S1	cultivar	1	1	2
84	E 277 S1	exotique	1	5	2
85	V 278 S1	cultivar	1	1	1
86	I 279 C1	isolignée	1	1	1
87	V 280 S1	cultivar	1	1	1
88	V 281 S1	cultivar	1	1	1
89	V 282 S1	cultivar	1	1	1
90	V 283 S1	cultivar	1	1	1
91	V 285 S1	cultivar	1	1	1
92	E 288 S1	exotique	2	2	2
93	V 292 S1	cultivar	1	1	1
94	V 294 S1	cultivar	1	1	1
95	E 295 S1	exotique	1	1	1
96	V 297 S1	cultivar	1	1	2
97	I 306 E1	isolignée	1	1	1
98	V 307 S1	cultivar	1	1	2
99	I 312E1	exotique	1	1	1
100	V 314 S1	cultivar	1	1	1

N°	Code	Types	couleur fleur	couleur tégument	apparence de la graine
suite 2	Variétal				
101	I 315 E1	isolignée	1	1	2
102	I 318 E1	isolignée	1	2	2
103	I 324 E1	isolignée	1	5	2
104	E 325 S1	exotique	2	4	1
105	I 326 C1	isolignée	1	1	1
106	V 327 S1	cultivar	1	1	1
107	I 329 C1	isolignée	2	2	2
108	V 333 S1	cultivar	2	2	2
109	E 337 S1	exotique	3	2	2
110	V 338 S1	cultivar	1	1	1
111	V 341 S1	cultivar	1	1	1
112	E 342 S1	exotique	2	4	2
113	V 345 S1	cultivar	1	1	2
114	V 355 S1	cultivar	1	1	2
115	E 357 S1	exotique	2	2	2
116	V 358 S1	cultivar	2	5	2
117	I 360 C1	isolignée	2	4	2
118	I 363 C1	isolignée	1	1	2
119	V 365 S1	cultivar	1	1	1
120	I 366 B1	isolignée	1	1	2
121	I 367 E1	isolignée	1	2	2
122	I 369 S1	isolignée	1	1	1
123	V 374 S1	cultivar	1	1	1
124	V 375 S1	cultivar	1	1	1
125	I 376 D1	isolignée	1	1	1
126	V 380 S1	cultivar	1	1	1
127	V 382 S1	cultivar	2	4	1
128	V 383 S1	cultivar	1	1	1
129	I 386 E1	isolignée	1	1	2
130	V 395 S1	cultivar	1	1	1
131	V399 S1	cultivar	1	1	1
132	C404 F1	cultivar	1	2	2
133	C405 F1	cultivar	1	1	2
134	C408 F1	cultivar	1	1	1
135	C409 F1	cultivar	1	1	1
136	C415 F1	cultivar	1	1	2
137	C417 F1	cultivar	1	2	2
138	C420 F1	cultivar	1	1	1
139	C424 F1	cultivar	1	1	2
140	C443 F1	cultivar	1	1	1

Annexe 2 : Caractéristiques variétales des échantillons de Pois du PEA Programme .
(Couleur fleur: 1= blanche ; 2= type sauvage ; 3= rose ; 4= violet ; 5= mauve.
Couleur tégument : 1= blanc ; 2= vert ; 3= gris ; 4= marron ; 5= beige ; 6 vert-brun
Apparence de la graine :1= lisse ; 2= ridée.

ANNEXE 3

N°an1	Code An1	Clarté (L')	Phénols totaux		Tannins condensés		Pouvoir tannant
			bleu de Prusse		BuOH/HCl	Vanilline	Hémoglobine
1	E 007 S 1	76,0	6,2 ± 0,3	0	0,8 ± 0,1	8,8 ± 0,7	
1	E 007 E 2	73,0	4,5 ± 0,9	0	0,5 ± 0,1	7,5 ± 0,3	
2	V 009 S1	65,8	5,4 ± 0,8	0	0,8 ± 0,1	4,6 ± 0,4	
2	V 009 E2	68,5	4,3 ± 0,6	0	0,5 ± 0,2	6,3 ± 0,7	
3	V 012 S1	73,3	5,2 ± 0,9	0	0,7 ± 0,1	6,7 ± 0,3	
3	V 012 E2	71,8	5,0 ± 0,1	0	0,3 ± 0,1	8,6 ± 1,4	
4	V 015 S1	73,0	6,1 ± 0,1	0	0,7 ± 0,0	6,0 ± 0,4	
4	V 015 E2	71,1	5,4 ± 0,0	0	0,4 ± 0,1	6,2 ± 1,5	
5	I 016 E1	63,1	5,3 ± 0,4	0	0,7 ± 0,3	11,1 ± 1,6	
5	I 016 E2	64,1	5,9 ± 1,0	0	0,4 ± 0,2	7,3 ± 0,4	
6	I 021 C1	64,9	4,2 ± 0,7	0	0,6 ± 0,1	6,6 ± 1,1	
6	I 021 E 2	65,0	5,5 ± 0,8	0	0,6 ± 0,1	11,2 ± 0,3	
7	V 030 S1	44,1	53,8 ± 3,9	97,7 ± 5,6	53,5 ± 3,7	68,4 ± 6,2	
7	V 030 E2	48,4	61,6 ± 4,6	99,2 ± 6,8	63,2 ± 4,7	78,4 ± 1,8	
8	I 034 C1	59,4	5,5 ± 0,6	0	0,8 ± 0,2	7,1 ± 2,2	
8	I 034 E2	60,3	5,0 ± 0,3	0	0,4 ± 0,1	4,4 ± 0,6	
9	V 045 S1	74,4	6,8 ± 1,1	0	0,9 ± 0,2	12,1 ± 1,2	
9	V 045 E2	71,8	4,2 ± 0,1	0	0,5 ± 0,1	5,6 ± 0,4	
10	V 050 S1	73,0	5,6 ± 0,9	0	0,6 ± 0,1	10,7 ± 0,9	
10	V 050 E 2	70,9	3,6 ± 0,3	0	0,6 ± 0,1	12,7 ± 1,3	
11	E 065 S1	42,3	35,0 ± 3,3	88,7 ± 6,1	44,9 ± 6,4	66,8 ± 5,4	
11	E 065 E2	39,7	54,8 ± 3,8	109,8 ± 5,3	61,2 ± 2,9	76,9 ± 2,4	
12	E 069 S1	42,3	42,5 ± 4,9	61,8 ± 5,9	26,5 ± 4,3	55,0 ± 2,6	
12	E 069 E2	40,4	38,3 ± 3,3	67,5 ± 4,3	33,9 ± 2,4	60,8 ± 2,2	
13	E 089 E1	36,4	45,0 ± 2,7	84,6 ± 3,0	23,7 ± 1,6	63,1 ± 0,8	
13	E 89 E2	44,1	56,3 ± 4,9	96,6 ± 4,4	42,0 ± 5,1	57,6 ± 3,6	
13	E 089 E3	42,2	49,1 ± 3,4	89,4 ± 3,2	46,7 ± 1,6	63,5 ± 5,1	
14	I 099 A1	67,1	6,3 ± 0,7	0	0,7 ± 0,1	9,6 ± 1,4	
14	I 099 A 2	62,5	5,3 ± 1,2	0	0,5 ± 0,1	8,8 ± 0,2	
15	V 117 S1	45,1	54,5 ± 4,9	81,0 ± 5,7	40,6 ± 1,9	69,6 ± 2,8	
15	V 117 E2	42,3	60,5 ± 3,4	95,2 ± 5,4	58,7 ± 3,3	72,0 ± 1,4	
16	E 121 S1	36,4	52,5 ± 4,2	90,3 ± 6,0	21,8 ± 1,6	80,3 ± 3,3	
16	E 121 E2	39,5	46,9 ± 2,9	62,8 ± 1,7	38,3 ± 2,1	67,2 ± 3,9	
17	I 136 E1	67,8	5,7 ± 0,8	0	0,6 ± 0,1	7,1 ± 1,4	
17	I 136 E2	69,2	4,8 ± 0,3	0	0,3 ± 0,1	4,5 ± 0,9	
18	V 139 S1	64,1	18,0 ± 1,3	11,0 ± 1,0	7,0 ± 0,9	18,2 ± 2,7	
18	V 139 E2	63,4	14,4 ± 0,9	12,9 ± 3,4	6,8 ± 0,8	26,4 ± 1,4	
19	V 141 S1	38,7	44,9 ± 3,5	94,2 ± 4,4	41,3 ± 4,0	56,4 ± 4,6	
19	V 141 E2	39,5	55,1 ± 3,3	74,6 ± 2,3	38,1 ± 3,3	67,8 ± 1,2	
20	I 147 C1	62,1	6,6 ± 1,1	0	0,9 ± 0,1	8,0 ± 1,6	
20	I 147 E 2	58,3	5,4 ± 0,7	0	1,0 ± 0,1	10,5 ± 1,0	
21	I 167 A1	73,6	5,9 ± 0,1	0	0,5 ± 0,1	10,9 ± 0,7	
21	I 167 A 2	71,1	4,2 ± 0,3	0	0,7 ± 0,1	10,2 ± 0,3	
22	I 168 B1	70,8	5,1 ± 0,3	0	0,6 ± 0,1	5,7 ± 0,8	
22	I 168 B 2	74,2	4,4 ± 0,4	0	0,8 ± 0,1	7,6 ± 0,4	

23	V 171 S1	45,1	56,2 ± 2,6	105,7 ± 3,4	51,1 ± 4,7	78,0 ± 2,4
23	V 171 E2	49,4	67,5 ± 3,4	97,9 ± 3,5	61,8 ± 3,0	73,3 ± 2,4
24	E 186 S1	39,1	27,6 ± 6,9	66,7 ± 1,7	39,7 ± 4,1	52,9 ± 5,7
24	E 186 D 2	38,2	46,0 ± 3,5	68,6 ± 3,5	38,0 ± 2,2	82,7 ± 4,7
25	V 219 S1	73,4	6,9 ± 0,7	0	0,7 ± 0,1	12,0 ± 1,4
25	V 219 E 2	75,2	4,0 ± 0,1	0	0,5 ± 0,1	11,5 ± 1,7
26	I 226 C1	71,6	5,5 ± 0,4	0	0,5 ± 0,1	12,0 ± 1,1
26	I 226 D 2	74,1	4,7 ± 0,4	0	0,8 ± 0,1	10,5 ± 1,0
27	V 242 S1	72,7	4,9 ± 0,3	0	0,4 ± 0,2	11,7 ± 1,9
27	V 242 A 2	75,2	3,5 ± 0,4	0	0,4 ± 0,1	8,5 ± 0,6
28	V 244 S1	38,0	51,3 ± 2,9	98,8 ± 4,2	39,1 ± 3,9	78,9 ± 4,8
28	V 244 E2	49,5	55,3 ± 4,4	76,2 ± 4,4	48,3 ± 3,7	66,5 ± 2,5
29	V 245 S1	73,2	5,1 ± 0,5	0	0,6 ± 0,1	5,2 ± 1,5
29	V 245 A 2	71,7	4,1 ± 0,7	0	0,6 ± 0,1	9,8 ± 0,5
30	V 256 S1	37,5	78,6 ± 2,1	121,0 ± 4,2	33,7 ± 2,2	90,5 ± 2,6
30	V 256 E 2	33,9	66,3 ± 1,1	110,6 ± 6,5	53,0 ± 1,0	90,8 ± 4,8
31	I 267 C1	34,4	44,3 ± 3,0	62,5 ± 5,4	49,5 ± 1,0	71,2 ± 2,6
31	I 267 B 2	51,2	72,3 ± 5,8	93,8 ± 5,6	70,6 ± 4,4	96,9 ± 3,2
32	E 295 S1	70,1	5,1 ± 0,3	0	0,8 ± 0,1	7,8 ± 1,2
32	E 295 E 2	58,9	18,9 ± 2,8	14,5 ± 1,0	6,3 ± 1,3	35,6 ± 3,5
33	I 312E1	74,7	4,9 ± 0,4	0	0,8 ± 0,1	6,8 ± 0,5
33	I 312 E 2	66,9	3,5 ± 0,5	0	0,5 ± 0,1	11,0 ± 1,4
33	I 312 E3	71,8	3,5 ± 0,2	0	0,7 ± 0,1	7,0 ± 0,6
34	E 325 S1	36,2	35,4 ± 4,0	70,4 ± 4,4	37,0 ± 4,1	71,3 ± 7,6
34	E 325 E 2	37,3	56,5 ± 2,7	72,9 ± 3,5	50,2 ± 5,6	105,3 ± 4,2
35	I 326C1	62,9	5,9 ± 0,3	0	0,7 ± 0,1	9,7 ± 1,0
35	I 326 E 2	62,8	4,3 ± 0,5	0	0,7 ± 0,1	8,9 ± 0,6
36	I 329 C1	43,0	58,8 ± 6,9	67,8 ± 8,6	41,0 ± 1,2	75,1 ± 1,8
36	I 329 E2	43,1	50,9 ± 2,1	68,2 ± 2,7	45,0 ± 1,0	56,0 ± 3,6
36	I 329 E3	44,6	67,8 ± 5,7	89,5 ± 6,2	50,2 ± 4,7	77,3 ± 5,3
37	E 342 S1	41,4	39,8 ± 1,1	79,2 ± 9,1	42,6 ± 5,1	73,0 ± 4,6
37	E 342 B 2	48,4	69,9 ± 6,5	96,4 ± 5,6	58,8 ± 6,8	88,8 ± 2,5
38	E 357 S1	52,9	20,7 ± 2,3	11,1 ± 0,7	5,8 ± 0,5	20,0 ± 2,1
38	E 357 E2	46,9	16,2 ± 1,0	6,9 ± 0,1	5,6 ± 0,2	18,4 ± 3,1
39	I 360 S1	39,7	55,6 ± 1,6	80,6 ± 6,7	55,2 ± 3,1	86,8 ± 2,9
39	I 360 B 2	54,0	58,1 ± 4,4	76,3 ± 3,3	52,1 ± 5,0	82,5 ± 4,4
40	I 363 C1	71,1	4,5 ± 0,3	0	1,0 ± 0,1	7,4 ± 0,9
40	I 363 D 2	74,3	4,8 ± 0,3	0	0,6 ± 0,1	8,9 ± 0,3
41	E 367 S1	64,0	5,1 ± 0,3	0	0,7 ± 0,1	5,6 ± 1,5
41	E 367 E 2	56,6	3,5 ± 0,8	0	0,5 ± 0,1	12,2 ± 1,2
42	V 380 S1	67,0	6,2 ± 0,6	0	0,7 ± 0,2	5,9 ± 0,2
42	V 380 C 2	61,5	4,9 ± 0,1	0	0,6 ± 0,1	11,2 ± 0,8
43	V 382 S1	61,6	6,1 ± 0,1	0	0,7 ± 0,1	6,4 ± 0,6
43	V 382 E2	62,1	5,4 ± 0,3	0	0,3 ± 0,1	5,1 ± 0,9

Annexe 3 : Clarté (L*), teneurs en phénols totaux (éqs catéchine), tannins condensés (éqs catéchine pour le test vanilline, en mg/g d'après le E1% = 150 de Bate-Smith pour le BuOH-HCl), et pouvoir tannant (éqs ac. tannique) des téguments des graines de Pois (Collection 1991, 1992 et 1993), exprimées en mg/g de matière sèche.

ANNEXE 4 , Planche 3
ANALYSE DE VARIANCE

Nombre d'observations : 90 Nombre de variables : 5
N° et noms des variables: 1 = répétition ; 2 = numéro ; 3 = Phénols totaux (PHT) ;
4 = Proanthocyanidines (PA) ; 5 = Pouvoir tannant (PT).

DISPOSITIF DE L'ESSAI :

FACTEUR 1 = 9 Variétés

1= V 045 (1) 2= V 009(2) 3= V 295 (3) 4 =V 357 (4) 5 = V 273 (5)
6 =V 171 (6) 7 = V 325(7) 8 =V 256 (8) 9 = V 305 (9)

10 REPETITIONS

ANALYSE DE LA 1 ère VARIABLE : PHENOLS TOTAUX (PHT)
ANALYSE DE LA VARIANCE

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTALE	84175,48	89	945,79				
VAR.FACTEUR 1	79853,82	8	9981,73	187,0	0,0000		
VAR.RESIDUELL E1	4321,66	81	53,35			7,30	16,9%

ANALYSE DE LA 2e VARIABLE : PROANTHOCYANIDINES (PA)
ANALYSE DE LA VARIANCE

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTALE	206171,42	89	2316,53				
VAR.FACTEUR 1	200745,02	8	25093,13	374,5	0,0000		
VAR.RESIDUELL E1	5426,41	81	66,99			8,18	15,0%

ANALYSE DE LA 3e VARIABLE : POUVOIR TANNANT (PT)
ANALYSE DE LA VARIANCE

	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
VAR.TOTALE	102910,2	89	1156,29				
VAR.FACTEUR 1	97467,58	8	12183,45	181,3	0,0000		
VAR.RESIDUELL E1	5442,63	81	67,19			8,20	15,1%

Planche 3 : Résultats de l'analyse de variance à 1facteur controlé réalisée sur les génotypes de pois (collection 1992)

ANNEXE 4 , Planche 4.

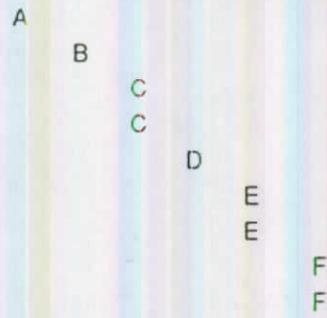
Test de NEWMAN-KEULS- seuil = 5%

F1	LIBELLES	MOYENNES
9	9	90,74
8	8	77,34
7	7	65,44
6	6	55,93
5	5	45,49
4	4	25,92
3	3	20,73
2	2	3,95
1	1	3,79

1 ère VARIABLE : PHENOLS TOTAUX (PHT)
GROUPES HOMOGENES

Test de NEWMAN-KEULS- seuil = 5%

F1	LIBELLES	MOYENNES
9	9	128,74
8	8	109,51
7	7	84,99
6	6	82,01
5	5	65,1
4	4	12,6
3	3	9,32
2	2	0
1	1	0

2 e VARIABLE : PROANTHOCYANIDINES (PA)
GROUPES HOMOGENES

Test de NEWMAN-KEULS- seuil = 5%

F1	LIBELLES	MOYENNES
8	8	102,37
9	9	94,04
7	7	83,14
6	6	62,79
5	5	54,14
4	4	40,11
3	3	38,31
2	2	6,92
1	1	6,85

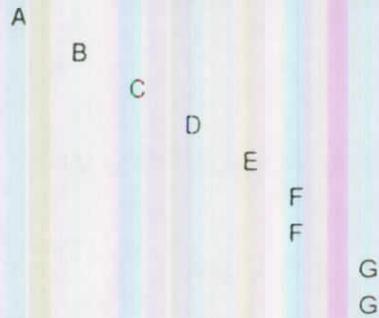
3e VARIABLE : POUVOIR TANNANT (PT)
GROUPES HOMOGENES

Planche 4 : Résultats du test de NEWMAN-KEULS-seuil = 5% réalisé sur les génotypes de Pois (collection 1992).

Titre :

LES FACTEURS ANTINUTRITIONNELS (F.A.N.) PHENOLIQUES
DE *Pisum sativum* L. ET DE *Vicia faba* L. (*Leguminosae*) :
ASPECTS STRUCTURAUX, GENETIQUES ET PHENOTYPIQUES.

Biochimie Appliquée - Phytochimie

Résumé :

Les tannins condensés ou proanthocyanidines sont des composés qui ont la propriété de former des complexes avec les protéines de la ration alimentaire et d'inhiber les protéases du tractus digestif.

A l'aide d'un panel de méthodes chimiques (méthode au bleu de Prusse couplée à l'adsorption sur PVPP, BuOH/HCl, Vanilline), méthodes biologiques (hémanalyse et complexation à la gélatine), méthodes physiques (spectrocolorimétrie et spectrométrie proche infrarouge) nous avons expertisé les facteurs antinutritionnels phénoliques de deux sources protéiques végétales: *Pisum sativum* L. et *Vicia faba* L. Parallèlement, une étude de la variabilité phénotypique de ces Légumineuses (pois et féverole) a montré une interaction génotype-milieu plus importante que l'effet milieu.

Nous avons également tenter de valider les méthodes physiques de dosages non destructives par rapport aux méthodes chimiques classiques ; la spectrométrie proche infrarouge en mode réflexion s'est avérée être une technique particulièrement bien adaptée aux programmes de sélection.

Pour une connaissance plus approfondie des molécules responsables de l'activité tannante chez ces deux Légumineuses, le contenu phénolique a été fractionné par affrontement entre solvants et par passage sur tamis moléculaire. Une méthode particulière d'étude a été développée et les résultats ont montré que la base chimique du contenu phénolique des téguments reposait essentiellement sur des molécules de type Proanthocyanidines ou tannins condensés. L'analyse structurale nous a permis d'identifier 14 molécules polyphénoliques s'accumulant dans les téguments. Les molécules identifiées sont des procyanidines dans le cas de la féverole (*Vicia faba* "Alfred") : 5 dimères et un trimère. En revanche, dans le cas du pois (*Pisum sativum* ssp *arvense* "V 256") les molécules isolées sont essentiellement des prodéphinidines : 5 dimères, 2 trimères et un tétramère.

Mots clé :

Vicia faba L., *Pisum sativum* L., Tannins, Proanthocyanidines, variabilité phénotypique, spectrométrie de masse (ES.MS), microdégradation.

