

Université de Neuchâtel
Faculté des Sciences

**Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène
oxydase produite par *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.**

Thèse présentée à la Faculté des Sciences par

Camille Perret

Chimiste diplômée de l'Université de Neuchâtel
pour l'obtention du titre de
Docteur ès Sciences

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Analyse de tannins inhibiteurs de la stilbène
oxydase produite par *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.**

de Mme Camille Perret

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

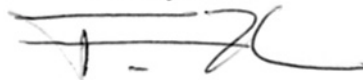
La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

MM. R. Tabacchi (directeur de thèse), R. Deschenaux,
R. Pezet (Changins) et L.B. Fay (Vevey)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 5 décembre 2001

Le doyen:



F. Zwahlen

à José
à Jeanne et à Benjamin
à mes parents

Remerciements

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Chimie Organique Analytique de l'Université de Neuchâtel, sous la direction du Professeur Raffaele Tabacchi.

J'aimerais tout d'abord le remercier pour m'avoir accepté dans son groupe et de m'avoir offert l'opportunité d'élargir mes connaissances en spectrométrie de masse. Il m'a aussi laissé la possibilité de créer des collaborations étroites qui ont permis la réalisation de ce travail.

J'aimerais de la même façon remercier le Dr Roger Pezet de la Station Fédérale en Recherches Agronomiques à Changins pour son savoir-faire, ses connaissances dans le domaine mycologique et sa bonne humeur.

Je tiens également à remercier :

Les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail :

Monsieur le Dr Laurent-Bernard Fay de l'entreprise Nestlé à Lausanne

Monsieur le Professeur Robert Deschenaux de l'Université de Neuchâtel.

Cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans l'aide précieuse de certains collaborateurs et collègues que je tiens vivement à remercier :

Le Dr Claude Saturnin pour ses conseils avisés en chromatographie et ses discussions sur le self-control.

Le Dr Damien Twerenbold de l'Institut de Physique à Neuchâtel pour m'avoir laissé utiliser à ma guise l'appareil Dynamo et pour m'avoir donné l'occasion d'essayer la cryodétection. J'aimerais par la même occasion remercier son groupe et particulièrement Frédérique Rossel pour son aide, sa patience et sa joie de vivre.

Monsieur Patrick Dietemann du groupe du Professeur R. Zenobi à Zürich pour m'avoir offert son amitié et la possibilité de mesurer sur un de leurs instruments MALDI/TOF.

Le Dr Véronique Cheynier de l'INRA à Montpellier et son équipe pour m'avoir accueillie comme stagiaire. Je les remercie pour les discussions passionnantes sur les tanins et pour toutes les méthodes d'analyse qu'ils n'ont pas hésité à me faire partager.

Le Dr Arnd Ingendoh et son équipe, de l'entreprise Bruker à Bremen en Allemagne, pour avoir accepté d'analyser un de mes échantillons sur leur appareil FT-ICR.

Le Dr Stefan Schürch de l'Université de Berne pour les essais sur leur nouvel appareil ESI-TOF.

Monsieur Freddy Nidegger de l'Université de Fribourg pour le travail effectué sur leur appareil FT-ICR.

J'aimerais remercier particulièrement le Dr Blaise Nicolet avec qui j'ai passé des moments inoubliables et de la même façon pour l'aide qu'il a apporté à la rédaction de ce travail.

Monsieur Nicolas Mottier pour sa bonne humeur de tous les matins, sa motivation à apprendre, son penchant pour les douceurs et surtout son imagination quoique parfois trop débordante.

Madame Armelle Michel pour son sourire, ses conseils avisés et sa disponibilité.

Le groupe du Dr Roger Pezet pour tous les moments passés ensemble.

Monsieur Manuel Tharin pour ses sauts d'humeur et pour tous les concerts auxquels il n'a pas participé pour passer une soirée avec nous.

Madame Florence Monnet pour son amitié, son entrain et pour le fait qu'elle ne m'en veuille pas trop de ne pas lui écrire.

Monsieur David Schwab pour avoir largement collaboré à la réalisation de ce travail.

Je tiens aussi à citer certains membres de l'Institut avec lesquels j'ai passé de très bons moments : David Wintgens, Olivier Vallat, Claire-Lise Zbinden, Jean-Marc Vaucher, Radek Sobota, Philippe Massiot, Matthieu Faure, Maurice Binggeli, Jessica Pacifico, Lucienne Bazzoni et sa famille, Sandrine et Frédéric Cherioux, Yann Berger et Blaise Dardel.

J'aimerais remercier certaines personnes qui n'ont pas participé scientifiquement à ce travail, mais qui ont partagé une grande partie de ma vie durant ces quatre années :

Ma famille pour leur gentillesse, leur soutien moral et financier, sans lesquels je n'aurais certainement pas pu venir à bout de cette thèse (et tout ce qui possède plus que 50 poils/cm²).

Monsieur José de Bastos pour sa patience, son courage et son amour.

Madame Peggy Von Kaenel pour les longues discussions téléphoniques et les soirées passées ensemble à refaire le monde.

Et finalement toutes les personnes que j'aurais malencontreusement oubliées mais à qui je témoigne toute mon affection.

Table des matières

RESUME	1
SUMMARY	3
I INTRODUCTION GENERALE	6
I.1 LA VIGNE	6
I.2 LES COMPOSES PHENOLIQUES DU RAISIN.....	6
<i>I.2.1 Les composés non-flavonoïdes</i>	<i>7</i>
I.2.1.1 Les acides phénoliques	7
I.2.1.2 Les stilbènes.....	7
<i>I.2.2 Les composés flavonoïdes.....</i>	<i>8</i>
I.2.2.1 Les flavonols	9
I.2.2.2 Les anthocyanes	9
I.2.2.3 Les tanins condensés (flavan-3-ols).....	11
I.3 LES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE	17
I.4 LA POURRITURE GRISE	20
<i>I.4.1 Le champignon Botrytis cinerea</i>	<i>20</i>
I.4.1.1 Cycle de développement et de reproduction de <i>Botrytis cinerea</i>	21
I.4.1.2 Pathologie	22
I.4.1.3 La latence du développement de <i>Botrytis cinerea</i>	23
I.4.1.4 Les moyens de lutte	27
<i>I.4.2 Résultats antérieurs</i>	<i>27</i>
I.5 INTRODUCTION A LA SPECTROMETRIE DE MASSE	28
<i>I.5.1 Historique du couplage LC/MS</i>	<i>28</i>
I.5.1.1 L'Interface Moving Belt (MBI)	28
I.5.1.2 L'Interface Particle Beam (PBI)	29
I.5.1.3 L'interface Continuous-Flow-FAB (CF-FAB)	29
I.5.1.4 L'interface Thermospray (TSP).....	30
I.5.1.5 L'interface Electrospray (ESI)	31
I.5.1.6 L'interface Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)	34
<i>I.5.2 La source Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI).....</i>	<i>35</i>
I.5.2.1 Les matrices	35
I.5.2.2 Le Two-phases MALDI.....	36
I.5.2.3 Les lasers.....	36
I.5.2.4 Mécanismes d'ionisation et désorption en MALDI.....	36
<i>I.5.3 Les analyseurs de masse</i>	<i>37</i>
I.5.3.1 L'analyseur Quadrupôle Ion Trap (QIT)	37
I.5.3.2 L'analyseur Time of Flight (TOF).....	40

I.5.3.3	L'analyseur Fourier Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR)	41
I.5.4	Le LCQ de THERMOFINNIGAN.....	42
I.6	BUT DU TRAVAIL	45
II	MATERIEL ET METHODES.....	47
II.1	MATERIEL VEGETAL.....	47
II.2	EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DES TANINS OLIGOMERIQUES ET POLYMERIQUES	47
II.2.1	Qualité des solvants utilisés	47
II.2.2	Extraction des tanins des baies de raisin.....	47
II.2.3	Extraction et fractionnement des tanins oligomériques	48
II.2.4	Extraction des tanins polymériques.....	48
II.2.5	Fractionnement de la fraction polymérique en fonction du DPm (Degré de Polymérisation moyen).....	48
II.2.5.1	Fractionnement de la fraction polymérique en fonction du DPm sur poudre de verre	48
II.2.5.2	Fractionnement de la fraction polymérique en fonction du DPm sur Rélite SP411 et LCC-Microsphères-DVB-450-1200.....	49
II.2.6	Schéma récapitulatif de l'extraction et du fractionnement des tanins du raisin	50
II.3	METHODES D'ANALYSE DES TANINS	51
II.3.1	Thiolyse.....	51
II.3.2	Hydrolyse enzymatique	51
II.4	TESTS BIOLOGIQUES	51
II.5	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE A HAUTE PERFORMANCE (HPLC)	53
II.5.1	Qualité des solvants utilisés	53
II.5.2	Préparation des échantillons.....	53
II.5.3	Instrumentation	53
II.5.4	Programmes HPLC	54
II.5.4.1	Programme HPLC « Thiolyse »	54
II.5.4.2	Programme HPLC « Stilbènes »	54
II.5.4.3	Programme HPLC « Phase normale »	55
II.5.4.4	Programme HPLC « Les oligomères ».....	55
II.6	DETERMINATION DU TEMPS DE RETENTION DU PTEROSTILBENE SUR DIFFERENTES COLONNES HPLC	56
II.6.1	Colonne RP-C ₁₈ Lichrospher-100, 5 µm, 250x4 mm.....	56
II.6.2	Colonne RP-C ₁₈ Nucleosil-100, 7 µm, 250x4.6 mm.....	56
II.7	TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES ET SPECTROMETRIQUES	57
II.7.1	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	57
II.7.2	Spectrométrie de Masse (MS).....	57

II.7.2.1	ESI-QIT/MS	57
II.7.2.2	LC/MS	57
II.7.2.3	ESI-FT-ICR/MS	58
II.7.2.4	MALDI-TOF/MS (home built, ETH, Zürich)	59
II.7.2.5	MALDI-TOF/MS (Dynamo, Thermo Bioanalysis).....	59
II.8	ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'É-VINIFERINE.....	60
II.9	SYNTHÈSE ET PURIFICATION DU RESVERATROL <i>TRANS</i> -DEHYDRODIMÈRE.....	61
II.10	SYNTHÈSE DU PTEROSTILBÈNE	62
II.10.1	<i>Produits et réactifs utilisés</i>	62
II.10.2	<i>Chromatographie sur Couche Mince (CCM)</i>	62
II.10.3	<i>La Chromatographie Liquide à Basse Pression (LPLC)</i>	62
II.10.3.1	Synthèse du 4-(3,5-diméthoxy-benzylidène)-2-phényl-4H-oxazol-5-one	62
II.10.3.2	Synthèse de l'acide 3,5-diméthoxy-phényl acétique	63
II.10.3.3	Synthèse du 4-[2-(3,5-diméthoxy-phényl)-vinyl]-phénol.....	64
III	DEVELOPPEMENT DE METHODES POUR L'ANALYSE DES TANINS	67
III.1	EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DES TANINS	67
III.1.1	<i>Analyse par HPLC des extraits bruts de Gamay et de Gamaret</i>	67
III.1.2	<i>Fractionnement des tanins oligomériques</i>	69
III.1.3	<i>Extraction des tanins polymériques</i>	70
III.1.4	<i>Détermination du degré de polymérisation moyen (DPm) par thiololyse</i>	70
III.1.5	<i>Fractionnement de la fraction polymérique en fonction du degré de polymérisation moyen (DPm)</i>	74
III.1.5.1	Fractionnement de la fraction polymérique sur poudre de verre.....	74
III.1.5.2	Fractionnement de la fraction polymérique sur résines	75
III.2	HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA FRACTION POLYMERIQUE.....	78
III.3	RECHERCHE DU PTEROSTILBÈNE DANS LES FRACTIONS OLIGOMERIQUES.....	80
IV	CARACTERISATION DES TANINS PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.....	83
IV.1	FRAGMENTATION ESI-MS ^N DES TANINS OLIGOMERIQUES	84
IV.2	CARACTERISATION DES TANINS OLIGOMERIQUES PAR LC/ESI-MS	88
IV.2.1	<i>Développement d'une méthode ESI-MS, sensible pour les tanins oligomériques</i>	89
IV.2.2	<i>Analyse LC/MS en mode SIM des fractions oligomériques</i>	89
IV.2.3	<i>Analyse LC/MS en mode « Dependant Scan Event » des fractions oligomériques</i>	92
IV.3	CARACTERISATION DE L'EXTRAIT DE TANINS POLYMERIQUES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	94

IV.3.1	Analyse par des tanins polymériques par ESI/QIT/MS (LCQ, Thermofinnigan).....	94
IV.3.2	Analyse des tanins polymériques par ESI/FT-ICR/MS (BioApex II, Bruker)	97
IV.3.3	Analyse des tanins polymériques par MALDI-TOF/MS et SALDI-TOF/MS (home built, ETH, Zürich)	101
IV.3.4	Analyse des tanins par MALDI-TOF/MS (Dynamo, Thermo Bioanalysis) ..	104
IV.4	ANALYSE DES FRACTIONS EN FONCTION DU DPM	109
V	CARACTERISATION DU RESVERATROL TRANS-DEHYDRODIMERE ET DE L'E-VINIFERINE	114
V.1	STRUCTURE DU RESVERATROL TRANS-DEHYDRODIMERE.....	114
V.2	L'ε-VINIFERINE.....	118
VI	TESTS BIOLOGIQUES	123
VI.1	TESTS BIOLOGIQUES SUR LES FRACTIONS POLYMERIQUES PROVENANT DE GRAPPES CUEILLIES EN 1995 EN FONCTION DE LEUR MATURITE.....	124
VI.1.1	Dpm des fractions polymériques en fonction de la date de cueillette.....	124
VI.1.2	Pouvoir inhibiteur des fractions en fonction de la date de cueillette	125
VI.2	TESTS BIOLOGIQUES SUR LES FRACTIONS OLIGOMERIQUES PROVENANT DE GRAPPES CUEILLIES EN 1999.....	127
VI.3	TESTS BIOLOGIQUES SUR LES FRACTIONS DPM PROVENANT DE GRAPPES CUEILLIES EN 1999	129
VI.4	CONCLUSION	130
VII	DISCUSSION	133
VII.1	ORIGINE BIOSYNTHETIQUE DES COMPOSES.....	133
VII.2	ACTIVITE BIOLOGIQUE DES STILBENES	141
VII.3	ACTIVITES BIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DES TANINS	142
VII.3.1	Complexation métal-ion.....	143
VII.3.2	Activité antioxydante.....	143
VII.3.3	Complexation des polyphenols avec les protéines et les polysaccharides	144
VII.4	ANALYSE DES TANINS INHIBITEURS DE LA STILBENE OXYDASE.....	144
VII.5	ANALYSE DES TANINS PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	146
VIII	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	148
VIII.1	CONCLUSION	148
VIII.2	PERSPECTIVES	149
IX	BIBLIOGRAPHIE.....	151

RESUME

Botrytis cinerea est le champignon pathogène responsable de la pourriture grise. Cette maladie est économiquement importante, car elle détruit chaque année une partie des récoltes viticoles et horticolas (fraises, concombres, tomates...).

Ce champignon infecte les baies de raisin à la floraison, mais reste latent durant toute la période estivale pour reprendre son développement à la véraison, provoquant le pourrissement de la grappe. Certaines variétés, comme le Gamaret, sont résistantes à l'attaque par *Botrytis cinerea* et d'autres, comme le Gamay, y sont très sensibles. Ce phénomène de latence serait entre autre attribué à la production de phytoalexines par la vigne (resvératrol (**1**), pterostilbène (**2**) et ϵ -viniférine (**3**)) inhibant le développement du champignon de juin à septembre.

Le resvératrol et le pterostilbène font partie de la famille des stilbènes et sont des composés synthétisés par la plante suite à un stress. Ces molécules peuvent s'oxyder sous l'action d'enzymes, la stilbène oxydase et les peroxydases, pour former respectivement le resvératrol *trans*-déhydrodimère (**4**), le pterostilbène déhydrodimère (**5**) et l' ϵ -viniférine. Le resvératrol est faiblement toxique envers *Botrytis cinerea*, ce qui n'est pas le cas pour le pterostilbène, qui est le composé le plus actif synthétisé par la plante. L' ϵ -viniférine et le resvératrol *trans*-déhydrodimère montrent une toxicité modérée contre le champignon. Quant au pterostilbène déhydrodimère, il est totalement inactif envers *Botrytis cinerea*. Lors d'un stress abiotique (par exemple l'attaque par un agent pathogène), la concentration de resvératrol augmente, alors que le pterostilbène tend à disparaître complètement.

La stilbène oxydase est une enzyme produite par *Botrytis cinerea* qui est donc capable d'oxyder les stilbènes. Cette enzyme est inhibée par les tanins présents dans la plante.

Ce travail met en évidence l'inhibition de l'enzyme par les tanins extraits de Gamay et de Gamaret en fonction de leur poids moléculaire et de la maturité du raisin.

Les tanins de la grappe sont composés d'un mélange de proanthocyanidines et de proanthocyanidines galloylées. Ces molécules sont reliées entre-elles par une liaison carbone-carbone, formant un polymère de taille variable (entre 2 et 50 unités monomériques). Ces composés sont très polaires dû à un grand nombre de groupements hydroxyles, et de ce fait, sont difficile à séparer et à analyser. La spectrométrie de masse s'est avérée être la méthode de choix pour la caractérisation de ces polymères.

La deuxième partie de ce travail décrit le développement de méthodes d'analyse des tanins par différentes techniques en spectrométrie de masse.

Malgré l'utilisation d'ionisations douces, telle que l'électrospray, il n'a pas été possible de détecter des ions au-delà de 3000 uma. L'utilisation de différents types d'analyseurs (*Ion Trap* et FT-ICR/MS) ne n'a pas permis de contrer ce problème. De ce fait, nous avons

utilisé la technique d'ionisation MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) couplé a un analyseur TOF (*Time-Of-Flight*). Les résultats obtenus permettent de détecter des ions au-delà de 4000 uma.

SUMMARY

Grey mould is one of the most important diseases of grapes. Flowering clusters are infected by the fungus *Botrytis cinerea*, but it does not develop until ripening. This latency is probably maintained by an unfavourable environment, corresponding to the production of phytoalexins (resveratrol **(1)**, pterostilbene **(2)** and ϵ -viniferin **(3)**). Some varieties, as Gamaret, are very resistant to the fungus and some, as Gamay, are very sensitive.

These stilbenic compounds are present in vine at low concentration. Enzymes, such as stilbene oxidase and peroxidases, are able to oxidize these molecules to form, respectively, resveratrol *trans*-dehydrodimer **(4)**, pterostilbene dehydrodimer **(5)** and ϵ -viniferin.

As described in the literature, resveratrol is not toxic against *Botrytis cinerea*, compared to pterostilbene, which is the most toxic compound produced by the plant. ϵ -viniferin and resveratrol *trans*-dehydrodimer show higher activity than resveratrol. Pterostilbene dehydrodimer is not active against the fungus. Under stress (for example, when the plant is attacked by a pathogen agent), the concentration of resveratrol increases and the pterostilbene tends to disappear.

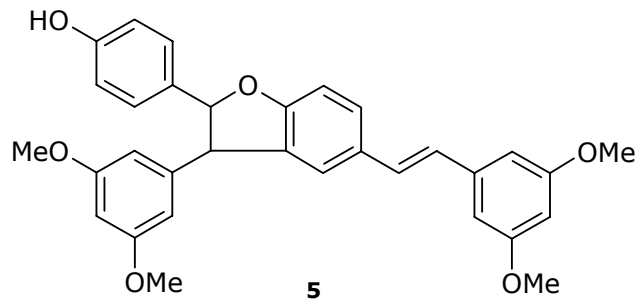
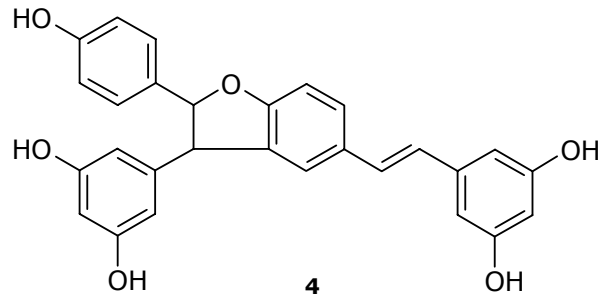
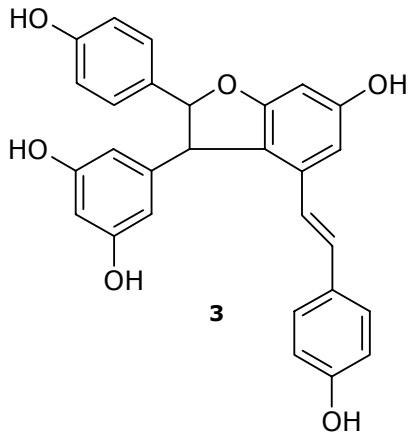
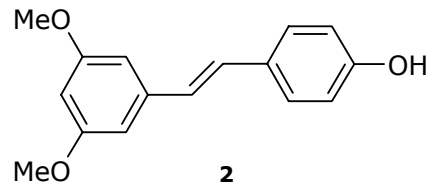
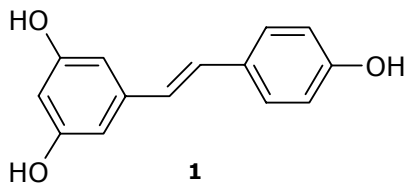
Stilbene oxidase is an enzyme produced by *Botrytis cinerea*, which might oxidize stilbenic compounds. The tannins present in the grape inhibit this enzyme.

This work describes the enzyme inhibition by tannins extracted from Gamay and Gamaret varieties according to their molecular weights and grape maturity.

Grape tannins are composed of proanthocyanidins and galloylated proanthocyanidins. These molecules are linked by a carbon-carbon bond, generating a polymer of various size (between 2 or 50 monomeric units). These compounds are very polar and thereby difficult to separate and analyse. Mass spectrometry is a suitable method for the analysis of such polymers.

The second part of this work describes the development of new analytical methods for the characterization of tannins by mass spectrometry.

Soft ionization as electrospray, did not allow the detection of ions up to 3000 uma. The use of different analysers such as Ion Trap and FT-ICR/MS did not help us for solving this problem. For that reason, we tried the MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) ionization technique coupled to a Time-Of-Flight analyser, which permits the detection of higher masses up to 4000 uma.



CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

I INTRODUCTION GENERALE

I.1 LA VIGNE

Les vignes cultivées ou sauvages appartiennent au genre *Vitis* [1]. Le premier groupe, dit eurasiatique, ne comporte qu'une seule espèce, *Vitis vinifera* Linné. Celle-ci comprend un archétype, *Vitis vinifera silvestris*, qui est la vigne sauvage et *Vitis vinifera sativa*, qui est la vigne cultivée. Les innombrables variétés de *V. silvestris* sont couramment désignées par le terme générique de lambrusque. En Europe, cette vigne sauvage a pratiquement disparue aussi bien sous l'effet du mildiou ou du phylloxéra que des réaménagements territoriaux ou de la disparition des forêts vierges. La vigne cultivée, *Vitis vinifera sativa*, comprend des milliers de variétés ou cépages, à l'intérieur desquels il n'a guère été possible de procéder à des classifications poussées.

Le deuxième groupe, dit groupe asiatique, comprend un peu plus de 10 espèces souvent peu étudiées, dont la plus commune est *Vitis amurensis*. Cette espèce produit de petites baies possédant une saveur très sucrée. Elle est assez sensible au phylloxera, très résistante au mildiou et au froid de l'hiver.

Le troisième groupe, dit groupe américain, possède une vingtaine d'espèces (ex. : *V. riparia*, *V. lambrusca*, *V. rupestris*) qui sont distribuées de manière hétérogène sur le continent.

La domestication de la vigne s'est effectuée peu à peu par le prélèvement de boutures sur les vignes sauvages (pinot, riesling, kadarka, rkatsiteli, rosaki). D'autres cépages sont des clones obtenus à partir d'un seul pied issu de semis (alicante, bouschet, italia, müller-thurgau). Selon les cépages, on distingue les raisins de table et les raisins de cuve.

La vigne se cultive dans les régions chaudes et très ensoleillées, préférentiellement sur les flans des coteaux. La qualité et le goût du fruit dépendent essentiellement des composants minéraux liés à l'origine géologique.

I.2 LES COMPOSES PHENOLIQUES DU RAISIN

Le raisin, fruit de la vigne, contient à sa maturité principalement de l'eau et des sucres (glucose, fructose, pectine et polysaccharides). Il possède aussi d'autres composés comme, des terpènes (citrol, geraniol...), des flavones, des aldéhydes (éthanal, propanal, vanilline...), des anthocyanes (responsables de la couleur) et des tanins.

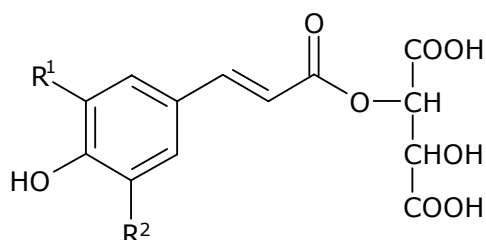
Les composés phénoliques sont des constituants importants du raisin. Ils sont caractérisés par la présence d'un noyau benzénique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles, pouvant être acylés ou glucosylés. Leur nomenclature est basée sur la distinction entre les composés non-flavonoïdes et les flavonoïdes.

I.2.1 Les composés non-flavonoïdes

Les composés non-flavonoïdes regroupent les acides phénoliques ainsi que les stilbènes. Ils ne possèdent pas de squelette « flavone ».

I.2.1.1 Les acides phénoliques

On distingue tout d'abord les dérivés de l'acide benzoïque, composés d'un squelette à sept carbones. Ils sont principalement représentés dans le raisin par l'acide gallique, qui est généralement lié par une liaison ester à l'épicatéchine (cf. chapitre I.2.2.1). D'autres composés phénoliques sont également présents, comme les dérivés d'esters hydroxycinnamiques possédant une structure du type C6-C3 (Figure I.2-1). Les composés les plus fréquents sont l'acide *p*-coumarique, l'acide *t*-caféique l'acide *t*-fertarique et l'acide *t*-sinapique [2;3].



Esters hydroxycinnamiques	R ₁	R ₂
Acide <i>t</i> -caféique	OH	H
Acide <i>p</i> -coumarique	H	H
Acide <i>t</i> -fertarique	OCH ₃	H
Acide <i>t</i> -sinapique	OCH ₃	OCH ₃

Figure I.2-1: Structures chimiques de quelques dérivés de l'ester hydroxycinnamique présents dans les raisins.

I.2.1.2 Les stilbènes

Les stilbènes sont des composés phénoliques contenant au minimum deux noyaux aromatiques reliés par une double liaison, formant un système conjugué. Cette

particularité leur confère une grande réactivité due à la résonance des électrons sur la totalité de la molécule. Les plus abondants dans le raisin sont le *trans*-resvératrol et son dérivé glucosylé : le picéide, ainsi que les dimères : le resvératrol *trans*-déhydrodimère et l' ϵ -viniférine (Figure I.2-2 et Figure I.2-3) [4;5].

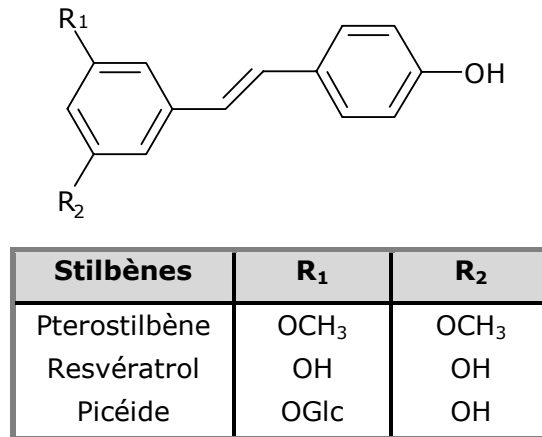


Figure I.2-2: Structures chimiques de quelques stilbènes.

Ce type de molécules existe aussi sous la forme de dérivés trimériques jusqu'à pentamériques [6-13]. Les stilbènes sont connus pour leurs propriétés antioxydantes vis-à-vis des lipoprotéines à basse densité (LDL). Ils pourraient ainsi jouer un rôle protecteur contre les maladies cardiovasculaires [14]. On leur attribue aussi des activités chimiopréventives contre le cancer [15].

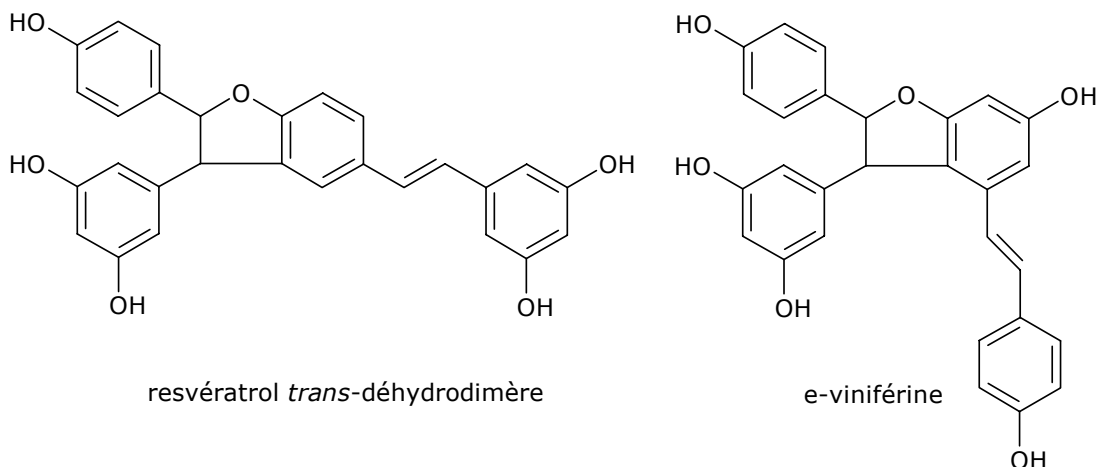


Figure I.2-3: Dimères de stilbènes.

I.2.2 Les composés flavonoïdes

Les composés flavonoïdes sont formés d'un squelette de base à 15 carbones (C₆-C₃-C₆), correspondant à la structure de la 2-phényl-benzopyrone (Figure I.2-4). Au sens large du terme, ce groupe comprend principalement trois familles de composés : les flavonols, les

anthocyanes et les flavan-3-ols, qui se différencient par le degré d'oxydation du noyau pyranique central [16].

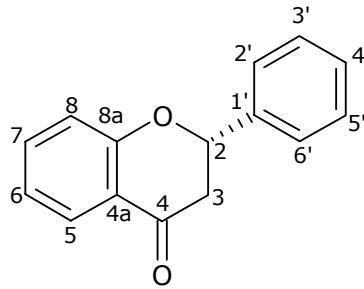
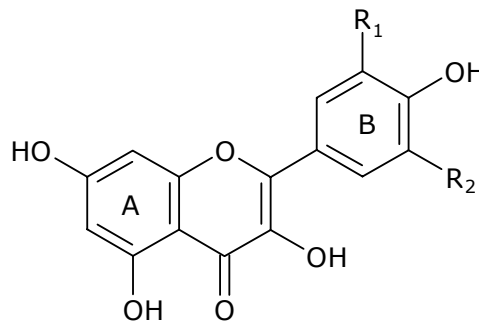


Figure I.2-4: Structure chimique de la 2-phényl-benzopyrone.

I.2.2.1 Les flavonols

Quatre flavonols sont majoritairement présents dans le raisin: Le kaempférol, la quercétine, la myricétine et l'isorhamnéthine (Figure I.2-5). Les dérivés de la quercétine sont toujours prédominants. Ceux de la myricétine semblent être spécifiques aux variétés de raisins rouges [17]. On leur attribue des propriétés bénéfiques dans le traitement des maladies du cœur et des cancers [18-20] ou encore des activités antitumorales et chimiopréventives [21].



Flavonols	R ₁	R ₂
Kaempferol	H	H
Quercétine	OH	H
Myricétine	OH	OH
Isorhamétine	OCH ₃	H

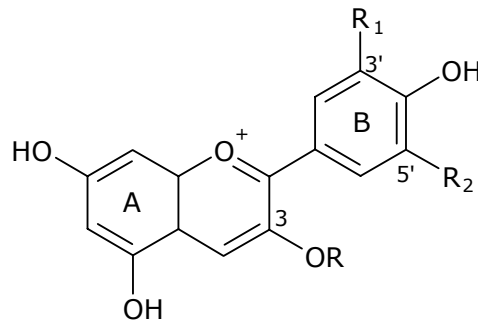
Figure I.2-5: Structures chimiques de quelques flavonols présents dans le raisin.

I.2.2.2 Les anthocyanes

Les anthocyanes jouent un rôle prépondérant dans la coloration des raisins rouges. Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavone » généralement glucosylé en

Introduction générale

position C-3 [22]. Les anthocyanes se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation, par la nature, le nombre et la position des oses liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment. On distingue cinq anthocyanidines dans le genre *Vitis* : La cyanidine, la péonidine, la delphinidine, la pétunidine et la malvidine (Figure I.2-6).



Anthocyanidines R*=H	R ₁	R ₂
Malvidine	OCH ₃	OCH ₃
Péonidine	OCH ₃	H
Delphinidine	OH	OH
Pétunidine	OCH ₃	OH
Cyanidine	OH	H

* : Forme monoglucoside, R=glucose

Figure I.2-6: Structures chimiques de quelques anthocyanidines.

Contrairement à d'autres espèces qui présentent des teneurs importantes en anthocyanes diglucosylées en position C-3' et C-5', l'espèce *Vitis vinifera* n'en contient que des traces et se caractérise par la présence majoritaire de 3-monoglucosides d'anthocyanidines, en particulier de la malvidine 3-O-glucoside et de ses dérivés acylés [23].

Le pH est un facteur important dans le changement de couleur des anthocyanes. La forme flavylium, de couleur rouge, est stable en milieu acide et se transforme, en milieu basique, soit en base carbinol (incolore), en chalcone (jaune) ou base quinonique (bleue). Pour la malvidine-3-O-glucoside, la forme hémiacétal (AOH) est largement majoritaire (Figure I.2-7). Toutefois, le cation flavylium est en quantité suffisante pour que sa couleur rouge prédomine.

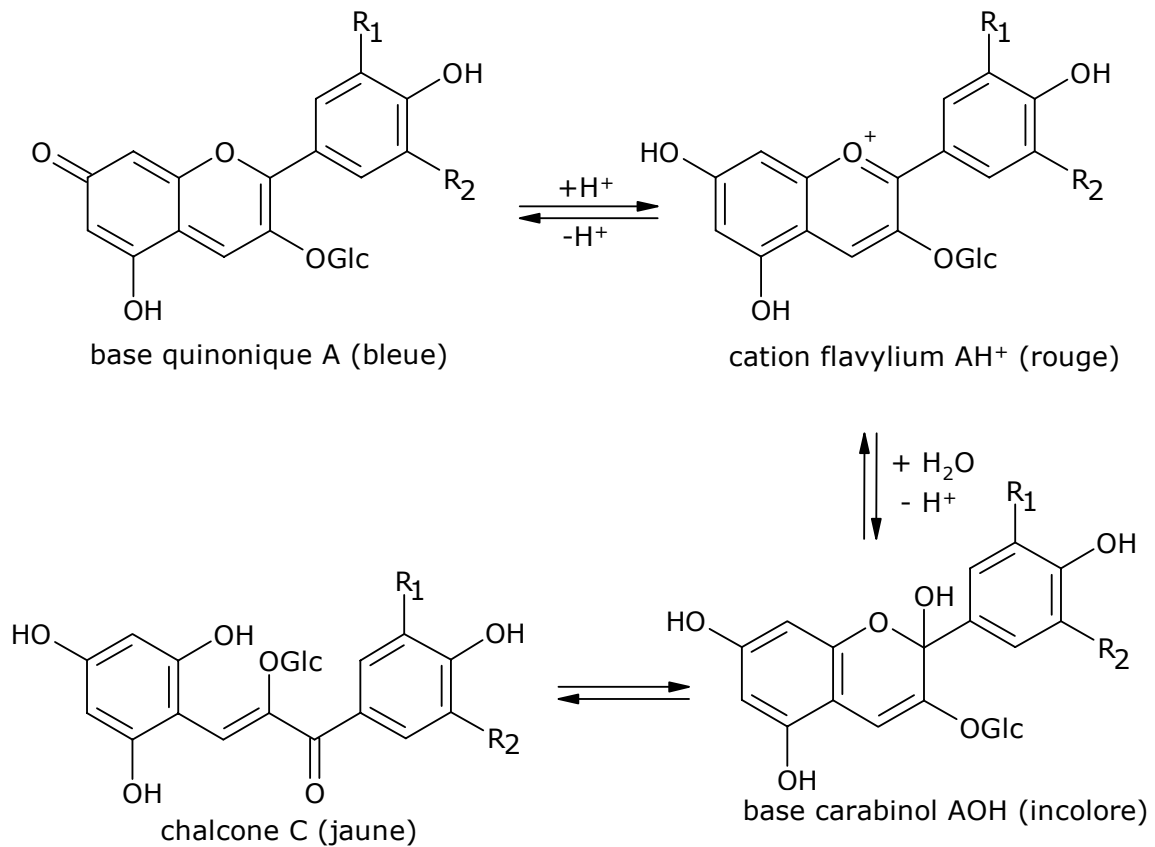


Figure I.2-7: Transformation de la structure de la malvidine-3-O-glucoside en milieu aqueux [17].

1.2.2.3 Les tanins condensés (flavan-3-ols)

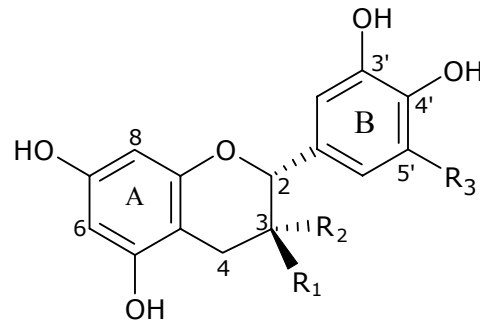
Les tanins condensés, appelés aussi polyphénols ou proanthocyanidines, sont largement répandus dans notre alimentation (fruits, vin, thé...) et jouent un rôle important dans les qualités organoleptiques et nutritionnelles des produits et spécialement des vins [24;25]. Dans la baie de raisin, la pellicule et les pépins sont les zones de concentration des tanins et des composés phénoliques [26-28]. Leur structure complexe est formée d'unités répétitives monomériques qui varient par leurs centres asymétriques, leur degré d'oxydation et leur nombre de substituants galloylés [29].

➤ Les unités monomériques

Les formes naturelles monomériques des flavan-3-ols se différencient par la stéréochimie des carbones asymétriques C-2 et C-3 et par le niveau d'hydroxylation du noyau B (Figure I.2-8). On distingue ainsi les catéchine (dihydroxylées) des gallocatéchine (trihydroxylées). Ces dernières n'ont pas été identifiées dans le raisin sous leurs formes

Introduction générale

monomériques, mais leur présence dans les formes polymériques, notamment dans les pellicules de *Vitis vinifera*, implique leur existence en tant que monomère [28].



Flavanols	R ₃	R ₁	R ₂
(+)-catéchine	H	OH	H
(-)-épicatéchine	H	H	OH
(+)-gallocatéchine	OH	OH	H
(-)-épigallocatéchine	OH	H	OH

Figure I.2-8: Structures chimiques des unités monomériques constitutives des tanins condensés.

Ces unités peuvent être substituées par l'acide gallique en position C-3, en particulier la (-)-épicatéchine, formant l'(-)-épicatéchine-3-O-gallate (Figure I.2-9) [30-32].

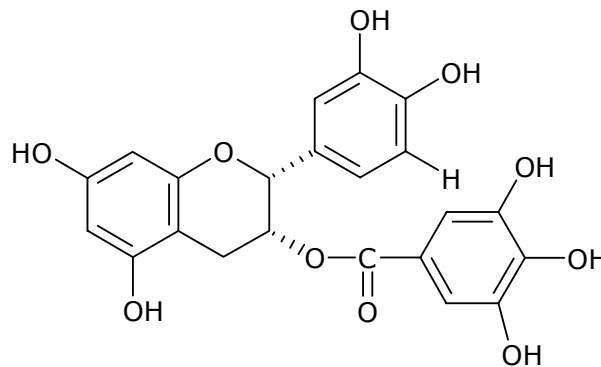


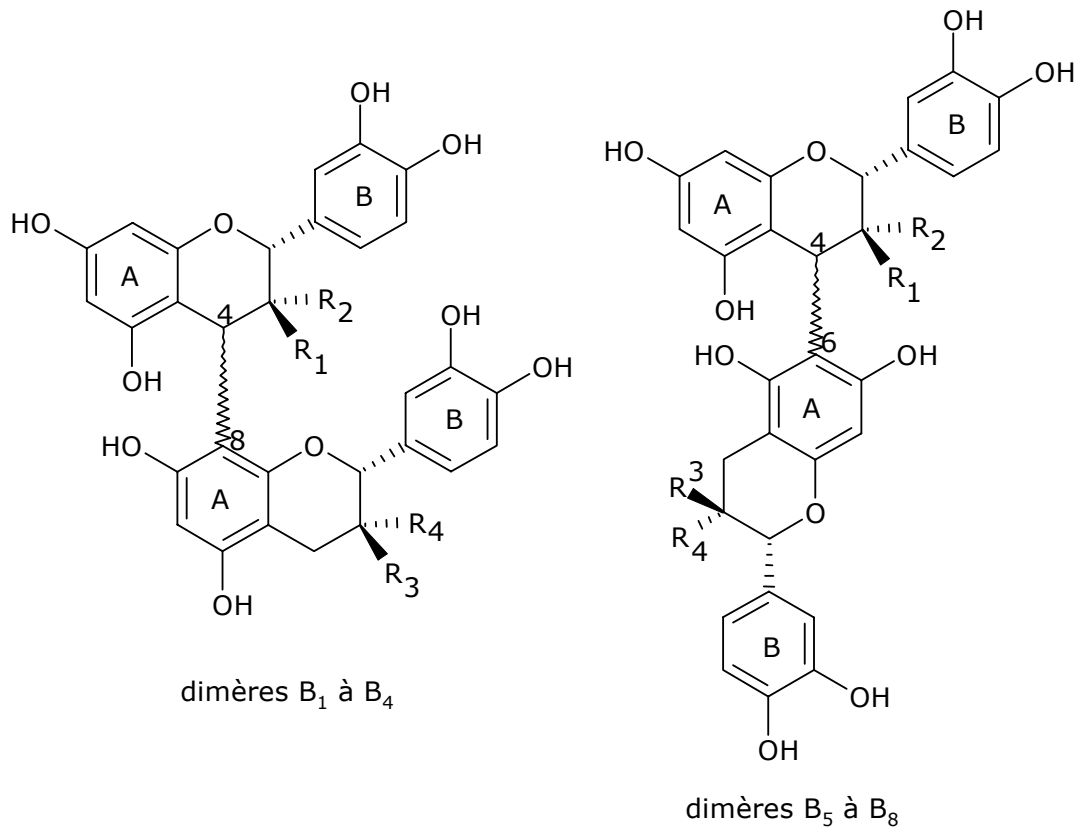
Figure I.2-9: Structure de l'(-)-épicatéchine-3-O-gallate.

➤ Les tanins condensés (type A et B)

Les tanins condensés ou proanthocyanidines sont des oligomères ou polymères de flavan-3-ols qui ont la propriété de libérer des anthocyanes en milieu acide, à chaud, par rupture de la liaison intermonomérique [33;34]. Dans le raisin on distingue deux types de proanthocyanidines suivant la nature de l'anthocyane libérée. D'une part, les

procyanidines (polymères de catéchine et d'épicatéchine), libèrent de la cyanidine ; d'autre part, les prodelphinidines (polymères de gallocatéchine et d'épigallocatéchine), libèrent de la delphinidine [35].

Les proanthocyanidines se distinguent par leur nombre d'unités monomériques et le type de liaison les reliant entre-elles. Ainsi, une trentaine de proanthocyanidines dimériques, trimériques et tétramériques ont déjà été identifiées [32;36-38]. Le type B se caractérise par une liaison intermonomérique qui peut être soit C4-C8 ou C4-C6, de conformation *trans* par rapport à l'hydroxyle en position C-3. La stéréochimie du carbone C-2 est généralement (R), mais il existe quelques exceptions. Les structures des principaux dimères de type B du raisin sont représentés par la Figure I.2-10. Les proanthocyanidines de type A contiennent une liaison éther supplémentaire entre le carbone C-2 et les hydroxyles 5 ou 7 du noyau A (Figure I.2-11) [24].



Dimères	Noms	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
B ₁	épicatéchine-(4β→8)-catéchine	H	OH	OH	H
B ₂	épicatéchine-(4β→8)-épicatéchine	H	OH	H	OH
B ₃	catéchine-(4α→8)-catéchine	OH	H	OH	H
B ₄	catéchine-(4α→8)-épicatéchine	OH	H	H	OH
B ₅	épicatéchine-(4β→6)-épicatéchine	H	OH	H	OH
B ₆	catéchine-(4α→6)-catéchine	OH	H	OH	H
B ₇	épicatéchine-(4β→6)-catéchine	H	OH	OH	H
B ₈	catéchine-(4α→6)-épicatéchine	OH	H	H	OH

Figure I.2-10: Structures chimiques des proanthocyanidines dimériques de type B.

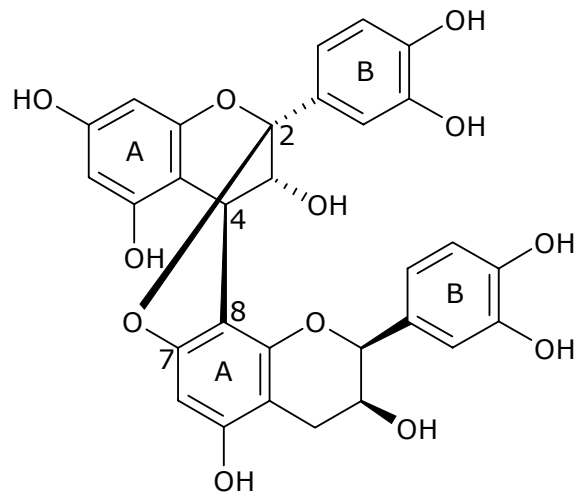


Figure I.2-11: Proanthocyanidine A-2

Les flavan-3-ols, présents dans le raisin, se rencontrent majoritairement sous la forme de polymères. Les tanins de pépins sont constitués de procyanidines partiellement galloylées [39], alors que ceux des pellicules contiennent également des prodéphinidines [28].

La Figure I.2-12 représente la structure d'une procyanidine polymérique. On y distingue l'unité supérieure, les unités intermédiaires et l'unité inférieure. Les unités monomériques se répartissent indifféremment dans le polymère, aussi bien dans les unités supérieures qu'en position terminale. Toutefois, on note la prédominance de l'épicatéchine (galloylée ou non) dans les unités supérieures [28].

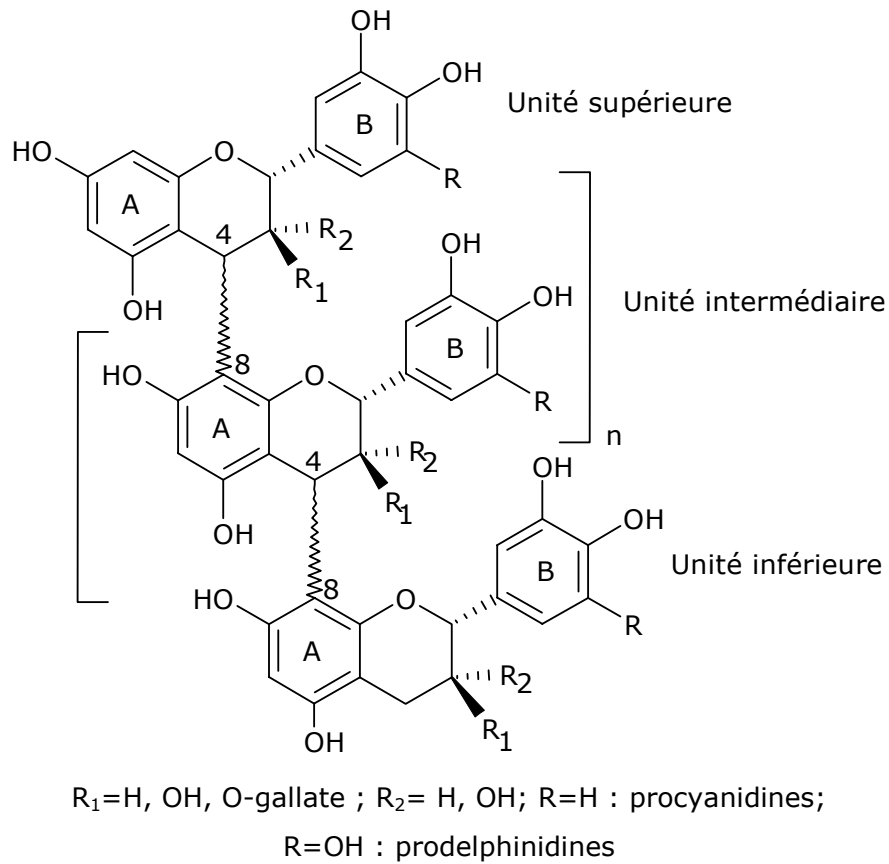


Figure I.2-12: Variations possibles de la structure polymérique d'un tanin condensé (proanthocyanidine ou prodelphinidine)

Le nombre moyen d'unités monomériques, défini comme le degré moyen de polymérisation (DPM) (cf. chapitre VII.3), peut aller jusqu'à 18 dans une fraction issue de pépins [38] et avoisine les 30 unités dans un extrait de pellicule [28].

D'importants travaux ont mis en évidence certaines propriétés biologiques et pharmaceutiques des tanins (cf. chapitre III) : antivirales [24], antitumorales et chimiopréventives [21]. Ce sont également des antioxydants capables de piéger les radicaux libres [35;40-43]. Notons le travail de *E. Haslam* (1998) [24], qui a résumé de façon générale les propriétés physiologiques de ces composés.

I.3 LES MALADIES CRYPTOGAMIQUES DE LA VIGNE

Les champignons sont des organismes ne possédant ni chlorophylle ni tissus constructeurs. La plupart des 10'000 espèces de mycètes classifiées sont saprophytes (organisme dont la nutrition est assurée directement à partir de matières organiques en décomposition), dont une partie sont connues comme pathogènes envers les plantes.

Certains champignons peuvent provoquer des nécroses locales ou complètes des tissus, une hypoplasie (retard dans le développement de la plante) ou une hyperplasie (croissance accrue d'une partie ou de la totalité de la plante). Dû souvent à l'absence de traitements efficaces, ces maladies détruisent partiellement les cultures et sont à l'origine de beaucoup de problèmes économiques [44;45].

Les maladies de la vigne sont principalement générées par des champignons pathogènes. Ces derniers peuvent s'attaquer à toutes les parties de la plante, c'est le cas de :

➤ ***Uncinula necator* : responsable de l'oïdium**

Ce champignon est originaire d'Amérique du Nord. Il a été introduit en Europe pour la première fois en 1845. L'oïdium s'attaque à tous les organes verts de la plante et provoque la destruction complète de la récolte si aucune mesure prophylactique n'est appliquée à temps. L'oïdium hiverne sous la forme de mycélium dans les bourgeons dormants ou dans l'écorce des ceps. Au printemps, le champignon se développe de manière optimale entre 20 et 27°C avec un taux élevé d'humidité. Le fongicide de base est le soufre utilisé en poudrage. Il existe également des fongicides spécifiques contre cette maladie, mais ils sont susceptibles d'induire une résistance.

➤ ***Plasmopara viticola* : responsable du mildiou**

Importé d'Amérique en France vers 1878, le mildiou est rapidement devenu l'un des plus redoutables ennemis de la vigne dans la plupart des régions d'Europe. Tous les organes verts peuvent être infectés par le pathogène. Les symptômes sont la coloration jaunâtre de la cuticule et l'apparition de taches brunes sur les feuilles. Le champignon hiverne dans les feuilles mortes de la vigne, se propage au printemps lors de fortes précipitations et pénètre ensuite dans les tissus de l'hôte. Les moyens de lutte préventifs sont actuellement l'utilisation de fongicides spécifiques dès que les jeunes sarments atteignent la taille de 40-50 cm.

➤ *Elsinoe ampelina* : responsable de l'antracnose

Cette maladie est très répandue sur tous les continents. Ce champignon attaque tous les organes verts de la vigne, provoquant de petites perforations sur les feuilles et des chancres bordés de noir sur les rameaux et sur les baies. Les jeunes tissus sont très sensibles. L'infection peut alors provoquer un arrêt de la croissance des rameaux, la détérioration des porte-greffes et une réduction du nombre de fruits produits. On combat cette maladie par un traitement d'hiver ainsi que par des applications de fongicides en cours de végétation.

➤ *Guignardia bidwelli* : responsable du black rot

Cette maladie est originaire des Etats-Unis et sévit actuellement en France, en Italie et maintenant en Suisse. Ce champignon produit des ascospores (spores sexuées) qui provoquent des infections primaires sur les jeunes feuilles, aussitôt après le débourrement (stade phénologique dans le développement de la vigne, caractérisé par le dégagement des organes foliacés (ou floraux) des écailles duveteuses (bourre) et des bourgeons) par l'apparition de taches foliaire brunes. Ces taches, sur lesquelles le champignon sporule, provoquent une amplification de la maladie qui atteint les grappes et les dessèche. Les vignobles abandonnés représentent un danger réel d'extension de la maladie en répandant une quantité importante d'ascospores. La lutte doit être à la fois prophylactique, en supprimant tous les foyers primaires, et chimique, en assurant dès le débourrement une protection fongicide.

➤ *Phomopsis viticola* : responsable de l'excoriose

Cette maladie est apparue pour la première fois en Allemagne, en 1967, et s'est répandue très rapidement sur le continent européen. On trouve le parasite sur tous les organes de la vigne et c'est en hiver que les symptômes sont les plus visibles. Les bois attaqués ont une écorce blanche, couverte de minuscules points noirs. La contamination s'effectue très tôt au printemps ; elle est favorisée par un temps humide. La maladie se dissémine par la pluie, les oiseaux et les insectes. Un lessivage des ceps avec du dinitrocarbolinéum en hiver permet de lutter contre le champignon, mais ne permet pas son élimination. Un ou deux traitements avec des fongicides au débourrement limitent la dissémination de la maladie.

➤ *Pseudopezicula tracheiphila* : responsable du rougeot

Cette maladie touche tous les vignobles du Nord de l'Europe, mais préférentiellement la France et l'Allemagne. Le champignon attaque seulement les feuilles, rarement les rameaux. Les taches sont pâles, s'agrandissent et deviennent jaunes avec un liseré rouge (sur les cépages blancs) ou rouge foncé à bordure violette (sur les cépages rouges). Sur les feuilles basses et à mi-hauteur, le limbe peut être totalement envahi et sa destruction peut entraîner une défoliation précoce et un dessèchement des grappes avec réduction du rendement. Le champignon survit sous la forme de mycélium dans les feuilles mortes, sur le sol, formant des apothécies (réceptacle en forme de disque qui contient les organes de reproduction chez certains champignons) au début du printemps. Celles-ci atteignent la maturité lors de l'éclatement des bourgeons et produisent des ascospores sur une longue période. Les ascospores sont disséminées par le vent et germent dans un film d'eau sur les jeunes feuilles. La contamination nécessite une période de pluie ou une forte humidité relative pendant au moins 2 à 4 jours et des températures de 15 à 20°C. La lutte se fait par l'utilisation de fongicides à des intervalles réguliers à partir de l'éclatement des bourgeons.

➤ *Botrytis cinerea* : responsable de la pourriture grise

Cette maladie est décrite au chapitre 1.4.

➤ **L'esca et l'eutypiose**

Ces deux maladies sont principalement responsables de la destruction partielle de plusieurs vignobles en France. Les champignons impliqués s'attaquent directement à la charpente du cep et provoquent sa mort à plus ou moins brève échéance [45;46]. Il en résulte une diminution progressive de l'encépagement du vignoble. Ces maladies induisent non seulement une diminution de la récolte sur plusieurs années, mais aussi des frais de replantation.

I.4 LA POURRITURE GRISE

La pourriture grise est une des maladies les plus importantes de la vigne. Elle est générée par le champignon pathogène *Botrytis cinerea*. Son développement rapide, insidieux, engendre chaque année la destruction de centaines d'hectares de cultures viticoles [47].



Figure I.4-1: a) grappe de raisin atteinte par *Botrytis cinerea* b) agrandissement présentant la destruction de la grappe de raisin et la sporulation de *Botrytis cinerea*.

I.4.1 Le champignon *Botrytis cinerea*

Le genre *Botrytis* est actuellement classé parmi les Discomycètes inoperculés, de l'ordre des *Leotiales* et de la famille des *Sclerotiniaceae* [48]. Ce genre a été découvert pour la première fois en 1729 par *Pier Antonio Micheli* et il a été répertorié dans son livre « *Nova Plantarum Genera* » [49].

Les espèces *Botrytis* sont toutes pathogènes et saprophytes. La maladie se développe principalement sur les grappes de raisins, les petits fruits rouges, certains légumes (concombres, tomates) et les fleurs d'ornement [50;51]. On dénombre actuellement plus de 235 espèces sensibles à l'attaque par *Botrytis cinerea* [51].

I.4.1.1 Cycle de développement et de reproduction de *Botrytis cinerea*

Comme tout être vivant, il naît, se développe et se reproduit. La conidie (ou spore) est le point de départ de ce cycle. C'est une cellule unique, multinucléée, différenciée (qui a atteint son stade final de développement) et en dormance (qui maintient un niveau de métabolisme limité à sa survie). Sa viabilité est d'autant plus longue que la température et l'hygrométrie sont basses. Dans de bonnes conditions d'humidité et de température, son métabolisme s'active et elle se différencie, c'est-à-dire que sa dormance est levée et que les processus de division cellulaire sont activés. Elle va produire une première cellule fille, le tube germinatif, qui à son tour va se diviser et former un filament multicellulaire, l'hyphe. Celui-ci va former des hyphes latéraux qui vont s'entrecroiser en un réseau de plus en plus important, le mycélium. Des facteurs principalement nutritionnels et climatiques vont progressivement arrêter la croissance hyphale et induire la formation d'organes reproducteurs, les conidiophores, sur lesquels un grand nombre de conidies vont apparaître. Le mycélium donne également naissance à des amas mycéliens très denses, les sclérotes, considérés comme les organes de résistance du champignon durant l'hiver. Les sclérotes donnent naissance au printemps, à de nombreux conidiophores produisant des conidies (cf Figure I.4-2).

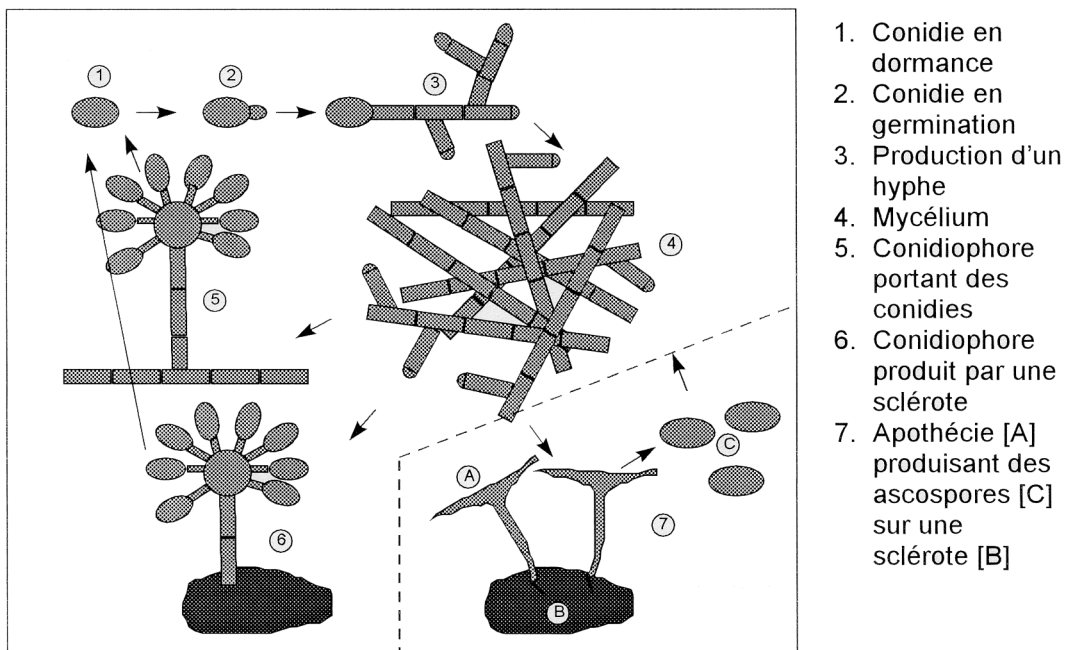


Figure I.4-2: Cycle biologique de *Botrytis cinerea*.

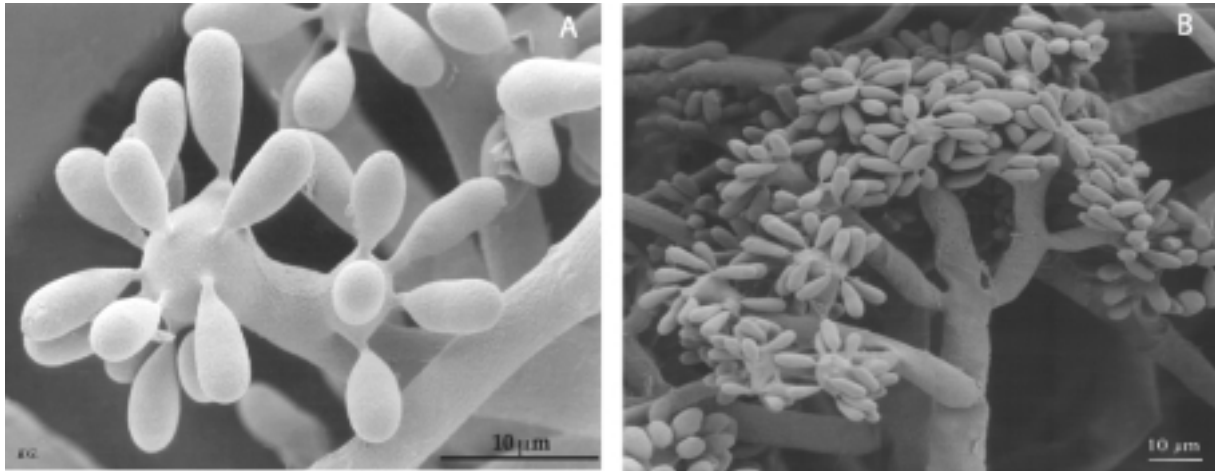


Figure I.4-3: a) Conidies sur un conidiophore b) Conidiophore ramifié ; conidies à un stade de développement homogène [48]. Photographies prises au microscope électronique.

1.4.1.2 Pathologie

L'infection des structures végétales peut se faire de différentes façons. Les tubes de germination des conidies peuvent passer à travers la barrière cuticulaire par action enzymatique, par les stomates (ouverture microscopique dans l'épiderme d'une feuille, éventuellement d'une tige, assurant les échanges gazeux entre la plante et l'atmosphère) ou par les blessures provoquées par des piqûres d'insectes. L'infection par du mycelium provenant de tissus morts de parties végétales infectées est aussi fréquente [50;51].

➤ Infection par action enzymatique :

Les conidies de *Botrytis cinerea* adhèrent à la plante par interactions hydrophobes entre leur paroi cellulaire et la cuticule du fruit [52]. Lors de leur germination, une cutinase est sécrétée, dissolvant la barrière cuticulaire de la plante et leur permettant ainsi d'atteindre l'épiderme [48]. A ce stade, *Botrytis cinerea* sécrète d'autres enzymes, les polygalacturonases (ou pectinases) dégradant la pectine (constituant du ciment cellulaire assurant la solidité des tissus) et s'infiltrer à l'intérieur de la baie.

➤ Infection par les stomates :

Certains mécanismes hôte-pathogène se font par la pénétration des tubes germinatifs par les stomates. Mais ce mode d'infection est une exception pour le genre *Botrytis*.

- Infections par le mycelium :

Botrytis cinerea se développe de façon limitée à la base des étamines déhiscentes, permettant ainsi la contamination directe des fruits par le champignon. L'infection par le mycelium se produit de fruit à fruit à la maturité de la grappe. Ce mécanisme est dépendant du milieu environnemental de la plante.

Le développement du champignon est favorisé par certains facteurs externes comme :

- L'humidité
- Les tissus morts
- La température
- Les lésions de la plante
- La lumière

I.4.1.3 La latence du développement de *Botrytis cinerea*

Après l'infection de la grappe en fleur par le champignon pathogène, celui-ci reste latent durant une longue période (juin à septembre). Il reprend son développement après la véraison de la grappe et provoque le pourrissement de celle-ci [53-55]. Durant cette période, le parasite reste sous sa forme dormante, accroché au végétal, et ne montre aucune croissance (Figure I.4-4).

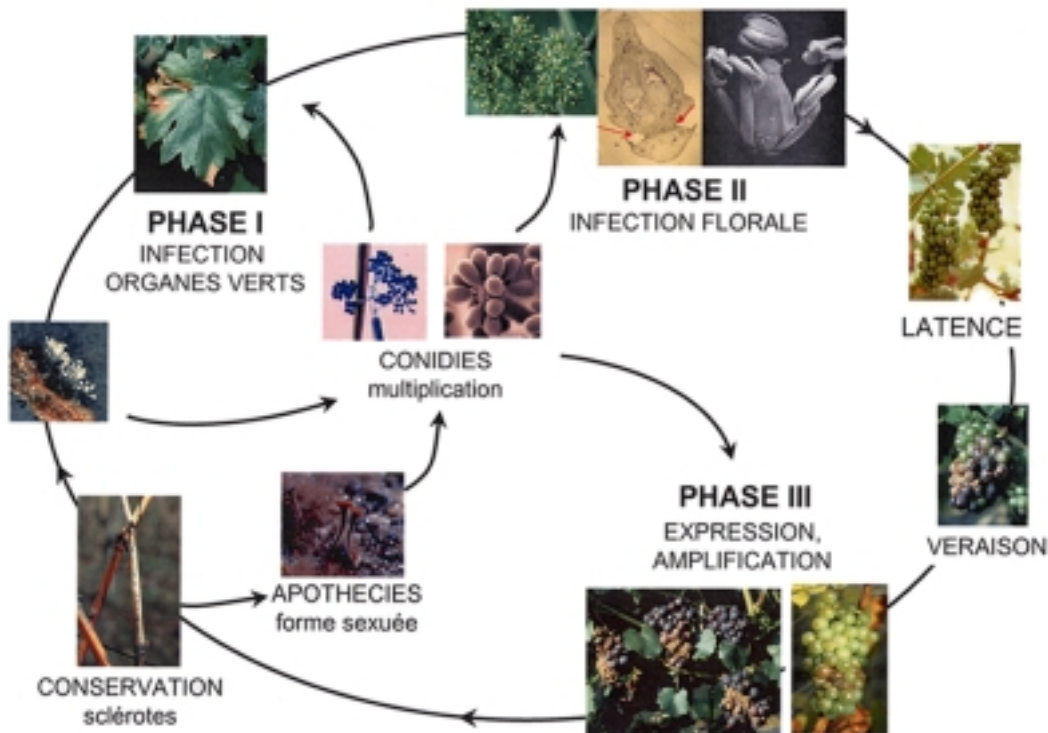


Figure I.4-4: Cycle d'infection et de développement de *Botrytis cinerea*.

Introduction générale

Le phénomène de latence, pendant lequel le champignon cesse son développement, n'a pas pu être expliqué. Des études ont mis en évidence certaines réactions hôte-parasite. L'hypothèse de l'accumulation rapide de composés antifongiques (resvératrol, resvératrol *trans*-déhydrodimère et ϵ -viniférine) par la vigne après infection par *Botrytis cinerea* a été mise en relation avec sa latence [56-59]. Des travaux ont confirmé la présence de composés stilbéniques, comme le pterostilbène, l' α et la β -viniférine [5;58;60-62]. Les structures ont été vérifiées par *W. Li* en 1996 [63] et par *A.-C. Breuil* en 1998 [64;65]. D'autres études mettent en avant la biosynthèse de ces composés lors de l'attaque par *Botrytis cinerea* [66-69]. Ces molécules sont synthétisées dans les feuilles et les baies lorsque la plante est attaquée par un champignon ou lorsqu'elles sont exposées à la lumière UV [58;70-72]. La stilbène oxydase est une enzyme produite par *Botrytis cinerea*. Les peroxydases sont produites par la plante [73]. Toutes deux sont capables d'oxyder les stilbènes monomériques pour former les dimères correspondants (Figure I.4-5) [64;65;69;74-76].

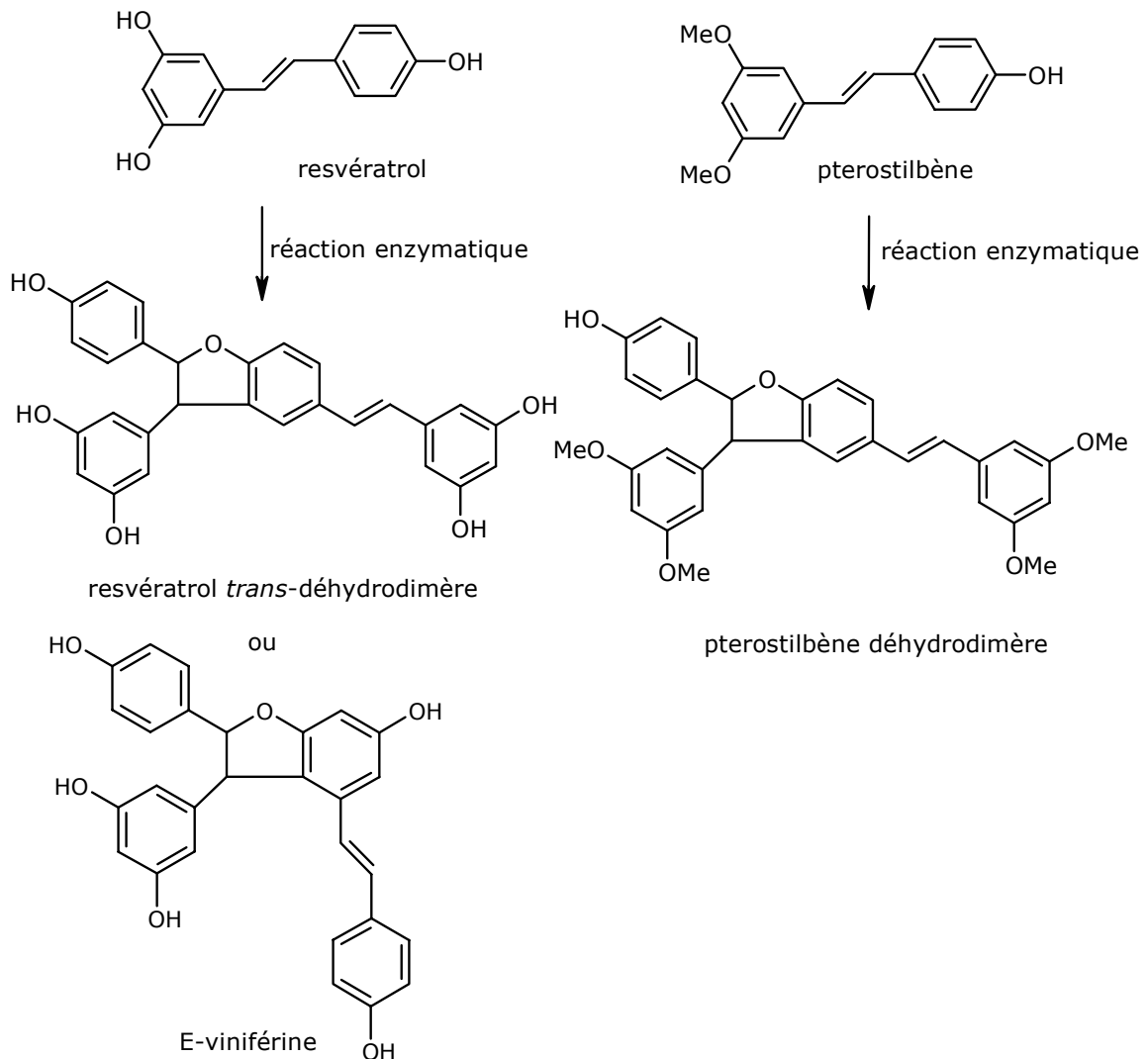


Figure I.4-5: Dimérisation du resvératrol et du pterostilbène par l'action d'enzymes (stilbène oxydase ou peroxydases).

Introduction générale

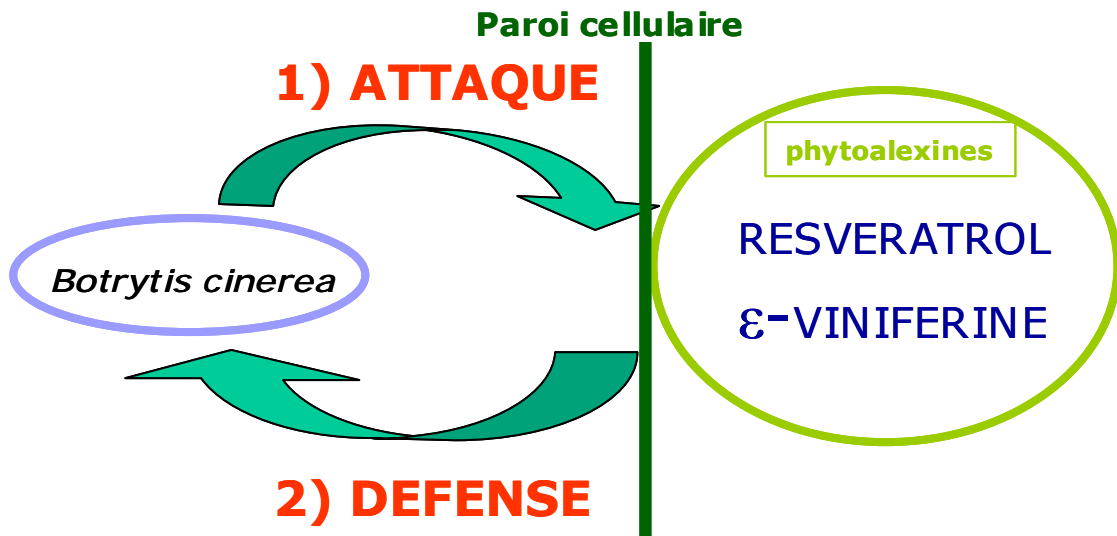
La stilbène oxydase oxyde le resvératrol et le pterostilbène pour former respectivement le resvératrol *trans*-déhydrodimère [77] et le pterostilbène déhydrodimère [65]. Quant aux peroxydases, elles dimérisent le resvératrol pour former l'ε-viniférine [69].

Les tanins, présents dans la vigne, inhibent la stilbène oxydase. Cette découverte a été publiée en 1982 par *Blaich* [59] puis présentée par le Dr. *R. Pezet* en 1992 [78] au 10^{ème} congrès international sur *Botrytis*. Aucune étude n'a été entreprise pour déterminer si les peroxydases sont aussi inhibées par les tanins. Le schéma de la page suivante illustre ce mécanisme de défense (Figure I.4-6).

Des travaux dirigés par le Dr. *R. Pezet*, ont été publiés sur la toxicité du pterostilbène envers les conidies de *Botrytis cinerea* [79].

L'enzyme stilbène oxydase a été par la suite isolée par le Dr. *R. Pezet* en 1998 [80].

1) Attaque de la plante par *Botrytis cinerea* et production de stilbènes



2) Production d'enzymes par *Botrytis cinerea*, inhibées par les tanins

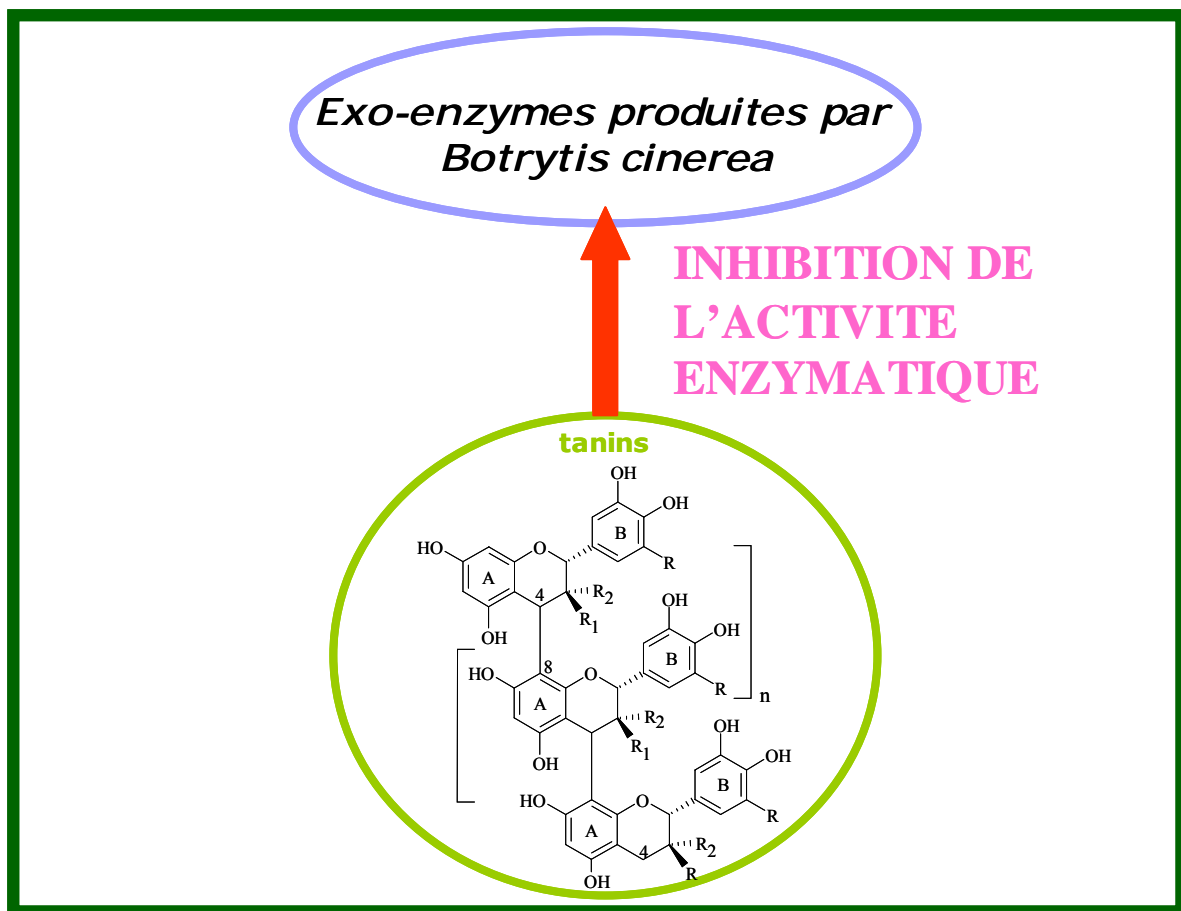


Figure I.4-6: Schéma montrant la production de phytoalexines lors de l'attaque par *Botrytis cinerea*, puis la sécrétion d'enzymes par le champignon et finalement leur inhibition par les tanins présents dans la plante.

De récents travaux effectués par le Dr. R. Pezet (communication personnelle) ont confirmé que le resvératrol *trans*-déhydrodimère et l' ϵ -viniférine étaient plus actifs que le resvératrol [60]. De ce fait, l'inhibition de la réaction de dimérisation maintient un équilibre entre le resvératrol et les dimères formés. Par contre, le dimère de pterostilbène ne possède aucune activité ce qui n'est pas le cas du pterostilbène lui-même. Il a été démontré que le pterostilbène disparaissait lors de l'apparition du resvératrol dans les parties malades de la plante.

I.4.1.4 Les moyens de lutte

Le contrôle de *Botrytis cinerea* est rendu difficile par le fait qu'il peut contaminer un grand nombre d'hôtes et d'organes végétaux et qu'il se développe très rapidement après sa période de latence. Les fongicides sont uniquement utilisés de manière prophylactique, aux stades pré- et post-floral afin de minimiser la prolifération à la maturité du fruit. Les fongicides actuels (anilinopyrimidines, phénylpyrroles et phenoxyquinolines) sont utilisés de façon limitée, afin d'éviter les phénomènes de résistance, déjà observés lors de l'utilisation répétée de certains produits dans les années 1970.

Les conditions de stockage des produits horticoles (ex. fraises, concombres) doivent être contrôlées pour éviter la prolifération du champignon. Il s'agit entre autre de l'atmosphère ambiante (température, humidité), de l'irradiation des produits et de la période de latence. Certaines mesures, comme l'élimination des déchets organiques et des tissus moribonds peuvent être efficaces.

I.4.2 Résultats antérieurs

Une seule publication à ce jour provenant de la collaboration entre le groupe du Prof. R. Tabacchi (Université de Neuchâtel) et le Dr. R. Pezet (Station Fédérale de Changins, Nyon), a mis en évidence l'inhibition de l'enzyme stilbène oxydase par des composés phénoliques [3]. Ces résultats ont montré que la stilbène oxydase était inhibée par certains composés présents dans la grappe. L'épicatéchine-3-*O*-gallate et l'épicatéchine montraient de loin la plus forte inhibition ; suivaient la catéchine, l'acide caffeoyle tartrique, la taxifoline-3-*O*-ramnoside et enfin la quercétine-3-*O*-glucuronide. L'acide coumaroyle tartrique (*Z* et *E*) et l'acide *p*-coumarique ne présentaient quasiment aucune activité inhibitrice (cf. Figure I.2-1 et Figure I.2-8).

I.5 INTRODUCTION A LA SPECTROMETRIE DE MASSE

Les tanins sont difficiles à isoler, à cause de leur poids moléculaire élevé, de leur polarité et de leur large polydispersité. Pour leur caractérisation, la spectrométrie de masse s'est avérée être la technique la plus appropriée.

Le développement rapide de la technique, pendant les années 1970 à 2000, a permis l'apparition de nouveaux procédés d'ionisation douce, qui évitent la fragmentation des composés. Les plus importantes ont été les découvertes de l'électrospray (ESI) et de l'APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*). Ces techniques ont la particularité de former des ions à pression atmosphérique, simplifiant considérablement la manipulation et permettant un réel couplage LC/MS.

La technique MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) couplée à un analyseur TOF (*Time of Flight*) a aussi pris une grande place sur le marché. Grâce à l'avancée technologique, l'utilisation de cet instrument est devenue aisée et sa taille a été considérablement réduite.

I.5.1 Historique du couplage LC/MS

Le principal problème du couplage HPLC/MS a été de concilier le flux de l'HPLC, qui est de l'ordre de 0.3-1 mL/min, au vide poussé d'un spectromètre de masse. De plus, il a fallu trouver une technique permettant l'ionisation de tous les types de composés, y compris les non-volatils, les macromolécules et les composés très polaires. Afin de résoudre ce problème de couplage, plusieurs voies ont été explorées, parmi lesquelles on peut citer l'augmentation de la capacité de pompage au niveau de la source, l'élimination du solvant avant l'introduction de l'analyte dans la source et la miniaturisation des colonnes HPLC [81].

Ce chapitre explique brièvement le développement de sources à pression atmosphérique, de 1970 à nos jours.

I.5.1.1 L'Interface Moving Belt (MBI)

C'est en 1974 que la première interface LC/MS (*Moving Belt Interface*) est apparue [82]. Le principe repose sur le fait que l'éluant, provenant de la colonne HPLC, est transporté mécaniquement jusqu'à la chambre d'ionisation. Lors de ce transport, la phase mobile est évaporée par un léger chauffage et par des étapes successives de pompage. Le solvant

est ainsi complètement éliminé avant son introduction dans la source. Ce système est compatible avec différents modes d'ionisation tels que l'EI (*Electronic Impact*), le CI (*Chemical Ionization*) et le FAB (*Fast Atom Bombardment*). Cette interface est techniquement dépassée et n'a plus qu'un intérêt historique.

I.5.1.2 L'Interface Particle Beam (PBI)

L'interface PBI a été décrite pour la première fois en 1984 par *R. Willoughby* et *N. Browner* [83]. Le principe est basé sur l'enrichissement de l'éluant en analytes par évaporation du solvant avant l'ionisation. La phase mobile, sortant de la colonne HPLC, est entraînée sous pression dans un petit orifice de 5-10 μm , qui crée un jet de gouttelettes de taille uniforme, ceci dans une chambre à température ambiante et à pression atmosphérique. Grâce à un séparateur de moment, les analytes de hauts poids moléculaires sont préférentiellement transférés vers la source EI/CI (*Electron Impact* ou *Chemical Ionization*) où ils seront ionisés et les petites molécules sont éliminées par pompage (Figure I.5-1).

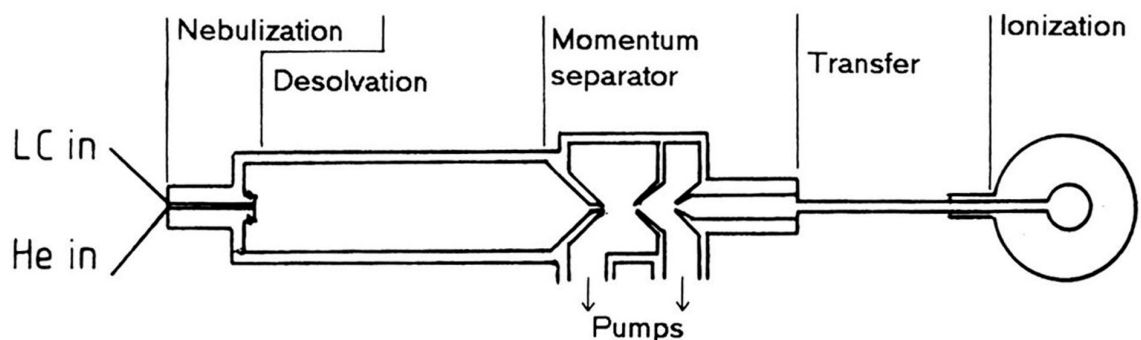


Figure I.5-1: Représentation schématique d'une source PBI.

I.5.1.3 L'interface Continuous-Flow-FAB (CF-FAB)

Ito et al. (1985) [84] ont été les premiers à coupler l'HPLC avec une source FAB en utilisant une micro HPLC et une interface *frit-FAB*. L'ionisation consiste à bombarder avec des particules neutres de Xénon ou d'Argon une cible sur laquelle est déposé l'analyte dissous dans une matrice de glycérol. Ce faisceau d'atomes rapides éjecte les ions hors de la matrice sans apport de chaleur. Ce type d'ionisation est adapté aux molécules polaires et thermolabiles de masses moléculaires élevées. Le couplage avec la LC comprend un système appelé *frit-FAB*. La phase mobile provenant de la LC, enrichie de 10 % de glycérol, passe à travers une fritte poreuse en acier, qui retient les molécules de

glycérol et constitue la cible du faisceau FAB. En 1986, *Caprioli et al.* [85] proposèrent une interface *continuous-flow* FAB dans laquelle, le capillaire amenant la phase mobile, passe à travers l'extrémité de la sonde FAB, pour dépasser de 0.2 mm de la surface de celle-ci. On obtient à la surface de la cible un film très fin constamment renouvelé (Figure I.5-2).

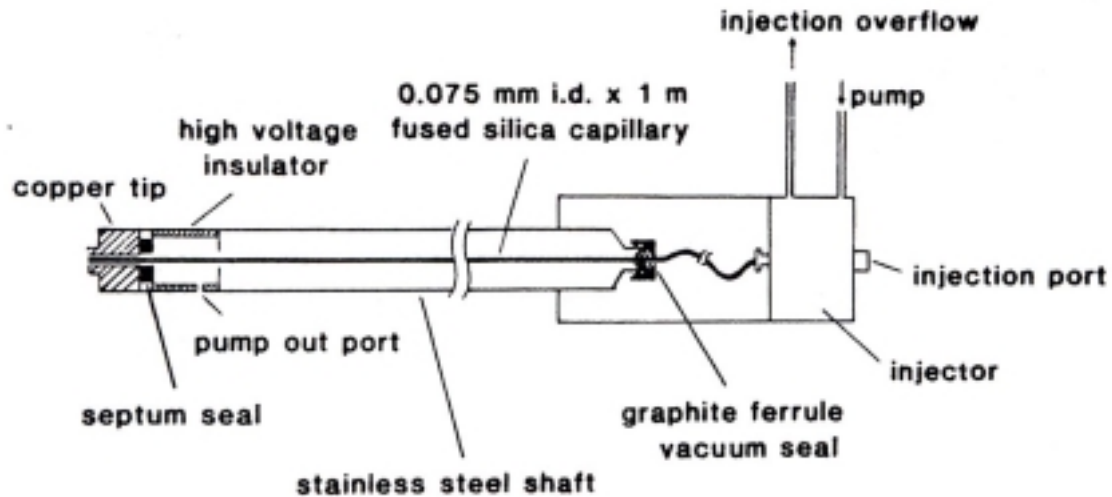


Figure I.5-2: Premier prototype d'une interface CF-FAB, construite par *Caprioli et al.* [85].

I.5.1.4 L'interface Thermospray (TSP)

L'interface thermospray a été développée par *L. Vestal* [86] à l'Université de Houston sur la base d'un projet démarré dans les années 1970. Cette technique d'ionisation n'est plus beaucoup utilisée, car d'autres méthodes, plus pratiques, ont vu le jour. Ce processus de vaporisation est réalisé dans un tube capillaire chauffé (vaporisateur) qui permet de convertir le flux de liquide en ions en phase gazeuse (Figure I.5-3). Un jet de vapeur supersonique, composé de microparticules et de très fines gouttelettes, est alors obtenu à la sortie du capillaire. Il est projeté au centre de la source, où l'excès de vapeur est éliminé par une pompe mécanique, puis piégé par une trappe à azote liquide. Placé perpendiculairement, un cône laisse passer les ions vers une série de lentilles électrostatiques qui focalisent les ions sur l'analyseur de masse. Une électrode, appelée repoussoir (*repeller*), est placée en face de l'orifice du cône pour améliorer l'extraction des ions ou induire une fragmentation CID (*Collision Induced Dissociation*). A l'extrémité du capillaire se trouve un filament dont le rôle est de fournir des électrons. Une électrode à décharge est également placée pour renforcer à ce niveau l'effet du filament lorsque celui-ci est insuffisant. Le principal défaut de cette interface est sa difficulté d'utilisation (réglage de nombreux paramètres) et sa maintenance coûteuse.

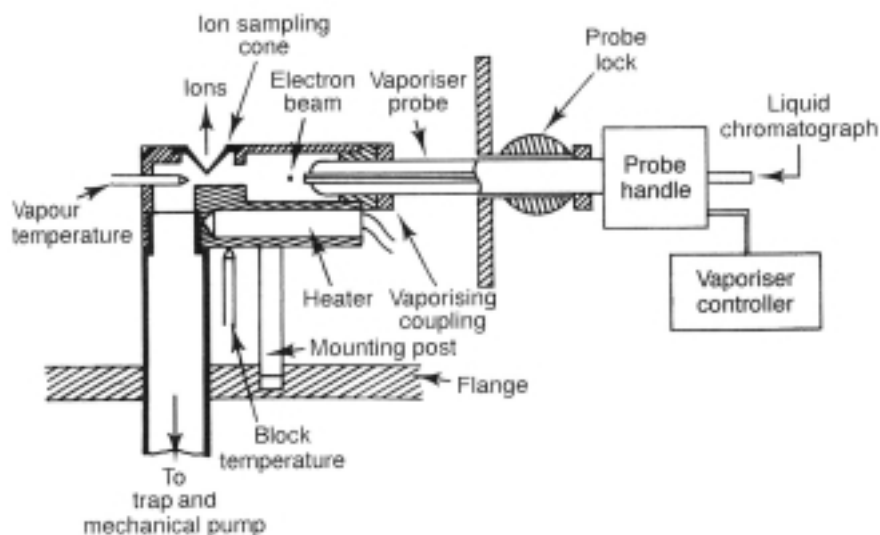


Figure I.5-3: Représentation schématique d'une source thermospray [87].

1.5.1.5 L'interface Electrospray (ESI)

Cette interface fait partie des nouvelles techniques d'ionisation à pression atmosphérique (API). Comme son nom l'indique, l'ionisation des molécules se fait dans une chambre qui se trouve à pression atmosphérique et non à vide poussé comme les autres procédés décrits précédemment. Ce processus résulte de l'auto-répulsion des charges électrostatiques à la surface de la goutte (cf. Figure I.5-1). Nous pouvons nommer trois interfaces majeures : l'électrospray (ESI), l'*Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) (cf. chapitre I.5.1.6) et l'*Ion Spray* (ISP) qui mettent en application un phénomène décrit par *J. Zeleny* en 1917 [88]: des gouttes de tailles uniformes de 1 μm de diamètre sont produites par l'application d'un potentiel à la sortie du capillaire émergeant du solvant.

L'interface ESI développée par *C. Whitehouse et al.* (1985) [89] est décrite de la façon suivante : Une solution est introduite dans une chambre à pression atmosphérique à travers une aiguille en acier inoxydable à un débit de 5-20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Un potentiel de -3.5 kV est appliqué à l'électrode cylindrique (l'aiguille étant reliée à la terre) pour la détection d'ions positifs. Un potentiel de - 4.5 kV à + 40 V est appliqué à l'entrée et à la sortie du capillaire en verre respectivement. Les potentiels sont inversés pour la détection d'ions négatifs. Le liquide est pulvérisé depuis la pointe de l'aiguille et les gouttes formées sont dispersées par un flux chaud d'azote appliqué à contre-courant à un débit de 150 mL/min. Les ions formés par évaporation du solvant par le gaz séchant sont entraînés à travers le capillaire dans une chambre où un vide partiel est établi (10^{-4} Torr) formant un faisceau d'ions supersoniques. Finalement, ceux-ci sont filtrés à travers l'écumoire et dirigés par des lentilles électrostatiques vers l'analyseur de masse.

Introduction générale

Le procédé de formation des ions par l'application d'un potentiel a longtemps été débattu, mais il peut être divisé en trois parties :

- la formation des gouttes
- la réduction des gouttes
- la formation des ions gazeux

L'application d'un champ électrique élevé à la pointe de l'aiguille de l'électrospray produit une séparation partielle des ions positifs et négatifs. En mode positif, les ions positifs sont accumulés à la surface de la pointe du liquide du capillaire et les ions négatifs sont amassés à l'intérieur du liquide. Les répulsions des ions positifs à la surface et le champ électrique régnant entre les charges positives augmente la tension de surface du liquide pour former un cône, appelé cône de *Taylor* (Figure I.5-4) [90]. L'accumulation des charges à la pointe du cône provoque un filament liquide qui finalement se divise en gouttelettes chargées [91]. Ce phénomène apparaît que si le champ électrique E_0 vaut :

$$E_0 = (2\gamma\cos 49^\circ/\epsilon_0 r_c)^{1/2} \quad (1)$$

γ : tension de surface

ϵ_0 : constante de permittivité du vide

$\cos 49^\circ$: moitié de l'angle du cône de *Taylor*

r_c : rayon du capillaire

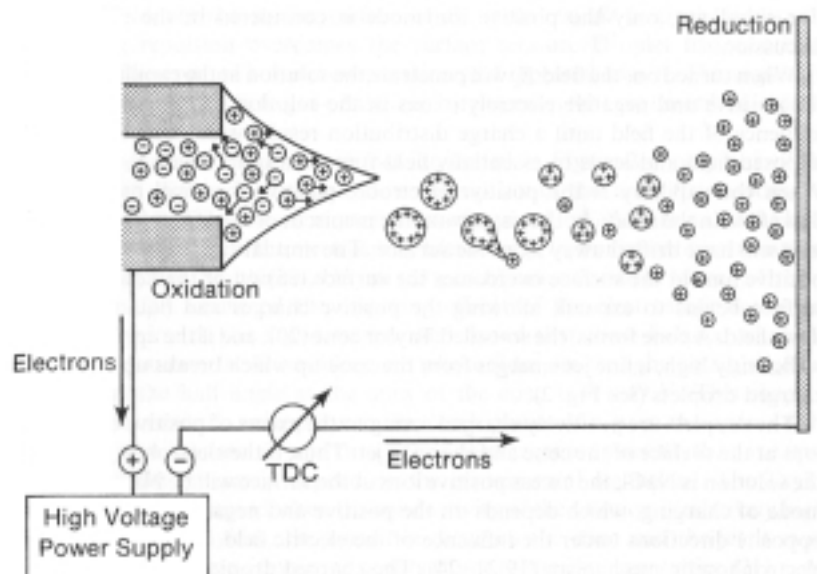


Figure I.5-4: Représentation du procédé « électrospray » par la formation du cône de *Taylor*.

Introduction générale

Le champ électrique est proportionnel à la tension de surface et celle-ci est dépendante de la concentration des ions en solution. Pour qu'un phénomène « électrospray » apparaisse, il faut une concentration minimale en électrolyte de 10^{-5} M. Au-dessus de cette limite, le courant total des gouttes (I) augmente très lentement par rapport à la concentration des ions en solution. *J. De la Mora* et *I. Locertales* [90] ont proposé l'équation suivante :

$$I \approx f(\epsilon/\epsilon_0) (\gamma K V_f \epsilon/\epsilon_0)^{1/2} \quad (2)$$

K : conductivité de la solution

ϵ : permittivité de la solution

V_f : vitesse du flux

Nous pouvons déduire de l'équation (2) pour le rayon R des gouttes de charge q les équations suivantes [92]:

$$R \approx (V_f \epsilon / K)^{1/3} \quad (3)$$

$$q \approx 0.7 [8\pi(\epsilon_0 \gamma R^3)^{1/2}] \quad (4)$$

En conclusion, l'augmentation de la concentration en électrolytes dans les gouttes augmente la conductivité K et de ce fait diminue le rayon des gouttes (selon l'équation (3)). L'évaporation du solvant, induite par la température ambiante, conduit à la diminution du rayon R des gouttes à q constant. Lorsque le rayon vaut environ $1 \mu\text{m}$, il est proche de la limite de *Rayleigh* [93] et q_{RY} vaut:

$$q_{RY} = 8\pi(\epsilon_0 \gamma R^3)^{1/2} \quad (5)$$

Le champ électrique perpendiculaire à la surface de la goutte sphérique vaut selon la loi coulombienne :

$$E = q/4\pi\epsilon_0 R^2 \quad (6)$$

La combinaison des équations 5 et 6 pour R nous mène à l'équation 7, correspondant à la force du champ électrique lors de la fission de la goutte à la limite de *Rayleigh*. Les forces répulsives coulombiennes dépassent alors la force de cohésion de la tension de surface et la goutte explose en gouttelettes 100 fois plus petites [94]. La formation de l'ion gazeux résulte de ce phénomène : lorsque la goutte ne contient plus de solvant, la charge se dépose alors sur l'électrolyte MX formant l'ion M^+ [95].

$$E_{Ry} = (4\gamma/\epsilon_0 R)^{1/2} \quad (7)$$

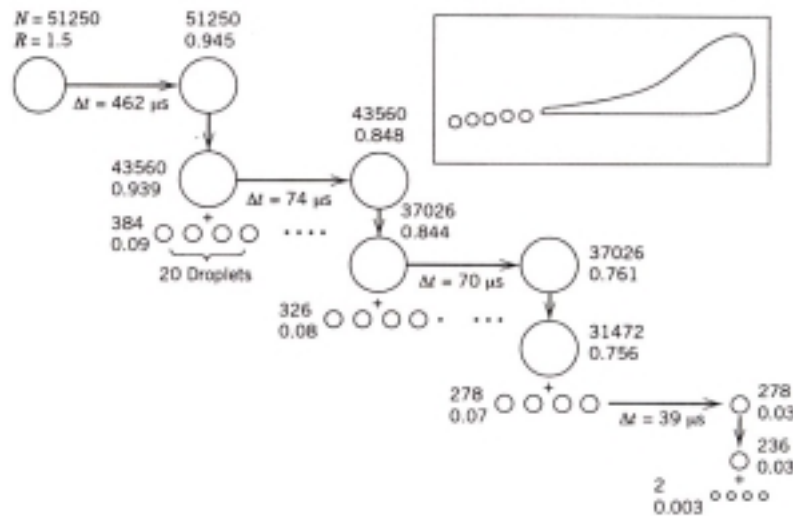


Figure I.5-5: Représentation schématique de la formation de la goutte chargée à son explosion. R = rayon de la goutte en μm , N = nombre de charges élémentaires sur la surface de la goutte, Δt = temps utilisé pour la réduction de la goutte jusqu'à la limite de *Rayleigh* [96].

Comme la source ESI délivre un courant électrique continu, une oxydation électrochimique, créant des ions positifs ou éliminant les ions négatifs, se produit sur le capillaire métallique (cathode) et une réduction électrochimique, éliminant les ions positifs se produit sur la contre-électrode (anode) [97].

1.5.1.6 L'interface Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI)

L'interface d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), appelée à ses débuts *Heated Nebulizer* [98] diffère considérablement de l'électrospray. En effet, l'éluant est vaporisé dans un tube en graphite chauffé entre 450-550°C. Une vapeur de solvant et d'analytes est produite dans la source et une ionisation est induite par une aiguille à décharge électrique. Un important flux d'azote (100 L/min) permet l'élimination du solvant. Les ions sont ensuite transférés dans un capillaire chauffant puis une écumeuse pour enfin arriver dans l'analyseur de masse. En raison de l'efficacité des réactions ions-molécules produites par la source APCI, le temps de vie des ions est augmenté permettant ainsi une limite de détection très basse [99].

I.5.2 La source Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI)

Cette méthode d'ionisation est devenue très populaire pour l'analyse des molécules à haut poids moléculaire et non volatiles. Son fonctionnement est très simple mais les mécanismes de formation des ions sont encore mal décrits [100;101]. Cette technique fonctionne de la manière suivante :

L'analyte est dissous dans un large excès de matrice. Celle-ci est un liquide ou un solide, de faible poids moléculaire, qui absorbe à la longueur d'onde du laser utilisé (UV ou IR). Une goutte de ce mélange est déposée sur une cible en métal, puis le solvant est évaporé, co-cristallisant l'analyte. Après irradiation, un mélange de molécules neutres et chargées est expulsé de la cible par paquet. Seul un faible nombre de ces molécules est ionisé puis détecté.

I.5.2.1 Les matrices

Il n'a pas été encore clairement expliqué pourquoi certaines matrices sont efficaces et d'autres ne le sont pas. Mais il existe quelques règles qui peuvent être appliquées de manière générale [100] :

- La matrice doit avoir une forte bande d'absorption à la longueur d'onde du laser utilisé.
- L'analyte doit être solubilisé dans la matrice dans un rapport moléculaire se situant entre 1 :1000 et 1 :10'000
- Le potentiel d'ionisation des matrices doit être faible (8 eV env.)

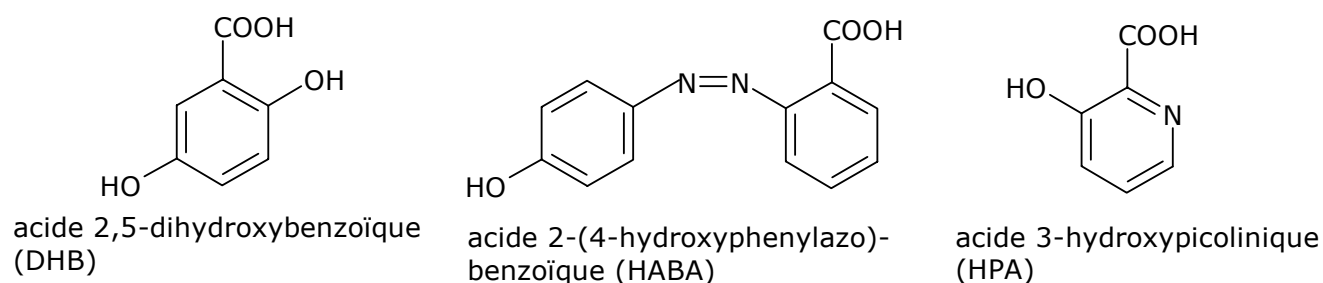


Figure I.5-6: Exemple de matrices utilisées en MALDI.

1.5.2.2 *Le Two-phases MALDI*

Cette méthode utilise une matrice à très faible pression de vapeur (ex. glycérol) dans laquelle sont mélangées de fines particules de graphite [102-104]. L'échantillon reste ainsi sous forme liquide lorsqu'il se trouve sous-vide. Cette technique a plusieurs avantages :

- Le graphite absorbe l'énergie du laser, il n'est utilisé que pour la transférer sur l'analyte.
- La matrice agit en tant que donneur de proton.
- La matrice protège les ions préformés lors de leur désorption en diminuant leur dégradation thermique.
- Le phénomène de co-cristallisation est supprimé, l'analyte reste solubilisé dans la matrice lors de l'analyse. Le signal est ainsi plus stable.

1.5.2.3 *Les lasers*

Les lasers les plus largement utilisés sont le laser ultraviolet N₂ à 337 nm, avec une largeur de pulse se situant entre 1 ns et quelques ns, délivrant une énergie de 3.68 eV à chaque pulse et le laser infrarouge Er :YAG à 2.94 μm, avec une largeur de pulse de 85 ns, délivrant une énergie de 0.42 eV [100].

1.5.2.4 *Mécanismes d'ionisation et désorption en MALDI*

Plusieurs modèles ont été proposés afin de comprendre les différents mécanismes de formation des ions (Figure I.5-7), comprenant le transfert des ions à l'état excité par le laser, les mécanismes de protonation, l'ionisation thermique et la désorption des ions préformés [100]. Certains fondements théoriques peuvent être appliqués pour l'explication de mécanismes d'ionisation [105]:

- L'ionisation multi-photon de la matrice : Il faut environ 2 à 3 irradiations d'un laser UV pour atteindre le potentiel d'ionisation de la matrice.
- Mécanisme de protonation : une matrice devient plus acide lorsqu'elle se trouve dans un état excité. Cette particularité est utilisée pour la protonation des analytes lors de l'ionisation.
- L'ionisation thermique : la formation des ions est accélérée par l'augmentation de la température de la cible, due à l'énergie du laser.

- Désorption des ions préformés : certaines molécules sont présentes sous la forme de sel dans l'échantillon. Grâce à l'énergie fournie par le laser, celles-ci sont désorbées et les ions libérés.

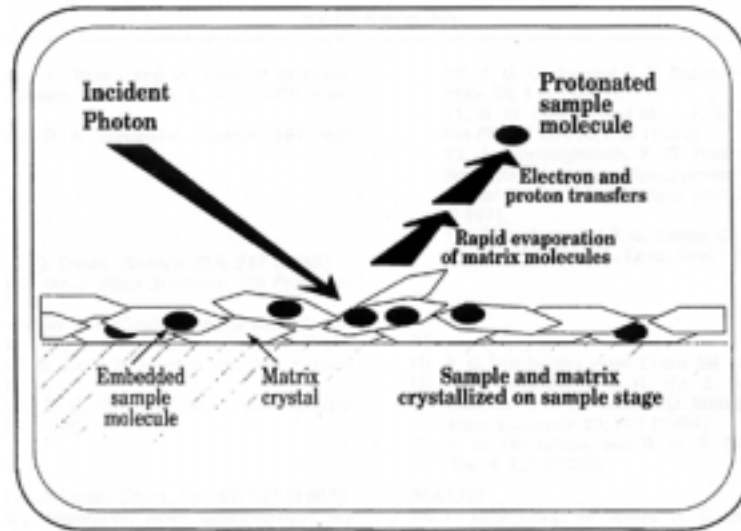


Figure I.5-7: Schéma proposé représentant absorption de l'énergie par la matrice, la protonation et l'extraction de l'ion [101].

I.5.3 Les analyseurs de masse

Pour la réalisation de ce travail, nous avons utilisé différents analyseurs de masse, ceci dans le but de comparer leur sensibilité pour la détection des tanins.

Après leur formation dans la source, les ions sont analysés à l'aide d'un analyseur de masse. Celui-ci permet de séparer les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) pour qu'ils soient ensuite détectés. Le chapitre ci-dessous explique brièvement le fonctionnement des différents analyseurs de masse utilisés pour ce travail.

I.5.3.1 L'analyseur Quadrupôle Ion Trap (QIT)

Le QIT est un analyseur comprenant 3 électrodes. Les deux électrodes se trouvant aux extrémités sont appelées *entrance* et *exit end caps electrodes* et celle se trouvant au centre du QIT, en forme de demi-lune, est appelée *ring electrode* (Figure I.5-8). Chaque *end cap electrode* possède un petit trou afin de permettre l'entrée et la sortie des ions dans la cavité de l'analyseur. Les ions éjectés à travers l'électrode de sortie sont focalisés

par la *conversion dynode* et accélérés à travers les lentilles de sortie vers le système de détection des ions.

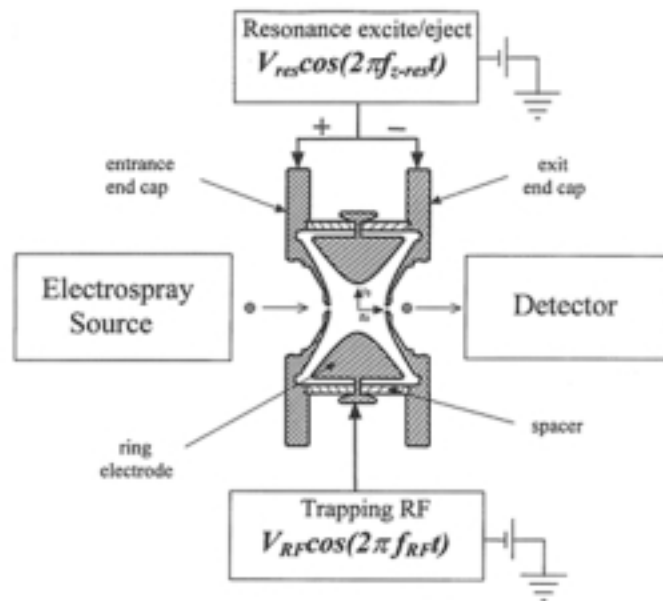


Figure I.5-8: Schéma d'une *Ion Trap* [96].

Un champ électrique est formé par les 3 électrodes lorsque la radiofréquence rf vaut :

$$rf = V_{rf} \cos(2\pi f_{rf} t) \quad (8)$$

Le champ électrique trappe les ions et les stocke au centre de l'analyseur. Les ions suivent alors la trajectoire décrite par l'équation différentielle de *Matthieu* [106] selon les paramètres a_z et q_z , représentant les paramètres dimensionnels de « trappage » des ions en fonction de l'axe z :

$$a_z = -2a_r = -16eU/m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2 \quad (9)$$

$$q_z = -2q_r = -8eV/m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2 \quad (10)$$

r : direction radiale

z : direction axiale

U : amplitude du courant direct (dc)

V : amplitude de la radiofréquence (rf)

e : charge d'un ion

m : masse d'un ion

r_0 : rayon interne de la *ring electrode*

z_0 : distance axiale depuis le centre de l'analyseur jusqu'au point le plus proche d'une *end capped electrode*

Ω : $\Omega = 2\pi f_{rf}$; f_{rf} est la fréquence du voltage principal (rf)

Introduction générale

Le diagramme de stabilité du QIT est représenté en fonction de a_z et q_z selon la solution de l'équation *Mathieu* (équation 9 et 10) (Figure I.5-9). La flèche montre les points de stabilité du diagramme lorsque $a_z = 0$, depuis le point d'entrée de l'ion dans la trappe jusqu'à sa sortie. Les cercles représentent la valeur de q_z pour des ions ayant un rapport m/z différent, car q_z est inversement proportionnel à la masse (m), un rapport m/z élevé signifie un q_z bas. Chaque ion a un propre q_z à $V = \text{constante}$, de ce fait les ions ayant un rapport m/z élevé ne sont pas détectés lorsque q_z vaut 0 et sont à la limite de détection lorsque $q_z = 0.0908$. Lorsque V augmente, les ions positionnés sur l'axe q_z se déplacent vers un q_z plus élevé. Lorsque q_z vaut 0.900, les ions passent en phase d'excitation, puis lorsque $q_z = 0.908$, ils se trouvent à la limite de la stabilité et sont éjectés à travers le trou de l'électrode *end capped*.

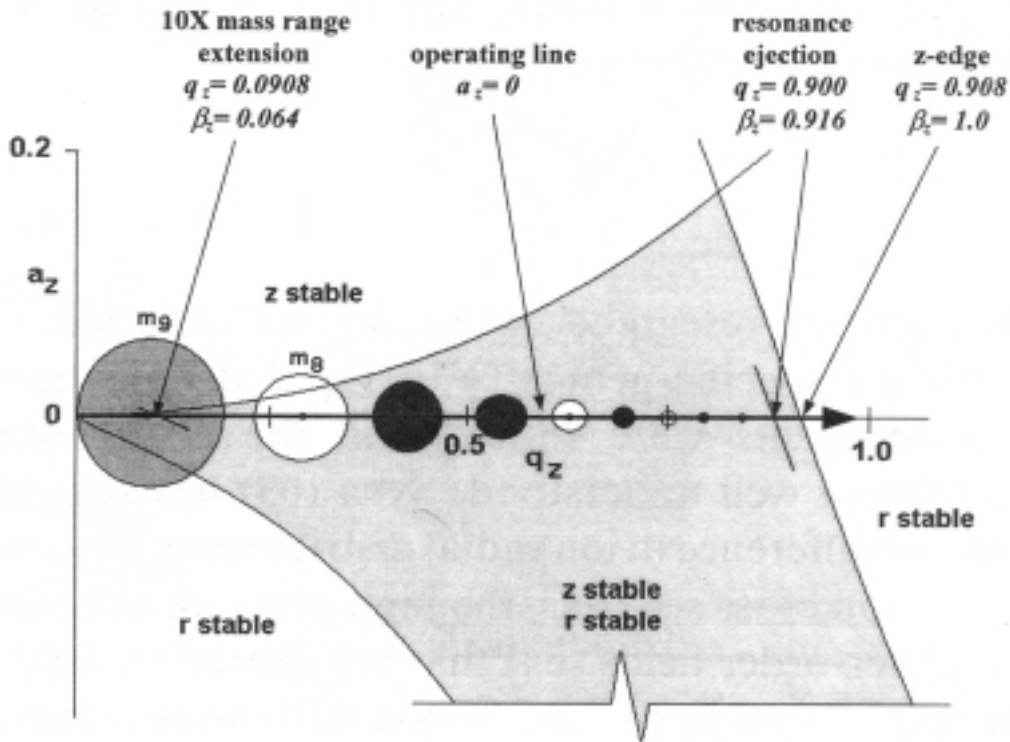


Figure I.5-9: Diagramme de stabilité de l'ion trappe.

Les ions de rapport m/z possèdent une fréquence de mouvement fondamentale propre au q_z et cette fréquence est couramment utilisée pour faire résonner ces ions. Les fréquences de mouvement des ions dans la dimension z sont définies par l'équation suivante :

$$f_h = (hf_{rf} \pm \beta_z f_{rf}/2) \quad \text{où } h = (0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots) \quad (11)$$

f_h : fréquence de mouvement de l'ion

f_{rf} : fréquence de la *rf* appliquée à la *ring electrode*

β_z : paramètre utilisé pour définir la fréquence d'un ion en fonction de sa position sur le diagramme de stabilité

A la limite de détection, β_z vaut 0.064, à la limite de stabilité, β_z vaut 0.916 et lorsque l'ion est éjecté, β_z vaut 1.

1.5.3.2 L'analyseur Time of Flight (TOF)

Un ion accéléré par une tension U atteint une vitesse v dépendante du rapport masse/charge. Un analyseur TOF de longueur L se base sur le principe suivant : un ion ayant une vitesse v et un rapport m/z met un temps t pour traverser la distance de la source au détecteur [107;108].

$$t = (m/2zeV)^{1/2} L \quad (12)$$

La source doit fonctionner par pulsations afin d'éviter que les ions ayant un m/z différent soient détectés en même temps. Les caractéristiques d'un analyseur TOF sont :

- la transmission extrêmement rapide des ions de la source au détecteur
- la rapidité des scans
- la détection d'ions de très hauts poids moléculaires
- la capacité d'adaptation aux nouvelles sources (entre autres ESI [109])

La résolution obtenue est faible comparée à d'autres analyseurs. Ceci provient de la dispersion des ions après leur extraction. Cet effet peut être en partie corrigé par l'installation d'un réflectron électrostatique (Figure I.5-10). Celui-ci est constitué d'une série de lentilles à différents potentiels qui compensent l'énergie cinétique des ions ayant un temps de vol différent. Le principe du réflectron repose sur le fait qu'un ion ayant une grande énergie cinétique pénétrera plus profondément dans le système de lentilles et rattrapera un ion plus lent (mais de masse identique). Les ions de même masse arriveront ainsi en même temps au détecteur. Le désavantage du réflectron est une perte de signal dû à l'addition de cette grille de lentilles électrostatiques.

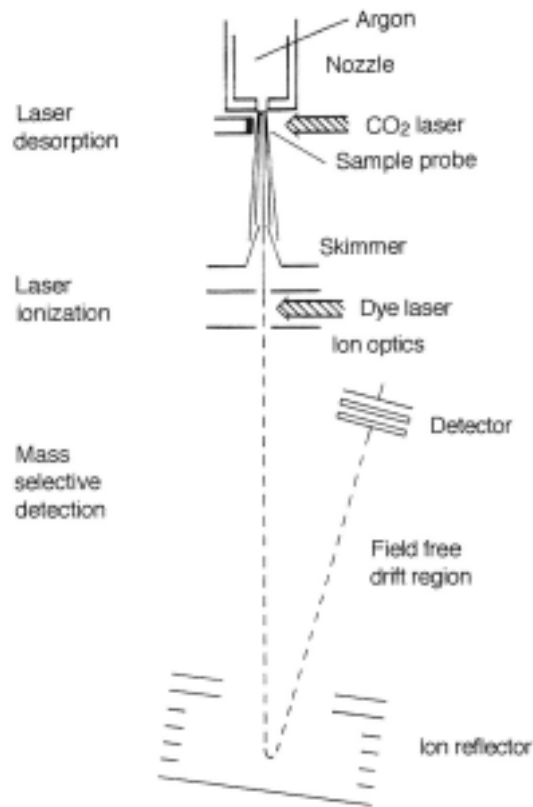


Figure I.5-10: MALDI-TOF avec système de lentilles appelé réflectron.

I.5.3.3 L'analyseur Fourier Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR)

Un analyseur FT-ICR est représenté par une cellule cubique placée dans un champ magnétique B élevé [110]. La cellule est composée de deux *trapping plates* opposées, de deux *exciting plates* opposées et de deux *receiver plates* opposées (Figure I.5-11). Un ion de masse m , de vitesse v et de charge élémentaire z décrit dans la cellule un cercle de rayon r , perpendiculaire au champ magnétique. La fréquence du cyclotron ω_c , qui est inversement proportionnelle au rapport m/z est donnée par l'équation suivante :

$$\omega_c = 2\pi f = v/r = Bez/m \quad (13)$$

où f est la fréquence du ion en Herz. La résonance cyclotronique du ion est induite en appliquant un champ électrique sinusoïdal. Lorsque la fréquence sinusoïdale est identique à celle de la fréquence cyclotronique du ion, la condition de résonance est établie et l'ion est accéléré de manière régulière vers un rayon de giration plus grand. Le mouvement cohérent des ions génère une image dans les *receiver plates* [111]. Quand la cohérence des ions est perturbée dans le temps, l'image du signal disparaît. Le domaine-temps du signal des *receiver plates* enregistre toutes les informations des fréquences des ions en

rotation. En appliquant une transformée de Fourier, le signal du domaine-temps est converti en un signal domaine-fréquence, qui peut alors être transformé en un spectre de masse par l'application de l'équation (13).

La particularité de cet analyseur est sa très haute résolution (10^6) et son domaine de masse élevé (5000 uma).

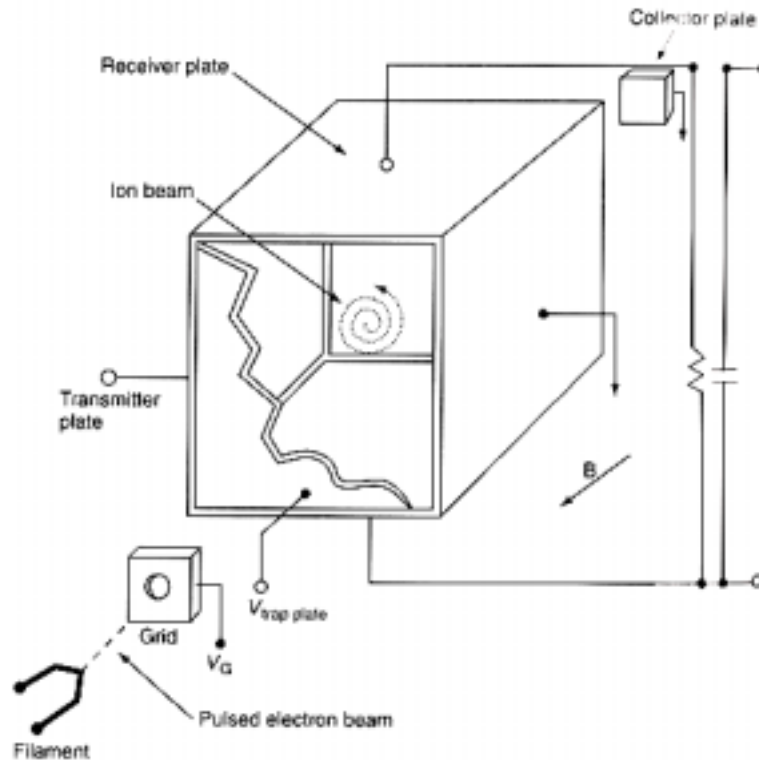


Figure I.5-11: Représentation schématique d'une cellule d'un FT-ICR/MS.

I.5.4 Le LCQ de THERMOFINNIGAN

Le LCQ (ThermoFinnigan, San José, CA, USA) a été l'instrument principal de ce travail. Sa structure est expliquée ci-dessous.

L'appareil se divise en 4 parties :

- La source électrospray : cette source est directement reliée à l'HPLC par un capillaire en verre ou à la micropompe qui se trouve sur le côté de l'appareil. L'azote, servant à nébuliser le liquide, est connecté sur le devant de la source.

- La région API : les ions électrosprayés traversent un capillaire chauffant (180-250°C), qui a pour fonction l'élimination complète du solvant, puis ils sont dirigés vers le tube lens qui a une tension entre 0 et ± 60 V (*tube lens offset voltage*). Cette tension sert à aider à la désolvatation par l'accélération des ions. L'écumoire sert de zone tampon entre la « haute » pression de la région API (1 Torr) et la « basse pression » (10^{-3} Torr) des octapôles. La zone entre le *tube lens* et l'écumoire est celle de la fragmentation CID (*Collision induced Dissociation*), car la pression résiduelle est suffisante pour induire une collision entre les différents ions.
- Les octapôles : Ceux-ci servent uniquement à transférer les ions de la région API à la trappe ionique. Ils servent aussi à éliminer les ions instables et les ions métastables produits au cours du déplacement. Les deux octapôles sont reliés par des lentilles (*interoctapole lenses*) qui focalisent les ions durant leur transfert.
- La trappe ionique : Elle est l'analyseur de masse du LCQ. Grâce aux différents modes de scans, nous avons pu effectuer plusieurs types d'analyses suivant l'information recherchée. Les ions à analyser sont ensuite expulsés de la trappe vers la dynode, puis vers le multiplicateur d'électrons (cf Figure I.5-12).

Introduction générale

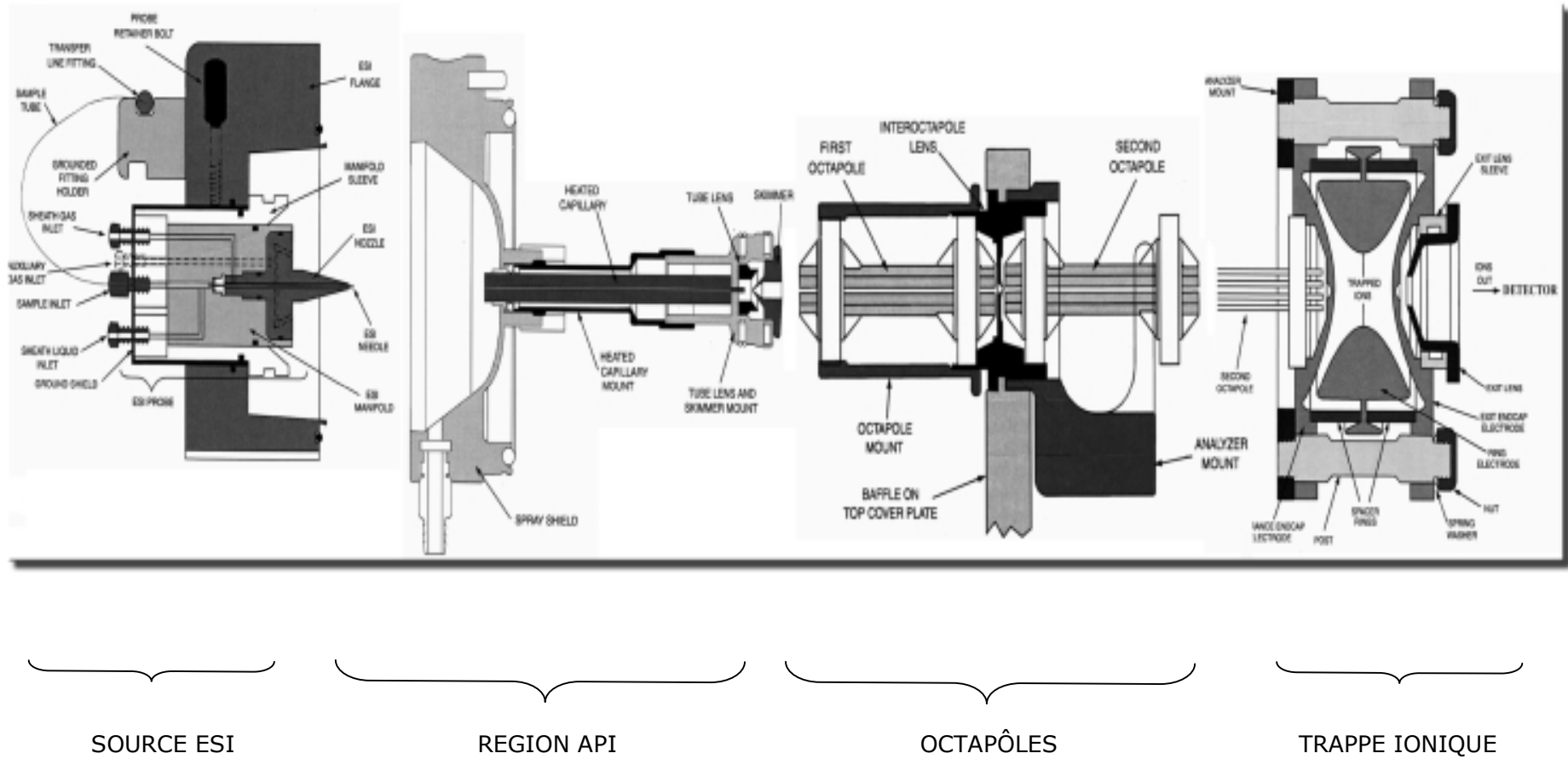


Figure I.5-12: Schéma du LCQ de *ThermoFinnigan*, monté d'une source électrospray.

I.6 BUT DU TRAVAIL

Le champignon *Botrytis cinerea* est responsable de la pourriture grise, maladie qui détruit chaque année une partie des récoltes viticoles. Le développement de cette maladie est insidieux, car le phénomène de latence (décrit dans le chapitre I.4) ne permet pas de détecter l'infection. L'utilisation de fongicides pendant la période de floraison est efficace, mais n'aboutit pas à l'éradication du parasite. Certaines variétés comme Gamaret sont résistantes à *Botrytis cinerea*. Les mécanismes de défense de ces plantes sont finalement peu connus, il est donc difficile d'expliquer la résistance ou au contraire la sensibilité d'une variété.

Ce travail s'est basé sur les observations faites par le Dr. R. Pezet et le Prof. R. Tabacchi, prouvant que la stilbène oxydase (laccase), produite par *B. cinerea*, est inhibée *in vitro*, par des composés phénoliques présents dans la grappe à de très faibles concentrations [3]. Cette enzyme est capable de dimériser les phytoalexines produites par la plante. L'inhibition de la laccase par ce type de composés peut être appliquée par analogie aux composés polyphénoliques du raisin : les tanins.

Le mécanisme de défense, expliqué par la figure I.4-3, met en jeu la stilbène oxydase, les stilbènes et les tanins. Le but est donc de prouver que les tanins inhibent cette enzyme, bloquant ainsi l'oxydation des stilbènes. De plus, il est intéressant de déterminer quel type de tanin inhibe le plus efficacement l'enzyme et s'il y existe des différences entre les tanins d'une variété sensible (Gamay) et d'une variété résistante (Gamaret).

Dans un premier temps, nous avons développé des méthodes d'extraction, de séparation des tanins à partir de baies de raisin puis, dans un deuxième temps, nous avons caractérisé ces fractions par spectrométrie de masse, puis nous avons testé leur pouvoir inhibiteur.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II MATERIEL ET METHODES

II.1 MATERIEL VEGETAL

Les grappes sont infectées à la floraison par *Botrytis cinerea*, mais celui-ci reste latent jusqu'à la véraison. Certaines variétés, comme Gamaret, inhibent le développement du champignon, de ce fait, les dégâts causés à la maturité du fruit sont faibles [55]. Cela a dirigé notre choix vers deux cépages. Nous avons choisi une variété résistante et une variété sensible :

- La variété Gamaret, résistante à *Botrytis cinerea*
- La variété Gamay 544, sensible à *Botrytis cinerea*

Les baies de raisin ont été récoltées à la Station Fédérale de Changins (VD, Suisse) à différents stades de maturité (fermeture de la grappe, véraison et maturité) en 1995 par le groupe du Dr. R. Pezet. Les fruits sont équeutés, congelés avec de l'azote liquide et lyophilisés. Une fois secs, ils sont broyés en une fine poudre.

Le matériel végétal utilisé pour le développement de méthodes analytiques (cf. chapitres III et IV) a été récolté le 02.08.99 à Changins (Nyon, Suisse).

II.2 EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DES TANINS OLIGOMERIQUES ET POLYMERIQUES

II.2.1 Qualité des solvants utilisés

Les solvants organiques utilisés pour la solubilisation, dilution et extraction sont de qualité technique en provenance de la maison SDS (France). Ils ont été distillés deux fois sur une colonne Vigreux.

II.2.2 Extraction des tanins des baies de raisin

Les tanins présents dans la poudre de raisin sont extraits trois fois avec un mélange MeOH/Acetone/H₂O 40:40:20 (v/v/v). Les phases sont réunies, puis l'acétone et le MeOH sont éliminés à l'évaporateur rotatif. La phase aqueuse est extraite trois fois avec de la ligroïne 90-110°C, puis trois fois avec de l'Et₂O afin d'éliminer les composants apolaires.

L'eau est ensuite congelée et sublimée (procédé de lyophilisation) pour obtenir finalement l'extrait brut.

II.2.3 Extraction et fractionnement des tanins oligomériques

Les tanins sont d'abord extraits selon la méthode décrite au chapitre II.2.2. Le mélange est déposé sur une colonne Toyopearl HW-40F (Tosohaas, Japon). La colonne est reliée à un détecteur UV (Gilson Holochrome, Angleterre) réglé à 280 nm. Une première élution est effectuée avec une solution EtOH/H₂O 50:50 (v/v) afin d'éliminer les acides phénoliques, les anthocyanes et les sucres. Les tanins oligomériques sont ensuite obtenus par élution au MeOH (cf. chapitre III.1.2).

II.2.4 Extraction des tanins polymériques

Les tanins sont d'abord extraits selon la méthode décrite au chapitre II.2.2. Le mélange est ensuite déposé sur une colonne LH-20 (Pharmacia Biochem, Suède). Les acides phénoliques et les oligomères sont élués avec une solution MeOH/H₂O 50:50 (v/v), puis la fraction polymérique est récupérée par élution avec un mélange acétone/H₂O 75:25 (v/v). Cette dernière fraction est purifiée sur un gel Toyopearl HW-40S (Tosohaas, Japon). L'élution est la suivante : MeOH/H₂O 50:50 (v/v) ; MeOH, puis acétone/H₂O 75:25 (v/v). La dernière fraction (acétone 75%) est lyophilisée pour finalement devenir une poudre de couleur orange (fraction polymérique).

II.2.5 Fractionnement de la fraction polymérique en fonction du DPm (Degré de Polymérisation moyen)

II.2.5.1 Fractionnement de la fraction polymérique en fonction du DPm sur poudre de verre

30 mg de la fraction polymérique sont dissous dans 0.5 mL de MeOH, puis les tanins sont précipités avec 5 mL de CHCl₃. Le contenu en entier est déposé en tête d'une colonne (1x10 cm) remplie de poudre de verre (212-300 µm, *unwashed*, Sigma, Suisse).

Les tanins sont ensuite élués avec des volumes de 30 mL d'un gradient CHCl₃/MeOH :

Tableau II.2-1: Pourcentage du mélange MeOH/CHCl₃ utilisé pour l'élution de chaque fraction tannique.

Fractions	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CHCl ₃ (%)	85	80	75	70	65	60	55	50	45	0
MeOH (%)	15	20	25	30	35	40	45	50	55	100

Les 10 fractions collectées sont ensuite analysées par thiolysé pour déterminer leur DPm (cf. chapitre II.3.1).

II.2.5.2 Fractionnement de la fraction polymérique en fonction du DPm sur Rélite SP411 et LCC-Microsphères-DVB-450-1200

60 mg de la fraction polymérique sont solubilisés dans 1 mL de MeOH. 1 g de rélite SP411 (ou LCC-Microsphères-DVB-450-1200) (LCC Engineering and Trading, Suisse) est introduit à cette solution. Le MeOH est évaporé à l'évaporateur rotatif. Le mélange est déposé en tête d'une colonne (1X10 cm) remplie de phase. L'élution est identique à celle décrite au chapitre II.2.5.1. Les 10 fractions collectées sont ensuite analysées par thiolysé pour déterminer leur DPm (cf. chapitre II.3.1).

II.2.6 Schéma récapitulatif de l'extraction et du fractionnement des tanins du raisin

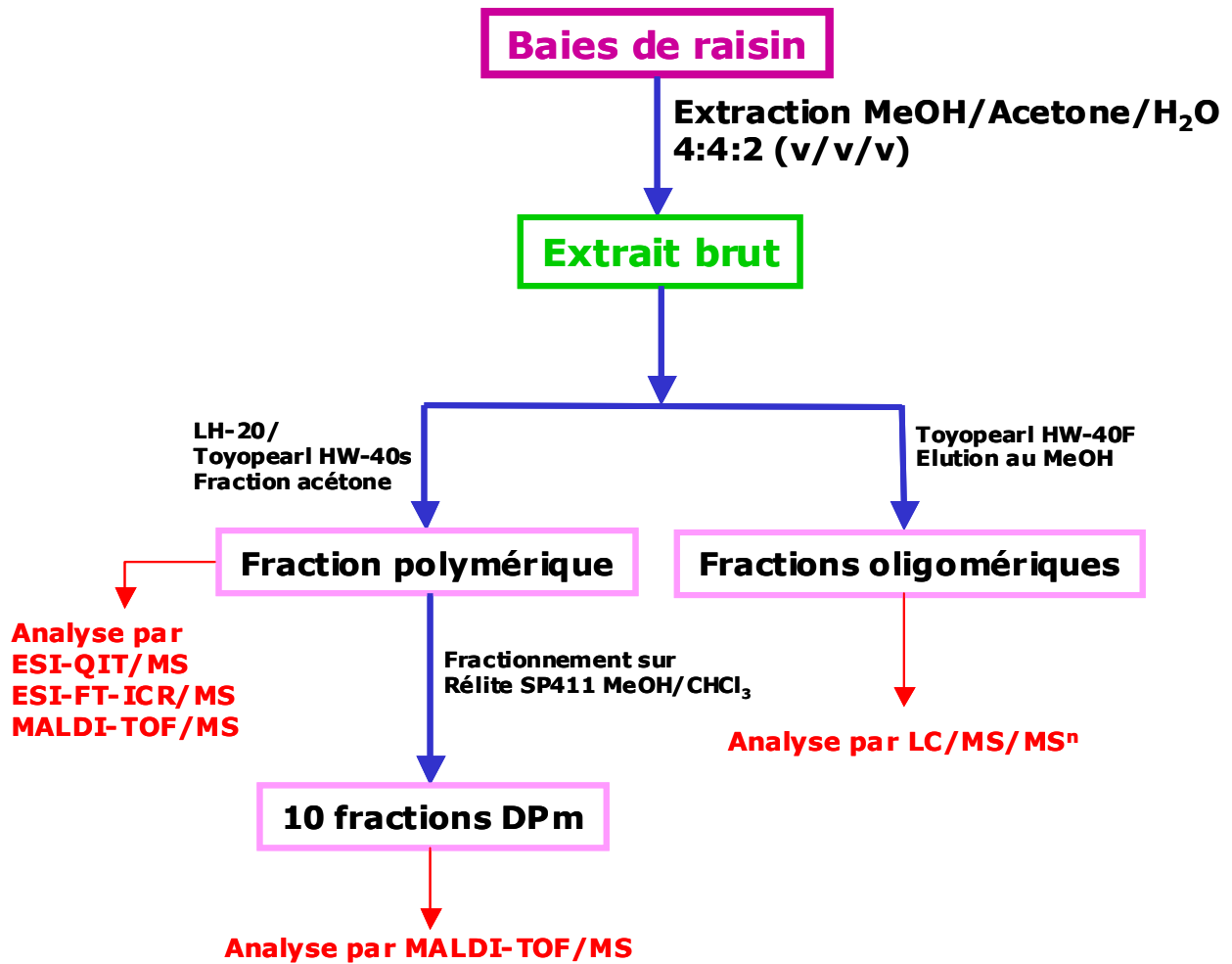


Figure II.2-1: Schéma récapitulatif de l'extraction et du fractionnement des tanins du raisin.

II.3 METHODES D'ANALYSE DES TANINS

II.3.1 Thiolyse

Le DPM (Degré de Polymérisation moyen) des fractions tanniques a été calculé par la méthode de la thiolyse (cf. chapitre III.1.4).

50 µL d'une solution méthanolique à 1 mg/mL en tanins sont mélangés à 50 µL d'une solution méthanolique HCl 0.2 N à 5% d' α -toluène-thiol (puriss, Fluka, Suisse) dans un pilulier 1,1-CTVG avec un bouchon 11-AC7 (Infochroma AG, Suisse). Le mélange réactionnel est laissé 2 min à 90°C puis est directement refroidi sous l'eau froide. L'échantillon est analysé par HPLC en utilisant le programme HPLC « programme thiolyse » (cf. chapitre II.5.4.1).

II.3.2 Hydrolyse enzymatique

50 mg de la fraction polymérique (cf. chapitre II.2.4) de Gamay ou Gamaret sont dissous dans 30 mL d'un tampon citrate 50 mM à pH 5.5. La solution est thermostatisée à 37°C et 30 mg de tannase (*Aspergillus oryzae*, Kikkoman, Japon) sont ajoutés. Le pH est ajusté à l'aide d'un pH-stat (Dosimat, Impulsomat muni d'une électrode au calomel, Metrohm, Suisse) avec une solution NaOH 0.1 N. Il faut en ajouter en moyenne entre 3-5 mL pour chaque réaction. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 48 heures. La solution est extraite trois fois à l'AcOEt, puis le solvant organique est éliminé à l'évaporateur rotatif. L'hydrolysate est dissous dans 0.5 mL d'un mélange H₂O/CH₃CN 50:50 (v/v), puis 20 µL sont injectés sur la colonne HPLC avec le programme « stilbènes » (cf. chapitre II.5.4.2) pour les analyses LC/MS.

II.4 TESTS BIOLOGIQUES

Les tests biologiques sont effectués sur toutes les fractions oligomériques et polymériques des baies de raisin. La stilbène oxydase a été purifiée selon le Dr. R. Pezet [80]. Les tests sont réalisés avec la fraction DEAE 0.1 M NaCl, contenant l'enzyme. Elle a été diluée de telle sorte que son activité soit de 60 nmol de resvératrol oxydées par min pour 10 µL d'enzyme.

Le mélange réactionnel est le suivant :

- 40 μL de resvératrol $4.3 \cdot 10^{-3}$ M dans l'EtOH
- 10 μL d'enzyme
- 2-100 μL d'une solution tannique inhibitrice dont la concentration est calculée en fonction du DPM correspondant (une unité DPM vaut 288 g/mol environ).

Le volume est ajusté à 3 mL avec un tampon phosphate-citrate 0.1 M à pH 5.2. Le spectrophotomètre (Shimazu UV-160, Japon) est thermostaté à 30°C. La baisse d'absorbance du resvératrol à 307 nm est mesurée toutes les 10 secondes durant 160 secondes. L'appareil calcule le nombre de moles de resvératrol oxydées par minute via le coefficient d'extinction molaire ($\epsilon = 22363$). Chaque mesure est répétée en triplicata.

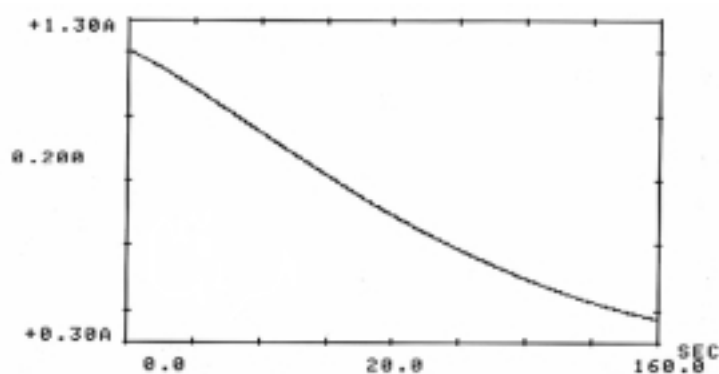


Figure II.4-1: Spectre de la variation d'absorbance (307 nm) du resvératrol en fonction du temps pour l'inhibition de la stilbène oxydase.

II.5 CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE À HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

II.5.1 Qualité des solvants utilisés

Les solvants organiques, de qualité HPLC, proviennent de la maison SDS (France). L'eau est bidistillée sur un système Millipore de Supelco (USA).

Les solvants sont filtrés avant utilisation sur un filtre Millipore (Supelco, USA) en nylon (0.45 μm , 47 mm de diamètre).

II.5.2 Préparation des échantillons

Les extraits sont filtrés, avant injection dans la colonne HPLC, sur un filtre Millipore (Supelco, USA) en nylon (0.45 μm , 25 mm de diamètre) avec un adaptateur Swinnex non stérile (25 mm de diamètre).

II.5.3 Instrumentation

Trois différentes colonnes HPLC ont été utilisées pour les analyses :

- RP-C₁₈ Lichrospher-100, 5 μm , 250x4 mm avec une précolonne Lichrocart-100, 5 μm , 4x4 mm muni d'un système manu-CART 4 mm (Merck, Allemagne).
- RP-C₁₈ Nucleosil-100, 7 μm , 250x4.6 mm avec une précolonne Nucleosil-100, 7 μm , 20x4 mm (Bischoff, Suisse).
- Nucleosil-100, 7 μm , 250x7 mm (Dr Ing. H. Knauer GmbH, Allemagne).

Deux appareils ont servi pour les analyses HPLC :

- HP-1050 couplé à un détecteur DAD HP-1040 A (Agilent)
- HP-1100 couplé à un détecteur UV à longueur d'onde variable (Agilent)

Différents programmes HPLC sont utilisés en fonction des analyses ; ils ont été nommés par rapport à leur utilisation.

II.5.4 Programmes HPLC

II.5.4.1 Programme HPLC « Thiolyse »

Application : Analyse des produits de réaction de la thiolyse

Colonne : RP-C₁₈ Nucleosil-100, 7 µm, 250x4.6 mm

Flux : 0.8 mL/min

λ : 280 nm

A : H₂O/HCOOH 98:2 (v/v)

B: CH₃CN/H₂O/HCOOH 80:18:2 (v/v/v)

Injection: 10 µL

Temps (min)	% A	%B
0	85	15
15	25	75
20	0	100
24	0	100
25	85	15
36	85	15

II.5.4.2 Programme HPLC « Stilbènes »

Application : Détection par LC/MS des stilbènes de l'hydrolyse enzymatique et des extraits tanniques

Colonne : RP-C₁₈ Lichrospher-100, 5 µm, 250x4 mm

Flux : 1 mL/min

λ : 307 nm

A : H₂O/CH₃CN 7:3 (v/v)

B: CH₃CN

Injection : 20 µL

Temps (min)	% A	%B
0	100	0
1	100	0
20	35	65
22	35	65
24	0	100
26	0	100
27	100	0
37	100	0

II.5.4.3 Programme HPLC « Phase normale »

Application : Analyse des extraits bruts de Gamay et de Gamaret

Colonne : Nucleosil-100, 7 µm, 250x7 mm

Flux : 1 mL/min

λ : 280, 254, 366 nm

A : CH₂Cl₂/MeOH/H₂O/TFA 10:86:2:0.005 (v/v/v/v)

B : CH₂Cl₂/MeOH/H₂O/TFA 82:18:2:0.005 (v/v/v/v)

Injection : 20 µL

Temps (min)	% A	%B
0	0	0
50	40	60
55	55	45
60	100	0
65	100	0
65.1	0	100
70	0	100

II.5.4.4 Programme HPLC « Les oligomères »

Application : Analyse LC/MS/MSⁿ des proanthocyanidines oligomériques

Colonne : RP-C₁₈ Nucleosil-100, 7 µm, 250x4.6 mm

Flux : 1 mL/min

λ : 280 nm

A : H₂O

B : H₂O/CH₃CN 2:8 (v/v)

Injection: 20 µL

Temps (min)	% A	%B
0	97	3
7	80	20
22	70	30
40	60	40
50	0	100
55	0	100
56	97	3
66	97	3

II.6 DETERMINATION DU TEMPS DE RETENTION DU PTEROSTILBENE SUR DIFFERENTES COLONNES HPLC

II.6.1 Colonne RP-C₁₈ Lichrospher-100, 5 µm, 250x4 mm

20 µL d'une solution de 0.2 mg/mL de pterostilbène (PM 256 g/mole, cf. chapitre II.10) sont injectés sur la colonne RP-C₁₈ Lichrospher-100, 5 µm, 250x4 mm avec le programme HPLC « stilbènes » décrit au chapitre II.5.4.2. L'HPLC est couplée à un spectromètre de masse : le LCQ de Thermofinnigan (USA) (cf. chapitre II.7.2.2). L'ion à m/z 255 [M-H]⁻ est fragmenté par l'application d'une tension de 1V dans l'*Ion Trap*, donnant un ion MS² à m/z 240. Le temps de rétention est de 16.8 min.

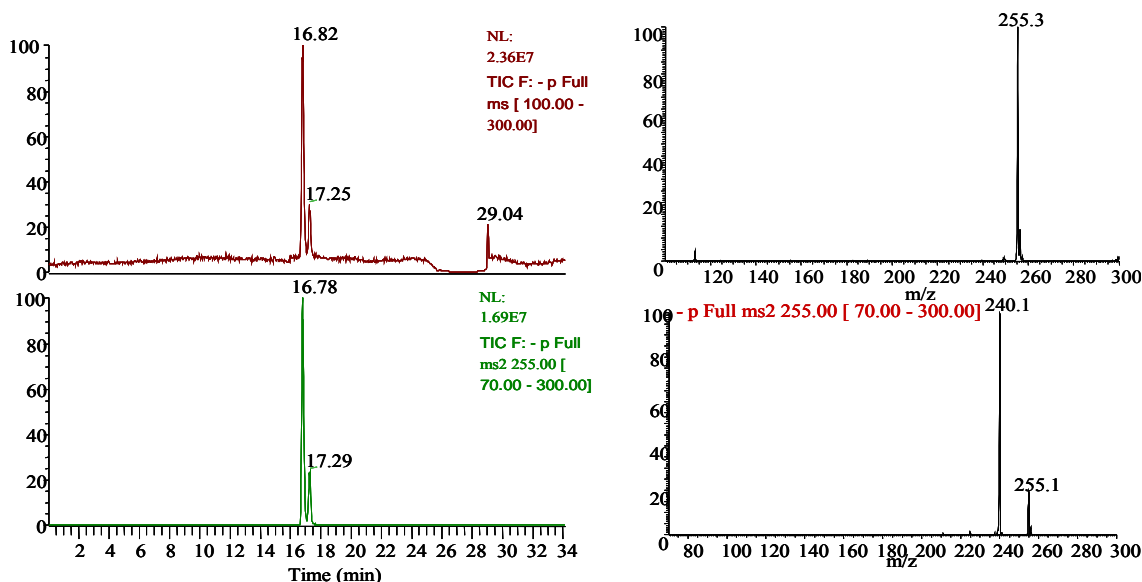


Figure II.6-1: Chromatogramme LC/MS du pterostilbène avec le spectre MS¹ et MS².

II.6.2 Colonne RP-C₁₈ Nucleosil-100, 7 µm, 250x4.6 mm

20 µL d'une solution de 0.2 mg/mL de pterostilbène (PM 256 g/mole, cf. chapitre II.10) sont injectés sur la colonne RP-C₁₈ Nucleosil, 7 µm, 250x4.6 mm avec le programme HPLC « les oligomères » décrit au chapitre II.5.4.4.

Le temps de rétention observé est de 41.8 minutes.

II.7 TECHNIQUES SPECTROSCOPIQUES ET SPECTROMETRIQUES

II.7.1 Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ont été mesurés sur un appareil Bruker AMX-400. Comme solvants deutérés, nous avons utilisé soit D₂O, Acétone-d₆, MeOH-d₄ ou CDCl₃ (Cambridge Isotope Laboratories Inc., USA).

II.7.2 Spectrométrie de Masse (MS)

Les extraits sont dissous dans l'acétone, le méthanol ou l'isopropanol (puriss. p.a., SDS, France) avant d'être analysés.

II.7.2.1 ESI-QIT/MS

L'appareil est un LCQ de Thermofinnigan (USA) (cf. chapitre I.5.4), équipé d'une source électrospray et d'un analyseur *Ion Trap*. Les paramètres de l'appareil sont ajustés en fonction de la méthode utilisée. En général les conditions suivantes ont été appliquées :

Tension de la source : 5 kV en positif et -3.5 kV en négatif

Température du capillaire : 210 °C

Flux d'azote : 900 mL/min

Flux auxiliaire d'azote : 300 mL/min

Tube lens offset : -40 à +40 V

Tension du capillaire : -30 à +30 V

Ces paramètres ne sont pas exhaustifs. Ils varient en fonction de la sensibilité de la méthode et de la calibration de l'appareil.

II.7.2.2 LC/MS

Les analyses LC/MS ont été effectuées sur le LCQ de Thermofinnigan (USA) en mode positif ou négatif. Le flux provenant de l'HPLC est séparé par un *Split* post-colonne, ainsi 90% du solvant est éliminé et 10% sont introduits dans la source ESI. Une solution de NH₄OH 5% est ajoutée en infusion à 3 µL/min avec une micro-pompe (Thermofinnigan, USA) afin de favoriser la déprotonation des ions uniquement en mode négatif. Les

paramètres utilisés sont identiques à ceux décrits dans le chapitre II.7.2.1. Nous avons appliqué différents modes d'analyse en fonction de l'expérience réalisée :

Le mode SIM : L'*Ion Trap* stocke sélectivement les ions préselectionnés, puis les scanne de manière à fournir une trace ionique SIM de chaque ion. Ceci permet d'augmenter considérablement la sensibilité de l'analyse.

Le mode *Dependant Scan Event* : Il utilise les critères du scan précédent pour l'application de la fragmentation MS/MS ou MSⁿ. Il s'agit entre autres de l'intensité du ion ou d'une liste d'ions préselectionnés. Pour l'analyse MSⁿ des oligomères, l'ion de plus forte intensité est selectionné, isolé, fragmenté et détecté. Le fragment est ensuite isolé, fragmenté puis détecté, et ainsi de suite jusqu'à que son intensité soit plus faible que 1×10^4 counts.

II.7.2.3 ESI-FT-ICR/MS

Ces mesures ont été effectuées par l'entreprise Bruker (Bremen, Allemagne), sur un appareil BioApex II 7.0 Tesla équipé d'une source ESI Apollo, en mode négatif par infusion directe. Les conditions sont les suivantes :

128 scans d'accumulation

Accumulation de 2 secondes dans l'hexapole pour chacun des scans

Voltage du capillaire: 4.3 kV

Tension du capillaire de sortie: -340 V

Amplitude (RF) de l'hexapole dans la source ESI: 500 V

Température du gaz séchant : 120 °C

Tensions de la trappe: -0.9 V (PV1) et -1.1 V (PV2)

Sidekick: -1.2 V (aucun gaz de collision n'est utilisé dans la cellule)

Ionization pulse length: 1.8 msec

Domaine de masse (m/z): 500 - 3000

Sweep width of detection: 217.4 kHz

Temps d'acquisition: 0.302 seconde

Acquisition time domain data size: 128 k

Processing data size: 256 k

II.7.2.4 MALDI-TOF/MS (home built, ETH, Zürich)

L'appareil a été construit par le groupe du Prof. R. Zenobi (ETHZ, Suisse). Il est équipé d'un analyseur *Time of Flight* d'une longueur de 2 m. Les ions sont désorbés par un laser incident (30°) UV, N₂, 337 nm (VSL-337ND-T), puis accélérés par une tension de 25 kV ; ils sont ensuite détectés par un détecteur pyroélectrique. L'énergie de chaque pulse varie entre 20-60 µJ. Une centaine de scans sont accumulés afin d'obtenir un spectre ayant un rapport signal/bruit élevé. Les mesures sont effectuées en mode positif. La matrice utilisée est l'acide *trans*-indolacrylique (IAA) (Fluka, Suisse). L'échantillon est préparé en superposant une couche de matrice, puis l'échantillon et finalement encore une fois la matrice dans des proportions décrites par G. Krueger [112].

II.7.2.5 MALDI-TOF/MS (Dynamo, Thermo Bioanalysis)

L'appareil utilisé est un DYNAMO de Thermo Bioanalysis (Spectronex, Suisse). Il est composé d'un analyseur *Time-of-Flight* d'une longueur de 1.2 m, d'un laser UV, N₂, 337 nm, d'une extraction dynamique et d'un détecteur multiplicateur d'électrons. L'échantillon est solubilisé dans le MeOH (0.01 mg/µL), puis 3 µL de cette solution sont dilués dans 10 µL d'une solution MeOH/H₂O 4:6 saturée d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (Fluka, Suisse). 2 µL de ce mélange sont déposés sur une plaque en métal. Les ions sont désorbés avec une énergie de laser de 48.00 µJ et une *delayed extraction* de 0.22 nanosecondes est appliquée.

Les standards de calibration internes sont l'*insulin bovine B-chain oxidized* m/z 3495.9 et l'angiotensine I humaine m/z 1296.7 (Sigma, Suisse).

II.8 ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'ε-VINIFERINE

L'isolement de ce composé a été effectué par le Dr. R. Pezet à Changins (Nyon, Suisse). 100 g de sarments de vigne (*Vitis vinifera*, var. Gamaret) sont broyés et extraits dans un litre d'un mélange H₂O/MeOH 7:3 (v/v) pendant 10 minutes dans l'obscurité. La solution est filtrée, puis la phase liquide est évaporée à sec avec un évaporateur rotatif (max. 30°C). Le résidu est solubilisé dans 300 mL de NaHCO₃ 3% et extrait trois fois avec 200 mL d'AcOEt. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na₂SO₄ et le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif (max. 30°C) pour obtenir 566 mg d'extrait brut. Celui-ci est ensuite solubilisé dans un mélange MeOH/H₂O 7:3 (v/v) et déposé sur une colonne RP-C₁₈ (Lichroprep, Merck, 23x2.5 cm). L'élution est la suivante : MeOH/H₂O 3:7, puis MeOH/H₂O 1:1 (v/v) et enfin MeOH. La fraction méthanolique pure est évaporée à sec et nous obtenons 181 mg d'un mélange de composés. Cette fraction est ensuite resolubilisée dans 5 mL de MeOH et 5 mL d'eau sont encore ajoutés. La solution est déposée sur une colonne RP-C₁₈ (Lichroprep, Merck, 23x2.5 cm) puis éluee successivement avec 100 mL de MeOH/H₂O 1:1 (v/v), 6:4 (v/v), 7:3 (v/v), puis MeOH pur. La fraction MeOH/H₂O 7:3 montre un composé fluorescent qui est isolé et le solvant est éliminé sous N₂. Le composé (34.48 mg) est purifié par HPLC semi-préparative (système HPLC Bruker):

Colonne : Lichrospher, Merck, RP-C₁₈, 50x2.5 cm

Flux : 3 mL/min

λ : 325 nm

Solvant A : MeOH/H₂O 4:6 (v/v)

Solvant B : MeOH

Temps (min)	% A	%B
0	100	0
140	33	77
145	55	100
180	0	100
195	100	0

Le composé est collecté entre 112-135 minutes. Le solvant est évaporé sous N₂ pour obtenir 28.6 mg de solide. Le produit est repurifié une dernière fois sur CCM préparative (SiO₂, plaque Merck, 20x20) avec un mélange CHCl₃/MeOH 8:1 (v/v). La bande fluorescente est délicatement retirée de la plaque et la silice est extraite avec du MeOH. Le composé obtenu est caractérisé par MS et RMN (cf. chapitre V.2).

II.9 SYNTHÈSE ET PURIFICATION DU RESVERATROL *TRANS*-DEHYDRODIMÈRE

Cette synthèse a été réalisée par le Dr. R. Pezet à la station fédérale de Changins (Nyon).

Le resvératrol *trans*-déhydrodimère est synthétisé par réaction enzymatique à partir du resvératrol (Sigma, Suisse) et de la stilbène oxydase, provenant de *Botrytis cinerea*, partiellement purifiée (fraction DEAE-Cl, 6B, 0.1 m NaCl) [80]. 10 mL d'une solution acétonique de resvératrol (5 mg/mL) sont dilués dans 1 L d'eau distillée. 2.4 mL d'enzyme (activité pour 10 µL : 122.58 nmoles oxydées par minute) y sont ajoutés. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à 30°C pendant 15 minutes. La phase aqueuse est extraite 3 fois avec de l'AcOEt (3 x 200 mL). Les phases organiques sont réunies et séchées sur Na₂SO₄ et le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif (max. 30°C). Le résidu est solubilisé dans un mélange MeOH/H₂O 3:7 (v/v) et déposé sur une colonne préparative RP-C₁₈ (1.5 x 10 cm), puis élué avec 100 mL de MeOH/H₂O 3:7 (v/v), 50 mL de MeOH/H₂O 1:1 (v/v) et 100 mL MeOH. La fraction méthanolique, contenant le composé, est évaporée à sec, puis est repurifiée par TLC préparative (SiO₂, 20x20, Merck) (éluant : CHCl₃/MeOH 8:1 (v/v)). La bande fluorescente (R_f : 0.25) est délicatement retirée et la silice est extraite avec du MeOH. Nous obtenons 16.6 mg de resvératrol *trans*-déhydrodimère pur.

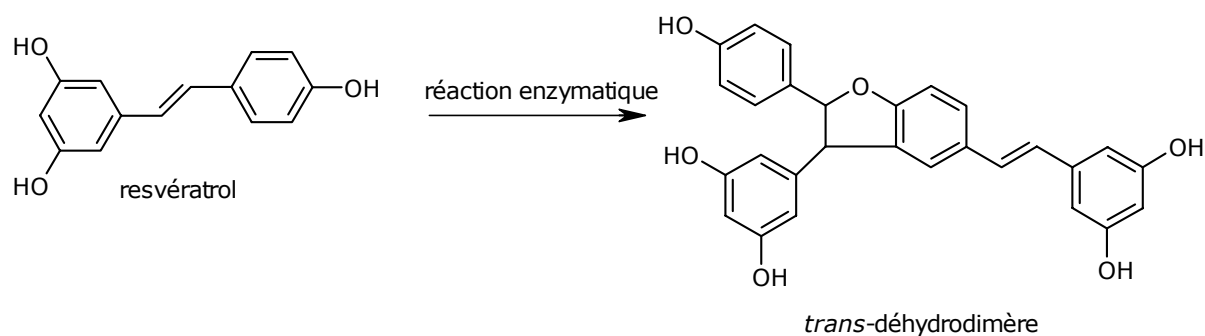


Figure II.9-1: Synthèse enzymatique du resvératrol *trans*-déhydrodimère

II.10 SYNTHÈSE DU PTEROSTILBÈNE

Certaines expériences ont nécessité l'utilisation du pterostilbène (cf. chapitres III.2 et III.3). Le Dr. V. Pont avait mis au point une méthode pour la synthèse de ce composé [113]. Afin de faciliter la manipulation, nous avons adapté les modes opératoires à des méthodes plus actuelles.

II.10.1 Produits et réactifs utilisés

Tous les produits et réactifs utilisés proviennent de la maison Fluka (Buchs, Suisse) et sont de qualité puriss. Les solvants, de qualité technique, ont été achetés à la maison SDS (France) et sont distillés deux fois sur une colonne Vigreux.

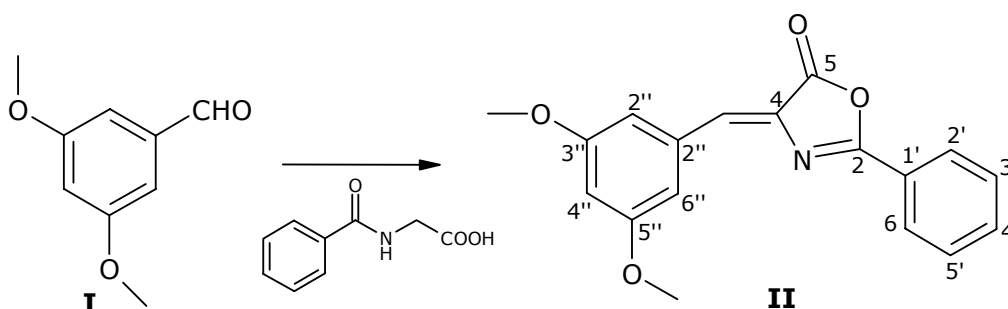
II.10.2 Chromatographie sur Couche Mince (CCM)

Les chromatographies sur couche mince ont été effectuées sur des plaques de silicagel 60 F254 (Merck, Allemagne) de 0.1 mm d'épaisseur sur feuille d'aluminium.

II.10.3 La Chromatographie Liquide à Basse Pression (LPLC)

Les chromatographies liquides à basse pression sont effectuées sur gel de silice (C-Gel, C-560, CU Chemie Uetikon AG, Suisse) de granulométrie 0.060-0.200 mm. Les colonnes utilisées sont en verre et leur grandeur et largeur sont adaptées en fonction de leur application.

II.10.3.1 Synthèse du 4-(3,5-dimethoxy-benzylidene)-2-phenyl-4H-oxazol-5-one



7.5 g (0.0451 mol) de diméthoxy-3,5-benzaldéhyde (**I**), 10.5 g d'acide hippurique (0.0587 mol), 7.5 g d'acétate de sodium (0.0914 mol) et 18 mL d'anhydride acétique sec sont introduits dans un bicol de 100 mL. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant une heure, puis il est refroidi dans un bain de glace pendant deux heures pour permettre la cristallisation du produit. 35 ml d'EtOH sont ensuite ajoutés et la solution est encore laissée ½ heure dans le bain de glace. Les cristaux jaunes sont filtrés sur büchner et lavés avec de l'EtOH glacé et de l'eau glacée.

Le solide est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (ligroïne 90-110°/AcOEt 3:1 (v/v)). On obtient 6.24 g (44.7%) de produit **II**.

P.F.:155-157 °C.

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) :

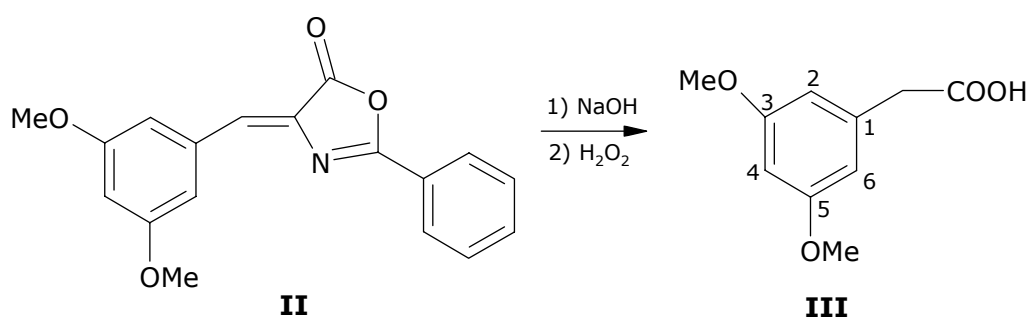
7.96 (2H, m, H-2',6'), 7.61 (1H, m, H-4'), 7.53 (2H, m, H-3',5'), 7.53 (1H, s, (C-4)-H), 6.82 (2H, d, H-2'',6''), 6.50 (1H, t, H-4''), 3.69 (6H, s, OCH₃).

¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD) :

168.78, 165.65, 161.28 (C-3'',5''), 135.49, 135.33, 133.78 (C-4-H), 132.35 (C-4'), 128.75 (C-3',5'), 127.73 (C-2',6'), 126.44, 107.75 (C-2'',6''), 102.25 (C-4''), 54.78 (OCH₃).

MS (ESI, positif, *m/z*) : 310 [M+H]⁺

II.10.3.2 Synthèse de l'acide 3,5-diméthoxy-phényl acétique



2.6 g (8.4 mmol) du composé **II** sont introduits dans 26 mL de NaOH 10%. Le mélange est chauffé à reflux pendant cinq heures, puis il est refroidi dans un bain de glace pendant une heure. 14 mL de H₂O₂ 10%, sont introduits, sous agitation, en faisant attention que la température ne dépasse pas 5°C. Le mélange réactionnel est laissé à température ambiante pendant 14 heures, sans agitation. La solution est acidifiée par addition d'HCl concentré, jusqu'à pH 3, puis la phase organique est extraite 3 fois à

l'AcOEt. Le produit est ensuite laissé au frigo durant la nuit, puis le précipité est récupéré par filtration sur büchner et séché.

Le composé est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (Ligroïne 90-100°/AcOEt/CH₃COOH 1:1:0.001 (v/v/v)). Nous obtenons 800 mg (48.6%) d'un solide jaune.

P.F. : 99-100 °C

¹H-RMN (400 MHz, CD₃OD) :

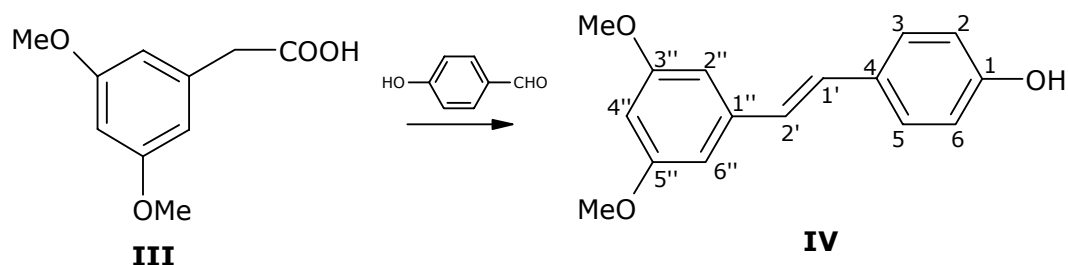
6.46 (2H, d, ³J=2.27 Hz, H-2,6), 6.39 (1H, t, ³J=2.25 Hz, H-4)), 3.77 (6H, s, OCH₃), 3.54 (2H, s, CH₂).

¹³C-RMN (100 MHz, CD₃OD) :

174.44 (C=O), 161.32 (C-3,5), 137.04 (C-4), 107.38 (C-2,6), 98.86 (C-1), 54.68 (OCH₃), 41.12 (CH₂),

MS (ESI, négatif, *m/z*): 195 [M-H]⁻

II.10.3.3 Synthèse du 4-[2-(3,5-dimethoxy-phenyl)-vinyl]-phenol



1 mL de pipéridine (10.1 mmol), 1.9 g (15.6 mmol) de *p*-hydroxybenzaldéhyde et 0.8 g (4.08 mmol) du produit **III** sont chauffés à 150°C dans un tricol relié à la trompe à vide, sous flux d'azote, 3 heures à 100°C et 3 heures à 150°C. Le mélange réactionnel est refroidi, puis extrait trois fois au chloroforme. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis filtrée. Le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif, puis le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice (Hexane/AcOEt 4:1 (v/v)). On obtient 460 mg (44%) de pterostilbène (**IV**).

P.F : 87°C

Matériel et méthodes

^1H -RMN (400 MHz, Acetone- d_6) :

7.45 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3,5), 7.18 (1H, d, $J_{\text{trans}}=16.4$ Hz, H-1'), 6.99 (1H, d, $J_{\text{trans}}=16.4$ Hz, H-2'), 6.86 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2,6), 6.73 (2H, d, $J=2.2$ Hz, H-4''), 6.38 (1H, t, $J=2.2$ Hz, H-2'',6''), 3.82 (6H, s, OCH_3)

^{13}C -RMN (100 MHz, Acetone- d_6) :

161.08 (C-3'',5''), 157.32 (C-1), 139.90 (C-1'), 128.83 et 128.78 (C-2' et C-4), 127.8 (C-3,5), 125.54 (C-2'), 115.43 (C-2,6), 103.99 (C-2'',6''), 99.12 (C-4''), 54.57 (OCH_3)

MS (ESI, négatif, m/z): 255 $[\text{M-H}]^-$

CHAPITRE III

DEVELOPPEMENT DE METHODES POUR L'ANALYSE DES TANINS

III DEVELOPPEMENT DE METHODES POUR L'ANALYSE DES TANINS

III.1 EXTRACTION ET FRACTIONNEMENT DES TANINS

III.1.1 Analyse par HPLC des extraits bruts de Gamay et de Gamaret

Les polyphénols sont des molécules très polaires qui sont solubles dans les solvants, tels que l'eau, le méthanol, l'éthanol et l'acétone. Leur solubilité dépend de leur degré de polymérisation. Les tanins à faible DPM (<6) sont solubles dans l'éthanol et le méthanol, ceux à DPM plus élevé (>6) sont solubles dans l'acétone/H₂O 75:25 ((v/v)). Leur extraction et leur fractionnement à partir du raisin, se base sur cette particularité [114].

L'extrait brut, obtenu comme décrit au chapitre II.2.2, contient des tanins mais aussi des acides phénoliques et des composés polaires (anthocyanes, flavanols, polysaccharides...). Les deux figures ci-dessous (Figure III.1-1 et Figure III.1-2) représentent les chromatogrammes des extraits bruts de Gamay et Gamaret injectés sur une phase normale avec le programme HPLC « phase normale » (cf.chapitre II.5.4.3) [115;116].

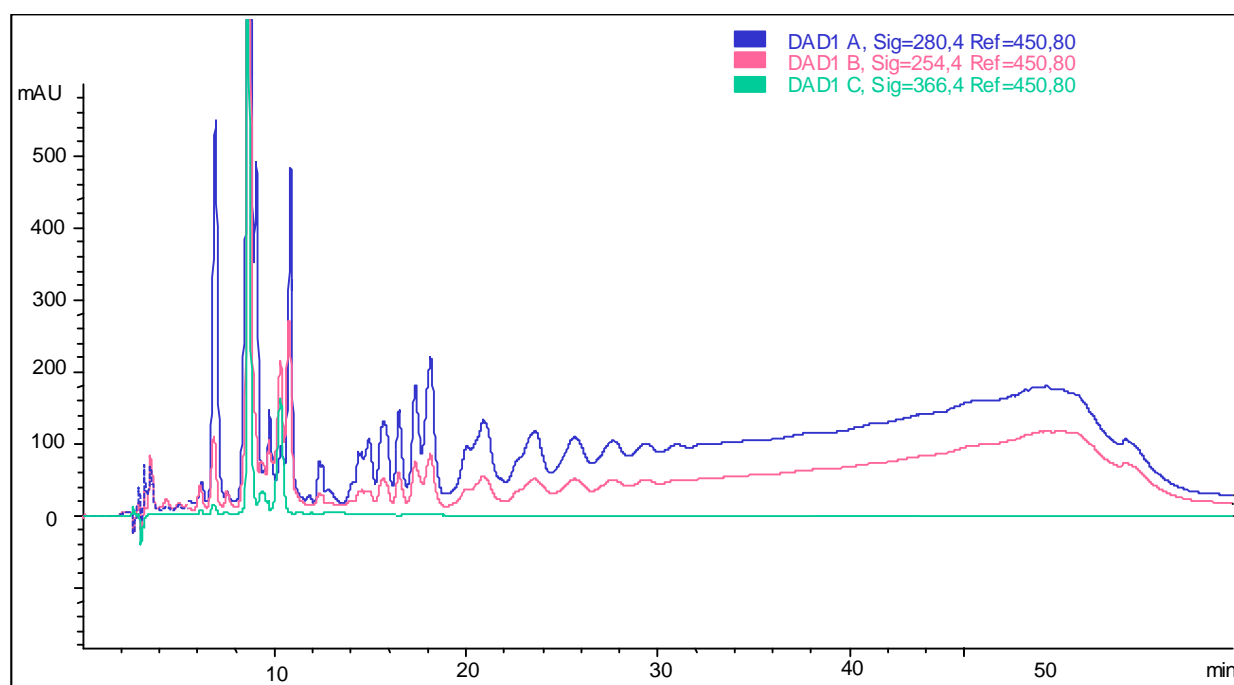


Figure III.1-1: Chromatogramme UV (280, 254 et 366 nm) de l'extrait Gamay.

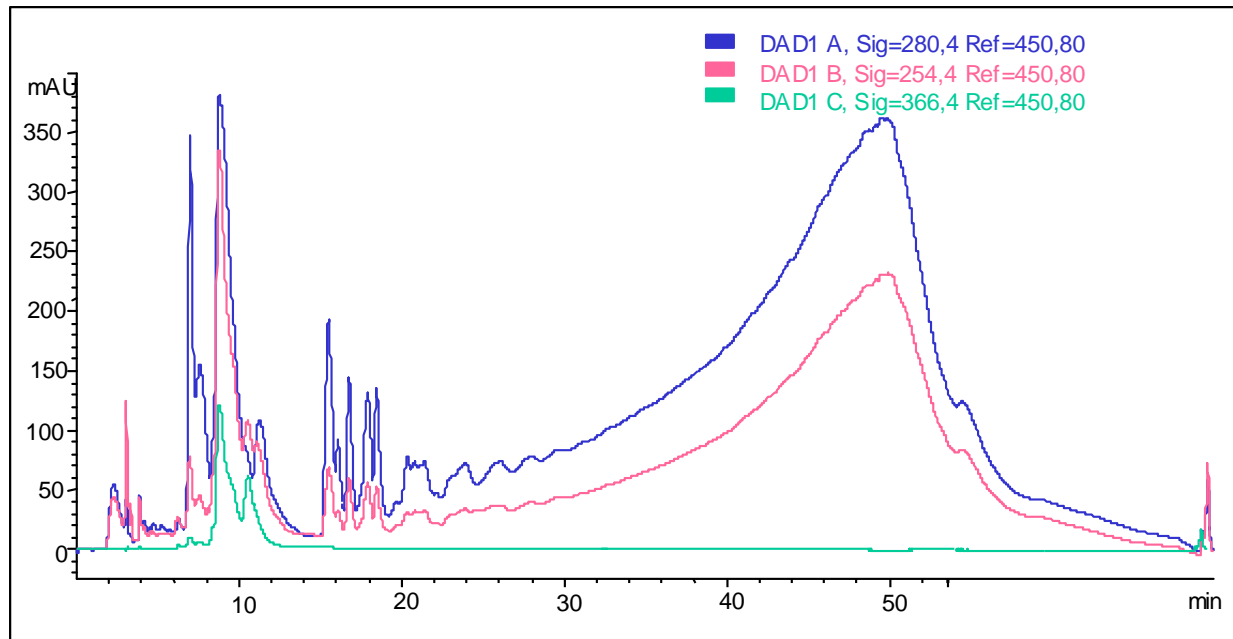


Figure III.1-2: Chromatogramme UV (280, 254 et 366 nm) de l'extrait Gamaret.

La première partie du chromatogramme (0-11 min.) correspond, entre autre, aux composés phénoliques simples, comme les flavonols, les acides phénoliques et les anthocyanes. La deuxième partie (12-19 min.) montre une série de larges pics non résolus pouvant être attribués à la catéchine, l'épicatéchine, l'(épi)catéchine-*O*-gallate, puis aux proanthocyanidines dimériques. Plus le poids moléculaire augmente, moins la séparation des pics est bonne. De ce fait, la troisième partie du chromatogramme (20-70 min.) correspond aux oligomères et aux polymères éluant sous la forme d'un large pic irrésolu.

La principale différence entre le chromatogramme de Gamay et celui de Gamaret est un rapport plus élevé entre les tanins oligomériques et les tanins polymériques dans l'extrait Gamay.

La séparation de ces composés par HPLC est très difficile dû au grand nombre d'isomères et de dérivés possibles pour chaque polymère. La présence d'esters galliques complique énormément l'analyse de ces molécules, car leur diversité augmente considérablement. L'analyse des tanins par HPLC est largement décrite dans la littérature, mais n'apporte aucune solution à la séparation d'extraits tanniques du raisin composés de proanthocyanidines et de proanthocyanidines galloylées [115;117-129].

III.1.2 Fractionnement des tanins oligomériques

Les chromatogrammes HPLC (phase normale) des extraits bruts de raisin (cf. chapitre III.1) montrent entre 20 et 28 minutes de larges pics irrésolus qui correspondent aux différents isomères oligomériques.

L'isolement de tels composés est décrit dans la littérature, mais nécessite l'utilisation de multiples méthodes de purification [130]. La séparation par HPLC sur phase normale s'est avérée être efficace lorsque l'extrait tannique ne contenait pas de proanthocyanidines galloylées [115]. Pour le raisin, la même méthode a été appliquée par V. Cheynier (1997) [131], mais sans grand succès. Le chromatogramme obtenu est semblable à ceux de Gamay et Gamaret (Figure III.1-1 et Figure III.1-2).

Afin d'obtenir une bonne séparation sur colonne HPLC, une nouvelle méthode a été développée permettant le fractionnement des tanins oligomériques (cf. Figure III.1-3 et Figure III.1-4). L'extrait brut est déposé en tête d'une colonne Toyopearl HW-40F, reliée à un détecteur UV. Une première élution est effectuée avec une solution EtOH/H₂O 50:50 (v/v) afin d'éliminer les acides phénoliques, les anthocyanidines et les sucres. Les tanins oligomériques sont ensuite obtenus par élution au MeOH (cf. chapitre II.2.3). Les deux chromatogrammes ci-dessous montrent très nettement les différents pics appartenant à des tanins oligomériques. En règle générale, plus leur temps de rétention est élevé, plus leur poids moléculaire augmente [132]. Mais, l'analyse par LC/MS nous démontrera que cette règle n'est pas applicable dans notre cas (cf. chapitre IV.2).

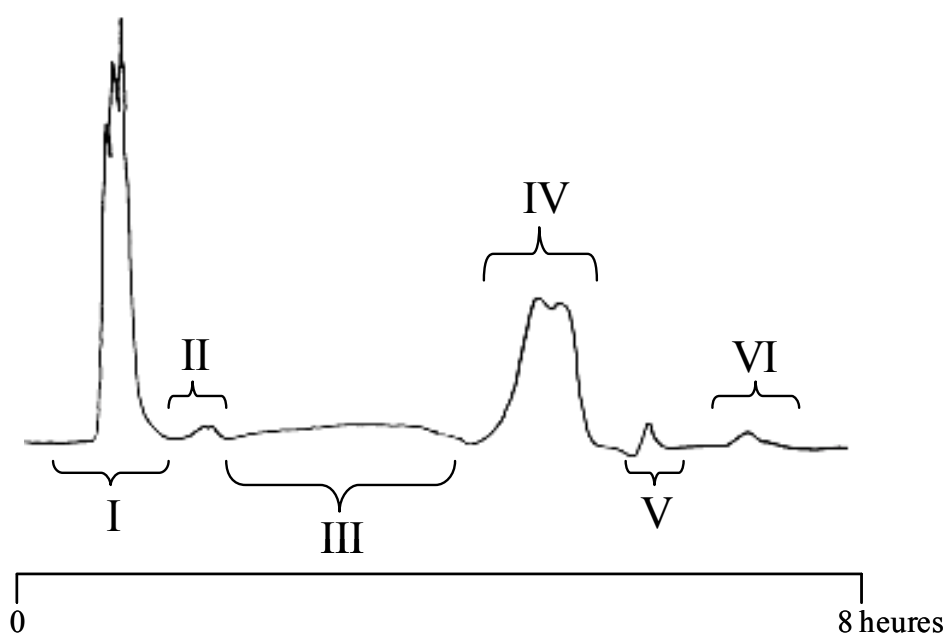


Figure III.1-3: Fractionnement des tanins oligomériques de Gamaret sur HW 40F.

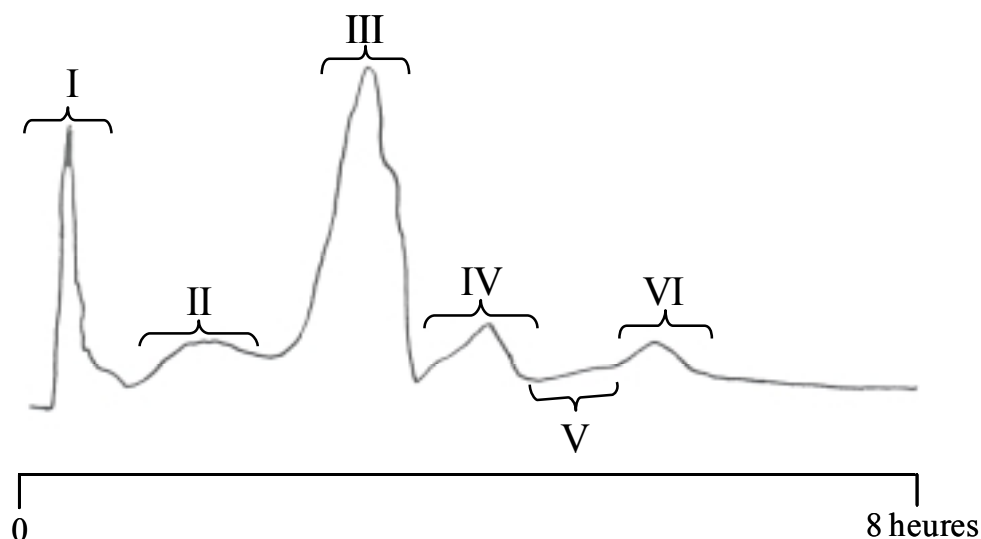


Figure III.1-4: Fractionnement des tanins oligomériques de Gamay sur HW 40F.

Les deux chromatogrammes se différencient par les concentrations des fractions oligomériques (II à VI). Ces fractions peuvent être ensuite analysées par LC/MS sur RP-C₁₈ avec le programme HPLC « les oligomères » (cf. chapitres IV.2 et II.5.4.4).

III.1.3 Extraction des tanins polymériques

L'extrait brut est composé d'un mélange d'acides phénoliques, d'anthocyanes, de sucres, de proanthocyanidines oligomériques et polymériques. Grâce aux différences de solubilité et d'affinité avec les phases LH-20 et Toyopearl HW-40S, il est possible de séparer sélectivement ces différents composés dans le but d'obtenir une fraction contenant les molécules simples, une fraction oligomérique et une fraction polymérique à DPm élevé (cf. chapitre II.2.4) [114;133].

Plus la grappe est mûre, plus la purification de la fraction polymérique est difficile. Ceci est dû à l'augmentation de la quantité d'anthocyanes et de sucres présents dans le grain.

III.1.4 Détermination du degré de polymérisation moyen (DPm) par thiolysse

Cette réaction permet de déterminer le degré moyen de polymérisation (DPm) d'une fraction tannique via la rupture de la liaison interflavanique, ceci en milieu acide et en présence d'un agent nucléophile fort : l'alpha-toluène thiol [134] (cf. chapitre II.3.1) [28;35;135]. La rupture de la liaison carbone-carbone libère toutes les unités terminales telles qu'elles et toutes les unités intermédiaires et supérieures sous la forme de

carbocations (cf. chapitre I.2.2.3), puis ceux-ci réagissent avec l'alpha-toluène thiol pour former des dérivés benzylthioéther ; les unités terminales sont conservées intactes sous la forme de monomères (Figure III.1-5). La stéréochimie de toutes les unités est conservée de même que les substituants tels que les galloates (voir mécanisme réactionnel en annexe) [134].

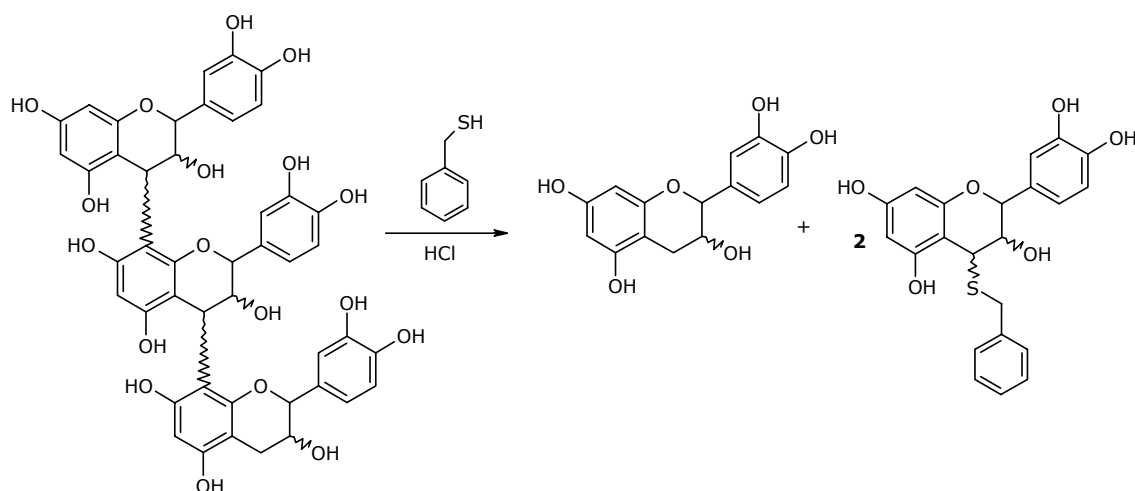


Figure III.1-5: Schéma réactionnel de la thiolysse

Le DPM se détermine par le rapport de toutes les unités (terminales, intermédiaires et supérieures) sur le nombre d'unités terminales.

$$\text{DPM} = \frac{\Sigma \text{ toutes les unités (terminales + intermédiaires+ supérieures)}}{\Sigma \text{ unités terminales}}$$

Le mélange réactionnel obtenu a été caractérisé par LC/ESI-MS en mode négatif et positif avec une colonne RP-C₁₈ selon le programme HPLC « thiolysse » (cf. chapitre II.5.4.1). Certains produits de la réaction s'ionisent beaucoup mieux en mode positif et d'autres en mode négatif.

Tableau III.1-1: Caractérisation des composés de réaction de la thiolysse par LC/ESI-MS en comparant le mode positif et négatif.

Composé	RT (min)	[M+H] ⁺	Intensité des ions	[M-H]	Intensité des ions
Catéchine	8.7	291	4.50E+05	289	1.80E+05
Epicatéchine	9.5	291	2.40E+05	289	8.80E+04
Epicatéchine-3-OG	10.9	443	0.00E+00	441	9.40E+05
Cat ou Epicat-SH	14.1	413	0.00E+00	411	1.40E+04
Epigallocatechine-SH	14.5	429	2.00E+05	427	1.60E+04
Catéchine-SH	15.5	413	2.70E+04	411	8.60E+05
Epicatéchine-SH	16.1	413	2.60E+05	411	1.00E+04
Epicatéchine-3-OG-SH	16.7	565	1.90E+06	563	2.20E+06

Développement de méthodes pour l'analyse des tanins

L'intensité des ions et quasiment semblable entre le mode négatif et positif, mais l'épicatéchine-3-OG (RT 10.9 min.) et les dérivés de la catéchine ou de l'épicatéchine (Rt 14.1 min.) ne sont ionisés qu'en mode négatif (cf. Figure III.1-6 et Figure III.1-7).

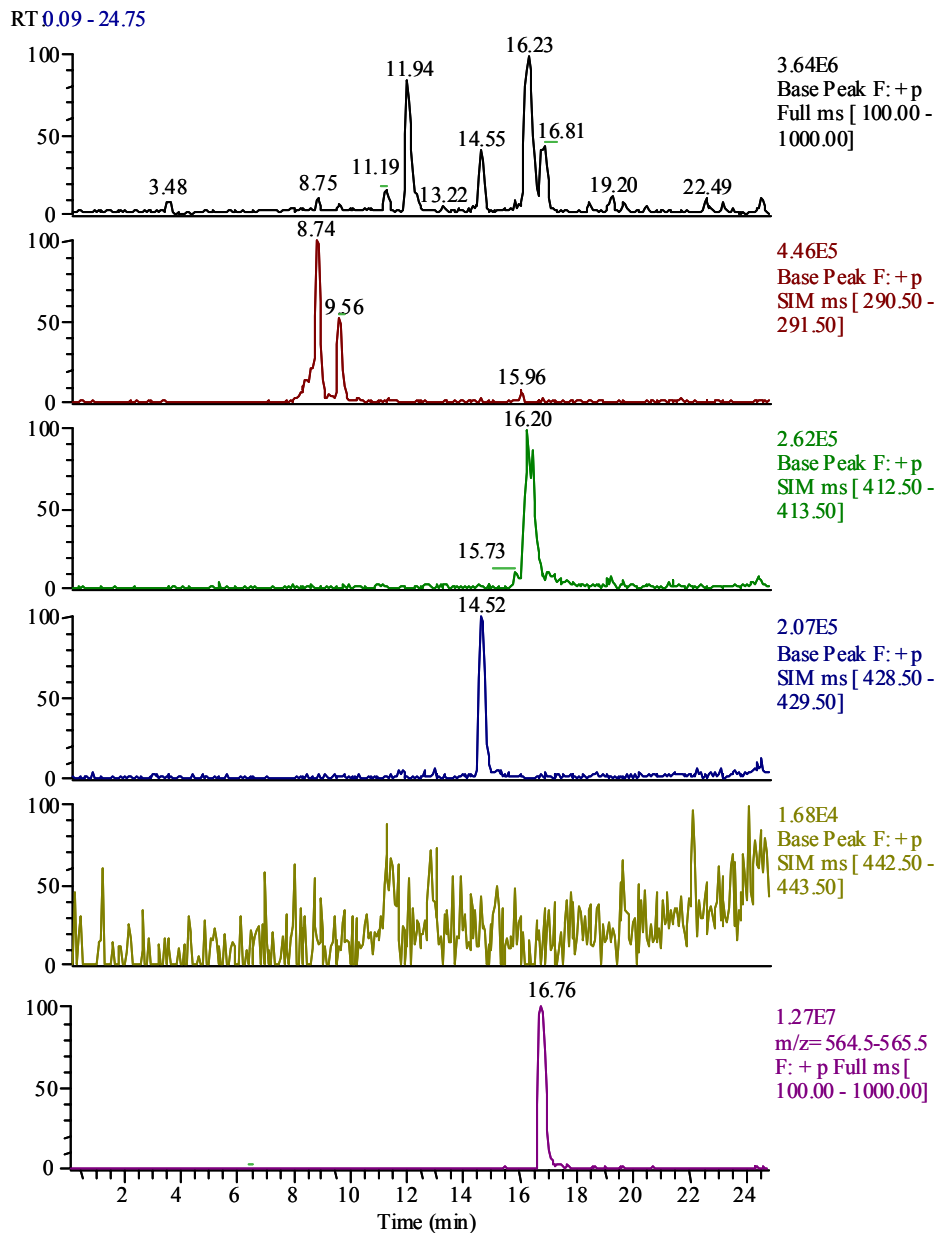


Figure III.1-6: Caractérisation de la thiolysé par LC/ESI-MS en mode positif.

Développement de méthodes pour l'analyse des tanins

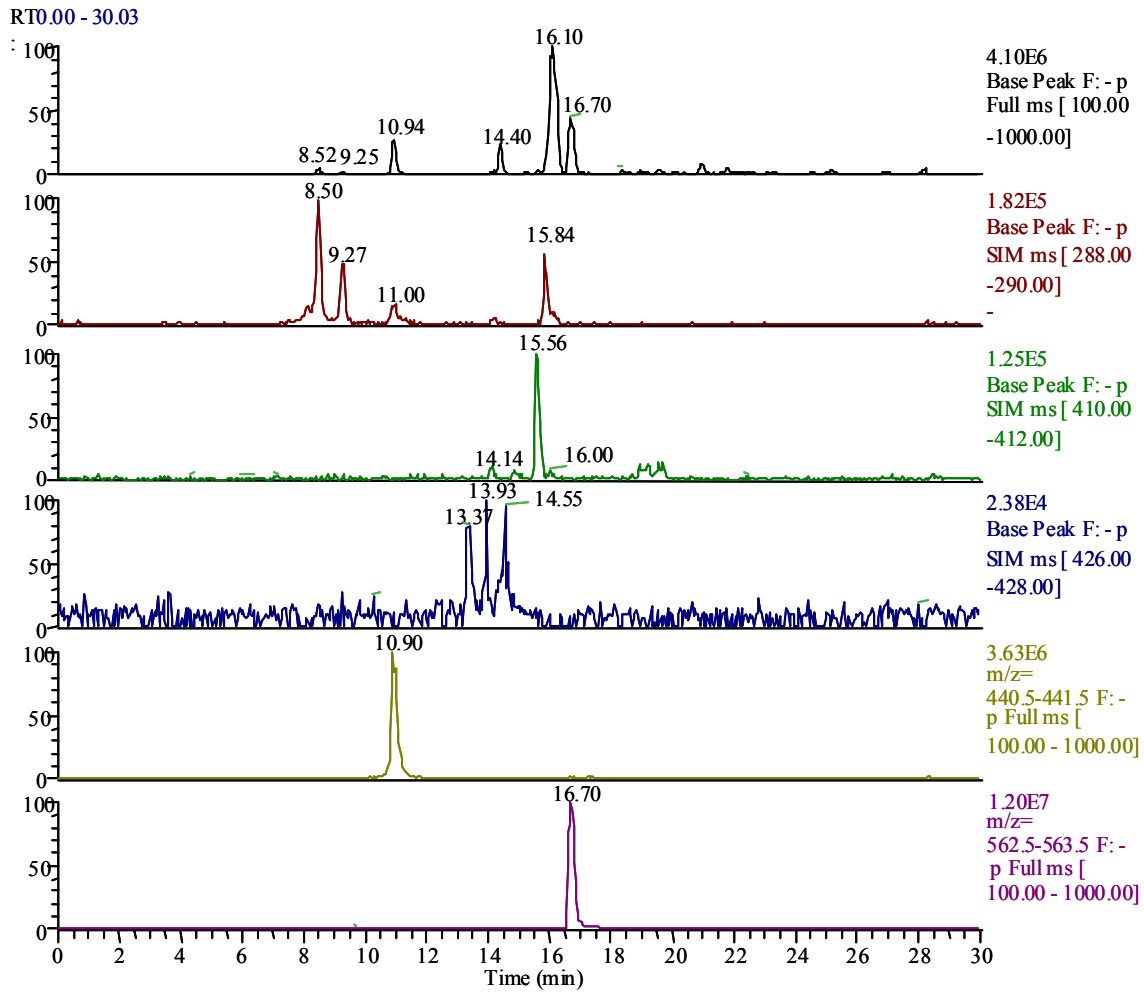


Figure III.1-7: Caractérisation de la thiolysse par LC/ESI-MS en mode négatif.

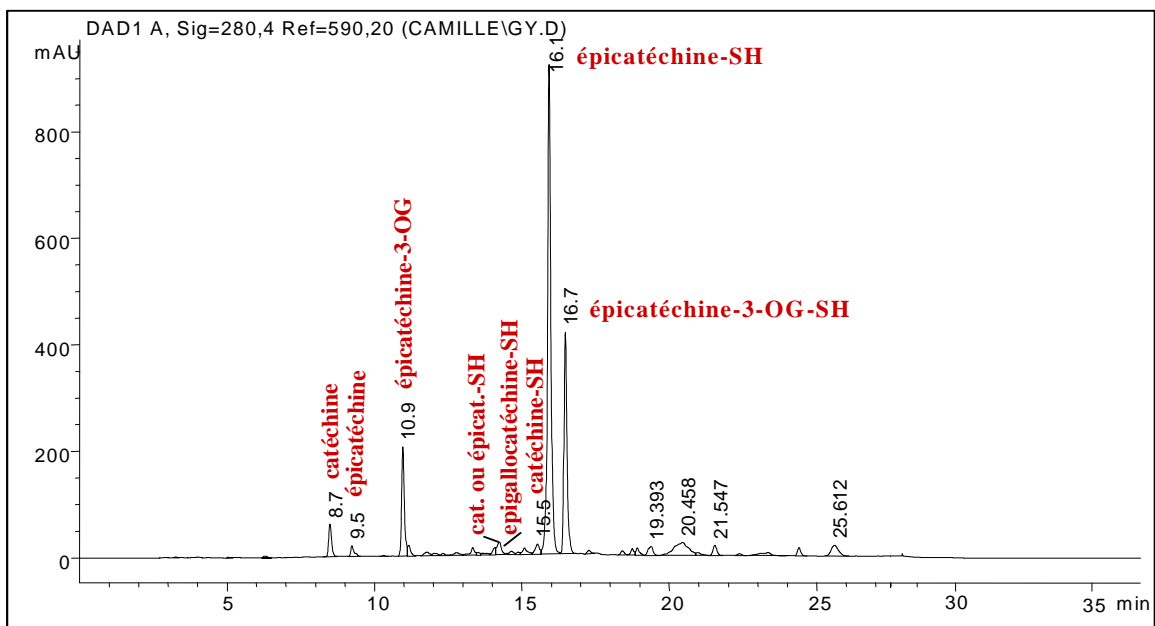


Figure III.1-8: Chromatogramme HPLC UV (280 nm) de la réaction de thiolysse de la fraction acétone de Gamay selon le programme HPLC « thiolysse ».

La catéchine et l'épicatéchine (m/z 290) s'ionisent aussi bien en mode positif qu'en mode négatif. L'ion à 15.8 min ($289 [M-H]^-$) est certainement un composé thiolysé, secondaire, coéluant avec l'épicatéchine-SH. L'épicatéchine-3-O-gallate (m/z 442) ne s'ionise qu'en mode négatif ($441 [M-H]^-$). En effet, l'acide gallique est un composé riche en électrons, qui, par la présence de trois hydroxyles sur le cycle benzénique, peut facilement perdre un proton. L'intensité de l'ion en mode négatif ($411 [M-H]^-$) à RT=14.1 min est très faible, car il ne se trouve qu'en quantité insignifiante dans les fractions que nous avons analysées (cf. Figure III.1-8). L'épigallocatechine-SH (m/z 428) s'ionise très bien en mode positif, comparé au mode négatif. Elle n'est pas détectée sous sa forme native car elle ne doit pas être présente en tant qu'unité terminale. La catéchine-SH est en quantité moindre par rapport à l'épicatéchine-SH (m/z 413). Finalement, l'épicatéchine-3-O-gallate-SH (m/z 564) se détecte facilement dans les deux modes d'ionisation. Cette analyse des produits de réaction de la thiolysé nous a permis de caractériser les pics du chromatogramme UV afin de calculer les DPM de chaque fraction.

III.1.5 Fractionnement de la fraction polymérique en fonction du degré de polymérisation moyen (DPM)

Il est important de rappeler qu'un des buts de ce travail est d'étudier l'inhibition de la stilbène oxydase par les tanins condensés. La fraction polymérique est de loin la plus active, et de ce fait il a fallu développer une méthode afin de mettre en évidence la relation entre le DPM des tanins et leur pouvoir inhibiteur.

Plusieurs méthodes décrites dans la littérature, ont été mises au point pour la séparation de tanins oligomériques et polymériques en fonction de leur poids moléculaire : par *gel permeation chromatography* de tanins acétylés provenant de la plante *Eucalyptus* spp. [136], par *counter-current chromatography* [137;138], par chromatographie d'affinité [139], sur cartouches Sep-Pak C₁₈ avec des tanins de la grappe de raisin [140] et sur Fractogel Toyopearl HW-40S [141;142]. D'autres techniques utilisant l'HPLC avec une colonne phase normale ou inverse ont été développées [115;116;125;126;141].

III.1.5.1 Fractionnement de la fraction polymérique sur poudre de verre

B. Labarbe (1999) [143] a mis au point une méthode de fractionnement des tanins polymériques par DPM croissant. Elle se base sur la solubilité des tanins en fonction du pourcentage de MeOH dans un mélange MeOH/CHCl₃. Un extrait polymérique de tanins

de raisin est déposé sur une phase constituée de poudre de verre, puis est élué par un gradient croissant de MeOH/CHCl₃ (cf. chapitre II.2.5.1).

Cette méthode a été appliquée à l'extrait Gamay (Figure III.1-9).

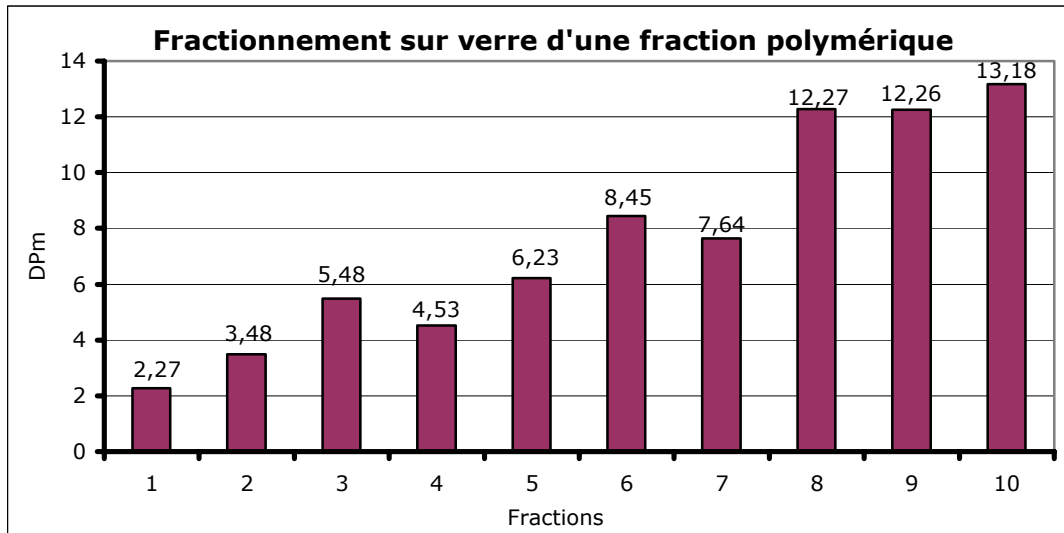


Figure III.1-9: Fractionnement sur poudre de verre d'une fraction polymérique.

La fraction polymérique de départ a un DPM de 9. Grâce à ce fractionnement, nous obtenons des DPM variant entre 2.27 et 13.18. Ce graphique montre une augmentation du DPM en fonction du pourcentage de MeOH, mais pas de manière linéaire. Ceci est en partie dû à la formation d'une croûte en tête de colonne. Les tanins de faible DPM se trouvent encapsulés dans cet amalgame, ne se libérant qu'avec un pourcentage élevé de MeOH. Ce résultat n'étant pas satisfaisant, nous avons cherché une autre phase permettant de fixer l'extrait polymérique en tête de colonne et d'élué sans que la phase intervienne de manière déterminante. Nous nous sommes orientés vers des phases hydrophobes et poreuses.

III.1.5.2 Fractionnement de la fraction polymérique sur résines

Les résines rélite SP411 et LCC-Microsphères-DVB-450-1200 (LCC Engeneering and Trading, Suisse) sont des polymères synthétiques, très poreux, hydrophobes, formés de styrène et de divinylbenzène (DVB).

La grandeur de la particule, le diamètre des pores et leur surface varient. Ces caractéristiques sont décrites dans le Tableau III.1-2.

Tableau III.1-2: Résumé de certaines caractéristiques des résines utilisées.

	Diamètre de la particule (μm)	Diamètre des pores (\AA)	Surface (m^2/g)
Rélite SP411	300-800	200-300	600
LCC-Macrosphères-	450	180	1200

La phase LCC-Microsphères-DVB-450-1200 possède un diamètre des pores plus petit (180 \AA) et une surface deux fois plus grande (1200 m^2/g) en comparaison avec la rélite SP411.

L'extrait polymérique de Gamay (cf. chapitre III.1.3) a été fractionné sur la rélite SP411 puis sur la phase LCC-Macrosphères-DVB-450-1200 en appliquant le gradient d'élution décrit dans le Tableau III.1-2. Les graphiques ci-dessous nous montrent l'évolution des Dpm en fonction du pourcentage de MeOH contenu dans l'éluant, correspondant aux fractions 1 à 10 (cf. chapitre II.2.5).

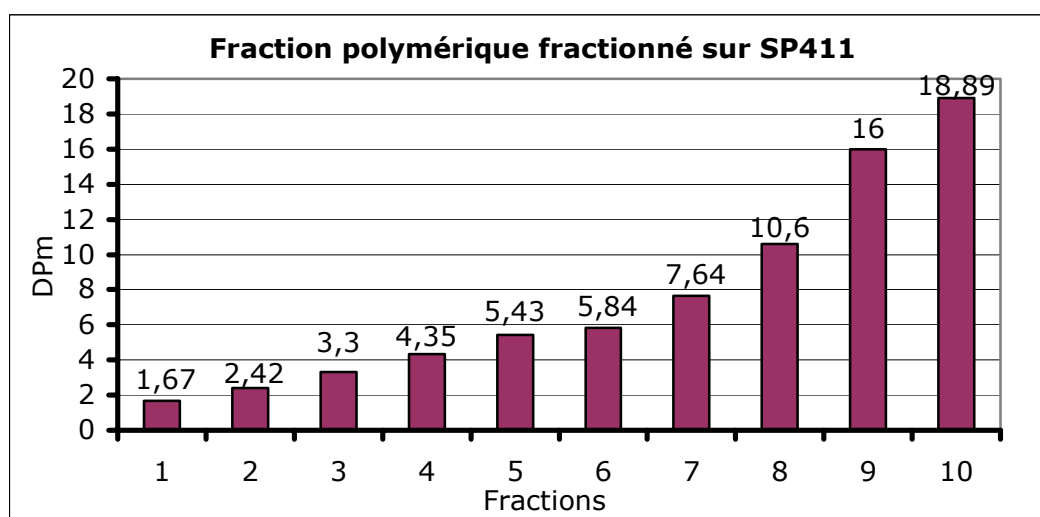


Figure III.1-10: Fractionnement de la fraction polymérique de Gamay sur la rélite SP411

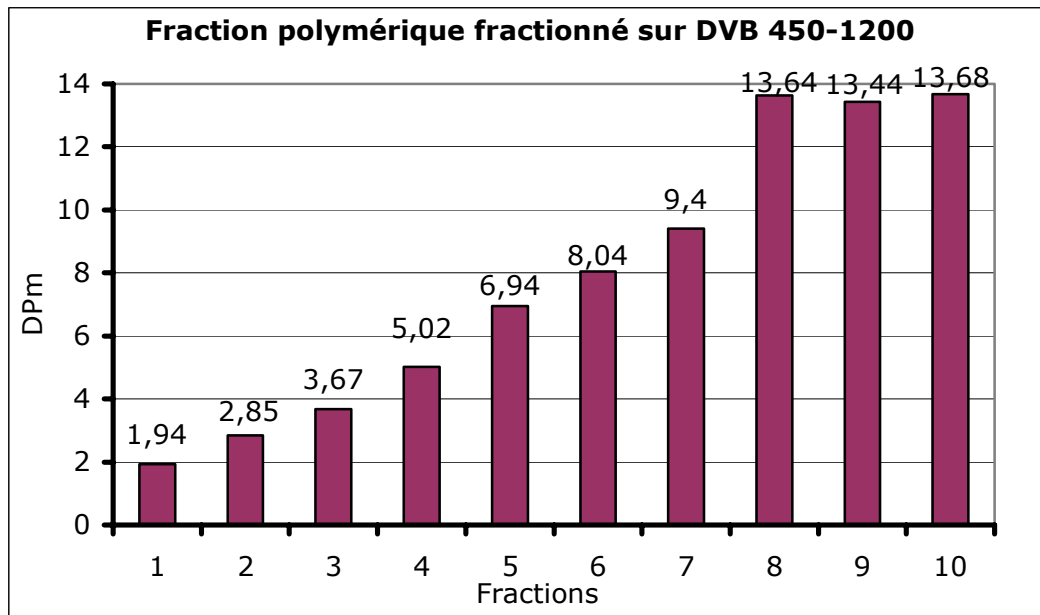


Figure III.1-11: Fractionnement de la fraction polymérique de Gamay sur la phase LCC-Macrosphères-DVB-450-1200

La rélite SP411 permet un fractionnement régulier du mélange polymérique avec une augmentation croissante du DPM. En comparaison, la phase LCC-Macrosphères-DVB-450-1200 donne un fractionnement régulier jusqu'à un DPM de 9,4 puis les trois dernières fractions ont un DPM constant de 13 environ. D'après les résultats, il s'avère que la rélite SP411 permet un fractionnement plus uniforme que la phase LCC-Macrosphères-DVB-450-1200. Les raisons sont peut-être en relation avec le diamètre des pores et la surface, mais il est difficile de trouver une réponse si la nature exacte des interactions entre la phase et les tanins ne sont pas connues.

III.2 HYDROLYSE ENZYMATIQUE DE LA FRACTION POLYMÉRIQUE

Les fractions polymériques de Gamay et de Gamaret, en faible concentration, inhibent la stilbène oxydase. Les tanins peuvent complexer des molécules grâce à leurs groupements hydroxyles, en formant des liaisons hydrogènes ou éventuellement par estérification de la fonction alcool oxydée en position C-3 de l'unité monomérique [144]. Une manière de libérer ces composés se fait par hydrolyse enzymatique par la tannase (estérase) [145-147]. Cette enzyme est extraite de variétés d'*Aspergillus* [146;148]. Elle permet d'hydrolyser les fonctions esters et d'en libérer les composés [146;147]. Cette réaction a été appliquée à nos extraits polymériques de Gamay et Gamaret ; ceci afin de contrôler l'absence ou la présence de pterostilbène dans ces fractions.

L'hydrolyse enzymatique est effectuée selon la méthode décrite au chapitre II.3.2. Le produit de réaction est analysé par LC/MS, en mode négatif, en appliquant différents filtres. Le poids moléculaire du pterostilbène est de 256 g/mole. La méthode d'analyse comprend un scan de 100-300 uma, un scan SIM à 255 ([M-H]⁻), un scan MS/MS de l'ion parent et un scan SRM (*Selected Reaction Monitoring*) de l'ion *m/z* 255 avec un ion fils de *m/z* 240 et ceci à une tension de fragmentation de 1V.

Le temps de rétention du pterostilbène est de 16.8 minutes sur la colonne RP-C₁₈ avec le programme HPLC « stilbènes » (cf. chapitre II.5.4.2).

L'analyse LC/MS des fractions hydrolysées a été effectuée pour Gamay et Gamaret. Les échantillons sont dissous dans un mélange CH₃CN/H₂O 3:7 (v/v) puis ils sont injectés sur la colonne HPLC.

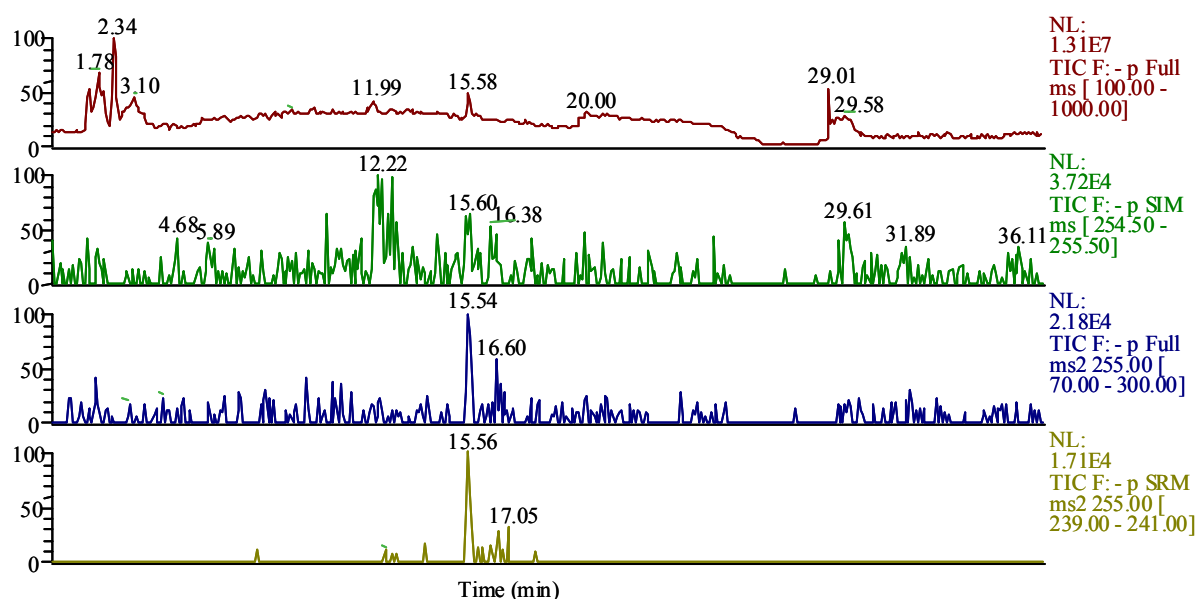


Figure III.2-1: Recherche par LC/MS du pterostilbène dans la fraction polymérique hydrolysée de Gamaret.

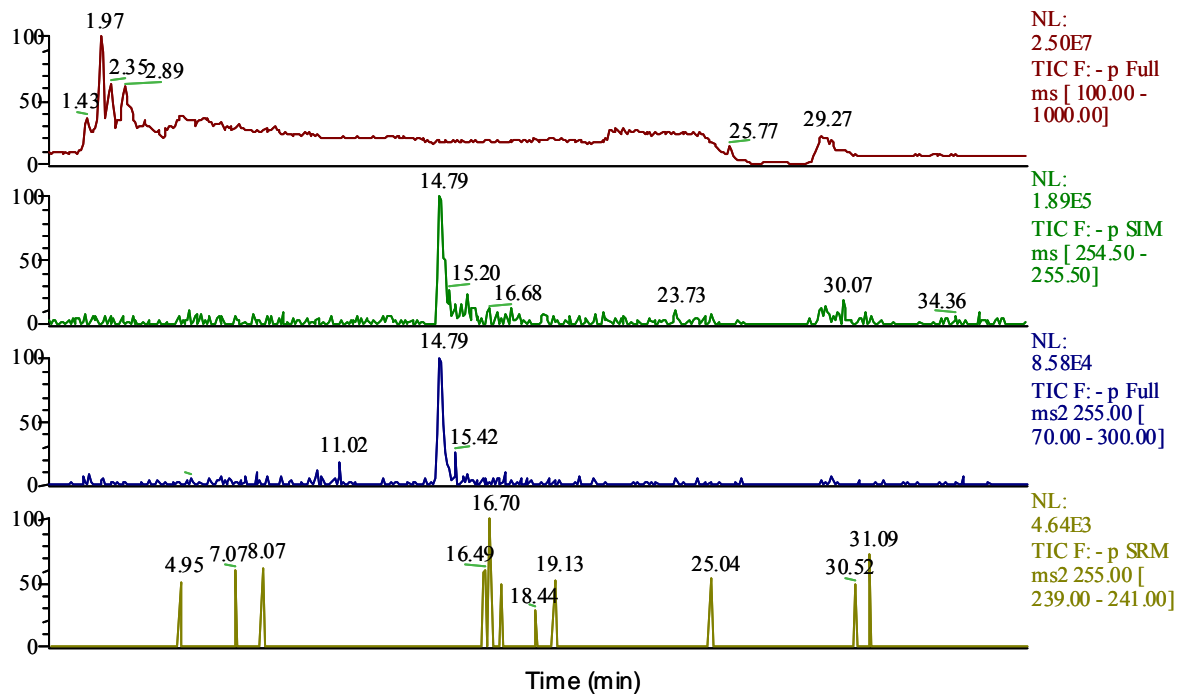


Figure III.2-2: Recherche par LC/MS du pterostilbène dans la fraction polymérique hydrolysée de Gamay.

La fraction Gamaret ne contient pas de pterostilbène, la trace SIM à m/z 255 $[M-H]^-$ ne montre aucun pic à 16.8 min pouvant correspondre au temps de rétention de ce composé. Par contre, un ion à 15.60 minutes est visible. Sa masse est identique à celle du pterostilbène, de même pour sa fragmentation MS^2 (m/z 240). Nous pouvons aussi observer la trace SRM correspondant à ce composé inconnu. Afin de confirmer ce résultat, l'échantillon a été dopé avec du pterostilbène. La trace SIM montre clairement deux pics à des temps de rétention différents.

L'hydrolysate de la fraction polymérique de Gamay ne contient pas de pterostilbène. Par contre, il y a aussi un composé de même poids moléculaire (RT 14.79 min.) que l'on peut observer sur la trace SIM à 255. Le spectre MS^2 de ce composé fournit un ion à m/z 213, correspondant à une perte de 42 uma. La trace SRM ne montre aucun pic à ce temps de rétention.

En résumé, le pterostilbène n'est présent dans aucun des échantillons. Il y a par contre, des composés non identifiés qui peuvent être de la famille des stilbènes. De ce fait, nous pouvons supposer qu'aucune des molécules recherchées n'est liée par une liaison ester aux proanthocyanidines.

III.3 RECHERCHE DU PTEROSTILBÈNE DANS LES FRACTIONS OLIGOMÉRIQUES

Le Dr. Roger Pezet a montré que le pterostilbène était absent dans les variétés résistantes, mais qu'il se trouvait en faible quantité dans les variétés sensibles comme Gamay. Le but de cette analyse est de vérifier sa présence ou son absence dans les fractions oligomériques de tanins de grappes saines de Gamay et de Gamaret. Celles-ci ont été obtenues selon la méthode décrite au chapitre III.1.2.

Le temps de rétention du pterostilbène est de 41.8 min. sur la colonne RP-C₁₈ avec le programme HPLC « les oligomères » (cf. chapitre II.5.4.4).

Toutes les fractions oligomériques sont successivement injectées et analysées par LC/MS en appliquant les modes SIM et SRM, décrits au chapitre III.2.

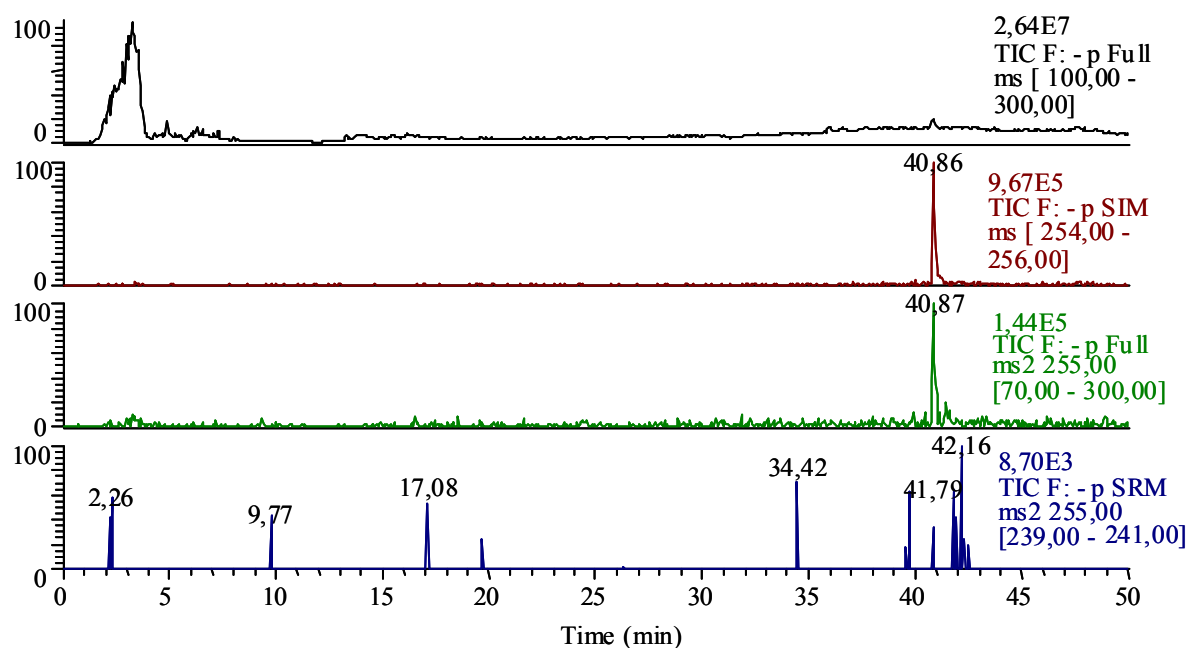


Figure III.3-1: Trace SIM et SRM d'une fraction oligomérique de Gamaret.

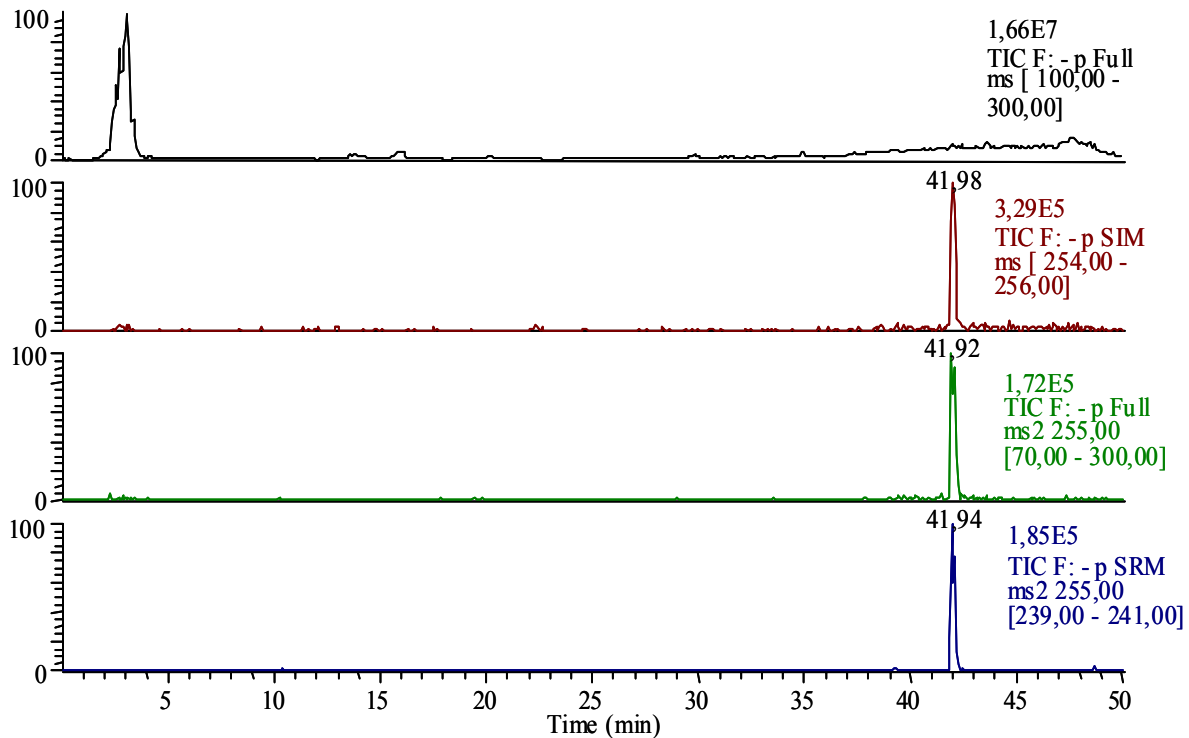


Figure III.3-2: Trace SIM et SRM d'une fraction oligomérique de Gamay.

Les fractions oligomériques de Gamaret ne contiennent pas de pterostilbène, mais un composé qui élué à un temps de rétention proche de celui du pterostilbène (Rt 40.86 min.). Il a le même poids moléculaire (m/z 255 [M-H]), mais son fractionnement MS/MS ne fournit pas un pic à m/z 240 mais à m/z 213. On pourrait émettre l'hypothèse que cette molécule soit semblable à celle détectée dans l'hydrolyse enzymatique de Gamay.

Par contre, une des fractions oligomériques de Gamay contient du pterostilbène, le temps de rétention, le poids moléculaire, sa fragmentation MS/MS et SRM coïncident parfaitement.

Ces résultats correspondent aux recherches menées par le Dr. Roger Pezet. Il a été mis en évidence que le pterostilbène est absent dans la variété résistante Gamaret, mais par contre, qu'il se trouve en faible quantité dans les variétés sensibles comme Gamay.

CHAPITRE IV

CARACTERISATION DES TANINS PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

IV CARACTERISATION DES TANINS PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Les proanthocyanidines se trouvent sous la forme d'un mélange complexe dans les extraits bruts. Grâce aux méthodes d'extraction et de fractionnement, décrites au chapitre III, il a été possible d'analyser ces fractions par spectrométrie de masse. Différentes techniques d'ionisation ont été utilisées pour caractériser les tanins oligomériques et polymériques :

- Premièrement, la fragmentation MS^n des proanthocyanidines oligomériques a été étudiée sur le LCQ de Thermofinnigan avec une source ESI. Cette recherche a été possible grâce à l'analyseur *Ion Trap*.
- Les tanins oligomériques des fractions obtenues selon la méthode décrite au chapitre III.1.2 sont analysés par LC/ESI-MS sur RP-C₁₈ (LCQ, Thermofinnigan).
- Le mélange de tanins polymériques (cf. chapitre II.2.4) a été analysé par ESI-QIT/MS (LCQ, Thermofinnigan), ESI-FT-ICR/MS (BioApex II, Bruker), en infusion ; MALDI-TOF/MS (fabriqué maison, ETHZ, *Prof. R. Zenobi*), MALDI-TOF/MS (Dynamo, Thermo Bioanalysis). Les instruments utilisés nous ont permis de comparer les différents ions formés, la sensibilité et la résolution des appareils. Chaque spectre nous a fourni des informations importantes sur la composition de la fraction polymérique.
- Finalement, les fractions obtenues par fractionnement de la fraction polymérique sur rélite SP411, selon la méthode décrite au chapitre III.1.5.2, ont été analysées par MALDI-TOF/MS (Dynamo, Thermo Bioanalysis).

IV.1 FRAGMENTATION ESI-MSⁿ DES TANINS OLIGOMERISQUES

L'étude de la fragmentation MSⁿ des proanthocyanidines oligomériques a été réalisée en infusant une solution très diluée de tanins polymériques. L'ion à fragmenter est isolé dans l'*Ion Trap* ; une tension de 1V (correspondant à une énergie de 20% sur le programme du LCQ) lui est appliquée; le fragment est éjecté de la trappe, puis détecté. Il est ensuite isolé et une tension de 1V est à nouveau appliquée ; il est ainsi refragmenté, éjecté puis détecté. Ce schéma peut se répéter jusqu'à 10 fois, mais dans notre cas, cela ne nous apporte aucune information supplémentaire au-delà de la fragmentation MS⁵.

L'analyse par MSⁿ a été appliquée à des dimères et trimères, galloylés et non-galloylés. Les figures ci-dessous décrivent les mécanismes ESI de fragmentation de ces ions. Afin de faciliter la compréhension et d'éviter toute confusion, nous avons nommé le dimère DP2 (DP signifiant Degré de Polymérisation et 2 se rapporte au nombre d'unités du polymère) et par exemple, le dimère galloylé sera nommée DP2G et le dimère digalloylé DP2G2.

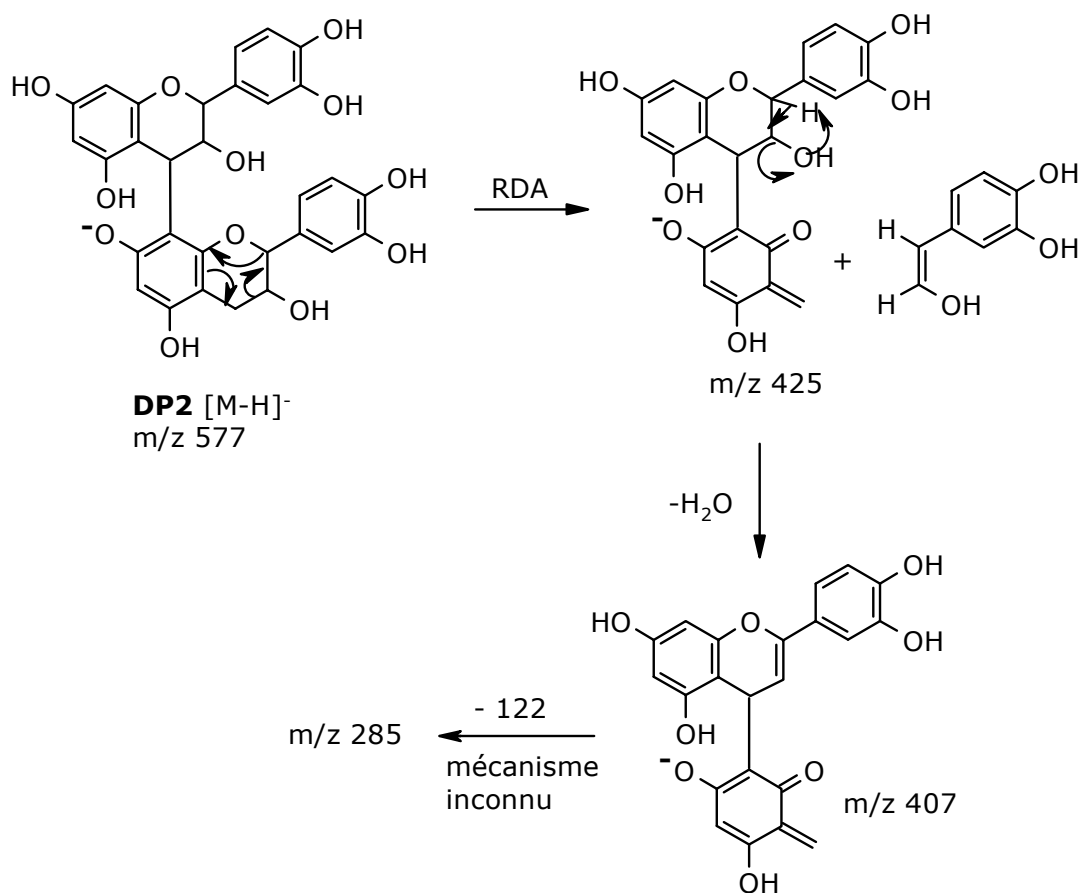


Figure IV.1-1: Mécanisme de fragmentation MS⁴ du dimère (DP2).

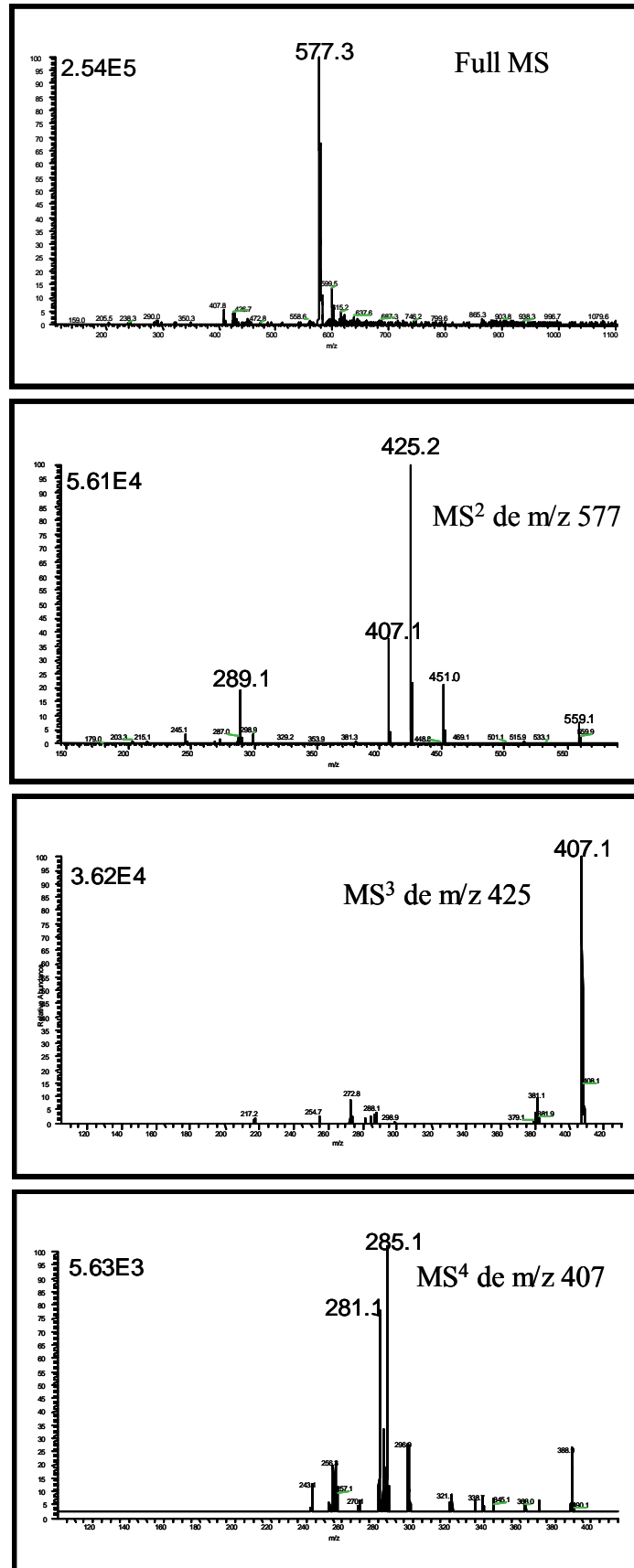


Figure IV.1-2: Spectres de fragmentation du dimère DP2.

Caractérisation des tanins par spectrométrie de masse

Le dimère DP2 (m/z 577 $[M-H]^-$) subit d'abord une fragmentation du type Rétro Diels-Alder (RDA) [131;149;150], qui a la particularité d'impliquer, non plus des électrons, bien décrit dans les mécanismes EI, mais des paires d'électrons, conduisant ainsi à une perte de 152 uma. L'ion ainsi formé (m/z 425) perd une molécule d'eau par un mécanisme simple de déshydratation décrit par *W. Friedrich* (2000) [120]. La dernière fragmentation n'a pas été élucidée et aucun mécanisme n'a été proposé à ce jour. La même étude a été appliquée pour le dimère galloylé DP2G (m/z 730).

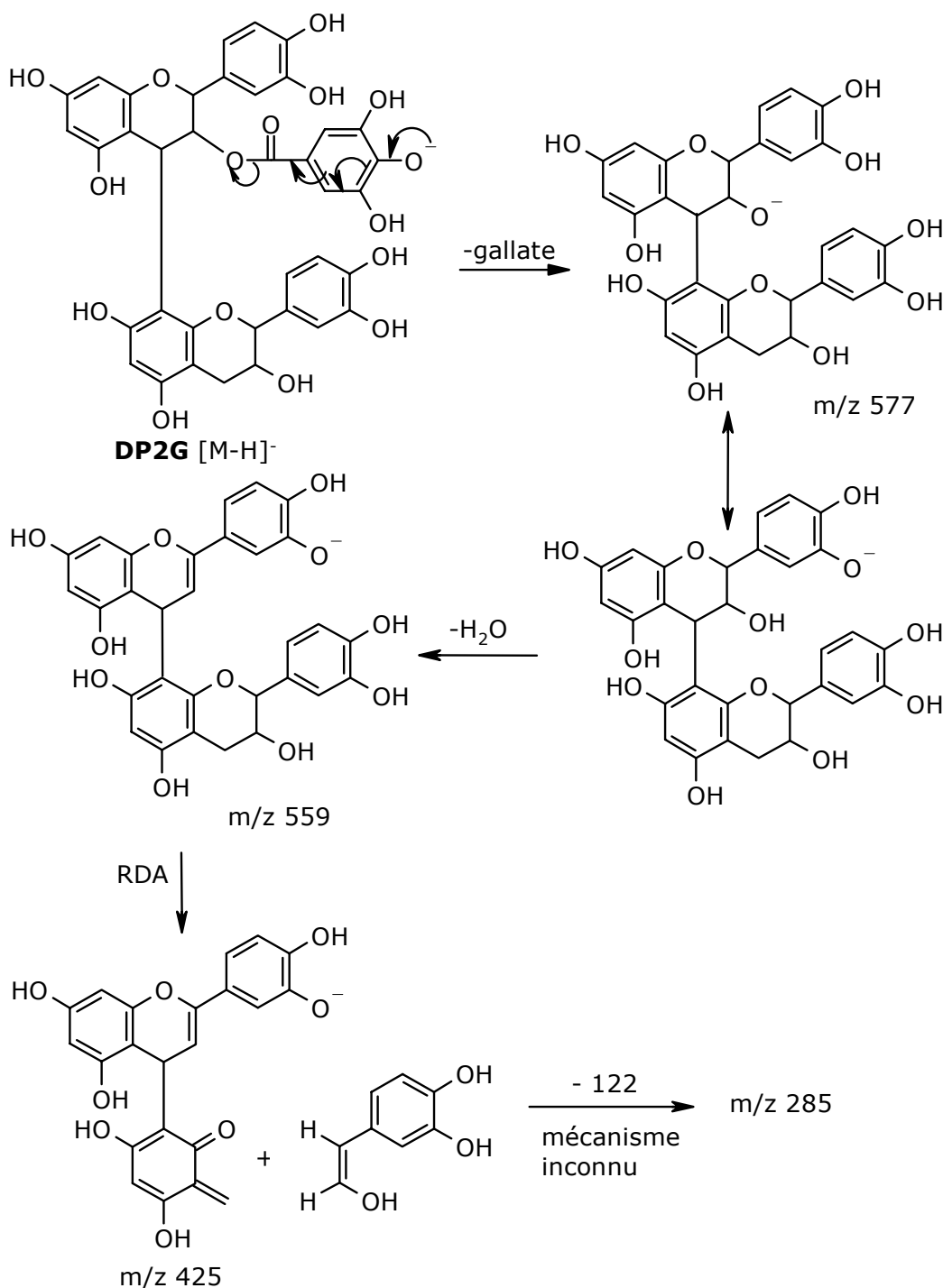


Figure IV.1-3: Mécanisme de fragmentation MS⁴ du dimère galloylé (DP2G).

Caractérisation des tanins par spectrométrie de masse

Le dimère galloylé DP2G (m/z 729 $[M-H]^-$) (Figure IV.1-3) subit, premièrement, la perte de l'acide gallique $[M-H-152]^-$ pour obtenir le dimère DP2 et deuxièmement, la déshydratation avant la réaction RDA.

Nous avons analysé de la même façon les trimères DP3 et DP3G. Le tableau ci-dessous résume les différentes fragmentations de ces composés.

Tableau IV.1-1: Enumération des différents fragments obtenus pour les dimères et les trimères

Composés	$[M-H]^-$	MS^2	MS^3	MS^4	MS^5
DP2	577	425*	407	285	
DP2G	729	577	559	407*	285
DP3	865	577	425*, 407*, 289		
DP3	865	695*	543*	525	
DP3G	1017	729	577	559, 407*	

*correspond à une fragmentation RDA

Le trimère DP3 peut suivre deux chemins de fragmentations : le premier montre la perte d'une unité catéchique pour obtenir le dimère à m/z 577, puis lors de l'analyse MS^3 , trois ions sont détectés avec des intensités semblables à m/z 425, 407 et 289. Leur formation à m/z 425 et 407 est expliquée dans la Figure IV.1-2. Le ion à m/z 289 correspond à l'(épi)catéchine (m/z 289 $[M-H]^-$).

La deuxième voie montre une première réaction RDA avec une perte d'eau, donnant un ion à m/z 695, puis une seconde réaction RDA formant un ion à m/z 543, suivie d'une déshydratation à m/z 525.

Le trimère galloylé DP3G ne montre qu'une seule voie de fragmentation. Il perd d'abord une unité catéchique pour former le dimère galloylé DP2 à m/z 729. L'expérience suivante (MS^3) nous indique la perte de l'acide gallique (m/z 577) pour former le dimère DP2. Finalement, les ions à m/z 559 et 407 correspondent à une déshydratation suivie d'une réaction RDA.

Nous observons que les mécanismes de fragmentation sont toujours semblables pour les proanthocyanidines oligomériques.

Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il existe 4 mécanismes de fragmentation pour ce type de composés :

- La fragmentation rétro Diels-Alder ; perte de 152 uma
- La déshydratation ; perte de 18 uma
- La perte de l'acide gallique sur les proanthocyanidines galloylées correspondant à 152 uma

- Une perte de 122 uma non caractérisée pouvant correspondre à une formule brute de $C_6H_2O_3$
- Perte d'une unité monomérique $[M-288]^-$

Comme nous pouvons le constater, la masse de la perte de l'acide gallique et du fragment provenant de la réaction RDA, sont identiques. Elles correspondent à 152 uma.

Cette étude de fragmentation MS^n a été par la suite appliquée à l'analyse des oligomères par LC/MS (cf. chapitre IV.2.3).

IV.2 CARACTERISATION DES TANINS OLIGOMERIQUES PAR LC/ESI-MS

L'analyse LC/MS des proanthocyanidines oligomériques est largement décrite dans la littérature [115;118;120;131;149;151-158]. Une bonne séparation des composés est obtenue sur RP- C_{18} par élution avec un gradient $H_2O/CH_3CN/HCOOH$ ou $/CH_3COOH$ [115;131]. L'utilisation d'un acide réduit les interactions entre les composés et la phase, diminuant ainsi la largeur des pics du chromatogramme (*peak tailing*).

Des essais réalisés dans nos laboratoires ont montré que les proanthocyanidines s'ionisaient beaucoup mieux en mode négatif, par perte d'un proton $[M-H]^-$, qu'en mode positif. En conséquence, dans notre cas, l'addition d'un acide dans la phase mobile diminue la sensibilité de la méthode. Nous avons donc simplement éliminé l'acide de notre mélange HPLC pour les analyses LC/MS. La séparation est légèrement moins bonne car la largeur des pics est plus importante, mais cela ne perturbe en rien les analyses.

Nous avons, en plus, ajouté un tampon NH_4OH 5% post-colonne à un débit de 3 $\mu L/min$. Cela favorise la déprotonation des proanthocyanidines, augmente le nombre d'ions formés en solution et améliore ainsi la sensibilité de la méthode.

Les fractions oligomériques des extraits de Gamay et de Gamaret obtenues par fractionnement sur la phase Toyopearl (HW-40F) (cf. chapitre III.1.2) sont analysées par LC/MS, en utilisant le mode *Selected Ion Monitoring* (SIM) et le mode *Dependant Scan Event* de l'instrument (cf. chapitre II.7.2.2) (LCQ, Thermofinnigan, équipé d'une *Ion Trap* (cf. chapitre I.5.4)).

Les proanthocyanidines oligomériques forment uniquement des ions $[M-H]^-$ en mode négatif. De ce fait, en connaissant leur structure, il est possible de sélectionner au préalable une liste d'ions afin d'obtenir leur trace SIM.

Cette méthode a été mise au point afin de montrer qu'une caractérisation partielle d'un mélange de tanins oligomériques était possible. Le chapitre suivant explique comment la

sensibilité de la méthode a été optimisée puis il présente les chromatogrammes LC/MS en mode SIM de fractions de Gamay et de Gamaret.

IV.2.1 Développement d'une méthode ESI-MS, sensible pour les tanins oligomériques

Il est important de décrire comment et par quels moyens cette méthode à été développée. Habituellement, la sensibilité d'une méthode est optimisée en adaptant les paramètres de l'appareil par rapport au composé à détecter. Dans notre cas, nous ne possédions qu'un mélange complexe de tanins, il était donc impossible d'optimiser les paramètres de cette manière.

Nous avons donc joué sur les particularités de l'analyseur *Ion Trap*. Nous avons infusé une solution très diluée de tanins polymériques et nous avons optimisé le signal en isolant soit l'ion 865 (DP3) ou 1017 (DP3G). Nous avons donc pu obtenir une sensibilité maximale sans pour autant utiliser des composés purs. Ces paramètres ont été ensuite appliqués pour l'analyse LC/MS.

IV.2.2 Analyse LC/MS en mode SIM des fractions oligomériques

Nous avons utilisé la méthode HPLC « Les oligomères » et les paramètres ESI décrits dans les chapitres II.5.4.4 et II.7.2.1. Les fractions sont obtenues comme exposé dans le chapitre II.2.3. Sur chaque fraction, nous avons procédé à des analyses SIM des ion 577 (DP2), 865 (DP3), 1153 (DP4), 729 (DP2G), 1017 (DP3G) et 1305 (DP4G). Une partie des résultats sont présentés par les figures IV-2.1 à IV-2.4.

Caractérisation des tanins par spectrométrie de masse

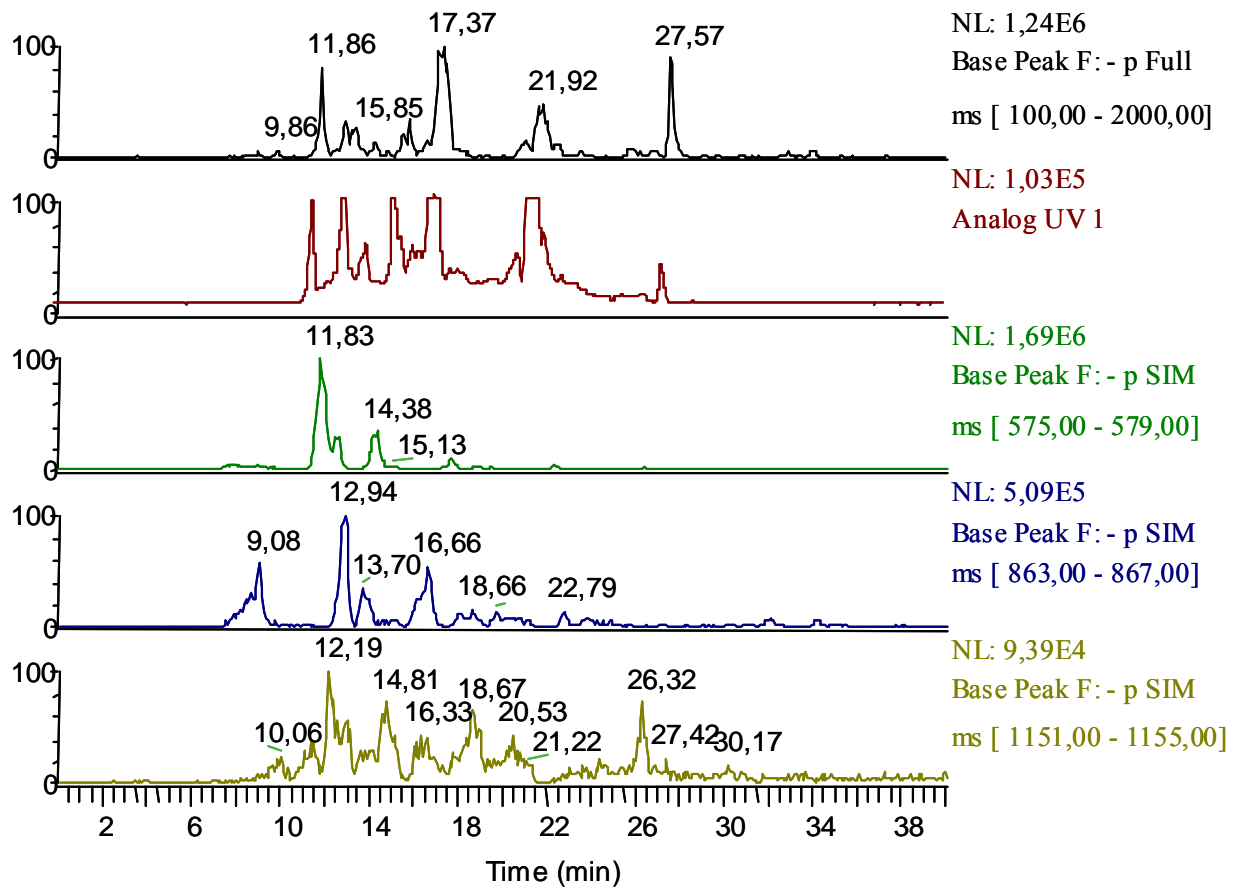


Figure IV.2-1: SIM des proanthocyanidines non-galloylées d'une fraction de Gamay

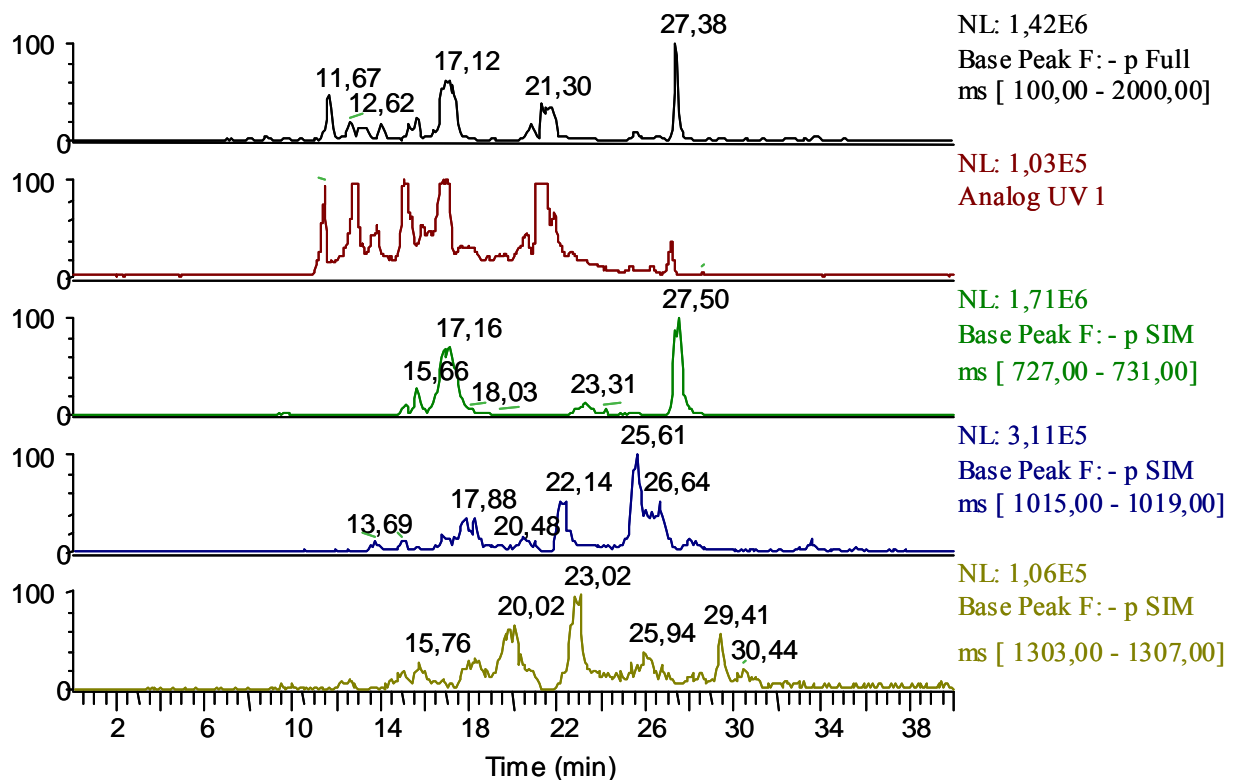


Figure IV.2-2: SIM des proanthocyanidines galloylées d'une fraction de Gamay.

Caractérisation des tanins par spectrométrie de masse

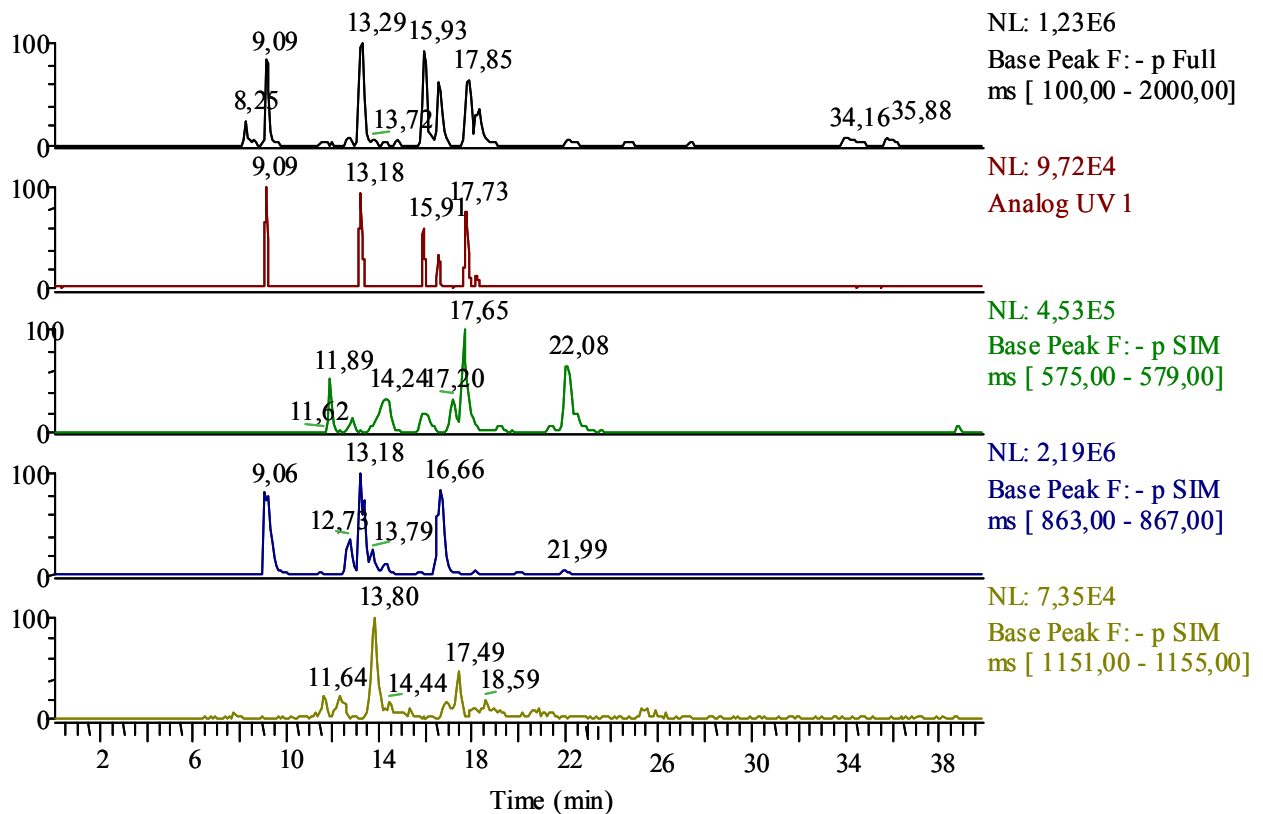


Figure IV.2-3: SIM des proanthocyanidines non-galloylées d'une fraction de Gamaret.

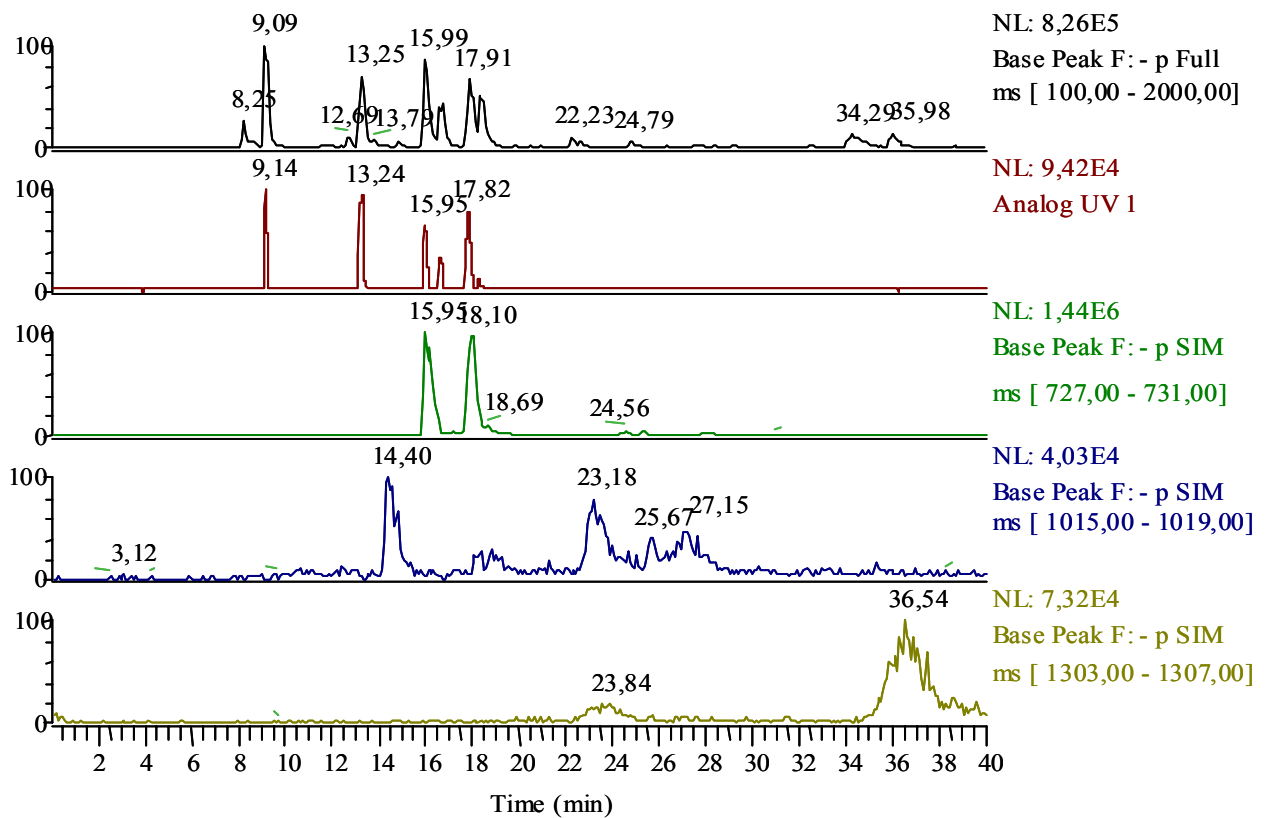


Figure IV.2-4: SIM des proanthocyanidines galloylées d'une fraction de Gamaret.

D'une manière générale, nous observons que les fractions de l'extrait Gamay sont beaucoup plus complexes que celles de Gamaret. Les chromatogrammes nous l'indiquent. De ce fait, certains pics de la fraction Gamay coéluent et les traces ioniques montrent des pics à des temps de rétention identiques. La majorité des pics du chromatogramme de Gamaret ont été caractérisés par l'analyse SIM.

Quelques observations peuvent être tirées de ces analyses :

D'une manière générale :

- Les composés galloylés éluent à des temps de rétention plus élevés que les composés non-galloylés.
- Les composés à faible poids moléculaire éluent avant les composés à haut poids moléculaire.
- Sur les spectres, il est possible d'observer l'ion $2[M-H]^-$.
- Certains composés ne sont pas détectés à l'UV 280 nm, mais apparaissent clairement sur la trace SIM.

IV.2.3 Analyse LC/MS en mode « *Dependant Scan Event* » des fractions oligomériques

Nous avons réalisé pour chaque fraction une analyse LC/MS/MSⁿ des composés, en utilisant le *Dependant Scan Event* de l'instrument (cf chapitre II.7.2.2). La figure ci-dessous montre l'analyse MSⁿ d'un pic du chromatogramme LC/MS par l'application d'une tension de 1V. A chaque cycle de fragmentation, l'intensité du courant ionique diminue pour finalement devenir quasiment nul.

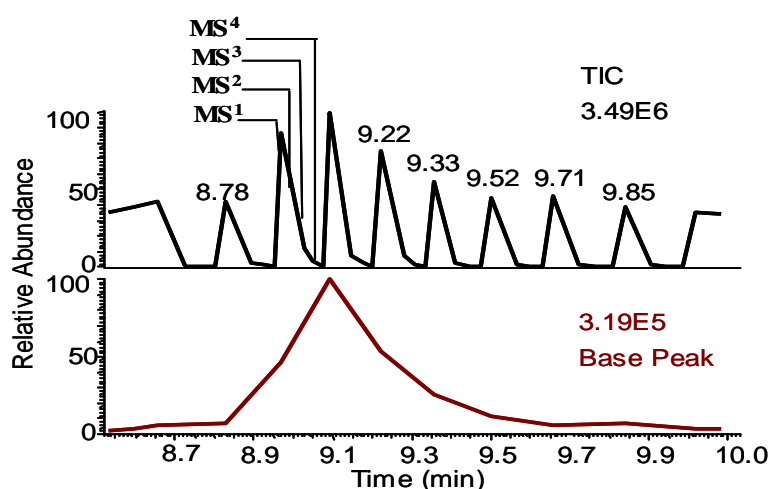


Figure IV.2-5: Analyses LC/MSⁿ par l'utilisation du *Dependant Scan Event*.

Ce type d'analyse permet uniquement de confirmer une structure que si les fragments sont connus (cf. chapitre IV.1).

Caractérisation des tanins par spectrométrie de masse

L'analyse LC/MS/MSⁿ fonctionne parfaitement sur les tanins oligomériques. Nous ne présentons ici qu'un seul exemple (cf. Figure IV.2-6).

L'analyse de la fragmentation d'un trimère (RT = 9.27 min) d'une fraction de Gamaret par LC/MS/MSⁿ, correspond à celle réalisée par infusion sur un mélange de tanins (cf. chapitre IV.1), comme le montre la Figure IV.2-6.

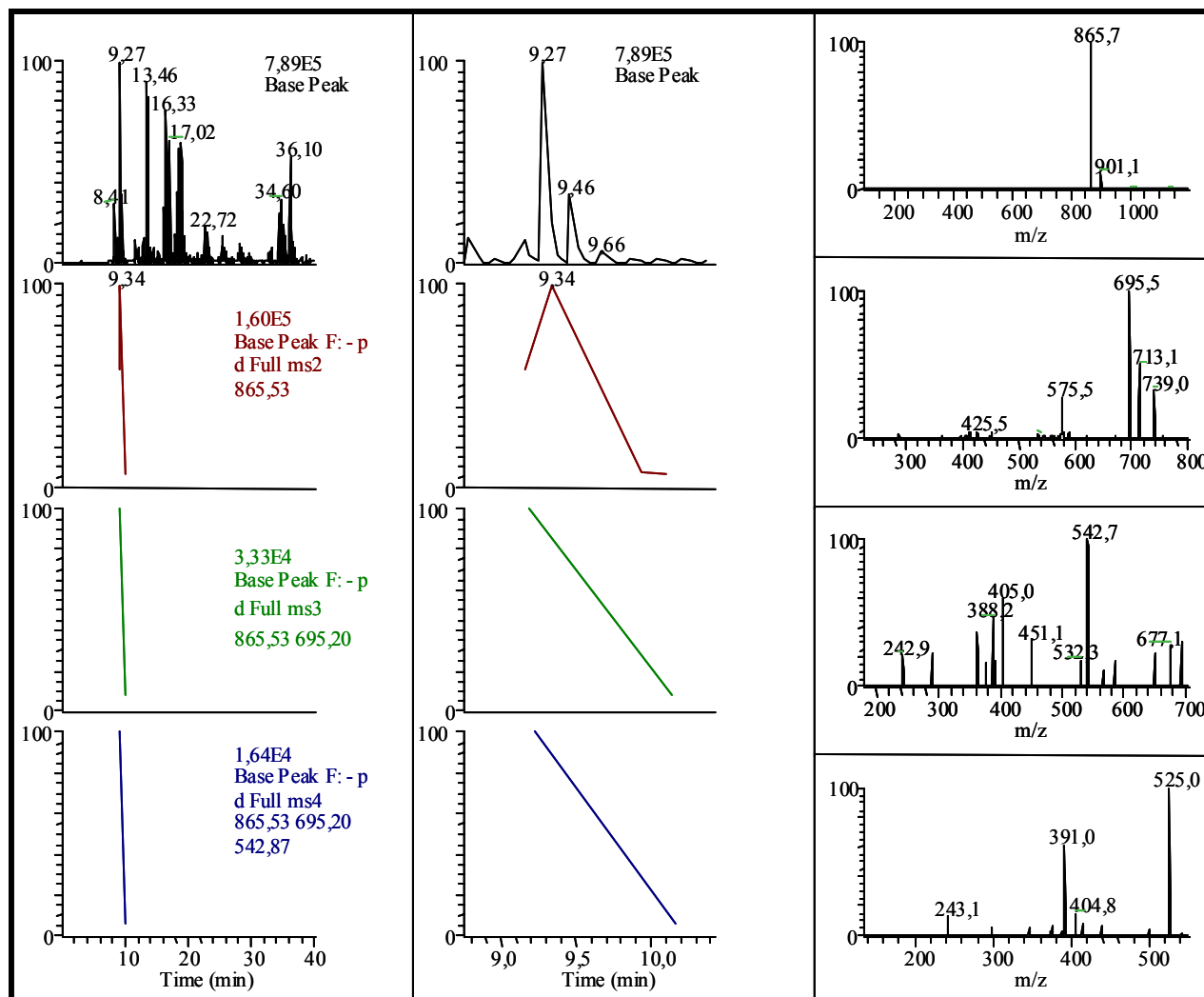


Figure IV.2-6: Fragmentation MS¹-MS⁴ d'un trimère (RT 9.27 min) d'une fraction de Gamaret. La première colonne correspond au chromatogramme complet avec l'analyse MSⁿ du pic à 9.27 min. La deuxième colonne montre l'agrandissement du chromatogramme entre 8.8 et 10.5 min pour le pic à 9.27 min. La troisième colonne correspond aux spectres de fragmentation MSⁿ du composé à RT = 9.27 min.

La molécule subit deux fragmentations RDA consécutives pour former les ions à m/z 695 et 543, puis se déshydrate donnant l'ion à m/z 525 (cf. Tableau IV.1-1).

Grâce au mode SIM et la fragmentation MSⁿ, chaque proanthocyanidine oligomérique est détectée, puis partiellement caractérisée (la stéréochimie des molécules reste inconnue).

IV.3 CARACTÉRISATION DE L'EXTRAIT DE TANINS POLYMÉRIQUES PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

La fraction polymérique a été caractérisée par différentes méthodes d'ionisation et en utilisant trois sortes d'analyseurs de masse.

IV.3.1 Analyse par des tanins polymériques par ESI/QIT/MS (LCQ, Thermofinnigan)

L'étude de l'ionisation des tanins polymériques en électrospray a déjà été étudiée par plusieurs groupes de recherche [115;120;131;132;149;159].

L'analyse ESI-MS des tanins a été réalisée, en premier lieu, sur un LCQ de Thermofinnigan (USA) (cf. chapitre I.5.4). Cet appareil est équipé d'une source ESI et d'un analyseur *Ion Trap*.

Une infime quantité de la fraction polymérique est dissoute dans un mélange MeOH/Isopropanol 2 :1, puis elle est infusée à un débit de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ dans la source ESI en appliquant les paramètres décrits au chapitre II.7.2.1. La sensibilité est améliorée en optimisant les paramètres sur les ions à m/z 577, 865, 1017. La figure ci-dessous correspond au spectre d'une fraction polymérique de Gamaret (domaine de masse de 0-2000 uma).

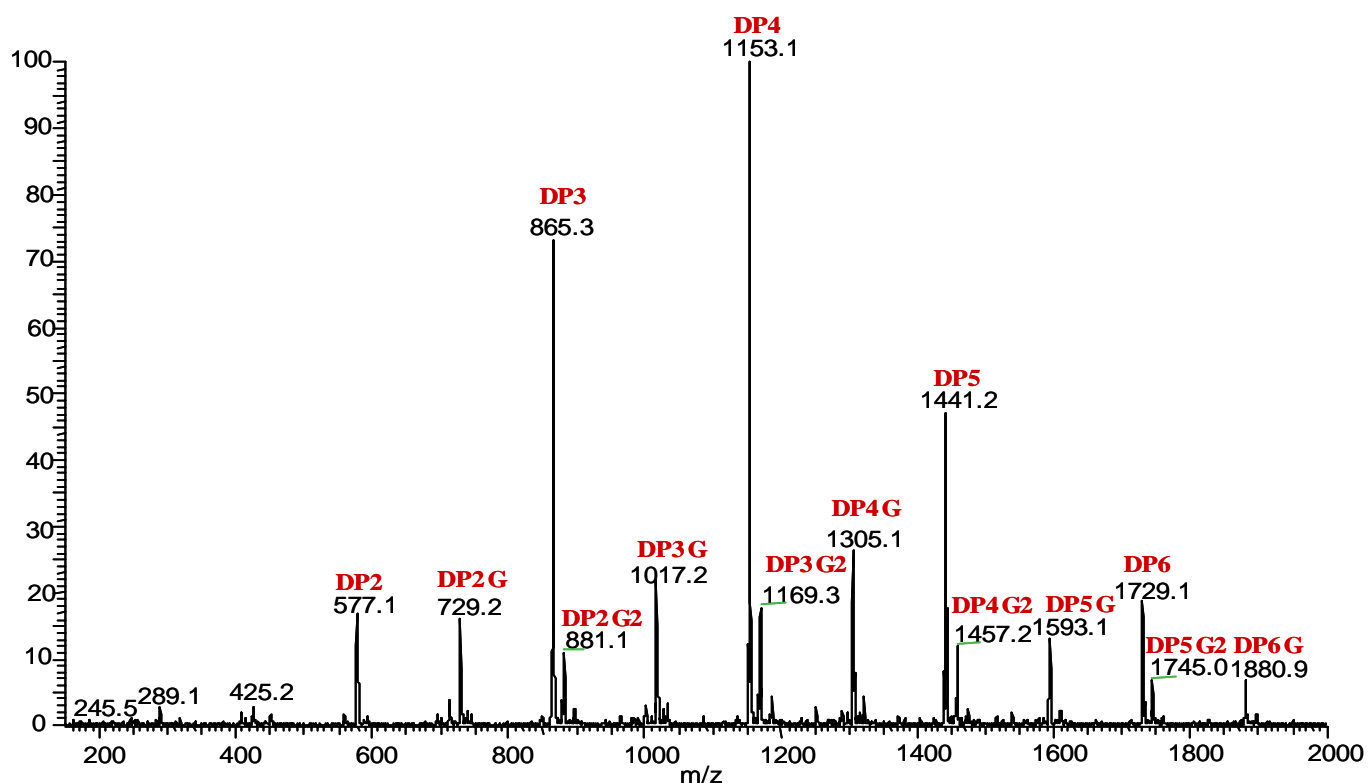


Figure IV.3-1: Spectre ESI d'une fraction polymérique de Gamaret

Caractérisation des tanins par spectrométrie de masse

La sensibilité de l'appareil est élevée dans un domaine de masse de 0 à 2000 uma (*normal mass range*), mais elle diminue lorsque l'on travaille dans un domaine de masse plus élevé de 0 à 4000 uma (*high mass range*). Le figure ci-dessous montre le spectre de la fraction polymérique de Gamaret dans un domaine de masse entre 1800 et 3000 uma.

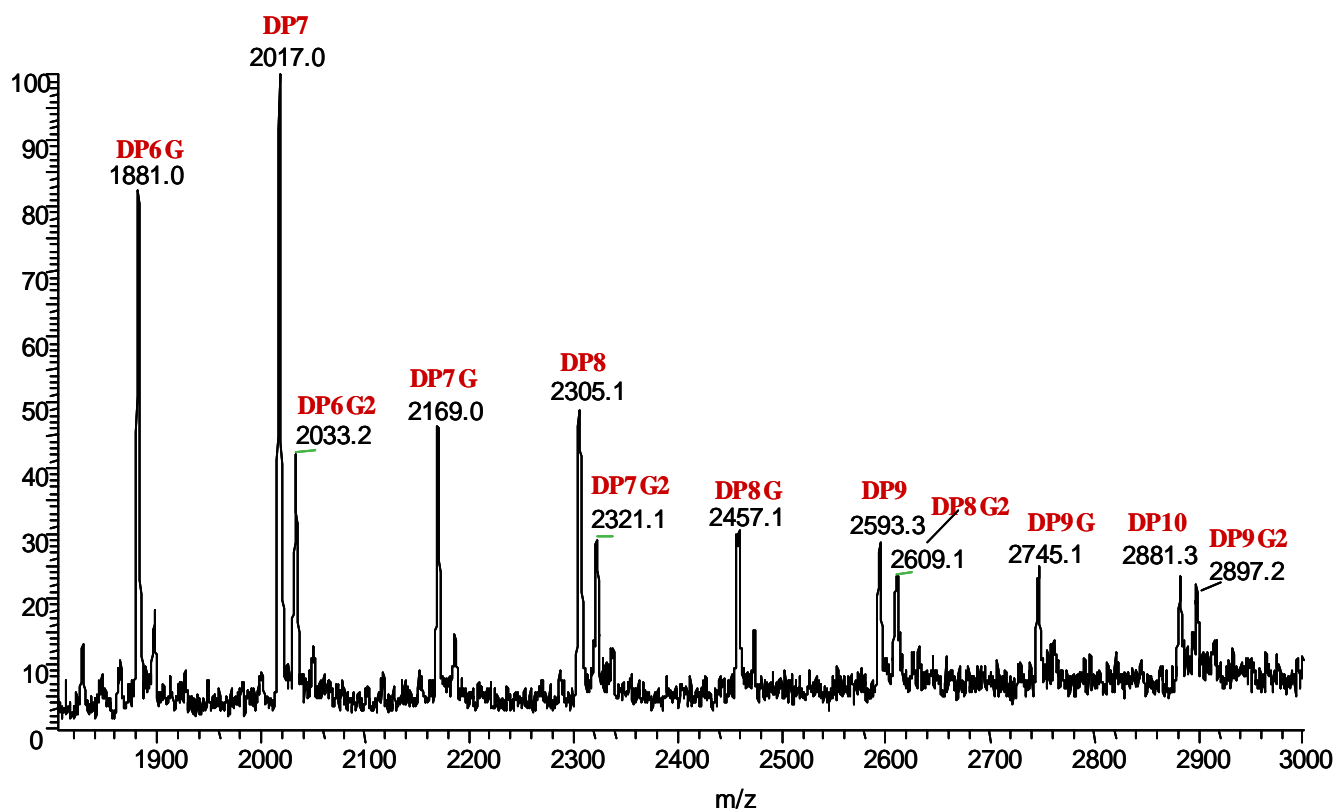


Figure IV.3-2: Spectre ESI d'un extrait polymérique de Gamaret entre 1800 et 3000 uma.

Ces composés sont des polymères avec comme unité répétitive, l'(épi)catéchine. Ils varient par le nombre d'acides galliques substitués en position C-3 et par un groupement hydroxyle supplémentaire en C-5' du cycle B benzénique (gallocatéchine et épigallocatéchine) (cf. chapitre I.2.2.3). Les polymères contenant la gallocatéchine ou l'épigallocatéchine possèdent une masse identique aux proanthocyanidines digalloylées ayant une unité en moins. Par exemple, si on ajoute à l'unité terminale du trimère DP3 (m/z 865) un hydroxyle en position C-5', sa masse correspondra au dimère digalloylé DP2G (m/z 881). Etant donné la concentration importante de proanthocyanidines galloylées dans les extraits tanniques de raisins, il est peu probable que ces pics correspondent majoritairement à des polymères contenant la gallocatéchine ou l'épigallocatéchine, ceux-ci étant présents en très faible quantité dans le raisin [17]. En sachant que les ions se trouvent soit sur la forme déprotonée $[M-H]^-$, soit sous la forme

Caractérisation des tanins par spectrométrie de masse

d'ions dichargés $[M-2H]^{2-}/2$, il est facile d'attribuer tous les pics du spectre aux proanthocyanidines correspondantes.

Le tableau ci-dessous représente la liste des ions observés sur le spectre ESI en mode négatif.

Tableau IV.3-1: Liste des ions obtenus en mode négative par ESI-QIT/MS

Polymère	PM (g/mole)	$[M-H]^-$	$[M-2H]^{2-}/2$
DP1	290	289	
DP1G	442	441	
DP2	578	577	
DP2G	730	729	
DP2G2	882	881	
DP3	866	865	
DP3G	1018	1017	
DP3G2	1170	1169	
DP4	1154	1153	576
DP4G	1306	1305	652
DP4G2	1458	1457	728
DP5	1442	1441	720
DP5G	1954	1593	796
DP5G2	1746	1745	872
DP6	1730	1729	864
DP6G	1882	1881	940
DP6G2	2034	2033	1016
DP7	2018	2017	1008
DP7G	2170	2169	1084
DP7G2	2322	2321	1160
DP8	2306	2305	1152
DP8G	2458	2457	1228
DP8G2	2610	2609	1304
DP9	2594	2593	1296
DP9G	2746	2745	1372
DP9G2	2898	2897	1448
DP10	2882	2881	1440

Les ions montrent à chaque DP supérieur un incrément de 288 uma, correspondant à une unité (épi)catéchique. Les ions à m/z 289 (DP1) et 425 correspondent à des ions de fragmentation de molécules de poids moléculaire plus élevé (cf. Figure IV.1-2). Les ions

ayant la plus grande intensité sont le trimère DP3 à m/z 865 et le tetramère à m/z 1153 (cf. Figure IV.3-1). Ceci est peut-être dû à une concentration élevée de ces composés dans la fraction, à leur ionisation facile ou enfin, à la présence d'ions multichargés. La résolution de l'appareil n'est pas suffisante pour montrer clairement une séparation des pics, de ce fait, il n'est pas facile de distinguer significativement les ions monochargés des ions dichargés ou multichargés [149].

Plus le poids moléculaire des proanthocyanidines augmente plus leur intensité décroît, de plus, les composés galloylés et digalloylés ont une intensité plus faible que les composés non-galloylés. Plusieurs raisons peuvent être invoquées :

- La concentration des composés galloylés peut être plus faible que celle des composés non-galloylés
- La déprotonation de l'acide gallique peut être défavorisée par les groupements nucléophiles des autres cycles benzéniques par formation de ponts hydrogène en fonction de l'arrangement spatial de la molécule [24].

Le spectre, réalisé dans le domaine de masse élevé (cf. Figure IV.3-2) montre une série de pics qui peuvent être facilement attribués grâce au Tableau IV.3-1, malgré le rapport signal/bruit bas. Le ion à m/z 1881 correspond à l'hexamère gallate DP6G et le ion le plus élevé monochargé à m/z 2897 correspond au nonamère digallate DP9G2. Les pics en amont de 16 uma des proanthocyanidines galloylés correspondent simplement à la présence d'une molécule de gallocatéchine ou d'épigallocatéchine dans le polymère. Aucun résultat, à ce jour n'a montré l'ionisation de proanthocyanidines monochargées jusqu'à un poids moléculaire de 2897 uma.

IV.3.2 Analyse des tanins polymériques par ESI/FT-ICR/MS (BioApex II, Bruker)

Les tanins peuvent être détectés avec un analyseur *Ion Trap* jusqu'à un poids moléculaire de 2897 uma. L'analyseur FT-ICR devait nous permettre de pousser cette limite de détection vers des masses plus élevées, en utilisant soit une source électrospray soit une source MALDI.

Une partie des analyses ESI/FT-ICR/MS (Bioapex II, Bruker) ont été effectuées à l'Université de Fribourg, mais la sensibilité et la limite de détection de l'instrument pour ce type de composés se sont avérées moins bonnes que celles obtenues sur l'appareil ESI-QIT/MS (LCQ, Thermofinnigan). Les analyses MALDI-FT-ICR/MS n'ont strictement donné aucun résultat.

Caractérisation des tanins par spectrométrie de masse

Par la suite, un échantillon a été analysé par Bruker Daltonics sur un appareil BioApex II (Bremen, Allemagne). Le spectre ESI/FT-ICR/MS est d'excellente qualité. Le rapport signal/bruit est extrêmement élevé et la résolution est spectaculaire, mais malheureusement la limite de détection est comparable avec celle obtenue sur l'analyseur *Ion Trap*.

Caractérisation des tanins par spectrométrie de masse

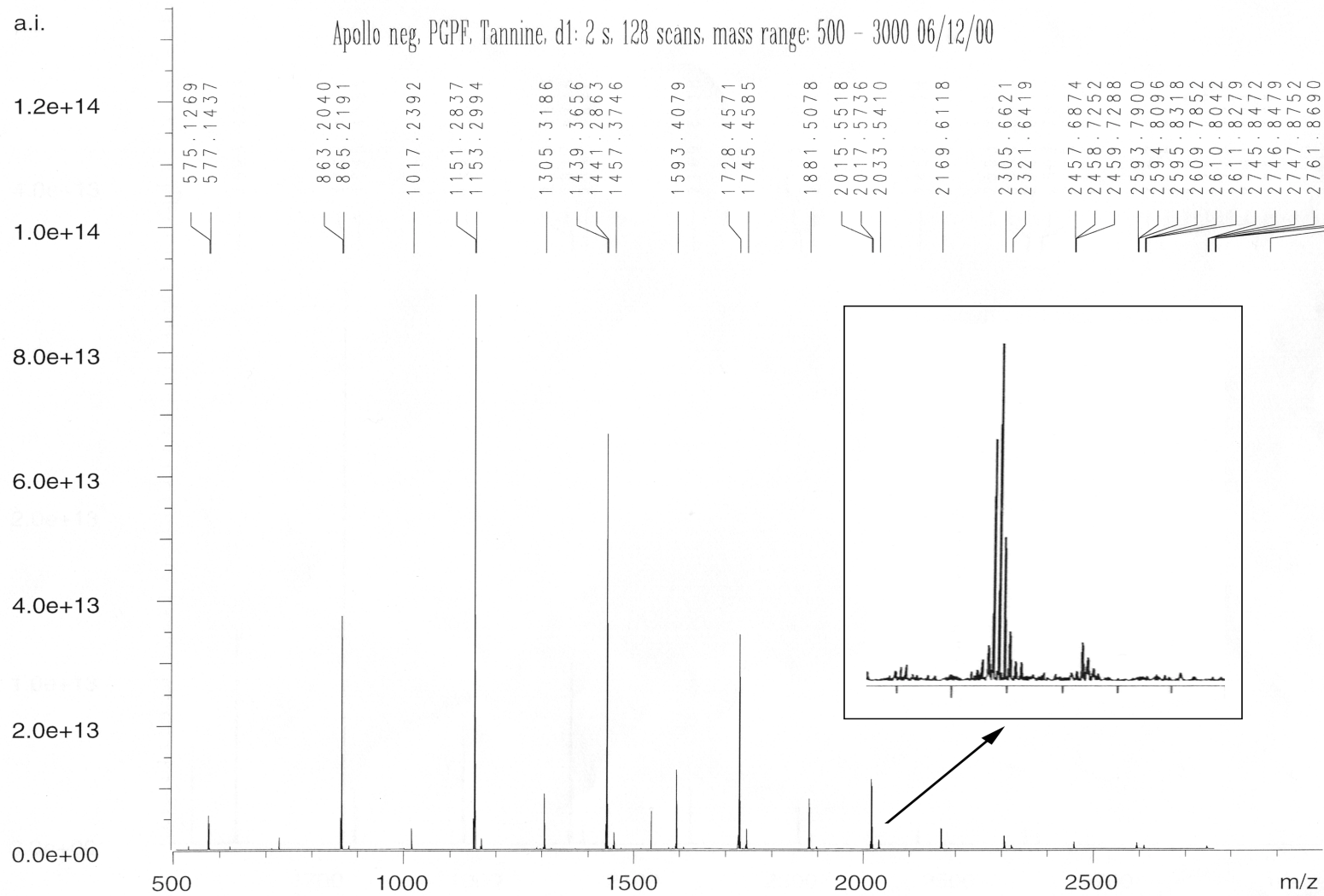


Figure IV.3-3: Spectre ESI-FT-ICR/MS d'une fraction polymérique de Gamay (Bruker Daltonics, BioApex II).

Caractérisation des tanins par spectrométrie de masse

Tableau IV.3-2: Liste des ions obtenus en mode négatif par ESI-FT-ICR/MS

Polymère	Formule brute	[M-H] ⁻ attendu	[M-H] ⁻ observé	ΔM
DP2	C30 H26 O12	577,1346	577,1437	0,0091
DP2G	C37 H30 O16	729,1456	729,1411	0,0045
DP3	C45 H38 O18	865,1980	865,2191	0,0211
DP3G	C52 H42 O22	1017,2089	1017,2392	0,0303
DP3G3	C59 H46 O26	1169,2199	1169,2923	0,0724
DP4	C60 H50 O24	1153,2614	1153,2994	0,0380
DP4G	C67 H54 O28	1305,2723	1305,3186	0,0463
DP4G2	C74 H58 O32	1457,2833	1457,3746	0,0913
DP5	C75 H62 O30	1441,3248	1441,2863	0,0385
DP5G	C82 H66 O34	1593,3357	1593,4079	0,0722
DP5G2	C89 H70 O38	1745,3467	1745,4585	0,1118
DP6	C90 H74 O36	1729,3882	1729,4571	0,0690
DP6G	C97 H78 O40	1881,3991	1881,5078	0,1087
DP6G2	C104 H82 O44	2033,4101	2033,541	0,1309
DP7	C105 H86 O42	2017,4515	2017,5736	0,1221
DP7G	C112 H90 O46	2169,4625	2169,6118	0,1493
DP7G2	C119 H94 O50	2321,4735	2321,6419	0,1685
DP8	C120 H98 O48	2305,5149	2305,6621	0,1472
DP8G	C127 H102 O52	2457,5259	2457,6874	0,1615
DP8G2	C134 H106 O56	2609,5368	2609,7852	0,2484
DP9	C135 H110 O54	2593,5783	2593,79	0,2117
DP9G	C142 H114 O58	2745,5892	2745,8472	0,2580

Grâce à la résolution de l'appareil, il est possible de voir les pics isotopiques (cf. Figure IV.3-3) mais ceux-ci ont toujours un incrément d'une unité. Cela signifie que les ions observés sont uniquement monochargés sous la forme [M-H]⁻. Il n'y a donc pas d'ions multichargés, comme dans le spectre ESI-QIT/MS (cf. chapitre IV.3.1) ou comme décrit par *H. Fulcrand et V. Cheynier* [131;149;151]. Certains ions possèdent une masse moléculaire inférieure de deux unités à une proanthocyanidine normale de type-B (cf. Figure IV.3-3). Ceci pourrait suggérer la présence d'une liaison supplémentaire entre deux carbones, correspondant à une proanthocyanidine de type-A (ex. *m/z* 575,1269)

(cf Figure I.2-11), mais d'après la littérature, ce type de composés n'a pas encore été isolé de la grappe de raisin.

L'instrument a permis la détection de proanthocyanidines jusqu'au nonamère gallate (DP9G, m/z 2745,8479), ce qui est tout à fait équivalent aux résultats obtenus avec le LCQ. Nous pouvons donc en déduire que la limite de détection de l'appareil FT-ICR/MS est comparable à celle de du LCQ, dans le cas des proanthocyanidines du raisin.

IV.3.3 Analyse des tanins polymériques par MALDI-TOF/MS et SALDI-TOF/MS (home built, ETH, Zürich)

L'analyse des tanins par MALDI-TOF/MS a été décrite par *M. Ohnishi-Kamayema* (1997) et *G. Krueger* (2000) [112;160;161]. Leurs analyses montrent la détection de tanins jusqu'à un poids moléculaire de 3349 uma (DP11G). Les ions sont détectés en mode positif sous la forme $[M+Na]^+$. Nous avons essayé de reproduire et d'améliorer la sensibilité de la méthode; ceci afin de permettre la caractérisation de la fraction polymérique.

Les mesures ont été effectuées sur un appareil construit à l'ETH de Zürich par le groupe du Prof. *R. Zenobi*. Nous avons d'abord tenté d'ioniser ces composés en utilisant la méthode SALDI (cf. chapitre I.5.2.2), décrite par le Dr. *M. Dale* en 1996 et 1997 [102;103], qui devait nous permettre de contrer le problème de co-cristallisation et de dégradation thermique. En effet, les tanins cristallisent difficilement, et sont très sensibles à la chaleur. Aucun résultat n'a été obtenu avec cette méthode ; nous avons donc opté pour la méthode d'ionisation standard : le MALDI. Nous avons essayé de reproduire les conditions décrites par *G. Krueger* (2000). Nous avons utilisé comme matrice l'acide *t*-indolacrylique (*t*-IAA), dans les mêmes proportions qu'il évoquait, aussi en essayant d'ajouter des ions Ag^+ ou Na^+ pour favoriser l'ionisation, mais sans grand succès. Le meilleur résultat a été obtenu par superposition d'une couche de matrice, d'une couche de tanins et d'une couche de matrice sur la cible. Les spectres ont été mesurés en mode positif en utilisant une haute énergie de laser (60 μ J) (cf. chapitre II.7.2.4).

Les résultats sont représentés par la Figure IV.3-4 et le Tableau IV.3-3.

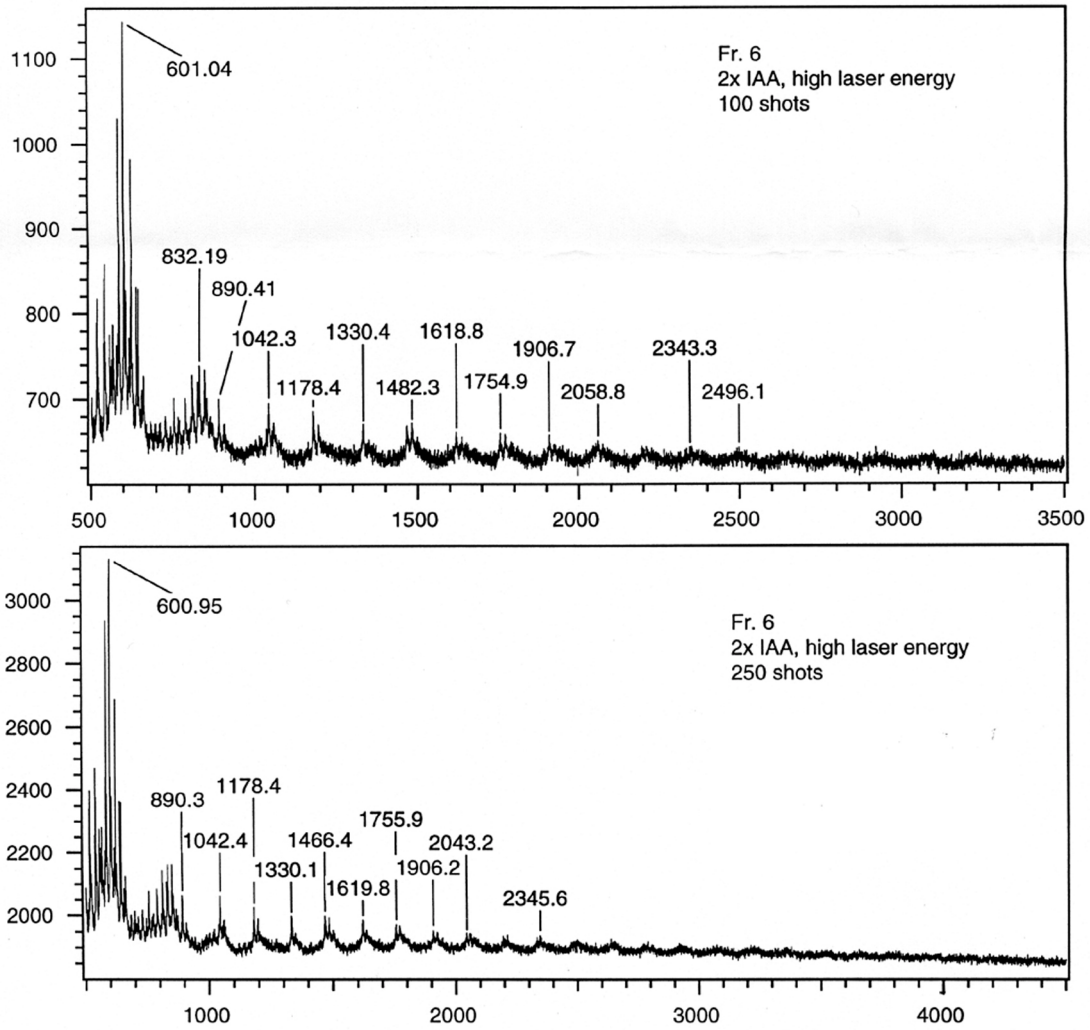


Figure IV.3-4: Spectre MALDI-TOF d'une fraction polymérique de Gamay sur un appareil construit à l'ETHZ. Mode positif, énergie du laser : 60 μ J, 100 et 250 scans, matrice *t*-IAA.

Tableau IV.3-3: Liste des ions obtenus sur un appareil MALDI-TOF (ETHZ)

Ions observés	PM (g/mole)	Polymère correspondant
601	601	DP2 + Na ⁺
754	753	DP2G + Na ⁺
832	*	*
853	853	DP2G + Na ⁺ -2H ₂ O *
871	871	DP2G + Na ⁺ -H ₂ O
890	889	DP3 + Na ⁺
1042	1041	DP3G + Na ⁺
1178	1177	DP4 + Na ⁺
1193	1193	DP3G2 + Na ⁺
1330	1329	DP4G + Na ⁺
1466	1466	DP5 + Na ⁺
1482	1481	DP4G2 + Na ⁺
1619	1618	DP5G + Na ⁺
1755	1754	DP6 + Na ⁺
1906	1906	DP6G + Na ⁺
2043	2042	DP7 + Na ⁺
2059	2058	DP6G2 + Na ⁺
2345	2346	DP7G2 + Na ⁺

* : artefacts dus à la matrice

Comme nous pouvons le constater, les ions observés se présentent sous la forme d'adduit [M+Na]⁺. La plus haute masse détectée est l'heptamère digallate (DP7G2), ce qui n'est pas comparable aux résultats de *G. Krueger* (2000), qui montrait la détection de masses jusqu'au undécamère DP11G à m/z 3347 ou aux résultats présentés dans les chapitres IV.3 et IV.3.1.

Le rapport signal/bruit du spectre est très bas. Ceci est dû soit à une mauvaise ionisation, soit à des problèmes liés à la sensibilité du détecteur. Mais il est quand même possible d'observer des ions à des incréments réguliers, correspondant aux tanins polymériques.

Les mesures ont, par la suite, été effectuées à l'institut de physique de Neuchâtel dans le groupe du Dr. *D. Twerenbold* sur un appareil MALDI-TOF (Dynamo, Thermo Bioanalysis). Ils développent actuellement un prototype MALDI-TOF équipé d'un détecteur cryogénique [162;163].

IV.3.4 Analyse des tanins par MALDI-TOF/MS (Dynamo, Thermo Bioanalysis)

La méthode décrite par *G. Krueger* (2000) a été appliquée sur un extrait polymérique de Gamay avec l'appareil Dynamo (Thermo Bioanalysis) en utilisant la même matrice (*t*-IAA)), mais sans succès. Par contre, l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (cf. chapitre II.7.2.5) nous a donné d'excellents résultats.

Les ions sont détectés en mode positif avec un adduit de sodium $[M+Na]^+$. La figure à la page suivante montre l'aspect général d'un spectre MALDI-TOF/MS d'une fraction polymérique de tanins et le tableau suivant permet son interprétation.

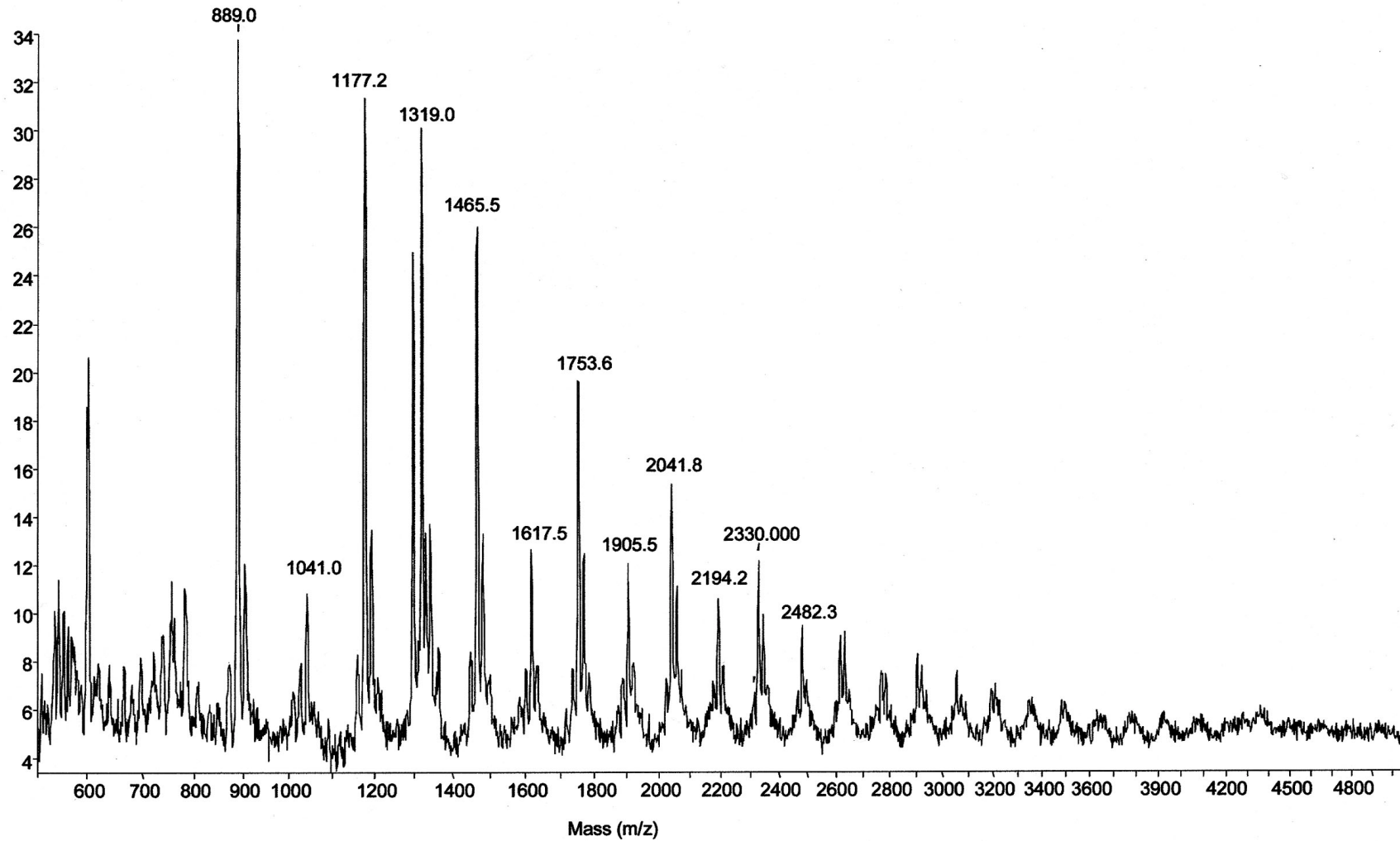


Figure IV.3-5: Spectre MALDI-TOF/MS d'une fraction polymérique de Gamay sur un appareil Dynamo (Thermo Bioanalysis) avec la matrice DHB.

Caractérisation des tanins par spectrométrie de masse

Tableau IV.3-4: Liste des ions obtenus par MALDI-TOF/MS (Dynamo)

Polymère	Nb d'esters galloylés	M	[M+Na] ⁺ calculé	[M+Na] ⁺ observé
dimère	0	578	601	600
	1	730	753	754
	2	882	905	905
trimère	0	866	889	889
	1	1018	1041	1041
	2	1170	1193	1193
	3	1322	1345	b
tétramère	0	1154	1177	1177
	1	1306	1329	1329
	2	1458	1481	1481
	3	1611	1634	1633
	4	1763	1786	1785
pentamère	0	1443	1466	1466
	1	1595	1618	1618
	2	1747	1770	1770
	3	1899	1922	1922
	4	2051	2074	b
	5	2203	2226	b
hexamère	0	1731	1754	1754
	1	1883	1906	1906
	2	2035	2058	2058
	3	2187	2210	2210
	4	2339	2362	b
	5	2491	2514	b
heptamère	0	2019	2042	2042
	1	2171	2194	2194
	2	2323	2346	2346
	3	2375	2398	b
	4	2628	2651	b
	5	2780	2803	b
octamère	0	2307	2330	2330
	1	2460	2483	2482
	2	2612	2635	2635
	3	2764	2787	2787
	4	2916	2939	b
	5	3068	3091	b

Caractérisation des tanins par spectrométrie de masse

Polymère	Nb d'esters galloylés	M	[M+Na] ⁺ calculé	[M+Na] ⁺ observé
nonamère	0	2596	2619	2619
	1	2748	2771	2771
	2	2900	2923	2923
	3	3052	3075	3075
	4	3204	3227	b
décamère	0	2884	2907	2906
	1	3036	3059	3059
	2	3188	3211	3211
	3	3340	3363	b
undecamère	0	3172	3195	3195
	1	3324	3347	b

b: masses non observées

Le spectre montre des ions à des intervalles réguliers, correspondant à des ions monochargés sous la forme $[M+Na]^+$. Quelques remarques générales peuvent être évoquées :

- Les ions les plus intenses sont ceux qui ne possèdent pas de substituants galloylés.
- Plus la molécule est substituée en acides galliques, plus l'intensité du ion est faible.
- Plus la masse des composés augmente, plus l'intensité des ions diminue.

La plus haute masse détectée est le décamère digalloylé DP10G2 à m/z 3211. De plus, il est possible d'observer des proanthocyanidines polygalloylées, comme par exemple le tétramère tétragalloylé DP4G4 à m/z 1785. La limite de détection de ces composés est comparable à celle obtenue par *G. Krueger* [112] dont la plus haute masse détectée est le undecamère galloylé DP11G à m/z 3347. La méthode que nous avons développée permet de détecter facilement des proanthocyanidines polygalloylées. Ceci provient peut-être du fait, que la matrice utilisée (DHB) permet une meilleure co-cristallisation des tanins et donc une meilleure extraction et ionisation. La liste des ions présentée par le Tableau IV.3-4 n'est pas exhaustive, il est possible d'observer des composés correspondants à des dérivés de l'(épi)catéchine, comme par exemple la gallo(épi)catéchine.

Le problème n'est pour autant toujours pas résolu. Les ions des proanthocyanidines à poids moléculaire élevé ont une faible intensité. La question que l'on peut se poser est : Est ce un problème d'ionisation ou de détection ou les deux ?

Plusieurs réponses peuvent être discutées :

- Les tanins à hauts poids moléculaires devraient s'ioniser plus facilement, car ils possèdent plus de sites susceptibles d'accepter un adduit de sodium ou un

proton. Si la quantité d'ions est alors importante, leur détection devrait être favorisée.

- Leur extraction hors de la matrice est un phénomène thermodynamique selon le Prof. *R. Zenobi* [100;164], peut-être, subissent-ils une dégradation due à la chaleur provenant du laser.
- Pendant leur transfert dans l'analyseur TOF, ils acquièrent une énergie cinétique qui peut favoriser leur fragmentation.
- Un phénomène de saturation du détecteur dû à la matrice et aux petites masses, peut défavoriser la détection de masses plus élevées.
- D'une manière générale, plus la masse est élevée, plus sa détection est difficile. Par exemple, l'ion dichargé [$M^{2+}/2$] de la myoglobine a une intensité, plus grande que son homologue monochargé [M^+] [162].

IV.4 ANALYSE DES FRACTIONS EN FONCTION DU DPm

Les fractions obtenues par fractionnement sur rélite SP411 (cf. chapitre III.1.5.2) (appelées fractions DPm) possèdent un DPm croissant, variant entre 2 et 18, correspondant à des masses entre 578 et 5184 uma, environ. L'analyse de ces fractions par ESI/MS est impossible à cause de la limite de détection des d'appareils (LCQ et BioApex II). La méthode développée pour l'analyse de la fraction polymérique par MALDI-TOF/MS peut être appliquée à l'analyse des fractions DPm.

Les échantillons sont préparés comme décrit dans le chapitre II.7.2.5, avec la matrice DHB. Chaque fraction a un DPm qui est représenté par le graphique ci-dessous. Les spectres MALDI-TOF/MS, présentés à la page suivante, correspondent aux fractions 1 à 8. Aucun spectre n'a pu être obtenu avec les fractions 9 et 10, certainement à cause d'un DPm trop élevé.

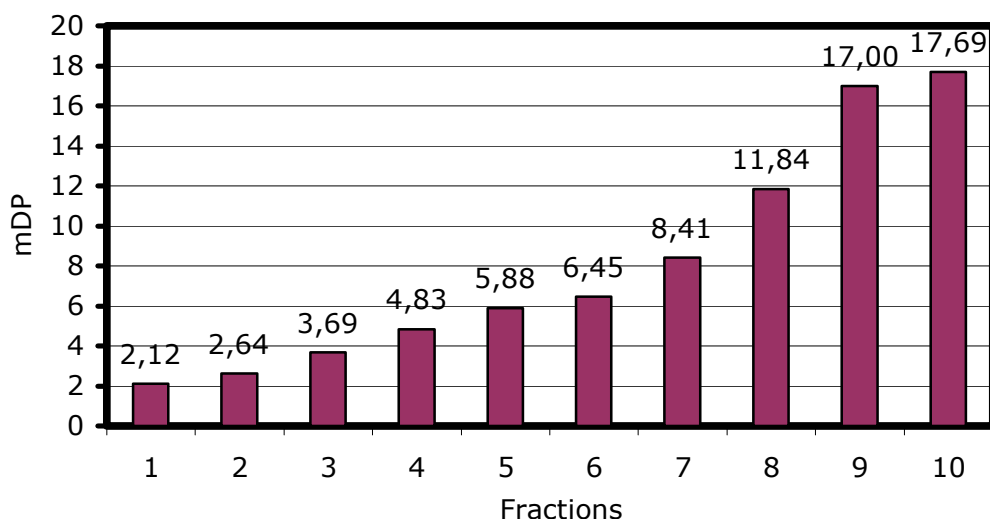


Figure IV.4-1: Valeurs DPm d'un extrait polymérique de Gamay fractionné sur SP411.

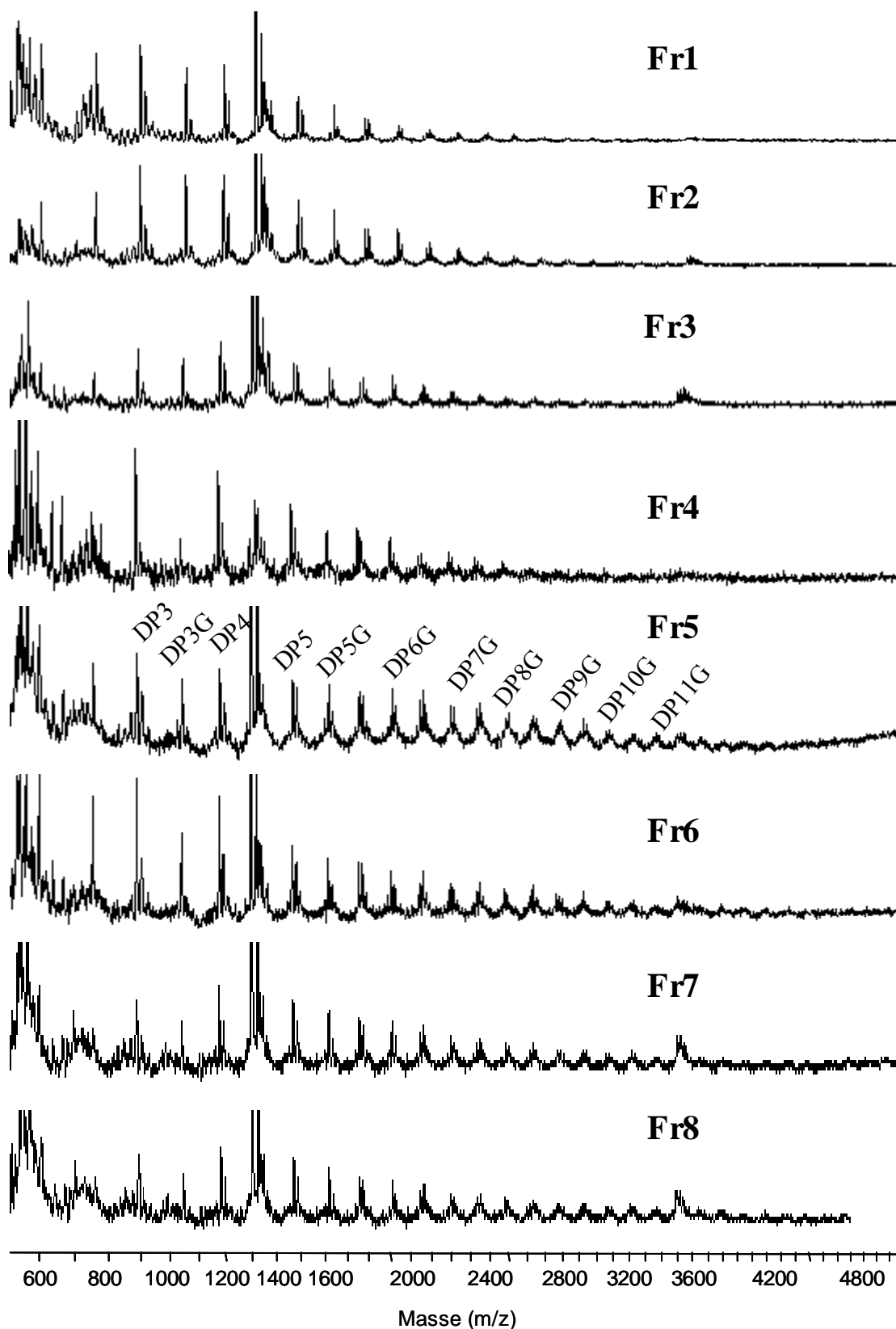


Figure IV.4-2: Spectres MALDI-TOF/MS des fractions DPM 1 à 8.

Caractérisation des tanins par spectrométrie de masse

Il est difficile d'obtenir un signal constant comparable entre chaque fraction, car il faut tenir compte de plusieurs paramètres variables :

- La concentration de l'échantillon
- La puissance du laser
- La *delayed extraction*
- La qualité de la cristallisation de l'échantillon

Ces facteurs ont une influence sur la qualité du spectre et sur la constance des résultats. Nous avons optimisé les différents paramètres afin d'obtenir une méthode systématique (cf. chapitre II.7.2.5). De cette manière, les spectres des fractions 1 à 8 sont comparables, à l'exception, peut-être de la fraction 4, dont l'intensité des ions est faible pour des raisons inconnues.

D'une manière générale, nous pouvons observer que plus le DPm augmente, plus les ions sont visibles au-delà de 3000 uma. Mais il est difficile de fixer une limite de détection de ces composés, car on peut encore observer des « vagues » vers des masses de 7000 uma, correspondant certainement à des proanthocyanidines.

Le tableau ci-dessous indique la plus haute masse détectée clairement pour chaque fraction par rapport au DPm, en tenant compte que plus le DPm est élevé, plus le rapport signal/bruit est bas. Il est évident d'après nos constatations, que les ions les plus intenses sont soit les proanthocyanidines non galloylées ou alors celles qui ne sont substituées qu'une seule fois par un acide gallique. La différence entre les pics les plus intenses est de 152 uma, correspondant à une unité d'acide gallique. Un groupement d'ions sur deux a un incrément de 288 uma, correspondant à une unité (épi)catéchique. Les ions à m/z 1297.5 et 3496.9 correspondent aux standards internes de calibration (cf. chapitre II.7.2.5).

Tableau IV.4-1: Tableau indiquant la masse la plus élevée visible pour chaque fraction.

Fraction	DPm	Polymère max. observé
1	2,12	DP8G
2	2,64	DP9
3	3,69	DP9
4	4,83	DP8G
5	5,88	DP11G
6	6,45	DP11G
7	8,81	DP11G
8	11,84	DP11G

Ce tableau n'est pas exhaustif, dans le sens où l'observation visuelle des spectres permet une meilleure interprétation.

Une grande différence entre les fractions 1 à 4 et 5 à 8 apparaît. Il y a effectivement un déplacement vers les plus hautes masses à partir de la fraction 5. Il n'est pas expliqué pourquoi, à partir de cette fraction uniquement, nous pouvons observer des ions à des masses plus élevées (est-ce vraiment à cause du DPm ?). D'une manière générale, l'intensité des pics varie en fonction du DPm des fractions. Plus il est élevé, plus les ions de hautes masses sont intenses.

CHAPITRE V

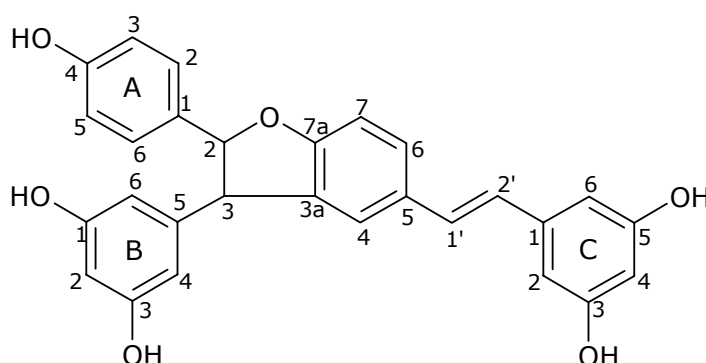
CARACTERISATION DU RESVERATROL *TRANS*- DEHYDRODIMERE ET DE L' ϵ -VINIFERINE

V CARACTERISATION DU RESVERATROL *TRANS*-DEHYDRODIMERE ET DE L' ϵ -VINIFERINE

Ce chapitre décrit la caractérisation par RMN et spectrométrie de masse de deux composés qui ont déjà été isolés par *P. Langcake* en 1977. Ceci permettra ensuite d'effectuer certains travaux sans douter de leur structure.

V.1 STRUCTURE DU RESVERATROL *TRANS*-DEHYDRODIMERE

Le resvératrol est un composé qui est synthétisé par la vigne, lorsque celle-ci est attaquée par un champignon ou après exposition à la lumière UV [57]. *Botrytis cinerea* produit une enzyme (la stilbène oxydase) [74] qui oxyde le resvératrol pour former son dimère correspondant : le resvératrol *trans*-déhydrodimère. Ce composé a été synthétisé et isolé par HPLC semi-préparative par le Dr. *R. Pezet* (cf. chapitre II). *P. Langcake* [77] avait affirmé que ce composé montrait une toxicité supérieure envers *Botrytis cinerea* que le resvératrol.



Ce composé a été synthétisé pour la première fois par *P. Langcake* en 1977 [77]. Sa structure fut par la suite confirmée par *A.-C. Breuil* en 1998 [64].

Analyse :

Formule brute : $C_{28}H_{22}O_6$

Poids moléculaire : 454 g/mol

Quantité synthétisée : 16.6 mg

SM (ESI) (m/z) : 453 $[M-H]^-$; 435 (MS^2) $[M-H-H_2O]^-$

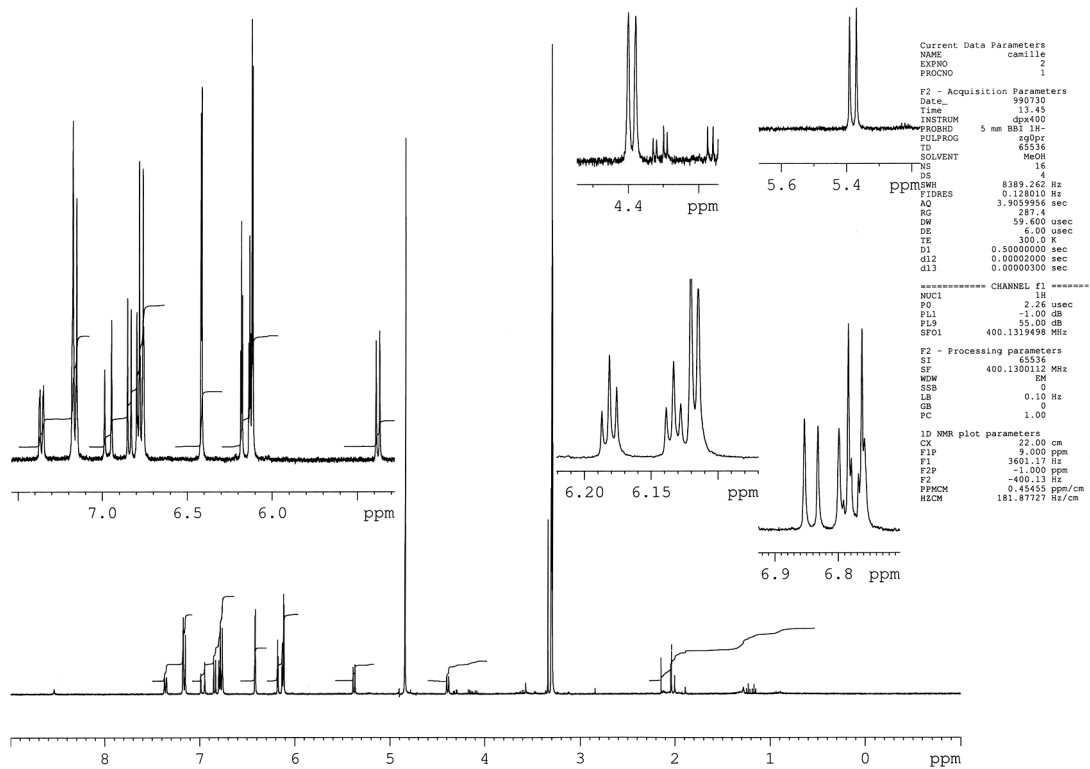


Figure V.1-1: Spectre ^1H -RMN du resvératrol *trans*-déhydrodimère.

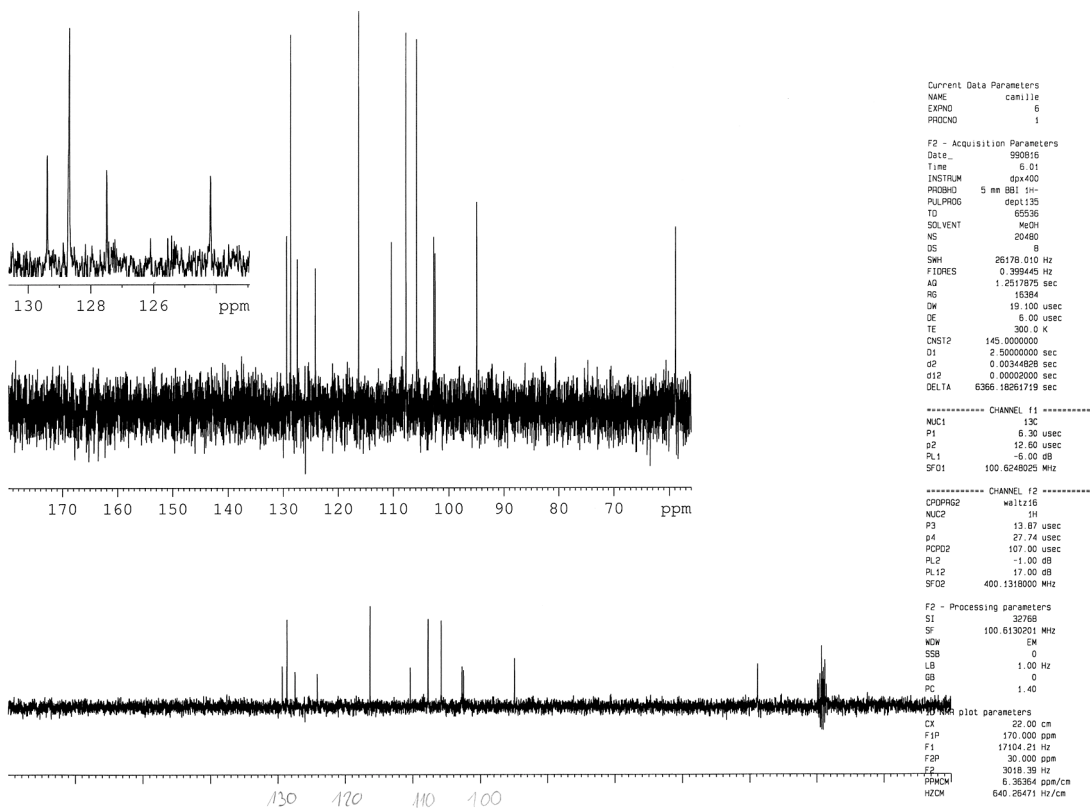


Figure V.1-2: Spectre ^{13}C -RMN du resvératrol *trans*-déhydrodimère.

Caractérisation du resvératrol *t*-déhydrodimère et de l' ϵ -viniférine

Tableau V.1-1: Comparaison des données spectroscopiques ^1H -RMN et ^{13}C -RMN avec A. C. Breuil [64].

Protons	^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) (δ , ppm)	^1H -RMN (500 MHz, Acetone- d_6) (δ , ppm) [64]
2	5.38 (1H, d, J=8.4 Hz)	5.49 (1H, d, J=8.0 Hz)
3	4.39 (1H, d, J=8.3 Hz)	4.49 (1H, d, J=8.0 Hz)
4	7.17 (1H, s)	7.28 (1H, brs)
6	7.37 (1H, dd, J=8.2 et 1.6 Hz)	7.45 (1H, dd, J=8.3 et 1.5 Hz)
7	6.84 (1H, d, J=8.3 Hz)	6.89 (1H, d, J=8.4 Hz)
1'	6.96 (1H, d, J=16.2 Hz)	7.08 (1H, d, J=16.2 Hz)
2'	6.78 (1H, d, J=16.2 Hz)	6.92 (1H, d, J=16.4 Hz)
2,6A	7.16 (2H, dd, J=8.5 et 2.0 Hz)	7.26 (2H, d, J=8.7 Hz)
3,5A	6.77 (2H, dd, J=8.6 et 2.0 Hz)	6.87 (2H, d, J=8.8 Hz)
4,6B	6.12 (2H, d, J=2.2 Hz)	6.21 (2H, d, J=2.0 Hz)
2B	6.18 (1H, t, J=2.2 Hz)	6.30 (1H, J=2.1 Hz)
2,6C	6.42 (2H, d, J=2.2 Hz)	6.55 (2H, d, J=2.1 Hz)
4C	6.13 (1H, t, J=2.2 Hz)	6.28 (1H, t, J=2.1 Hz)

Carbones	^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3OD) (δ , ppm)	^{13}C -RMN (125 MHz, Acetone- d_6) (δ , ppm) [64]
2	94.94	93.57
3	58.00	57.15
3a	132.87 ou 132.43 ou 132.37	131.26 ou 131.67 ou 132.05
4	124.18	123.44
5	132.87 ou 132.43 ou 132.37	131.26 ou 131.67 ou 132.05
6	128.68	128.14
7	110.38	109.86
7a	161.05	160.13
1'	129.39	128.60
2'	127.48	126.70
1A	132.87 ou 132.43 ou 132.37	131.26 ou 131.67 ou 132.05
2,6A	128.68	128.09
3,5A	116.34	115.62
4A	158.77	157.88
1,3B	159.98	159.22
2B	102.5	101.79
4,6B	107.75	106.86
5B	145.39	144.73
1C	141.19	140.28
2,6C	105.82	105.15
3,5C	159.67	159.00
4C	102.74	102.12

Le spectre ^1H -RMN montre un système aromatique complexe entre 6,0 et 7,4 ppm, correspondant à 15 protons, dont deux appartiennent à un système oléfinique.

Grâce à leur constante de couplage de 16,2 Hz (H-2' et H-1'), on peut déduire la présence d'une double liaison *trans*.

Nous pouvons observer un couplage AA'BB', présent sous la forme de doublets de doublets avec des constantes de couplage de 8,5 et 2,0 Hz, à 7,16 et 6,77 ppm (H-2,6A et H-3,5A).

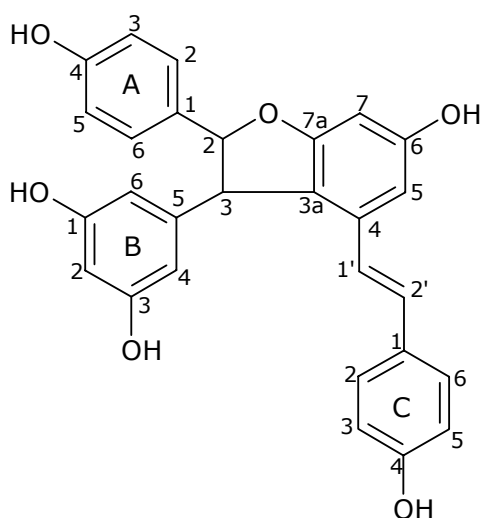
Deux systèmes doublet/triplet avec une constante de couplage de 2,2 Hz, correspondant à 6 hydrogènes, nous font suggérer un double système aromatique *ortho/para*.

Les signaux à 7,37, 7,17 et 6,84 ppm (H-6, H-4, H-7) nous indiquent la présence d'un cycle aromatique trisubstitué. Le proton à 7,37 ppm est couplé au proton à 6,77 ppm avec une constante de couplage de 8,2 Hz, (couplage *ortho* sur le noyau benzénique). Il est aussi faiblement couplé ($J^3=1,6$ Hz) avec le proton à 7,17 ppm, indiquant que ces hydrogènes sont en *méta* l'un de l'autre.

Deux autres hydrogènes, avec des constantes de couplage identiques (8,3 Hz), ont des déplacements chimiques un peu trop faibles pour appartenir à un système aromatique, mais suffisants pour être placé près d'un centre électronégatif, comme par exemple l'oxygène. Ceci est confirmé par le spectre HETCOR qui montre deux signaux couplés à 94,94/5,38 ppm et 58,00/4,39 ppm n'appartenant pas à un système aromatique (C-2 et C-3). Ceci permet de suggérer la présence d'un éther cyclique, reliant les différents systèmes entre eux.

V.2 L' ϵ -VINIFÉRINE

L' ϵ -viniférine est un composé qui est naturellement présent dans les parties ligneuses de la vigne est qui est synthétisé lorsque celle-ci est attaquée par un champignon ou sous exposition à la lumière. Elle a été découverte par *P. Langcake* en 1977 [60]. Elle est un produit d'oxydation du resvératrol par des peroxydases [69]. Cette molécule a été isolée du bois de vigne, puis purifié par HPC semi-préparative par le Dr. *R. Pezet* (cf. chapitre II.8).



Ce composé a pour la première fois été isolé de *Vitis vinifera* en 1977 par *P. Langcake* [60]. Il a ensuite à nouveau été isolé de la vigne par W.-W. Li en 1996 [63] et de *Gnetum parvifolium* en 1992 par *M. Lin* [165].

Analyse :

Formule brute : $C_{28}H_{22}O_6$

Poids moléculaire : 454 g/mol

SM (ESI) (m/z) : 453.7 [M-H]⁻

Caractérisation du resvératrol *t*-déhydrodimère et de l' ϵ -viniférine

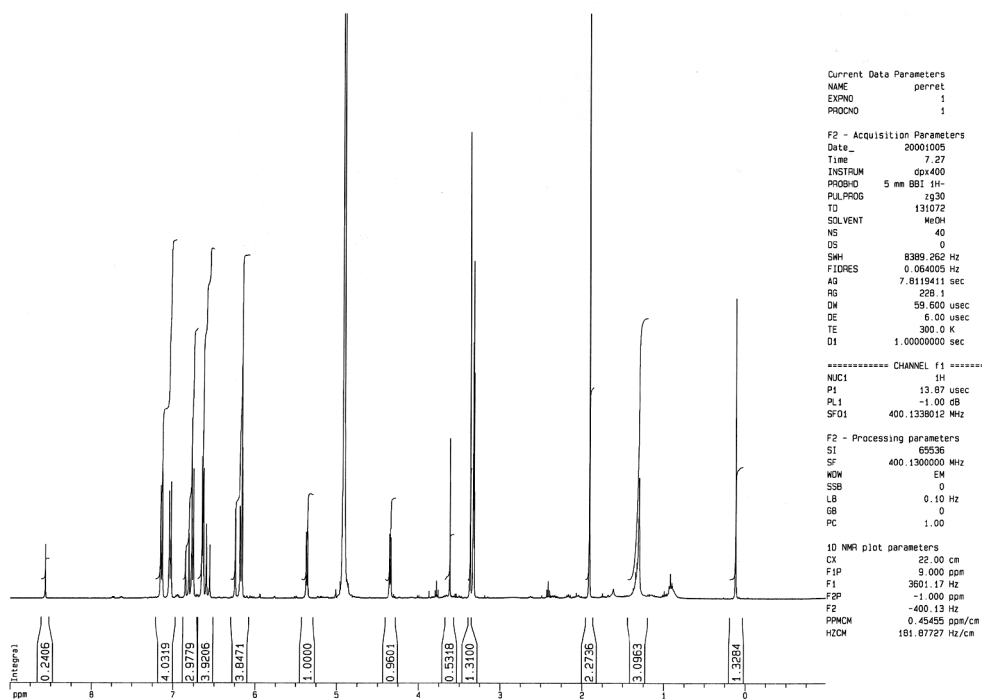


Figure V.2-1: Spectre ^1H -RMN de l' ϵ -viniférine.

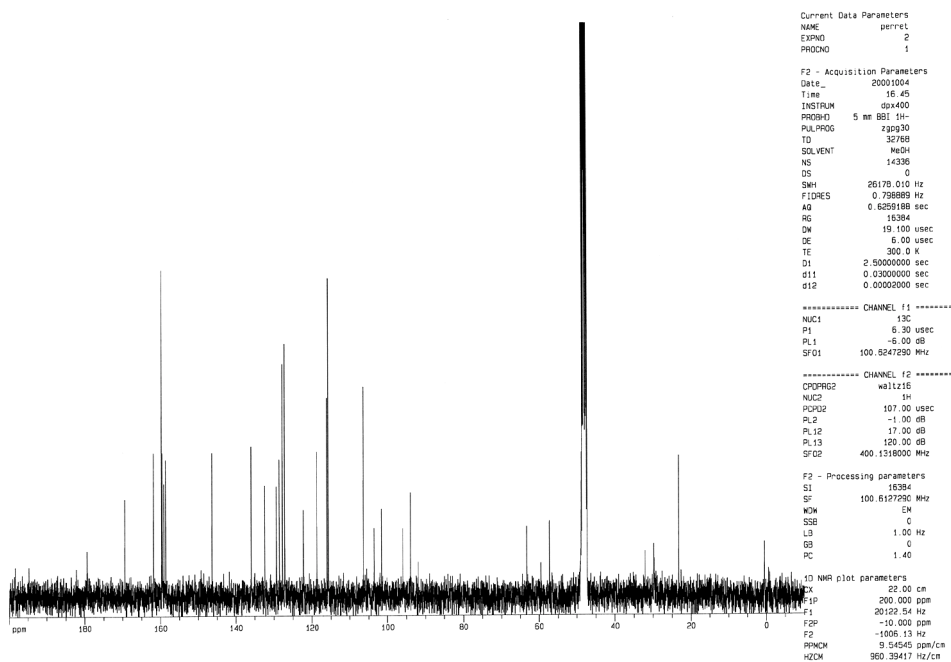


Figure V.2-2: Spectre ^{13}C -RMN de l' ϵ -viniférine.

Caractérisation du resvératrol *t*-déhydrodimère et de l' ϵ -viniférine

Tableau V.2-1: Comparaison des données spectroscopiques ^1H -RMN et ^{13}C -RMN avec *M. Lin* [165].

Protons	^1H -RMN (400 MHz, CD_3OD) (δ , ppm)	^1H -RMN (500 MHz, Acetone- d_6) (δ , ppm) [165]
2	5.36 (1H, d, J=6.6 Hz)	5.42 (1H, d, J=5.5 Hz)
3	4.34 (1H, d, J=6.6 Hz)	4.45 (1H, d, J=5.5 Hz)
5	6.63 (1H, d, J=1.9 Hz)	6.70 (1H, d, J=2.0 Hz)
7	6.24 (1H, d, J=1.9 Hz)	6.32 (1H, d, J=2.0 Hz)
1'	6.82 (1H, d, J=16.3 Hz)	6.89 (1H, d, J=16.0 Hz)
2'	6.57 (1H, d, J=16.4 Hz)	6.67 (1H, d, J=16.0 Hz)
2,6A	7.14 (2H, dd, J=8.5 et 1.8 Hz)	7.19 (2H, dd, J=8.5 et 2.0 Hz)
3,5A	6.76 (2H, dd, J=8.6 et 1.8 Hz)	6.83 (2H, dd, J=8.5 et 2.0 Hz)
4,6B	6.16 (2H, d, J=2.2)	6.24 (2H)
2B	6.18 (1H, t, H-2B)	6.25 (1H)
2,6C	7.03 (2H, dd, J=8.6 et 1.8 Hz)	7.16 (2H, dd, J=8.6 et 2.0 Hz)
3,5C	6.64 (2H, dd, J=8.6 et 1.8 Hz)	6.74 (2H, dd, J=8.6 et 2.0 Hz)

Carbones	^{13}C -RMN (100 MHz, CD_3OD) (δ , ppm)	^{13}C -RMN (125 MHz, Acetone- d_6) (δ , ppm) [165]
2	93.94	93.7
3	57.34	57.2
3a	118.66	119.7
4	135.97	136.4
5	103.52	104.2
6	159.49	159.5
7	95.98	96.7
7a	161.73	162.4
1'	129.35	130.1
2'	122.25	123.5
1A	132.36	133.8
2,6A	127.19	127.8
3,5A	115.66	116.1
4A	159.08 ou 158.57	158.2
1,3B	159.65	159.6
2B	101.60	102.0
4,6B	106.45	106.9
5B	146.36	147.3
1C	128.54	129.8
2,6C	127.76	128.6
3,5C	115.97	116.2
4C	159.08 ou 158.57	158.2

Le spectre ^1H -RMN nous suggère que ce composé appartient à la même classe que le resvératrol *trans*-déhydrodimère. Nous observons un seul système *ortho/para* à 6.18 et 6.16 ppm (H-2B et H-4,6B), correspondant à 3 hydrogènes. Les signaux à 6.82 et 6.57 ppm, avec un couplage de 16.3 Hz, nous indiquent la présence d'une double liaison *trans*.

Nous pouvons observer la présence de deux systèmes AA'BB', indiquant une substitution *para* sur les cycles aromatiques (H-2,6A-3,5A et H-2,6C-3,5C).

Deux hydrogènes, représentés par des doublets à 5.36 et 4.34 ppm avec une même constante de couplage de 6.6 Hz, nous indiquent un système central semblable au resvératrol *trans*-déhydrodimère (H-2 et H-3).

Les signaux à 6.63 et 6.24 ppm apparaissent sous la forme de doublets avec une constante de couplage de 1.9 Hz, correspondant à un couplage *méta* (H-5, H-7).

Le spectre ^{13}C -RMN montre plusieurs carbones très déblindés pouvant être attribués à des phénols. Nous pouvons en conclure que la structure est très proche du resvératrol *trans*-déhydrodimère, mais avec des variations au niveau des substituants aromatiques.

Grâce à ces données spectroscopiques, nous pouvons conclure que ces composés sont bien ceux présentés par *P. Langcake* en 1977 [60;77].

CHAPITRE VI

TESTS BIOLOGIQUES

VI TESTS BIOLOGIQUES

Les méthodes décrites au chapitre III permettent l'extraction et le fractionnement des tanins oligomériques et polymériques. Le chapitre IV montre la caractérisation par spectrométrie de masse des fractions obtenues au chapitre III. Ce travail a été réalisé dans le but de déterminer quel type de tanins inhibent la stilbène oxydase (cf. chapitre I). Ceci afin de démontrer l'effet inhibiteur des tanins sur une exo-enzyme produite par *Botrytis cinerea* et éventuellement d'en préciser son rôle dans la latence.

L'hypothèse de l'inhibition la stilbène oxydase par les tanins nous conduit à poser les questions suivantes :

- Est-ce que les tanins inhibent réellement la stilbène oxydase ?
- Quel rôle cette enzyme joue-elle dans le pouvoir pathogène du champignon ?
- Existe-il une corrélation entre l'inhibition de l'enzyme et la résistance d'un cépage ?
- Est-ce que la stilbène oxydase est responsable de la synthèse du resvératrol *trans*-déhydrodimère *in vivo*?

Le rôle de cette enzyme n'est pas encore bien précisé, mais il est possible qu'elle participe à un mécanisme clé qui engendre le phénomène de latence du champignon, tout en sachant que les laccases sont aussi capables d'hydrolyser la lignine [166;167]. Selon les résultats actuels, la concentration en tanins est peut-être suffisante pour assurer la défense de la grappe pendant sa maturation en inhibant l'activité du complexe enzymatique sécrété par le champignon (juin à septembre). Si cette hypothèse est vérifiée, il n'est alors pas expliqué pourquoi le champignon reprend son développement à la maturité de la grappe. Peut-être que la concentration en tanins diminue et que la vigne cesse la biosynthèse de stilbènes. Il a été démontré que la plus haute capacité de synthèse du resvératrol se situait 5 semaines après la floraison et diminuait de façon dramatique dès la véraison et jusqu'à la maturation de la grappe [66]. Il ne faut pas oublier que les peroxydases présentes dans la vigne sont aussi capables de dimériser les stilbènes et ainsi de maintenir une concentration suffisante en dimères plus antifongiques que le resvératrol [69].

Nous avons testé systématiquement, en parallèle, les fractions des variétés de Gamay et de Gamaret, car elles présentent une sensibilité différente à l'attaque par *Botrytis cinerea* (cf. chapitre II).

La première partie des tests biologiques a été effectuée sur des fractions polymériques provenant de grappes cueillies en 1995 à des stades de maturité variables. Puis grâce aux méthodes de fractionnement développées, nous avons appliqué ces tests aux fractions oligomériques et aux fractions DPM, obtenues comme décrit au chapitre II.2.3 et III.1.5, sur des extraits provenant de grappes cueillies le 02.08.99.

VI.1 TESTS BIOLOGIQUES SUR LES FRACTIONS POLYMERIQUES PROVENANT DE GRAPPES CUEILLIES EN 1995 EN FONCTION DE LEUR MATURITE

Les baies de raisins ont été cueillies à des stades différents de maturité (entre août et mi-septembre). Les tanins ont été extraits selon la méthode décrite dans les chapitres II.2.2 et II.2.4.

Le DPM des fractions polymériques a été mesuré (cf. chapitre II.3.1), ensuite nous avons testé leur pouvoir inhibiteur envers la stilbène oxydase, comme décrit au chapitre II.4.

VI.1.1 DPM des fractions polymériques en fonction de la date de cueillette

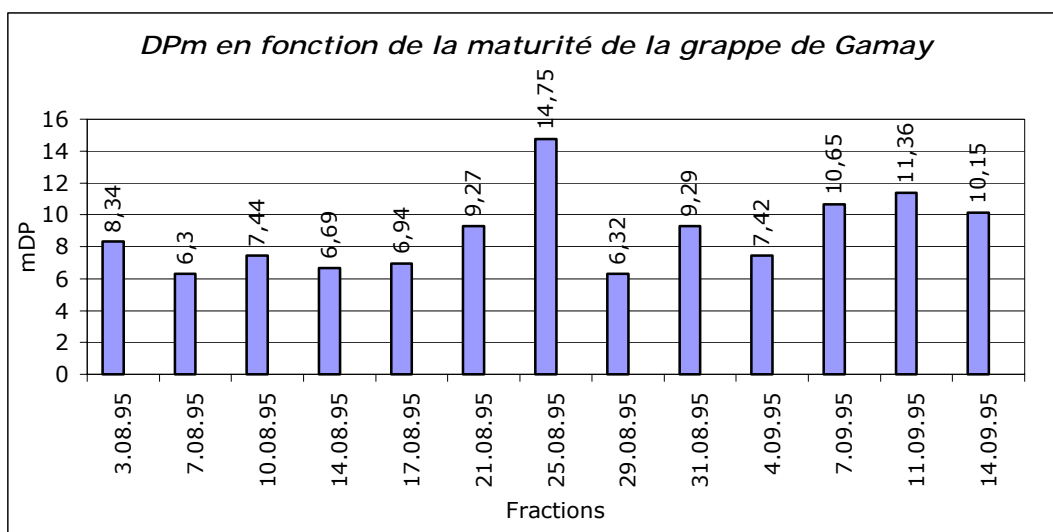


Figure VI.1-1: DPM des fractions polymériques en fonction de la date de cueillette pour Gamay.

Tests biologiques

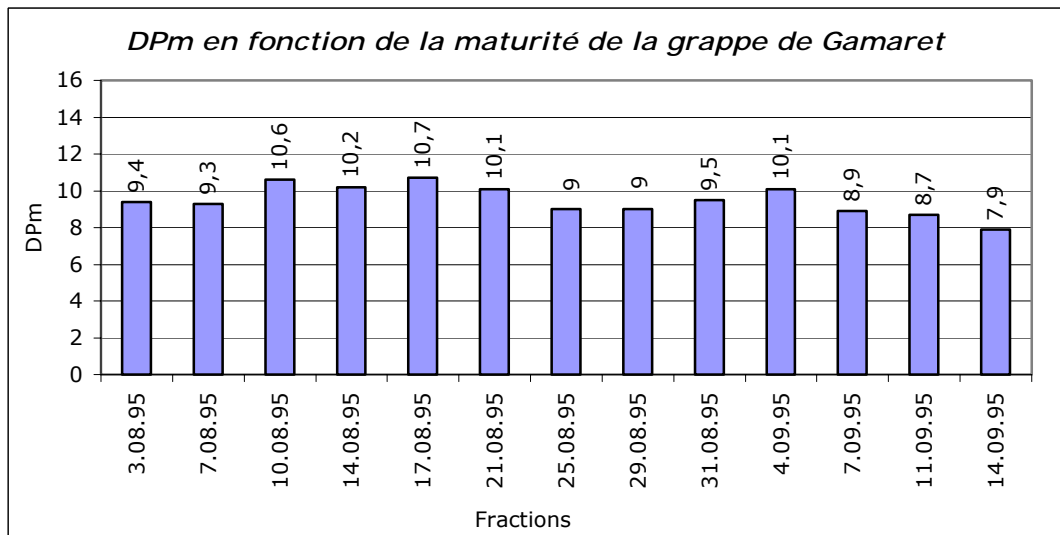
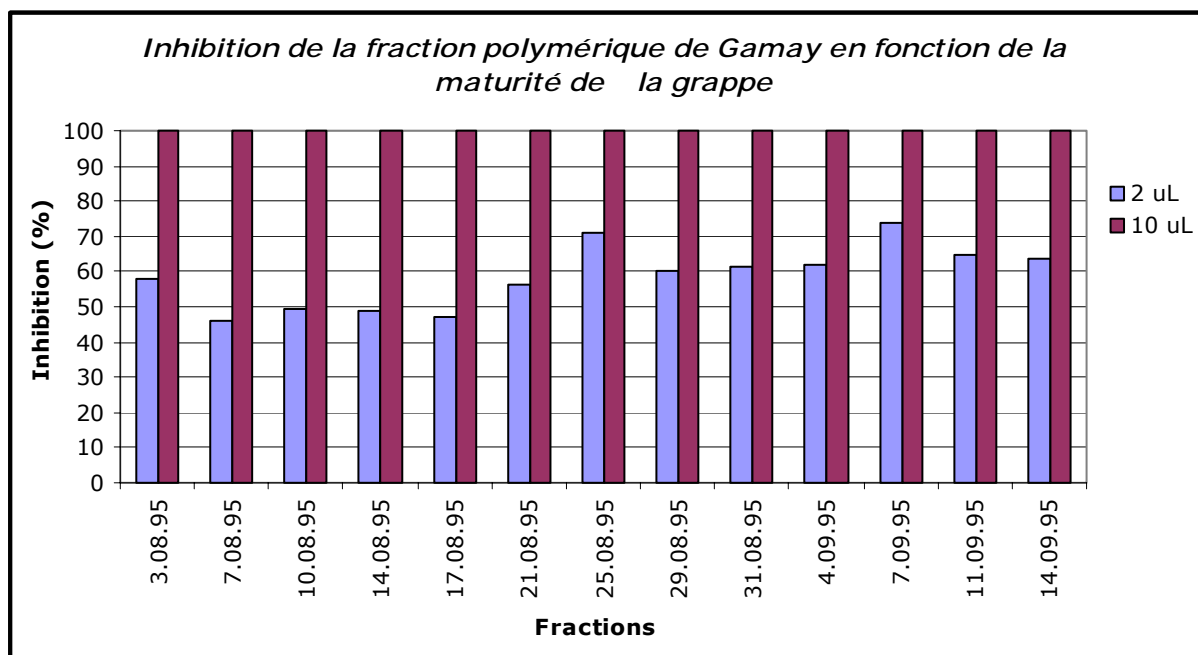


Figure VI.1-2: Dpm des fractions polymériques en fonction de la date de cueillette pour Gamaret.

Comme nous pouvons le constater, le Dpm de Gamaret est constant, avec une moyenne de 9 environ. Celui de Gamay varie beaucoup plus avec un minimum de 6.3 le 7.08.95 et un maximum à 14.75 le 25.08.95.

VI.1.2 Pouvoir inhibiteur des fractions en fonction de la date de cueillette



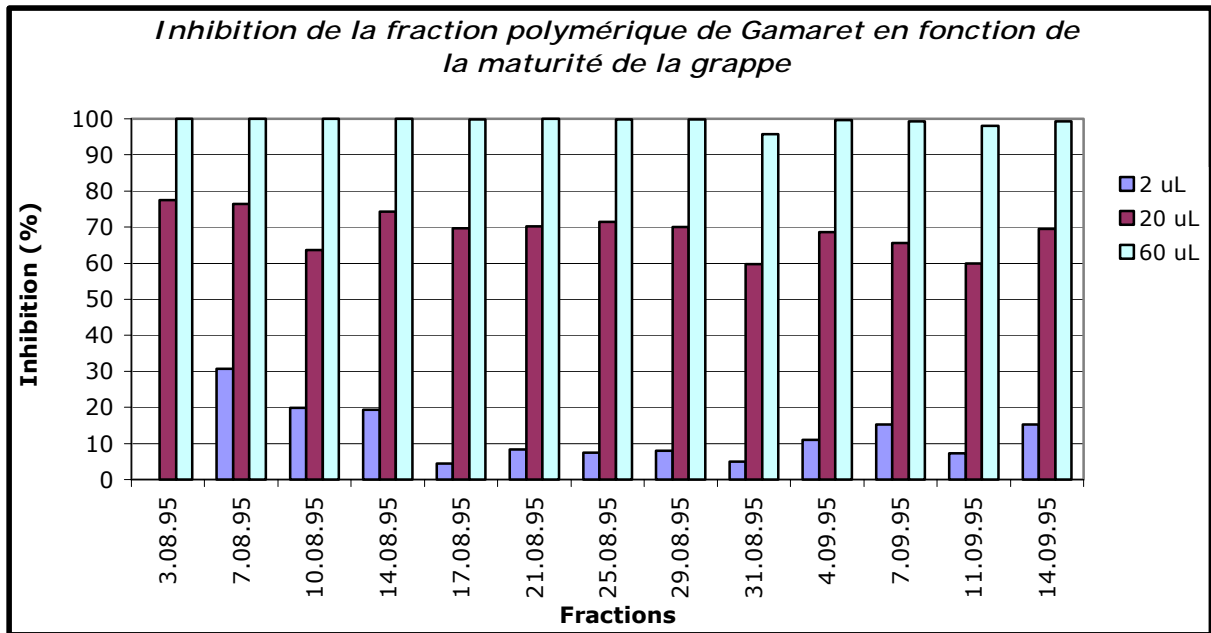


Figure VI.1-3: Inhibition de l'enzyme par les fractions polymériques en fonction de la date de cueillette.

D'une manière générale, les tanins de Gamay inhibent considérablement mieux la stilbène oxydase que ceux de Gamaret.

Nous observons que l'inhibition des fractions polymériques est directement proportionnelle au DpM de la fraction. Par exemple, la fraction 25.08.95 de Gamay a un DpM de 14.75, correspondant au DpM le plus élevé, inhibe très efficacement l'enzyme (72% d'inhibition pour 2 μ L de solution tannique).

VI.2 TESTS BIOLOGIQUES SUR LES FRACTIONS OLIGOMÉRIQUES PROVENANT DE GRAPPES CUEILLIES EN 1999

Ces fractions proviennent d'un extrait de grappes cueillies le 02.08.99. Les fractions sont obtenues, comme décrit au chapitre II.2.3. Les tests sont effectués comme énoncé au chapitre II.4.

Les résultats sont exposés par les graphiques ci-dessous, représentant le numéro de la fraction oligomérique dans l'ordre d'élution et son DPm, en fonction du pourcentage d'inhibition de l'enzyme :

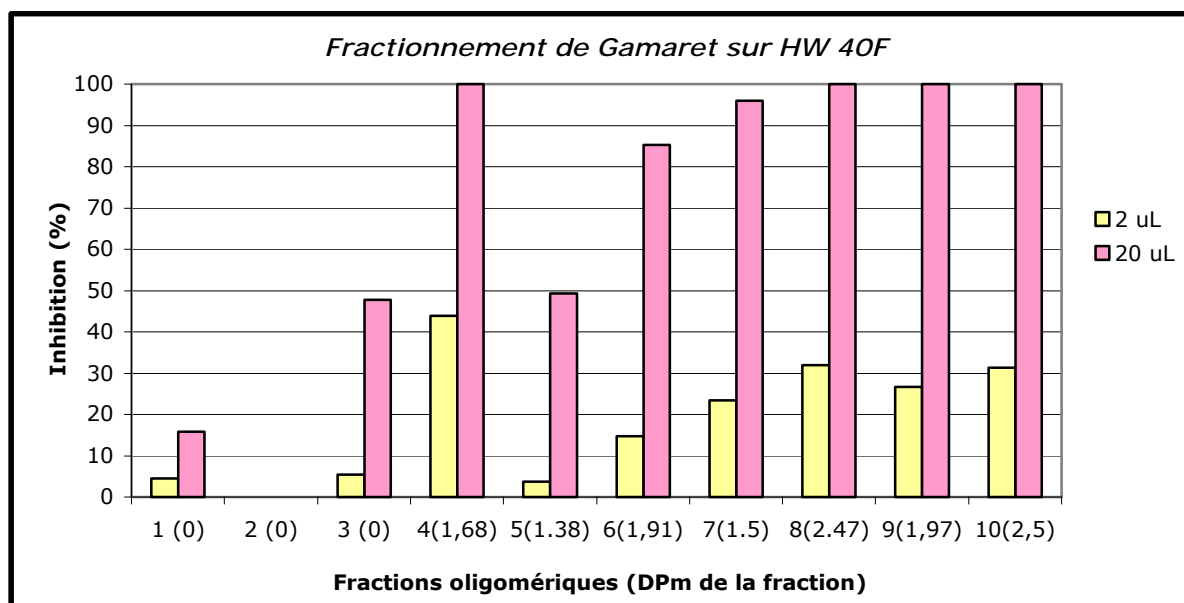
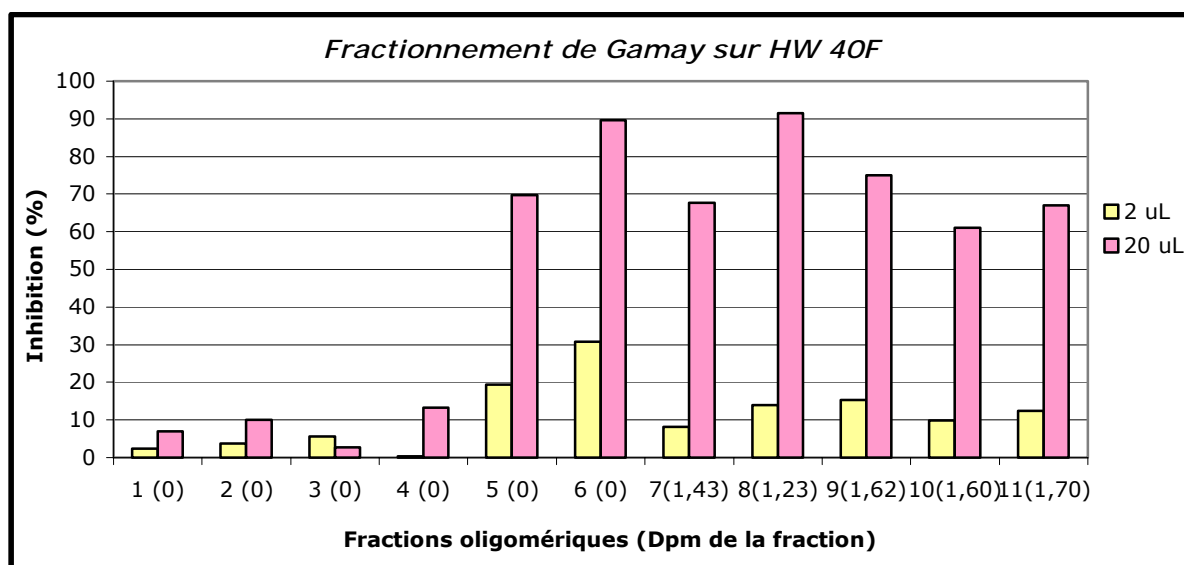


Figure VI.2-1: Résultats de l'inhibition de la stilbène oxydase par les fractions oligomériques de Gamay et Gamaret. Les chiffres entre parenthèses sur l'abscisse correspondent au DPm de la fraction.

Tests biologiques

Il est à noter que les D_{Pm} calculés sont relatifs. Certaines fractions contiennent énormément de catéchine ou d'épicatéchine ou alors d'autres composés, faussant les résultats de la thiolysse. Le D_{Pm} de certaines fractions n'a simplement pas pu être calculé (D_{Pm} = 0), car le chromatogramme HPLC montrait des pics à des temps de rétention identiques aux produits de la thiolysse. La fraction 2 de Gamaret était une huile insoluble et de ce fait, n'a pas pu être testée.

La concentration de la fraction est calculée en fonction de son D_{Pm} et des volumes entre 2 et 20 µL sont utilisés (cf. chapitre II.4).

D'une manière générale, les fractions oligomériques de Gamaret inhibent plus efficacement l'enzyme que celle de Gamay. Par exemple, la fraction 9 de Gamay montre une inhibition de 75 % à 20 µL et celle de Gamaret montre une inhibition de 100% pour le même volume. Les fractions 1 à 4 ne montrent quasi aucune activité, à l'exception des fractions 3 et 4 de Gamaret. D'après la LC/MS, ces fractions contiennent des acides phénoliques, des anthocyanes, de la catéchine et de l'épicatéchine [3]. Les fractions suivantes sont composées presque uniquement de proanthocyanidines oligomériques. Ceci confirme qu'elles inhibent la stilbène oxydase.

D'après les résultats LC/MS, il a été mis en évidence que la fraction 10 oligomérique de Gamay contenait pterostilbène, mais elle ne montre aucune différence d'inhibition avec les autres fractions.

VI.3 TESTS BIOLOGIQUES SUR LES FRACTIONS DPm PROVENANT DE GRAPPES CUEILLIES EN 1999

Les extraits polymériques de Gamay et de Gamaret (baies cueillies le 02.08.99) (cf. chapitre II.2.4) sont fractionnés sur SP411, puis le DPm est déterminé par thiolysse (cf. chapitres II.3.1 et III.1.5). Ces fractions sont ensuite testées pour l'inhibition de la stilbène oxydase, comme décrit dans le chapitre II.4.

La concentration est aussi ajustée en fonction du DPm, mais ce calcul ne tient pas compte des proanthocyanidines galloylées. Les graphiques ci-dessous représentent le DPm de la fraction en fonction du pourcentage d'inhibition de l'enzyme pour Gamay et pour Gamaret.

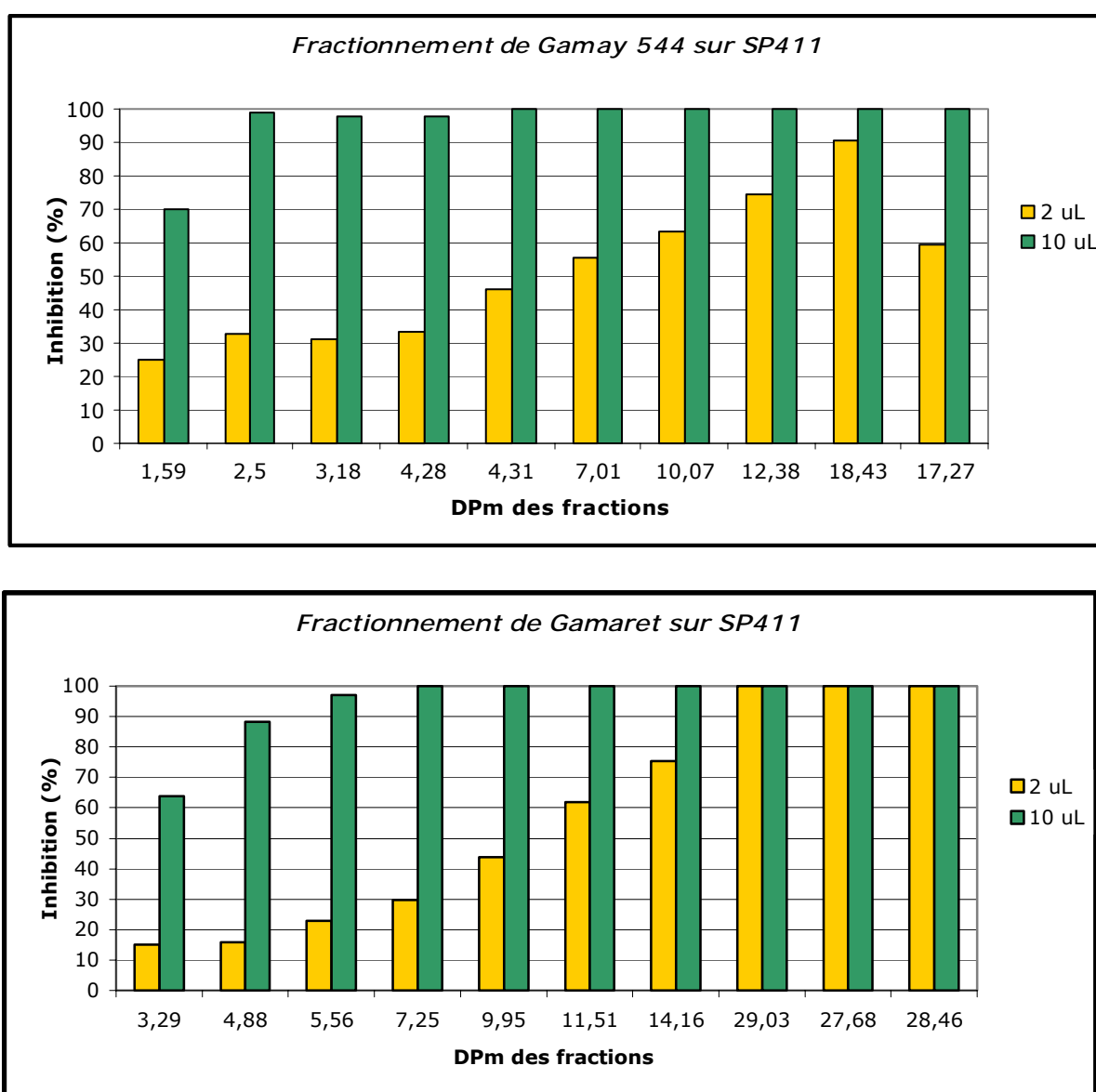


Figure VI.3-1: Graphiques représentant le pouvoir inhibiteur des fractions DPm de Gamay et de Gamaret en fonction du DPm.

Tests biologiques

Les valeurs d'inhibition obtenues montrent déjà une forte activité à partir de 2 μ L, ce qui n'était pas le cas pour les fractions oligomériques.

Les principales constatations sont :

- Les fractions Gamaret ont un DPm moyen plus élevé que celles de Gamay
- Plus le DPm augmente, plus le pouvoir inhibiteur est important
- Les fractions de Gamaret sont plus inhibitrices que celles de Gamay car les DPm moyen est plus élevé

Nous pouvons en déduire deux hypothèses :

- Si le DPm moyen de Gamaret est plus élevé, cela pourrait expliquer pourquoi ce cépage est plus résistant à *Botrytis cinerea*.
- Si le DPm moyen est plus élevé après la floraison et devient faible à la maturation de la grappe, cela pourrait, éventuellement, suggérer une raison à la latence de *Botrytis cinerea*.

VI.4 CONCLUSION

L'analyse du DPm, en fonction de grappes cueillies à différents stades de maturité, montre que le DPm moyen de Gamaret se situe autour de 9 et est constant, alors que celui de Gamay varie entre 6 et 14. D'après les tests biologiques, les tanins de Gamay sont plus inhibiteurs que ceux de Gamaret. Ces résultats ont été contredits par les tests des fractions oligomériques et DPm. Il est important de noter que les grappes de raisin n'ont pas été cueillies la même année.

Les fractions oligomériques de Gamaret inhibent mieux l'enzyme que celles de Gamay. Les fractions DPm de Gamaret sont aussi plus inhibitrices que celles de Gamay car le DPm moyen est plus élevé. Si l'on compare uniquement le pourcentage d'inhibition en fonction du DPm entre Gamay et Gamaret, on observe que les tanins de Gamay sont plus inhibiteurs.

Ces résultats pourraient être mis en relation avec la résistance des cépages à l'attaque par *Botrytis cinerea*. Il est possible que plus le DPm des tanins de la grappe est élevé, plus le cépage sera résistant, en rapport à l'inhibition de la stilbène oxydase.

Deux remarques peuvent être ajoutées :

- Premièrement, la composition et la structure des tanins peuvent varier d'un cépage à l'autre. Cela peut provenir de certains facteurs externes, comme l'humidité, la chaleur, le lieu de plantation.
- Deuxièmement, il est possible que le pouvoir inhibiteur des proanthocyanidines soit en relation avec leur structure. Certaines études ont montré, par exemple, que l'ajout d'un acide gallique en position C-3 diminuait l'inhibition de la peroxydation des lipides à basse densité [42]. De ce fait, une variation de la composition tannique peut amener à une augmentation ou à une diminution de l'inhibition des enzymes.

Ces résultats suggèrent certaines idées concernant les mécanismes de défense de la vigne contre *Botrytis cinerea*, mais en aucun cas apportent une réponse au problème.

CHAPITRE VII

DISCUSSION

VII DISCUSSION

VII.1 ORIGINE BIOSYNTHÉTIQUE DES COMPOSÉS

Le métabolisme primaire d'un organisme est constitué d'un ensemble de réactions chimiques catalysées par des enzymes. Il a pour but de fournir à l'organisme l'énergie dont il a besoin, ainsi que des intermédiaires et les macromolécules essentielles comme l'ADN et les protéines. Ce métabolisme est pratiquement le même pour tous les systèmes vivants [24;45;168;169].

Le métabolisme secondaire, quant à lui, implique des processus synthétiques dont les produits finaux ne semblent pas contribuer au fonctionnement fondamental de l'organisme. Les métabolites secondaires dérivent d'intermédiaires biosynthétiques du métabolisme primaire. Une des hypothèses émises pour expliquer leur production est qu'ils constituent une voie d'élimination d'intermédiaires du métabolisme primaire qui autrement s'accumuleraient dans l'organisme. Ces métabolismes secondaires permettraient ainsi de maintenir opérationnelles les réactions primaires en présence, par exemple, d'un excès de glucides.

Un large nombre de composés possèdent une structure en C₆(aromatique)-C₃ (acides aminés aromatiques, acides cinnamiques, coumarines, flavonoïdes) avec une origine biosynthétique commune : l'acide shikimique. Ce composé a été isolé pour la première fois en 1885 d'une plante japonaise *Illicium anisatum* [170]. Par la suite, il a été démontré qu'il pouvait remplacer les acides aminés essentiels comme la phénylalanine, le tryptophane et la tyrosine pour des bactéries mutantes *E. coli*.

Ces acides aminés essentiels sont des précurseurs de la biosynthèse de métabolismes secondaires, comme les proanthocyanidines et l'acide gallique. Leur synthèse est régie par l'action d'enzymes capables de modifier leur structure :

- Oxydation : les oxydases permettent l'introduction d'un atome d'oxygène dans la molécule
- Réduction : les déshydrogénases (ou réductases) permettent le transfert d'un hydrogène sur un oxygène moléculaire par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire
- Méthylation : La réaction se fait par le transfert du groupe méthyle d'une méthionine via l'acide tétrahydrofolique
- Halogénéation : La réaction se fait l'intermédiaire d'halogéno-peroxydases

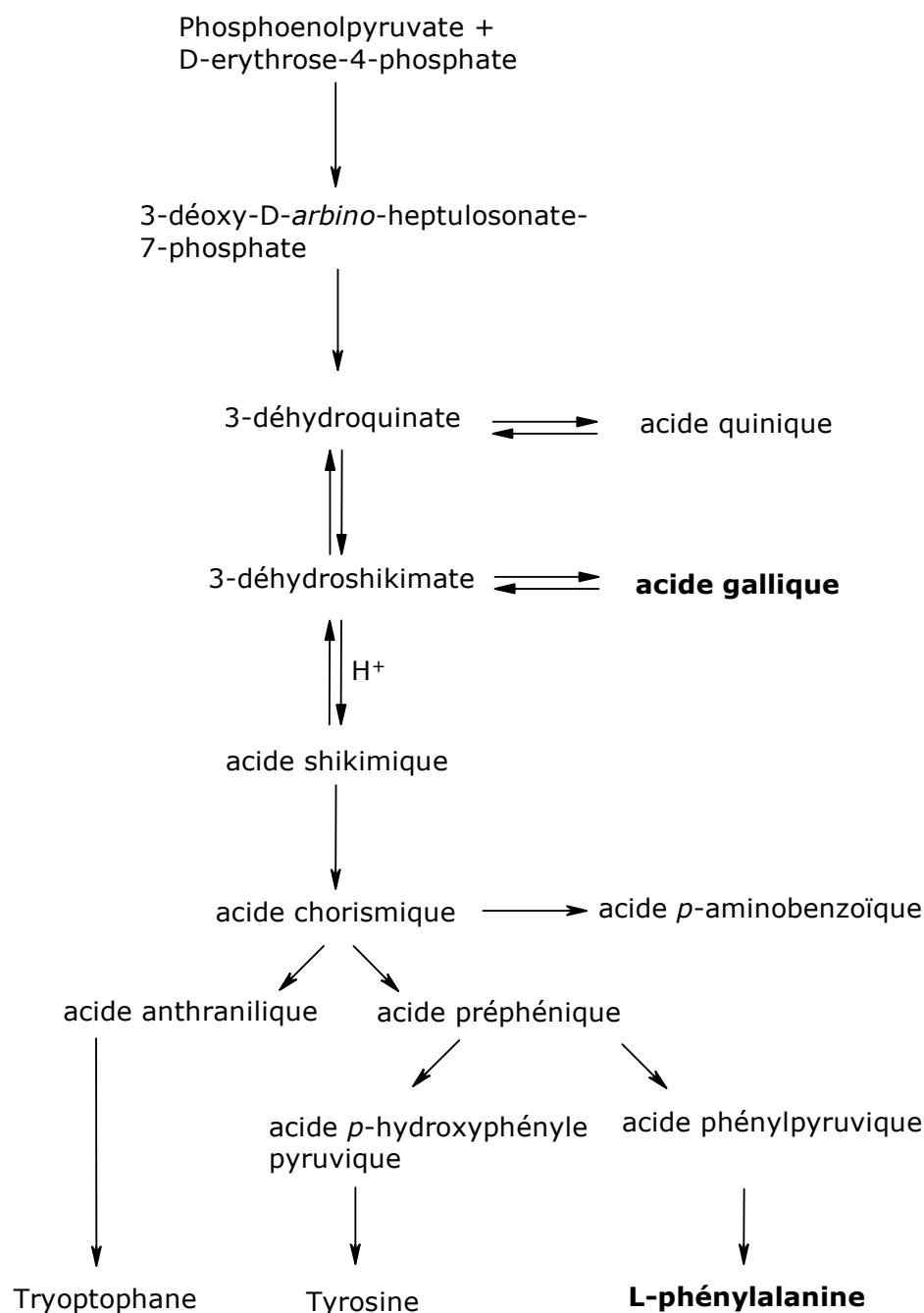


Figure VII.1-1: Voie biosynthétique de l'acide shikimique [168].

La première étape consiste en la condensation du phosphoénol-pyruvate avec l'érythrose-4-phosphate. Le produit de réaction est un sucre à 7 carbones ouvert, qui par la suite perd son unité phosphate pour former le 3-déhydroquinatate. Ce composé se libère ensuite d'une molécule d'eau pour donner le 3-déhydroshikimate qui est alors réduit par NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) en acide shikimique. Celui-ci est phosphorylé par une molécule d'ATP (adénosine triphosphate), puis il condense avec une seconde molécule de phosphoénol-pyruvate pour former l'acide 3-énolpyruvylshikimique-5-phosphate. Cet intermédiaire perd ensuite son groupe phosphate pour créer l'acide

chorismique, qui est le précurseur des acides aminés essentiels aromatiques, comme la tyrosine, la L-phénylalanine et le tryptophane.

La conversion de la L-phénylalanine en acide *p*-coumarique découle du métabolisme général des phénylpropanoïdes.

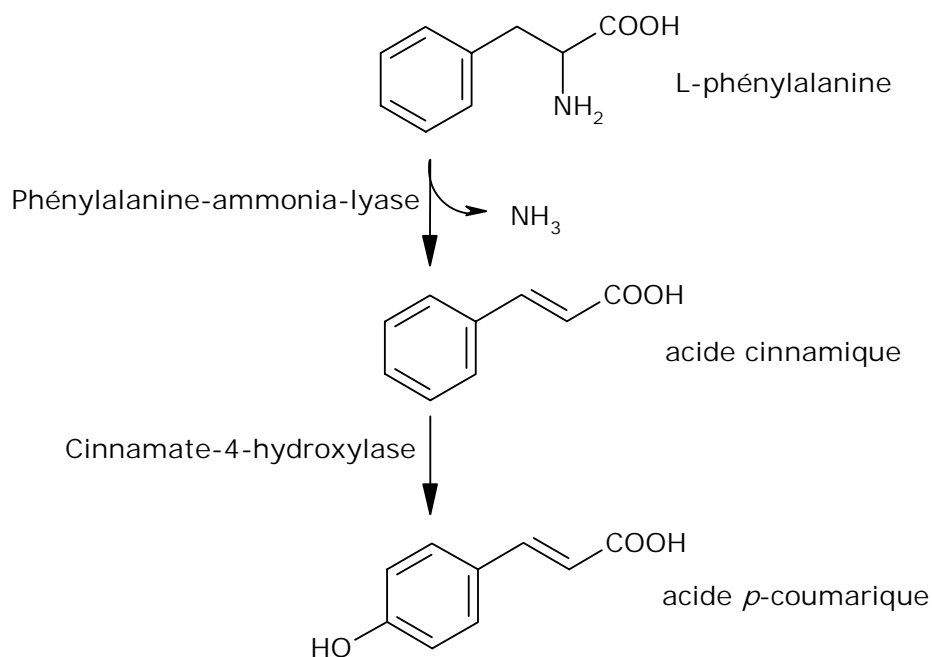


Figure VII.1-2: Métabolisme général des phénylpropanoïdes [169].

L'hydroxylation ou la méthylation du cycle aromatique de l'acide *p*-coumarique donne successivement l'acide cafféique, l'acide férulique, l'acide sinapique (cf. chapitre I), puis d'autres composés par réduction ou oxydation.

La biosynthèse des stilbènes, des flavonoïdes et des tanins découle de ce métabolisme. Le resvératrol est formé par la condensation du *p*-coumaroyl-CoA avec trois molécules de malonyl-CoA [169;171]:

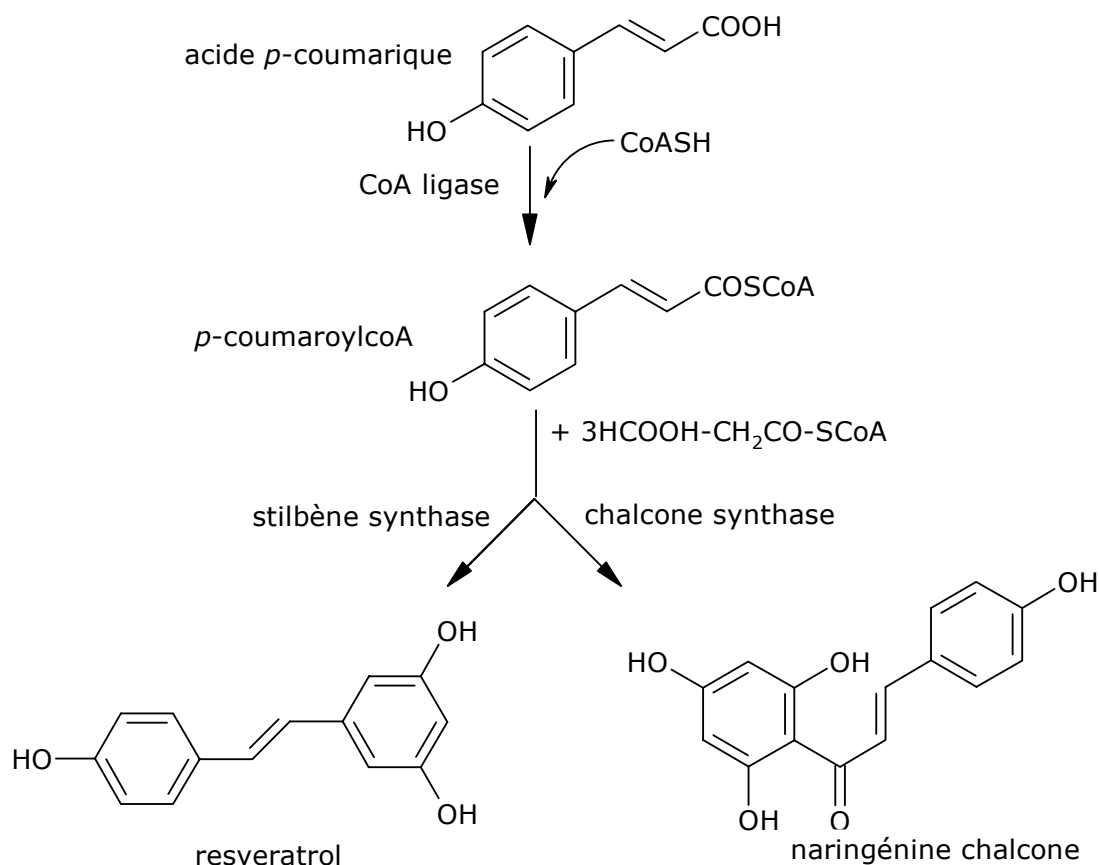


Figure VII.1-3: Biosynthèse des stilbènes[172].

La biosynthèse des stilbènes dans la vigne serait en compétition avec celle des flavonoïdes. En effet, la stilbène synthase et la chalcone synthase utilisent les mêmes substrats et ont une séquence en acides aminés identique à 70% [173].

La synthèse des viniférines a été attribuée à l'action des peroxydases vacuolaires sur le resvératrol [69;77]. Aucune voie de biosynthèse n'a pu être mise en évidence pour la picéide et le pterostilbène.

La biosynthèse des proanthocyanidines découle directement de la naringénine chalcone et de ce fait de celle des flavonoïdes. En effet, les flavonoïdes sont formés à partir de la naringénine par différentes réactions enzymatiques faisant intervenir des hydrolases, des réductases et des glucosyle transférases [24;174].

La synthèse de la famille des flavan-3-ols provient de ce fait aussi de la naringénine chalcone.

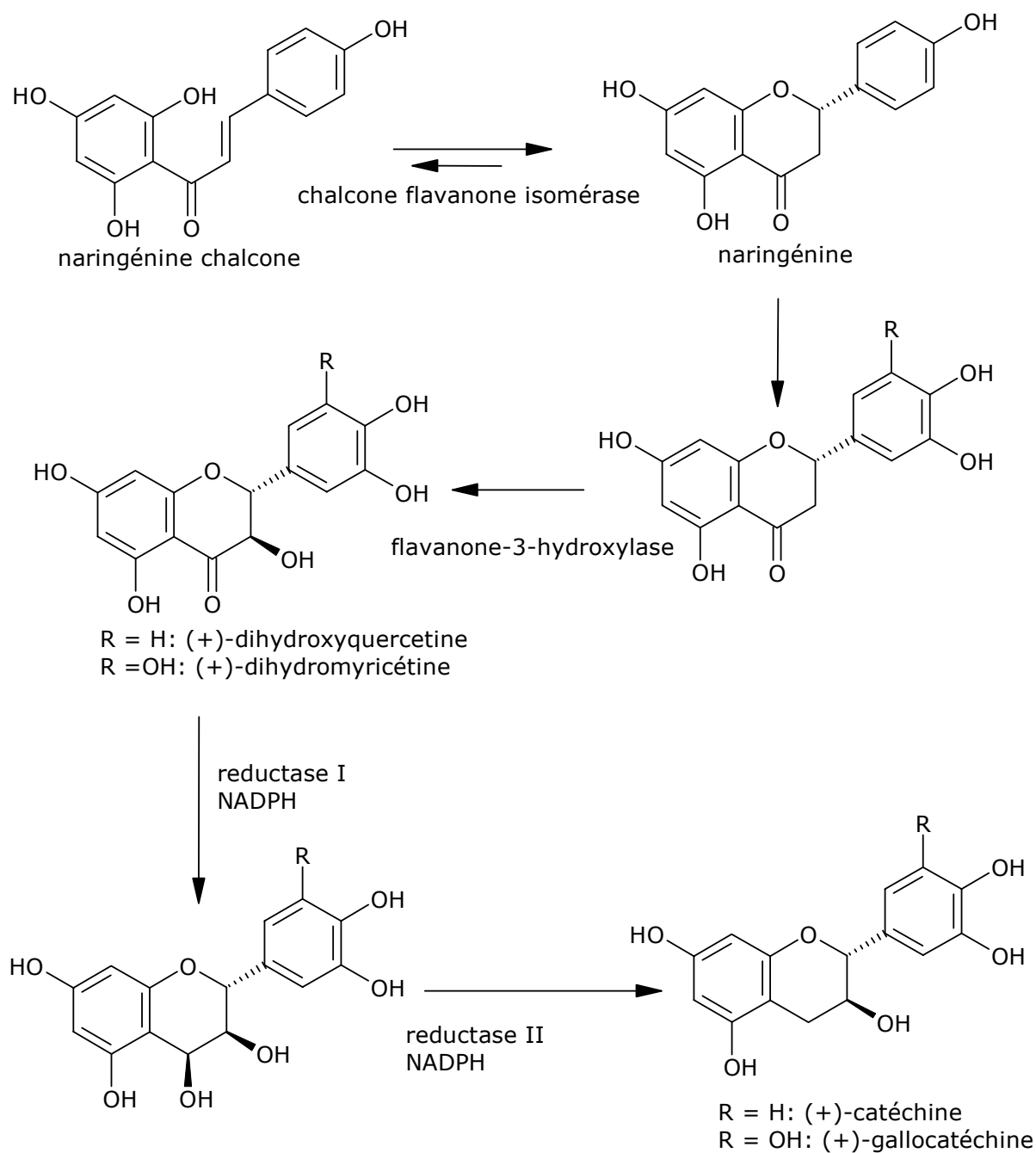


Figure VII.1-4: Biosynthèse de la (+)-catéchine et de la (+)-gallocatéchine.

L'hydroxylation sur le cycle B (cf. chapitre I) se fait après la formation du squelette C₆-C₃-C₆. La stéréochimie de la molécule est conservée tout au long des réactions afin de former spécifiquement la (+)-catéchine et la (+)-gallocatéchine [24].

La formation de l'épicatéchine reste un mystère, car la 2,3-*cis*-dihydroquercétine ((-)-dihydroquercétine) n'a jamais été isolée. Le mécanisme suivant a été proposé mettant le flavan-3,4-diol en tant qu'intermédiaire commun :

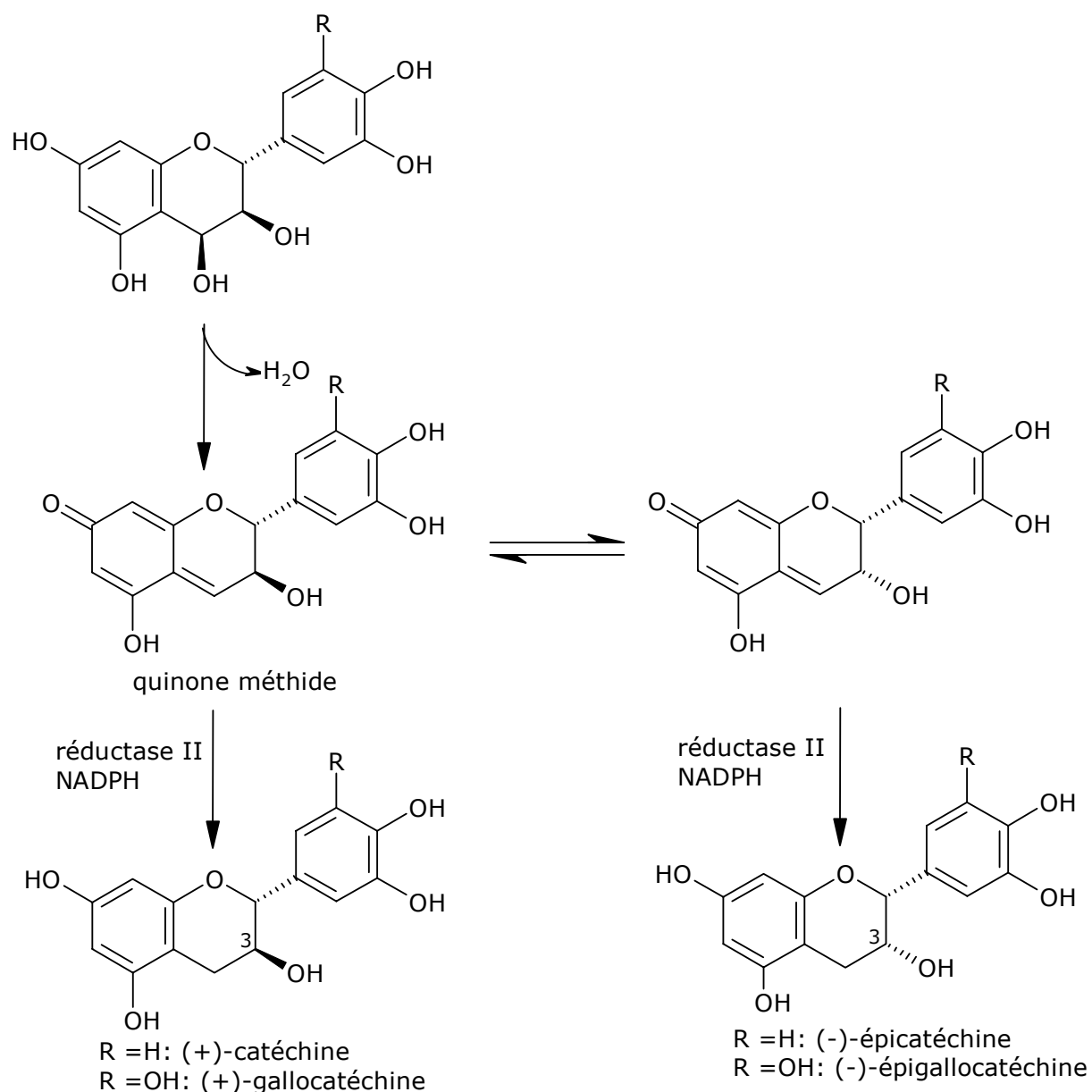


Figure VII.1-5: Synthèse possible de la conformation 3*R* ou 3*S* des phénols flavan-3-ols.

Ce mécanisme suggère que la réduction par la *réductase II* soit en fait un procédé en deux étapes : Premièrement la déshydratation suivie par la réduction par la quinone méthide [175]. La conformation de cette dernière permettrait une inversion de la stéréochimie du carbone C-3 par l'isomérisation via la forme énolique [176;177].

Les hypothèses émises pour la formation de proanthocyanidines oligomériques doivent tenir compte de certaines caractéristiques propre à ce type de molécules, il s'agit de :

- La nature biosynthétique des unités terminales et intermédiaires
- La stéréochimie de la liaison C₄-C₈ (ou C₄-C₆) reliant les unités doit être *trans* par rapport au carbone C-3

Discussion

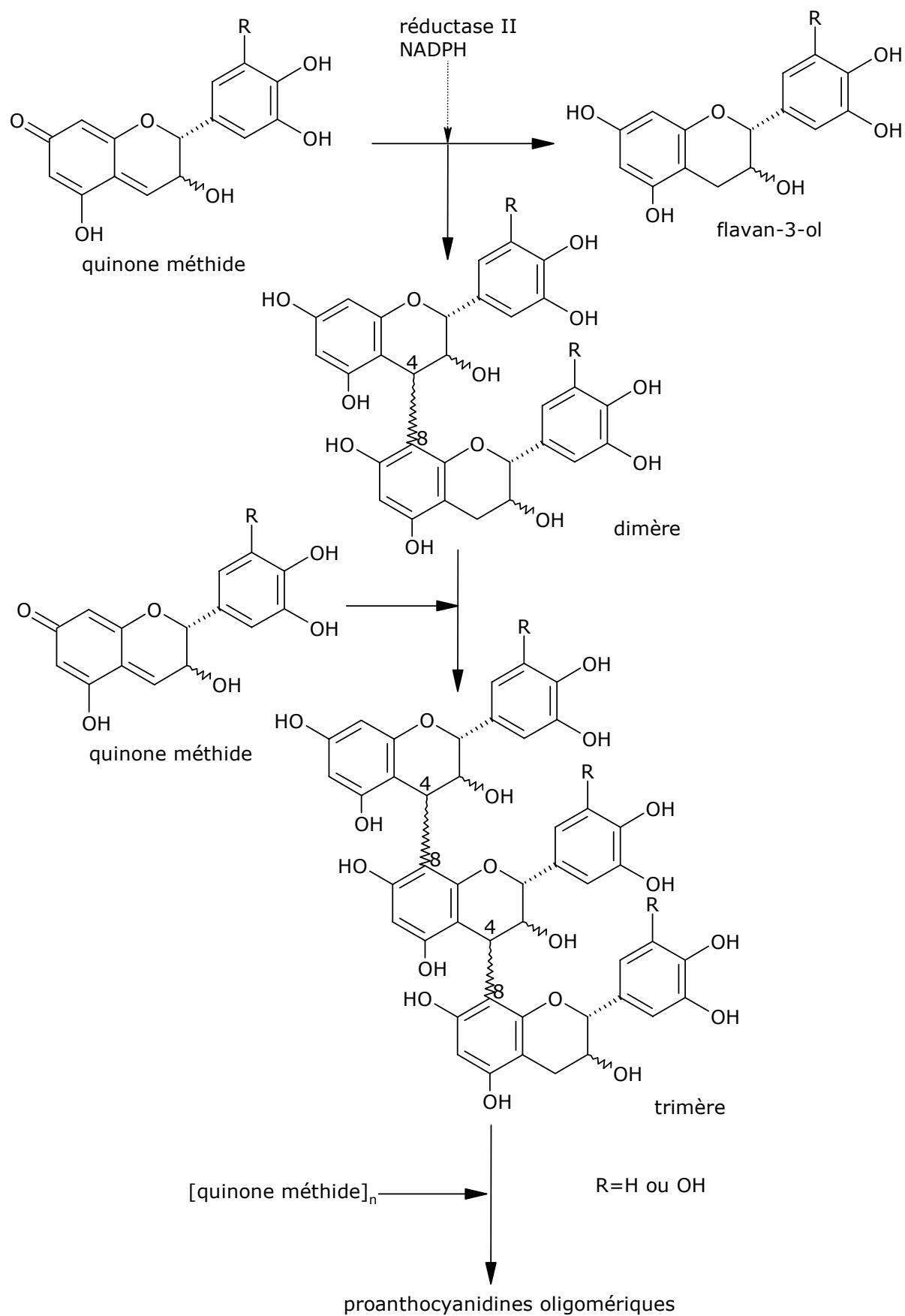


Figure VII.1-6: Schéma proposé pour la biogenèse des proanthocyanidines oligomériques [178].

Discussion

Ce mécanisme suggère que les proanthocyanidines soient formées par un procédé d'oligomérisation dans lequel la flavan-3-ol réagit avec la forme énolique de la quinoneméthide par attaque nucléophile. Les liaisons *trans* formées sont principalement des liaisons C₄-C₈, mais elles peuvent aussi être de nature C₄-C₆, pour ce mécanisme proposé. Les unités terminales et intermédiaires sont dérivées de la quinone méthide ; elles peuvent varier par la stéréochimie de leur carbone C-3, par un substituant greffé aussi en position C-3 (ex. : acide gallique) et par le nombre d'hydroxyles présents sur le cycle B (ex. : gallo(épi)catéchine).

Il est encore important de noter que l'acide gallique découle de l'oxydation de l'acide 3-déhydroshikimique et donc provient de la voie biosynthétique de l'acide shikimique.

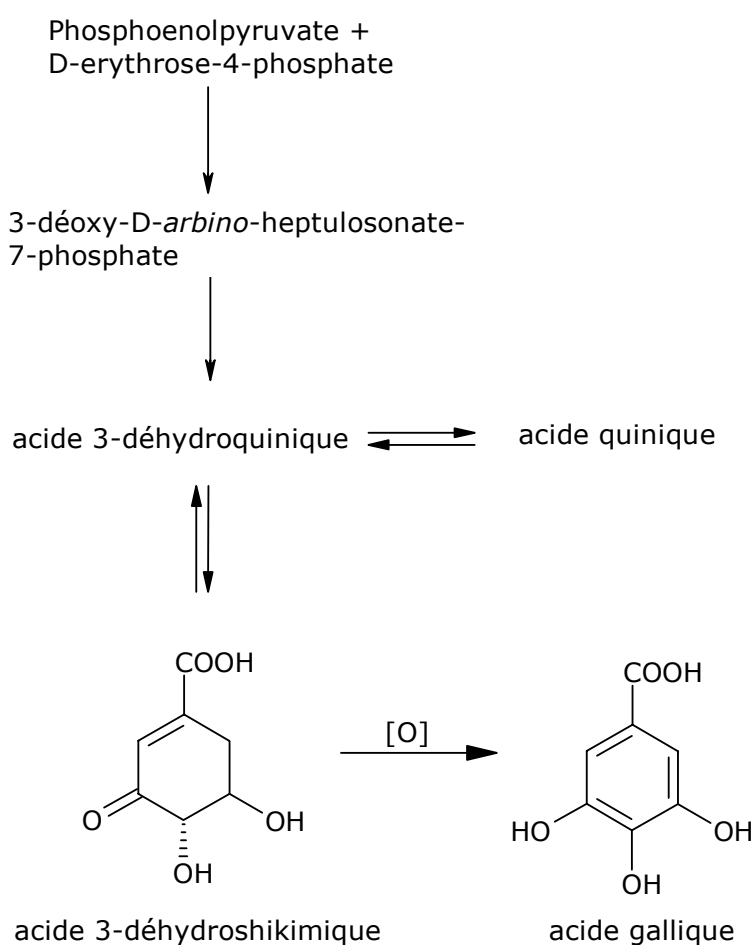


Figure VII.1-7: Biosynthèse de l'acide gallique [169].

L'acide gallique vient alors se greffer sur l'hydroxyle en position C-3 par estérification pour former la flavan-3-ol galloylée correspondante.

VII.2 ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES STILBÈNES

Il a été démontré que certains stilbènes possèdent des propriétés antifongiques [179;180]. Ces composés inhibent la croissance et la germination des spores [79;181]. D'autres composés stilbéniques sont présents naturellement dans la plante (ex. : pterostilbène) et sembleraient former une barrière de défense contre l'attaque de champignons.

Plusieurs effets toxiques des hydroxystilbènes ont été démontrés sur *Botrytis cinerea*:

- Effet sur la respiration des conidies :

Le premier effet sur les conidies est la diminution des échanges en oxygène. Le pterostilbène montre une inhibition très importante sur leur respiration.

Les symptômes de l'inhibition de la respiration semblent être identiques que ceux décrits par *H. Lyr* en 1987 [182]. Il prouva que les fongicides aromatiques, possédant un système conjugué identique aux stilbènes, induisent une peroxydation des lipides, spécialement ceux des mitochondries, des membranes nucléaires et ceux du réticulum endoplasmique. La raison est l'interaction de ces composés avec des enzymes flavines, comme la cytochrome C réductase. Ils bloquent le transport des électrons de la flavine au substrat et induisent, par la production de radicaux libres, une peroxydation des phospholipides membranaires.

- Effets visibles sur la conidie :

La germination des conidies est affectée en fonction de la concentration des hydroxystilbènes et de leur structure. Les effets peuvent aller de l'inhibition de la germination, jusqu'à la destruction des organelles et de la membrane cellulaire. Les composés les plus toxiques sont le pterostilbène et les stilbènes chloro-substitués.

- Effet sur les structures cellulaires :

Les conidies de *Botrytis cinerea* sont de forme elliptique. Elles possèdent plusieurs noyaux ; les mitochondries sont rondes ou ovoïdes ; les vacuoles, contenant probablement du glycogène, sont localisées dans le cytoplasme. Les trois membranes plasmiques (une externe et deux internes) sont bien définies et bien visibles au microscope.

L'adjonction de pterostilbène ou de chlorostilbènes engendre de rapides modifications structurales. Après 10 minutes les membranes s'épaississent, le réticulum endoplasmique

se désorganise et les ribosomes tendent à disparaître. Les organelles se détachent et finalement, le matériel cytoplasmique est expulsé de la membrane et coagule. Le resvératrol ne montre quasiment aucune toxicité contre les conidies.

La toxicité des hydroxystilbènes dépend avant tout de leurs substituants. L'activité antifongique est directement reliée à leur capacité d'infiltration dans les membranes. Ce phénomène tend à augmenter en fonction du pouvoir électro-attracteur des substituants, combiné à l'effet conjugué de ces molécules.

Ceci est valable pour les chlorostilbènes, mais semble moins acceptable pour le pterostilbène. Pour ce composé, d'autres raisons peuvent être évoquées : les volumineux groupements méthoxy peuvent perturber les liaisons intermoléculaires de la membrane. Des liaisons hydrogène peuvent être formées avec les protéines membranaires, modifiant la structure cellulaire.

La faible toxicité du resvératrol peut être expliquée par son caractère hydrophile, incompatible avec l'hydrophobicité des membranes biologiques.

VII.3 ACTIVITÉS BIOLOGIQUES ET PHARMACOLOGIQUES DES TANINS

La médecine traditionnelle a longtemps été décrite comme désuète et inefficace face à une médecine moderne en plein essor. Actuellement, les chercheurs tendent à porter de l'importance aux traitements utilisés par ces peuples primitifs qui utilisent des cocktails de plantes pour guérir leurs maux [24].

Une attention particulière a été donnée à des tribus provenant d'Amérique utilisant des plantes riches en polyphénols. Elles sont utilisées principalement en tant qu'anti-inflammatoire, digestif, diurétique et dans le traitement de l'hypertension artérielle. Des études ont montré des différences pharmacologiques en fonction de différentes classes de polyphénols [183-185]. Afin de mieux comprendre leurs propriétés biologiques, il faut expliquer en premier lieu leurs propriétés chimiques.

Ces composés ont certaines particularités:

- Ils se complexent avec des ions métalliques
- Ils ont des propriétés antioxyantes
- Ils peuvent se complexer avec d'autres molécules, entre autres des protéines des polysaccharides et des acides nucléiques

VII.3.1 Complexation métal-ion

Les polyphénols peuvent se complexer avec toutes sortes d'ions métalliques, mais leur activité biologique sera modifiée s'il s'agit de ions métalliques de transition (fer, vanadium, manganèse, cobalt et cuivre). En effet, ceux-ci possèdent certaines particularités (activité redox, donneur d'électrons π , coordination avec des ligands) qui permettront de modifier certaines réactions physiologiques [18;21;186;187].[24;156]

VII.3.2 Activité antioxydante

Une attention accrue a été portée sur le rôle des radicaux libres et autres oxydants, puis dans les mécanismes d'action de plusieurs phytotoxines et leur implication dans la plupart des maladies chroniques (cancers, maladie de Parkinson, arthrite, artériosclérose...). Une des hypothèses émises est que les mécanismes de défense diminuent avec l'âge et de ce fait la neutralisation de ces radicaux libres devient moins efficace [21].

Il a été démontré que les peuples utilisant une alimentation riche en antioxydants [19;117] sont moins exposés à des maladies cardiovasculaires [20] ou à certaines formes de cancer [19]. De ce fait, l'ingestion de polyphénols peut aider à la prévention de certaines maladies [18;20;117].

Les polyphénols ont la particularité d'inhiber la peroxydation des lipides, en agissant comme donneur de proton et accepteur de radicaux libres, stoppant ainsi le mécanisme d'autoxydation [18;43;186;187].

Les composés contenant une structure *ortho*-trihydroxylée, comme les gallotanins et les proanthocyanidines galloylées montrent une forte activité contre les anions superoxydes (O_2^-) [40;42;188;189].

Il a aussi été démontré que le thé vert avait des propriétés antioxydantes [20;41;150;190]. Il est riche en gallocatéchines qui ont la propriété de neutraliser les radicaux $OH\cdot$ et $HOO\cdot$ grâce à leur potentiel redox bas.

La taille des proanthocyanidines polymériques joue aussi un rôle important. Les dimères et trimères ont une activité antioxydante plus forte que les oligomères de taille supérieure [42;191].

VII.3.3 Complexation des polyphénols avec les protéines et les polysaccharides

Les polyphénols ont la particularité de se complexer aux protéines et aux polysaccharides [188;192;193]. Ces composés possèdent une multitude de groupement hydroxyles, capables de former des liaisons hydrogène avec plusieurs sites de la protéine (ou du polysaccharides). Ceci maintient une structure stable et rigide. Le complexe tanin-protéine précipite souvent lorsqu'il se trouve dans un milieu aqueux. Cela peut être expliqué de deux façons :

- Lorsque la protéine se trouve en faible concentration, les polyphénols se complexent sur plusieurs sites, formant une mono-couche à la surface de la protéine moins hydrophile que la protéine elle-même.
- Lorsque la protéine se trouve en forte concentration, les polyphénols se complexent sur les sites des protéines, mais elles forment aussi des liaisons inter-moléculaires. De cette manière, l'hydrophobicité du complexe augmente et le fait précipiter.

Si les polyphénols sont capables de se complexer avec les protéines, il est possible qu'ils puissent bloquer les sites actifs des enzymes, inhibant ainsi leur activité.

Selon *E. Haslam* [24], toutes les enzymes sont inhibées par les polyphénols in vitro.

VII.4 ANALYSE DES TANINS INHIBITEURS DE LA STILBENE OXYDASE

Les résultats exposés au chapitre III montrent que la réaction avec la tannase n'a pas libéré de pterostilbène, éliminant peut-être l'hypothèse d'une liaison ester avec la position C-3 d'une unité flavan-3-ol. Cette étude devait montrer que les hydroxyles des unités flavaniques n'étaient pas oxydés dans le but de « stocker » des molécules actives par liaison ester.

Il faut ajouter qu'il est possible que la tannase soit aussi inhibée par les tanins de poids moléculaire élevé, faussant les résultats. De ce fait, il est très difficile de savoir si certaines molécules sont complexées ou fixées par les fonctions phénoliques des tanins.

L'analyse des fractions oligomériques concorde avec les résultats récents du *Dr. R. Pezet*. Les variétés sensibles, comme le Gamay, possèdent du pterostilbène en trace, ce qui n'est pas le cas des variétés résistantes, comme le Gamaret. Il est alors possible que le pterostilbène ne soit pas une phytoalexine à proprement parlé, car son rôle dans les défenses de la plante contre le champignon est peut-être secondaire.

Grâce aux analyse LC/ESI/MS (LCQ, Thermofinnigan) des fractions oligomériques, nous avons observé peu de différences entre les variétés de Gamay et de Gamaret. Les fractions de Gamay sont simplement plus complexes (cf. chapitre IV). Cette méthode permet la caractérisation partielle des fractions oligomériques tanniques. Dans notre cas, elle a été appliquée à l'analyse du raisin (peau, pulpe, grains). L'étude séparée de la peau et des grains de raisin par LC/MS, en utilisant la méthode décrite au chapitre IV, permettrait de simplifier l'analyse.

Le spectre ESI/MS (LCQ, Thermofinnigan) de la fraction polymérique de Gamaret ne montrent strictement aucune différence avec celui de Gamay (le spectre ESI/MS de Gamay n'a pas été exposé dans ce travail, car il est identique à celui de Gamaret). Ces analyses ont aussi été réalisées en fonction de la maturité de la grappe, mais les spectres ESI/MS sont absolument comparables.

Nous avons par contre pu observer des différences entre les DPm des fractions polymériques en fonction de la maturité de la grappe. Gamay a un DPm qui varie de août à septembre, par contre celui de Gamaret reste stable durant toute la période estivale entre 9 et 10.

Les tests biologiques sur les fractions DPm montrent que plus le DPm est élevé, plus l'inhibition de l'enzyme est efficace. A la véraison, *Botrytis cinerea* se développe et provoque le pourrissement de la grappe. A cette période, le DPm mesuré est de 6.3 pour Gamay et de 9.3 pour Gamaret. Il est alors possible que l'inhibition de la stilbène oxydase, des peroxydases ainsi que d'autres enzymes hydrolytiques de *Botrytis cinerea* soit moins efficace, permettant ainsi le développement du champignon. Les tests des fractions oligomériques et DPm montrent que les tanins de Gamaret sont plus inhibiteurs que ceux de Gamay. Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus en fonction de la date de cueillette, mais cela peut provenir de la variation de la composition en tanins de la grappe par rapport aux années de récolte. Il est aussi possible que la structure des proanthocyanidines change en fonction de certains facteurs externes, comme l'humidité, le taux de sucres, la température ambiante, induisant une variation de l'inhibition enzymatique.

La toxicité des hydroxystilbènes envers *Botrytis cinerea* varie énormément en fonction de leur structure. Le resvératrol est beaucoup moins toxique que le pterostilbène (cf. chapitre VII.3.3), mais ses dimères correspondants (le *trans*-déhydrodimère et l' ϵ -viniférine) montrent une toxicité plus élevée envers *Botrytis cinerea*. Le dimère du pterostilbène est quant à lui inactif. Il faut ajouter que lors de l'attaque de *Botrytis cinerea*, le pterostilbène disparaît en faveur du resvératrol. Dans ce cas, le pterostilbène ne semble pas jouer un rôle déterminant pour la résistance de la vigne envers *Botrytis cinerea*.

VII.5 ANALYSE DES TANINS PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

L'analyse des tanins par spectrométrie de masse s'est avérée être un challenge. Il est très difficile, avec les instruments actuels, de pousser la limite de détection au-delà de 4000 uma. Les meilleurs résultats ont été obtenus par la technique MALDI, en mode positif. Les analyses par infusion, avec une source ESI ne permettent pas de dépasser 3000 uma.

D'une manière générale, plus le poids moléculaire augmente, plus la limite de détection diminue. De plus, les tanins galloylés s'ionisent moins bien que les non-galloylés. Les raisons supposées ont été exposées au chapitre IV.

Mais il reste la question : Est-ce un problème de détection, de fragmentation durant le transfert des ions de la source au détecteur (ou analyseur) ou est-ce un pur problème d'ionisation ?

A cette question, il ne nous a pas été possible de répondre. Le mécanisme d'ionisation par électrospray des composés est bien décrit dans la littérature (cf chapitre I.5), mais il n'est, par exemple, pas expliqué comment la charge se dépose sur l'analyte pour former l'ion [96]. L'ionisation MALDI est au contraire très floue. Plusieurs théories ont été étudiées, mais aucune ne semble répondre à toutes les questions. Quant au détecteur, il est connu que la détection des hautes masses est difficile.

CHAPITRE VIII

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

VIII CONCLUSION ET PERSPECTIVES

VIII.1 CONCLUSION

Les méthodes d'extraction et de fractionnement nous ont permis de séparer les tanins oligomériques des tanins polymériques. Les fractions oligomériques ont été obtenues par fractionnement sur gel HW-40S (Tosohaas, Japon). La fraction polymérique a été fractionnée sur une résine spéciale, la rélite SP411 (Résindion, Italie), dans le but d'obtenir un gradient DPm croissant. Toutes ces techniques nous ont permis de cibler les tests biologiques afin de mieux comprendre l'inhibition de la stilbène oxydase par les tanins.

Grâce à l'*Ion Trap* du LCQ de Thermofinnigan, nous avons montré que les mécanismes de fragmentation des tanins oligomériques sont toujours semblables. L'analyse par LC/MS nous a permis de caractériser partiellement chaque fraction.

L'étude par spectrométrie de masse des fractions polymériques et DPm s'est avéré être compliquée. Les tanins ne sont pas détectés au-delà de 3000 uma pour l'ESI/QIT/MS (LCQ, Thermofinnigan) et ESI/FT-ICR/MS (BioApex II, Bruker) et de 4000 uma pour le MALDI-TOF (Dynamo, Thermo Bioanalysis). Il n'a pas été possible de dépasser cette limite malgré la haute sensibilité de ces appareils.

La caractérisation du resvératrol *trans*-déhydrodimère, synthétisé via la stilbène oxydase, a permis de montrer que cette molécule provenait bien de l'oxydation du resvératrol. Quant à l' ϵ -viniférine, elle a été extraite directement de sarment de vigne. Un schéma de biosynthèse a été proposé par *M. A. Pedreno* mettant en cause des peroxydases [69].

Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'enzyme est inhibée par les tanins polymériques, avec un phénomène accru pour les tanins à poids moléculaires élevé. Les résultats concordent avec les récents travaux du Dr. *R. Pezet*, qui montraient que la stilbène oxydase était inhibée par les tanins. Mais ceux-ci ne permettent pas d'expliquer les différences de sensibilité de certains cépages face à l'attaque par *Botrytis cinerea*.

Ce travail permet de mieux comprendre les mécanismes de défense de la plante et du champignon *Botrytis cinerea*, mais il n'apporte ni la réponse à la raison de la latence du champignon, ni une solution définitive au problème de résistance des différents cépages. Par contre de nouvelles méthodes d'extraction et de séparation ont été développées pour la caractérisation des tanins oligomériques et polymériques.

VIII.2 PERSPECTIVES

Les tests d'inhibition effectués sur des échantillons prélevés en 1995 et 1999 se contredisent. Il est alors possible que la concentration et la composition tannique diffèrent d'une année à l'autre et d'une variété à l'autre. Il serait donc intéressant de répéter les tests en fonction de la date de cueillette sur plusieurs années et de les comparer.

Les tanins ont le pouvoir d'inhiber un grand nombre d'enzymes. Nous pourrions tester d'autres enzymes produits par *Botrytis cinerea* autres que la stilbène oxydase, comme par exemple, les pectinases, les cellulases et les cutinases.

Le mécanisme d'inhibition de l'enzyme par les tanins est peu connu, une modélisation par ordinateur permettrait de mieux comprendre comment et quels sites actifs sont bloqués.

L'utilisation répétée de fongicides peut induire une résistance de *Botrytis cinerea*. Le développement de fongicides sélectifs et peu polluants ne peut être réalisé que par une étude plus approfondie des mécanismes d'infection.

De la même façon, il serait intéressant d'étudier la résistance de certains cépages face à l'attaque par *Botrytis cinerea* et ainsi de développer des variétés moins sensibles.

Comme nous l'avons présenté dans ce travail, les tanins à haut poids moléculaire sont difficilement détectables (ionisable) avec les instruments actuels.

Les nouvelles techniques en spectrométrie de masse, comme le cryodétecteur, apporteraient une solution au problème de détection des tanins. Il serait aussi judicieux d'essayer d'ioniser ces composés par MALDI-TOF/MS en utilisant d'autres lasers, comme par exemple le laser infrarouge. Cela permettrait de fournir une énergie de désorption différente.

CHAPITRE IX

BIBLIOGRAPHIE

IX BIBLIOGRAPHIE

- [1] P. Huglin and C. Schneider, *Biologie et écologie de la vigne*, Technique et Documentation, Paris (1998).
- [2] Singleton, V. L., Timberlake, C. F., and Lea, A. G. H. The phenolic cinnamates of white grapes and wine. *Journal of Sciences and Food Agriculture* **29**, 1978. 403-10.
- [3] Goetz, G, Fkyerat, A., Métais, N., Kunz, M., Tabacchi, R., Pezet, R., and Pont, V. Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochemistry* **52**, 1999. 759-67.
- [4] Waterhouse, A. L. and Lamuela-Raventos, R. M. The occurrence of piceid, a stilbene glycoside in grape berries. *Phytochemistry* **37**(2), 1994. 571-3.
- [5] Langcake, P. Disease resistance of *Vitis* spp.v and the production of stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* **9**, 1981. 77-86.
- [6] Bokel, M., Diyasena, C. M. N., Gunatilaka, A. A. L., Kraus, W., and Sotheeswaran, S. Canaliculatol, an antifungal resveratrol trimer from *Stemonoporous canaliculatus*. *Phytochemistry* **27**(2), 1988. 377-80.
- [7] Kawabata, J., Ichikawa, S., Kurihara, H., and Mizutani, J. Kobophenol A, a unique tetrastilbene from *Carex Kobomugi ohwi* (Cyperaceae). *Tetrahedron Letters* **30**(29), 1989. 3785-8.
- [8] Ohyama, M., Tanaka, T., Iinuma, M., and Goto, K. Two novel resveratrol trimers, Leachianols A and B, from *Sophora leachiana*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **42**(10), 1994. 2117-20.
- [9] Ohyama, M., Tanaka, T., and Iinuma, M. A novel stilbene tetramer, Leachianol C, isolated from *Sophora leachiana*. *Tetrahedron Letters* **35**(42), 1994. 7817-20.
- [10] Ohyama, M., Ichise, M., Tanaka, T., Iinuma, M., and Burandt, J. Davidiol D, first occurring resveratrol pentamer isolated from *Sophora davidii*. *Tetrahedron Letters* **37**(29), 1996. 5155-8.

Bibliographie

- [11] Sarker, S. D., Whiting, P., and Dinan, L. Identification and ecdysteroid antagonist activity of three resveratrol trimers (suffruticosols A, B and C) from *Paeonia suffruticosa*. *Tetrahedron* **55**, 1999. 513-24.
- [12] Sultanbawa, M. U. S., Surendrakumar, S., and Wazeer, M. I. M. Novel resveratrol tetramer, Vaticaffinol, from *Vatica affinis* Thw. (Dipterocarpaceae). *Journal of the American Society Chemical Communications*, 1981. 1204-6.
- [13] Tanaka, T., Ohyama, M., Morimoto, K., Asai, F., and Iinuma, M. A resveratrol dimer from *Parthenocissus tricuspidata*. *Phytochemistry* **48**(7), 1998. 1241-3.
- [14] Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., and Kinsella, J. E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet* **341**, 1993. 1103-4.
- [15] Jang, M., Cai, L., and Udeani, G. O. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* **275**, 1997. 218-20.
- [16] Bourzeix, M., Weiland, D., and Heredia, N. A study of catechins and procyanidins of grape clusters, the wine and other by-product of the wine. *Bulletin de l'O.I.V* **669-670**, 1986. 1173-254.
- [17] Remy, S. Les tannins du vin rouge: caractérisation de structures natives et dérivées. 1999. Thèse de l'INRA (Montpellier).
- [18] Bohm, H., Boeing, H., and Hempel, J. Flavonols, flavones and anthocyanins as natural antioxidants in food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* **37**(2), 1998. 147-63.
- [19] Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H., and Van de Putte, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wine and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**, 1993. 1242-6.
- [20] Vinson, J. A., Dabbagh, Y. A., and Serry, M. M. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using *in vitro* oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 1995. 2800-2.
- [21] Lacaille-Dubois, M.-A. and Wagner, H. Importance pharmacologique des dérivés phénoliques. *Acta Botanica Gallica* **143**(6), 1996. 555-62.

Bibliographie

- [22] P. Ribereau-Gayon, Les composés phénoliques des végétaux, (1968).
- [23] Baldi, a., Romani, A., and Mulinacci, N. HPLC/MS application to anthocyanidins of *Vitis vinifera*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **43**, 1995. 2104-9.
- [24] E. Haslam, Practical Polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action, Cambridge University Press, Cambridge (1998).
- [25] Haslam, E. *In Vino veritas*: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* **19**, 1980. 2577-82.
- [26] Escribo-Bailon, M. T., Gutierrez-Fernandez, Y., Rivas-Gonzalo, J. C., and Santos-Buelga, C. Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**, 1992. 1794-9.
- [27] Ricardo-da-Silva, J. M., Belchior, A. P., Spranger, M. I., and Bourzeix, M. Oligomeric procyanidins of three grapevine varieties and wines from Portugal. *sciences des Aliments* **12**, 1992. 223-37.
- [28] Souquet, J. M., Cheynier, V., Brossaud, F., and Moutounet, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* **43**(2), 1996. 509-12.
- [29] R. W. Hemingway, Structural variations in proanthocyanidins and their derivatives, in "Plant polyphenols : synthesis, properties, significance" (R. W. Hemingway and P. E. Laks, Eds.), New-York (1992).
- [30] Su, C. T. and Singleton, V. L. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry* **8**, 2001. 153-1558.
- [31] Weinges, K. and Piretti, M. Isolation of procyanidins B1 from grapes. *Justus Liebig's Annalen der Chemie* **748**, 1971. 218-20.
- [32] Boukharta, M., Girardin, M., and Metche, M. Procyandines galloylées du sarment de la vigne (*Vitis vinifera*): séparation et identification par chromatographie liquide à haute performance et chromatographie en phase gazeuse. *Journal of Chromatography* **455**, 1988. 406-9.
- [33] Bate-Smith, E. C. Astringency in foods. *Food Processing* **23**, 1954. 124-35.

Bibliographie

- [34] Porter, L. J., Hirtstich, L. N., and Chang, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidins and delphinidins. *Phytochemistry* **25**(1), 1986. 223-30.
- [35] Hemingway, R. W. and McGraw, G. W. Kinetics of acid-catalysed cleavage of procyanidins. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **3**(4), 1983. 421-35.
- [36] Czochanska, Z., Yeap Foo, L., and Porter, L. J. Composition changes un lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry* **18**, 1979. 1819-22.
- [37] Escribo-Bailon, M. T., Guerra, M. T., Rivas-Gonzalo, J. C., and Santos-Buelga, C. Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **200**, 1995. 221-4.
- [38] Ricardo-da-Silva, J. M., Rigaud, J., Cheynier, V., Cheminat, A., and Moutounet, M. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry* **30**(4), 1991. 1259-64.
- [39] Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., and Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* **36**(3), 1994. 781-4.
- [40] Ricardo-da-Silva, J. M., Darmon, N., and Fernandez, Y. Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **39**(9), 1991. 1549-52.
- [41] Benzie, I. F. F and Szeto, Y. T. Total antioxidant capacity of teas by the Ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1999. 633-6.
- [42] Plumb, G. W., De Pascual-Teresa, S., and Santos-Buelga, C. Antioxidant properties of catechins and procyanidins: effect of polymerization gallylation and glycosylation. *Free Radical Research* **29**, 1998. 351-8.
- [43] Teissedre, T. L., Frankel, E. N., and Waterhouse, A. L. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidant from grapes and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **70**, 1996. 55-61.

Bibliographie

- [44] E. Müller and W. Loeffler, *Mycology*, Academic press, New-York (1982).
- [45] Poliart, C. Isolement et caractérisation de métabolites secondaires issus de champignons impliqués dans la maladie de l'esca. 2000. Thèse de la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel.
- [46] Dubin, G.-M., Fkyerat, A., and Tabacchi, R. Acetylenic aromatic compounds from *Stereum hirsutum*. *Phytochemistry* **53**, 2000. 571-4.
- [47] Bolay, A. and Pezet, R. Problèmes actuels de la lutte contre les maladies de la vigne. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* **19**(1), 1987. 21-4.
- [48] Gindro, K. Etudes de la sporulation de *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.:purification, caractérisation et rôle d'une cutinase constitutive des conidies non germées. 2000. Thèse de la Faculté des Sciences de l'Université de Lausanne.
- [49] P. A. Micheli, *Nova Plantarum Genera : juxta Turnefortii methodum disposita*, Firenze (2001).
- [50] J. R. Coley-smith, K. Verhoeff and W. R. Jarvis, *The Biology of Botrytis*, Academic Press, London (1980).
- [51] W. R. Jarvis, *Botrytinia and Botrytis species: taxonomy physiology and pathogenicity*, Agricultura Canada, (1977).
- [52] Bessis, R. Etude en microscopie électronique à balayage des rapports entre l'hôte et le parasite dans le cas de la pourriture grise. *Centre de Recherches Académiques des Sciences de Paris* **274**, 1972. 2991-4.
- [53] Hill, G., Stellwaag-Kittler, F., Huth, G., and Schloesser, E. Resistance of grapes in different developmental stages to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **102**, 1981. 328-38.
- [54] McClellan, W. D. and Hewitt, W. B. Early Botrytis rot of grapes:time of infection and latency of *Botrytis cinerea* Pers. in *Vitis vinifera* L. *Phytopathology* **63**(9), 1973. 1151-7.

Bibliographie

- [55] Pezet, R. and Pont, V. Infection florale et latence de *Botrytis cinerea* dans les grappes de *Vitis vinifera* (var. Gamay). *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* **18**(5), 1986. 317-22.
- [56] Nyerges, E. Vermehrung des *Botrytis cinerea* hemmenden sowie stimulierenden Substanzen im Rebholz. *Wein-Wissenschaft* **26**, 1971. 349-59.
- [57] Langcake, P. and Pryce, R.-J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiological Plant Pathology* **9**, 1976. 77-86.
- [58] Langcake, P. and McCarthy, W. V. The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis* **18**, 1979. 244-53.
- [59] Blaich, R., Bachmann, O., and Stein, U. Causes biochimiques de la résistance de la vigne à *Botrytis cinerea*. *Bulletin de l'OEPP* **12**(2), 1982. 167-70.
- [60] Langcake, P. and Pryce, R.-J. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* **33**, 1977. 151-2.
- [61] Langcake, P. and Pryce, R.-J. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry* **16**, 1977. 1193-6.
- [62] Pryce, R.-J. and Langcake, P. α -viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry* **16**, 1977. 1452-4.
- [63] Li, W.-W., Ding, L.-S., Li, B.-G., and Chen, Y-Z. Oligostilbenes from *Vitis heyneana*. *Phytochemistry* **42**(4), 1996. 1163-5.
- [64] Breuil, A. C., Adrian, M., Pirio, N., Meunier, P., Bessis, R., and Jeandet, P. Metabolism stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea*: Characterisation of a resveratrol dehydrodimer. *Tetrahedron Letters* **39**, 1998. 537-40.
- [65] Breuil, A. C., Jeandet, P., Adrian, M., Chopin, F., Pirio, N., Meunier, P., and Bessis, R. Characterization of pterostilbene dehydrodimers produced by a laccase of *Botrytis cinerea*. *Biochemistry and Cell Biology* **89**(4), 1999. 298-302.

Bibliographie

- [66] Bais, A. J., Murphy, P. J., and Dry, I. B. The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Australian Journal of Plant Physiology* **27**, 2000. 425-33.
- [67] Bavaresco, L., Petegolli, D., Cantu, E., Fregoni, M., Chiusa, G., and Trevisan, M. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis* **2**, 1997. 77-83.
- [68] Pont, V. and Pezet, R. Relation between the chemical structure and the biological activity of hydroxystilbenes against *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* **130**, 1990. 1-8.
- [69] M. A. Pedreno, M. Morales, A. A. Calderon, J. M. Zapataz and A. Ros Barcelos, A *trans*-resveratrol oxidizing basic peroxidase isoenzyme from *Vitis vinifera*, in "Plant peroxidases: Biochemistry and Physiology" (C. Obinger, U. Burner, R. Ebermann, C. Penel and H. Greppin, Eds.), Genève (1996).
- [70] Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., and Meunier, P. Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis cinerea* under natural conditions. *Journal of Phytopathology* **143**, 1995. 135-9.
- [71] Douillet-Breuil, A.-C., Jeandet, P., Adrian, M., and Bessis, R. Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* Spp. in response to ultraviolet C elicitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1999. 4456-61.
- [72] Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L. A., and Bessis, R. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevine, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mould. *Journal of Chemical Ecology* **23** (7), 1997. 1689-702.
- [73] Calderon, A. A., Garcia-Florenciano, E., and Pedreno, M. A. The vacuolar localization of grapevine peroxidase isoenzymes capable of oxidising 4-hydroxystilbenes. *Zeitschrift für Naturforschung* **47c**, 1992. 215-21.
- [74] Pezet, R., Pont, V., and Hoang-Van, K. Evidence for oxidative detoxication of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39**, 1991. 441-50.

Bibliographie

- [75] Cichewicz, R. H., Kouzi, S. A., and Hamann, M. T. Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *Journal of Natural Products* **63**, 2000. 29-33.
- [76] Sbaghi, M., Jeandet, P., Bessis, R., and Leroux, P. Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. *Plant Pathology* **45**, 1996. 139-44.
- [77] Langcake, P. and Pryce, R.-J. Oxidative dimerisation of 4-hydroxystilbenes *in vitro*: Production of a grapevine phytoalexin mimic. *Journal of the American Society Chemical Communications* **7**, 1977. 208-10.
- [78] Pezet, R., Pont, V., and Hoang-Van, K. Enzymatic detoxication of stilbenes by *Botrytis cinerea* and inhibition by grape berries proanthocyanidins. Verhoeff, K., Malathrakis, N. E., and Williamson, B. 1992. 87-92. Heraklion. Recent advances in Botrytis research : proceedings of the 10th International Botrytis Symposium.
- [79] Pezet, R. and Pont, V. Ultrastructural observations of pterostilbene fungotoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* **129**, 1990. 19-30.
- [80] Pezet, R. Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. *FEMS Microbiology Letters* **167**, 1998. 203-8.
- [81] W. M. A. Niessen and J. Van de Greef, Liquid Chromatography Mass Spectrometry. Principles and Applications, Marcel Dekker Inc., New-York (1992).
- [82] Scott, R. W. B., Scoot, C. G., Munroe, M., and Hess, J. Interface for on-line liquid chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography* **99**, 1974. 395-405.
- [83] Willoughby, R. C. and Browner, N. F. Monodisperse aerosol generation interface for combining liquid chromatography with mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **56**, 1984. 2625-31.
- [84] Ito, Y., Takeuchi, T, Ishii, D., and Goto, M. Direct coupling of micro high-performance liquid chromatography with fast atom bombardment mass spectrometry. *Journal of Chromatography* **346**, 1985. 161-6.

Bibliographie

- [85] Caprioli, R. M., Tan, F., and Cotrell, J. S. Continuous-flow sample probe for fast atom bombardment mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **58**, 1986. 2949-54.
- [86] Blakley, C. R., Mcadams, M. J., and Vestal, M. L. Crossed-Beam Liquid Chromatographe-Mass Spectrometer. *Journal of Chromatography* **158**, 1978. 261.
- [87] Blakley, C. R., Carmody, J. J., and Vestal, M. L. *Clinical Chemistry* **326**, 1980. 1467.
- [88] Zeleny, J. *Physical Review* **10**, 1917. 1.
- [89] Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., and Fenn, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Analytical Chemistry* **57**, 1985. 675-9.
- [90] De la Mora, J. F. and Locertales, I. G. The effect of charge emission from electrified liquid cones. *J.Fluid Mech.* **243**, 1994. 561.
- [91] Kebarle, P. and Tang, L. From ions in solution to ions in the gas phase. *Analytical Chemistry* **65**(22), 1993. 9.
- [92] Kebarle, P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 2000. 804-17.
- [93] Griessmann, U. and Röllgen, F. W. Electrodynamic effects in field desorption mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physic* **38**, 1981. 267.
- [94] Gomez, A. and Tang, K. Charge and fission droplets in electrostatic sprays. *Phys.Fluids* **6**, 1994. 404.
- [95] Zhou, S. and Cook, K. D. Protonation in electrospray mass spectrometry: Wrong-way-Round or right-way-round? *Journal of the American Society of Mass Spectrometry* **11**, 2000. 961-6.
- [96] Cole, R. B. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 2000. 763-72.

Bibliographie

- [97] Blades, A. T., Ikonomou, M. G., and Kebarle, P. Mechanisms of electrospray mass spectrometry. Electrospray as an electrolysis cell. *Analytical Chemistry* **63**, 1991. 2109.
- [98] Ikonomou, M. G., Naghipur, A., Lown, J. W., and Kebarle, P. Characterization of the reaction products of Deoxyguanosine with the anticancer agent BFNU and BFNU-1,1,1',1'-d4 in different buffers by high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* **19**, 1990. 434-46.
- [99] Sunner, J., Nicol, G., and Kebarle, P. Factors determining relative sensitivity of analytes in positive mode atmospheric pressure ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **60**, 1988. 1300.
- [100] Zenobi, R. and Knochenmuss, R. Ion formation in Maldi mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **17**, 1998. 337-66.
- [101] Busch, K. L. Desorption ionization mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **30**, 1995. 233-40.
- [102] Dale, M. J., Knochenmuss, R., and Zenobi, R. Graphite/liquid mixed matrices for laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* **68**(19), 1996. 3321-9.
- [103] Dale, M. J., Knochenmuss, R., and Zenobi, R. Two-phases matrix-assisted laser desorption/ionization : matrix selection and sample pretreatment for complex anionic analytes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **11**, 1997. 136-42.
- [104] Han, M. and Sunner, J. An activated carbon substrate surface for laser desorption mass spectrometry. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry* **11**, 2000. 644-9.
- [105] Dubois, F. Ion Formation and detection in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. 1999. Swiss Federal Institute of Technology, Zürich.

Bibliographie

- [106] March, R. E. An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 2000. 351-69.
- [107] Guilhaus, M. Principles and instrumentation in Time-of-Flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **30**, 1995. 1519-32.
- [108] Guilhaus, M., Mlynsky, V., and Selby, D. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **11**, 1997. 951.
- [109] Chernushevich, I. V., Loboda, A. V., and Thomson, B. A. An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **36**, 2001. 849-65.
- [110] B. Asamoto, FT-ICR/MS: Analytical applications of Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, VCH Publisher, Inc., New York (1991).
- [111] Amster, I. J. Fourier Transform mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **31**, 1996. 1325-37.
- [112] Krueger, C. G., Dopke, N. C., Treichel, P. M., Folts, J., and Reed, J. D. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of polygalloyl polyflavan-3-ols in grape seed extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**, 2000. 1663-7.
- [113] Pezet, R. and Pont, V. Mise en evidence de pterostilbene dans les grappes de *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry* **26**(5), 1988. 603-7.
- [114] J. Karchesy, Y. Bae, L. Chalker-Scott, R. F. Helm and L. Yeap Foo, Chromatography of proanthocyanidins, in "Plant polyphenols : synthesis, properties, significance" (R. W. Hemingway and P. E. Laks, Eds.), New-York (1992).
- [115] Hammerstone, J.-F., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., Rucker, R., and Schmitz, H. H. Identification of proanthocyanidins in Cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1999. 490-6.

Bibliographie

- [116] Cheynier, V., Souquet, J. M., Le Roux, E., Guyot, S., and Rigaud, J. Size separation of condensed tannins. *Methods in Enzymology* **299**, 1999. 178-83.
- [117] Adamson, G. E., Lazarus, S. A., Mitchell, A. E., and Prior, R. L. HPLC method for the quantification of procyanidins in Cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1999. 4184-8.
- [118] De Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J. C., and Santos-Buelga, C. Prodelphinidins and related flavonols in wine. *International Journal of Food Science and Technology* **35**, 2000. 33-40.
- [119] Ding, M., Yang, H., and Xiao, S. Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reverse-phase column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **849**, 1999. 637-40.
- [120] Friedrich, W., Eberhardt, A., and Galensa, R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. *European Food Research and Technology* **211**(1), 2000. 56-64.
- [121] Guillen, D. A., Barroso, C. G., and Perez-Bustamante, J. A. Selection of column and gradient for the separation of polyphenols in sherry wine by HPLC incorporating internal standards. *Journal of Chromatography A* **724**, 1996. 117-24.
- [122] Lea, A. G. H. Reversed-phase HPLC of procyanidins and other phenolics in fresh and oxidising apple juices using a pH shift technique. *Journal of Chromatography* **238**, 1982. 253-7.
- [123] Oszmianski, J. and Lee, C. Y. Isolation and HPLC determination of phenolic compounds in red grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* **41**(3), 1990. 204-6.
- [124] Palomino, O., Gomez-Serranillos, M. P., Slowing, K., Carretero, E., and Villar, A. Study of polyphenols in grape berries by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **870**, 2000. 449-51.

Bibliographie

- [125] Ricardo-da-Silva, J. M. Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high performance reverse phase liquid chromatography. *Journal of Sciences and Food Agriculture* **53**, 1990. 85-92.
- [126] Rigaud, J., Escribo-Bailon, M. T., Prieur, C., Souquet, J. M., and Cheynier, V. Normal phase high performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cocoa beans and grape seeds. *Journal of Chromatography A* **654**, 1993. 255-60.
- [127] Sanoner, P., Guyot, S., Marnet, N., Molle, D., and Drilleau, J.-F. Polyphenol profiles of french cider apple varieties (*Malus domestica* sp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1999. 4847-53.
- [128] Suarez, B., Picinelli, A., and Mangas, J. J. Solid phase extraction and hplc determination of polyphenols in apple musts and ciders. *Journal of Chromatography A* **727**, 1996. 203-9.
- [129] Tanaka, T., Fujisaki, H., Nonaka, G.-I, and Nishioka, I. Tannins and related compounds CXVII. Structures, preparation. High Performance Liquid Chromatography and some reactions of dehydroellagitannin-acetone condensates. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **40**(1), 1992. 2937-44.
- [130] Nonaka, G.-I, Morimoto, S., and Nishioka, I. Tannins and related compounds. Part 13. Isolation and structures of trimeric, tetrameric and pentameric proanthocyanidins from cinnamon. *Journal of the Chemical Society Perkin Trans I* , 1983. 2139-45.
- [131] Cheynier, V., Doco, T., Fulcrand, H., Guyot, S., Le Roux, E., Souquet, J. M., Rigaud, J., and Moutounet, M. ESI-MS analysis of polyphenolic oligomers and polymers. *Analisis Magazine* **25**(8), 1997. 32-7.
- [132] De Freitas, V. A. P., Glories, Y., Bourgeois, G., and Vitry, C. Characterization of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry. *Phytochemistry* **49**(5), 1998. 1435-41.
- [133] J. Karchesy, Analytical methods : an overview, in "Plant polyphenols : synthesis, properties, significance" (R. W. Hemingway and P. E. Laks, Eds.), New-York (1992).

Bibliographie

- [134] Rigaud, J., Perez-Ilzbarbe, J., Ricardo-da-Silva, J. M., and Cheynier, V. Micro method for the identification of proanthocyanidin using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **540**, 1991. 401-5.
- [135] Matthews, S., Mila, I., Scalbert, A., Pollet, B., Lapierre, C., Hervé du Penhoat, C. L. M., Rolando, C., and Donnelly, D. M. X. Method of estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**, 1997. 1195-201.
- [136] Cadahia, E., Conde, E., Garcia-Vallejo, M. C., and Fernandez de Simon, B. Gel permeation chromatographic study of the molecular weight distribution of tannins in the wood, bark and leaves of *Eucalyptus* spp. *Chromatographia* **42**(1/2), 1996. 95-100.
- [137] Berthod, A., Billardello, B., and Goeffroy, S. Polyphenols in counter-current chromatography. An exemple of large scale separation. *Analisis Magazine* **27**, 1999. 750-7.
- [138] Putman, L. J. and Butler, L. G. Fractionation of condensed tannins by counter-current chromatography. *Journal of Chromatography* **318**, 1985. 85-93.
- [139] Oh, H. and Hoff, J. E. Fractionation of grape tannins by affinity chromatography and partial characterization of the fractions. *Journal of Food Sciences* **44**(1), 1979. 87-9.
- [140] Sun, B., Leandro, C., Ricardo-da-Silva, J. M., and Spranger, M. I. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46**, 1998. 1390-6.
- [141] Derdelinckx, G. and Jerumanis, J. Separation of malt hop proanthocyanidins on Fractogel TSK HW-40(S). *Journal of Chromatography* **285**, 1984. 231-44.
- [142] Yanagida, A., Kanda, T., Shoji, T, Ohnishi-Kameyama, M., and Nagata, T. Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A* **855**, 1999. 181-90.

Bibliographie

- [143] Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J. M., and Moutounet, M. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(7), 1999. 2719-23.
- [144] P. E. Laks, Chemistry of condensed tannins B-ring, in "Plant polyphenols : synthesis, properties, significance" (R. W. Hemingway and P. E. Laks, Eds.), New-York (1992).
- [145] Bhat, T. K., Singh, B., and Sharma, O. P. Microbial degradation of tannins - A current perspective. *Biodegradation* **9**, 1998. 343-57.
- [146] Deschamps, A. M., Otuk, G., and Lebeault, J.-M. Production of tannase and degradation of Chestnut tannin by bacteria. *Journal of Fermentation Technology* **61**(1), 1983. 55-9.
- [147] Du, Q., Li, M., Cheng, Q., Zang, T. Y., and Ito, Y. Purification of (-)-epigallocatechin from enzymatic hydrolysate of its gallate using high-speed counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **687**, 1994. 174-7.
- [148] Bradoo, S., Gupta, R., and Saxena, R. K. Parametric optimization and biochemical regulation of extracellular tannase from *Aspergillus japonicus*. *Process Biochemistry* **32**(2), 1997. 135-9.
- [149] H. Fulcrand, S. Guyot, S. Remy, J. M. Souquet, T. Doco and V. Cheynier, Electrospray contribution to structural analysis of condensed tannins oligomers and polymers, in "Plant polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology" (G. G. Gross, Ed.), Dordrecht Kluwer Academic Publisher, (1999).
- [150] Miletova, P., Schram, K. H., Withney, J., Li, M., Huang, R., Kerns, E., Valcic, S., Timmermann, B. N., Rourick, R., and Klotz, S. Tandem mass spectrometry studies on green tea catechins. Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 2000. 860-9.
- [151] Fulcrand, H., Remy, S., Souquet, J. M., Cheynier, V., and Moutounet, M. Study of wine tannin oligomers by one-line liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1999. 1023-8.

Bibliographie

- [152] Lazarus, S. A., Adamson, G. E., Hammerstone, J.-F., and Schmitz, H. H. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in food and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1999. 3693-701.
- [153] Lecchi, P. and Abramson, F. P. Analysis of biopolymers by size-exclusion chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **828**, 1998. 509-13.
- [154] Nawwar, M. A. M, Marzouk, M. S., Nigge, W., and Linscheid, M. High-performance liquid chromatographic/Electrospray ionization mass spectrometric screening for polyphenolic compounds of *Epilobium hirsutum*-The structure of the unique ellagitannin Epilobamide -A. *Journal of Mass Spectrometry* **32**, 1997. 645-54.
- [155] Rohr, G. E., Riggio, G., Meier, B., and Sticher, O. Evaluation of different detection modes for the analysis of procyanidins in leaves and flowers of *Crataegus* spp. Part II. Liquid chromatography-mass spectrometry. *Phytochemical Analysis* **11**(2), 2000. 113-20.
- [156] Ross, A. R. S., Ikonomou, M. G., and Orians, K. J. Characterization of dissolved tannins and their metal-ion complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **411**, 2000. 91-102.
- [157] Salminen, J.-P., Ossipov, V., Lojonen, J., Haukioja, E., and Pihlaja, K. Characterization of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **864**, 1999. 283-91.
- [158] Wolfender, J.-L., Rodriguez, S., and Hostettmann, K. Comparison of liquid chromatography/electrospray, atmospheric pressure chemical ionization, thermospray and continuous flow fab atom bombardment mass spectrometry for the determination of secondary metabolites in crude plant extracts. *Journal of mass spectrometry and rapid communications in mass spectrometry* , 1995.
- [159] Guyot, S., Doco, T., Souquet, J. M., Moutounet, M., and Drilleau, J.-F. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. *Kermerrien*) skin and pulp. *Phytochemistry* **44**(2), 1997. 351-7.

Bibliographie

- [160] Ohnishi-Kameyama, M., Yanagida, A., Kanda, T., and Nagata, T. Identification of catechin oligomers from apple (*Malus pulima* cv. Fuji) in Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry and Fast-Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **11**, 1997. 31-6.
- [161] Vivas, N., Bourgeois, G., Vitry, C., Glories, Y., and De Freitas, V. A. P. Determination of the composition of the commercial tannin extracts by Liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **72**, 1996. 309-17.
- [162] Twerenbold, D., Vuilleumier, J.-L., Van den Brandt, B., and Gillevet, P. Detection of single macromolecules using a cryogenic particle detector coupled to a biopolymer mass spectrometer. *Applied Physical Letters* **68**(24), 1996. 3503-5.
- [163] Twerenbold, D., Gerber, D., Gritti, D., Gonin, Y., Netuschill, A., Rossel, F., Schenker, D., and Vuilleumier, J.-L. Single molecule detector for mass spectrometry with mass independent detection efficiency. *Proteomics* **1**, 2001. 66-9.
- [164] Knochenmuss, R., Stortelder, A., Breuker, K., and Zenobi, R. Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted desorption/ionization. *Journal of Mass Spectrometry* **35**, 2000. 1237-45.
- [165] Lin, M., Li, J.-B., Li, S.-Z., Yu, D. Q., and Liang, X. T. A dimeric stilbene from *Gnetum parvifolium*. *Phytochemistry* **32**(2), 1992. 633-8.
- [166] Xu, H., Lai, Y.-Z., Slomczynski, D., Nakas, J. P., and Tanenbaum, S. W. Mediator-assisted selective oxidation of lignin model compounds by laccase from *Botrytis cinerea*. *Biotechnology Letters* **19**(10), 1997. 957-60.
- [167] Youn, H.-D., Hah, Y. C., and Kang, S. O. Role of laccase in lignine degradation by white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters* **132**, 1995. 183-8.
- [168] L. Stryer, *Biochemistry*, Freeman, (1995).
- [169] K. G. B. Torsell, *Natural product chemistry. A mechanistic biosynthetic and ecological approach*, Taylor and Francis, (1997).

Bibliographie

- [170] E. Haslam, Shikimic acid. Metabolites and Metabolism, John Wiley, Chichester (1993).
- [171] Douillet-Breuil, A.-C. Les phytoalexins de la vigne: Synthèse-Métabolisme par *Botrytis cinerea*-Activités biologiques. 1999. Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé Université de Bourgogne-Franche-Comté.
- [172] H. Kindl, Biosynthesis of stilbenes, in "Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components" Academic Press, (1985).
- [173] Schroeder, J. and Schröder, G. Stilbene and chalcone synthases: Related enzymes with key functions in plant-specific pathways. *Zeitschrift für Naturforschung* **45c**, 1990. 1-8.
- [174] H. L. Hergert, Biogenesis of condensed tannins-an overview, in "Plant polyphenols : synthesis, properties, significance" (R. W. Hemingway and P. E. Laks, Eds.), New-York (1992).
- [175] Hemingway, R. W. and Foo, L. Y. Condensed tannins: quinone methide intermediates in cyanidin synthesis. *Journal of the American Society Chemical Communications* , 1983. 1035-306.
- [176] Hemingway, R. W. and Laks, P. E. Condensed tannins: a proposed route to 2R,3R-(2,3-proanthocyanidins). *Journal of the American Society Chemical Communications* , 1985. 746.
- [177] K. P. C. Vollhardt, Traité de chimie organique, De Boeck Université, Bruxelles (1990).
- [178] Haslam, E. Symmetry and promiscuity in proanthocyanidin biochemistry. *Phytochemistry* **16**, 1977. 1625-40.
- [179] J. Gorham, M. Tori and Y. Asakawa, The biochemistry of the stilbenoids, Chapman and Hal, London (1995).
- [180] R. Pezet and V. Pont, Mode of toxic action of Vitaceae stilbenes on fungal cells, in "Handbook of phytoalexin metabolism and action" (M. Daniel and R. P. Purkayastha, Eds.), Marcel Dekker, Inc, New-York (1995).

Bibliographie

- [181] Pezet, R. and Pont, V. Activite antifongique dans les baies de *Vitis vinifera*: effets d'acides organiques et du pterostilbene. *Revue Suisse de Viticulture, d'Arboriculture et d'Horticulture* **20**(5), 1988. 303-9.
- [182] H. Lyr, Mechanism of action of aromatic hydrocarbon fungicides, in "Modern Selective Fungicides" (H. Lyr, Ed.), Longman, (1987).
- [183] Okuda, T. Novel aspects of tannins-renewed concepts and structure-activity relationships. *Current Organic Chemistry* **3**, 1999. 609-22.
- [184] Okuda, T., Yoshida, T., and Hatano, T. Correlation of oxidative transformations of hydrolyzable tannins and plant evolution. *Phytochemistry* **55**, 2000. 513-29.
- [185] Xu, H. X., Kadota, S., Wang, H., Kurokawa, M., Shiraki, K., Matsumoto, T., and Namba, T. A new hydrolyzable tannin from *Geum japonicum* and its antiviral activity. *heterocycles* **38**(1), 1994. 167-75.
- [186] Debra, A., Pearson, H. H. S., Lazarus, S. A., and Keen, C. L. Inhibition of in vitro low-density lipoprotein oxidation by oligomeric procyanidins present in chocolate and cocoas. *Methods in Enzymology* **335**, 2001. 350-60.
- [187] Okuda, T., Yoshida, T., and Hatano, T. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. *Planta Medica* **55**(117), 1989. 122.
- [188] V. Cheynier, J. Rigaud and J. M. Ricardo-da-Silva, Structure of proanthocyanidin oligomers isolated from grape seeds in relation to some of their chemical properties, in "Plant Polyphenols, synthesis, properties and significance" (P.E.Laks, Ed.), Plenum Press, New-York (1992).
- [189] Potterat, O. Antioxydants and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry* **1**, 1997. 415-40.
- [190] Lakenbrink, C., Engelhardt, U. H., and Wray, V. Identification of two novel proanthocyanidins in green tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1999. 4621-4.

Bibliographie

- [191] Ursini, F., Rapuzzi, I., Toniolo, R., Tubaro, F., and Bontempelli, G.
Characterization of antioxidant effect of procyanidins. *Methods in Enzymology* **335**, 2001. 338-50.
- [192] Ricardo-da-Silva, J. M., Cheynier, V., Souquet, J. M., and Moutounet, M.
Interaction of grape seed procyanidin with various proteins in relation to wine fining. *Journal of Sciences and Food Agriculture* **57**, 1991. 111-25.
- [193] Haslam, E. Plant polyphenols (*syn.* vegetable tannins) and chemical defense-a reappraisal. *Journal of Chemical Ecology* **14**(10), 1988. 1789-805.

Ce travail a été réalisé d'octobre 1998 à novembre 2001 à l'Institut de Chimie à l'Université de Neuchâtel sous la direction du Professeur Raffaele Tabacchi et avec la participation du Dr Roger Pezet de la Station Fédérale en Recherches Agronomiques (Nyon). Les résultats de ce travail ont été partiellement publiés et ont fait l'objet de différents posters et communications orales lors de congrès.

PUBLICATIONS

C. Perret, R. Pezet and R. Tabacchi, Analysis of Oligomeric and Polymeric Tannins of Grape Berries by LC/ESI-MS/MSⁿ, *European Journal of Mass Spectrometry*, in press.

C. Perret, R. Pezet and R. Tabacchi, Fractionation of Polymeric Tannins According to the Mean Degree of Polymerization and Analysis of the Fractions by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Phytochemical Analysis*, under submission.

PRESENTATION ORALE

C. Perret, R. Pezet and R. Tabacchi, Qualitative Analysis of Tannins Extract by Mass Spectrometry, *SGMS Meeting*, Chaumont, Switzerland (2000).

PRESENTATION DE POSTERS

C. Perret, R. Pezet and R. Tabacchi, New Methods for the Analysis of Tannins, Inhibitors of an Enzyme Produced by *Botrytis cinerea*, *NSSC Fall Meeting*, Zürich, Switzerland (2001).

C. Perret, R. Pezet and R. Tabacchi, LC/ESI-MS: A New Method for the Characterization of Grape Tannins, Inhibitors of *Botrytis cinerea* Stilbene Oxidase, *XIIth International Botrytis Symposium*, Reims, France (2000).

C. Perret, R. Pezet and R. Tabacchi, LC/ESI-MSⁿ: Method for the Qualitative Analysis of Tannins Extract, *15th International Mass Spectrometry Conference*, Barcelona, Spain (2000).

C. Perret, R. Pezet and R. Tabacchi, Analysis of Oligomeric and Polymeric Tannins of Grape Berries by LC/ESI-MS/MSⁿ, *NSSC Fall Meeting*, Lausanne, Switzerland (2000).

C. Perret, R. Pezet and R. Tabacchi, Analysis of Tannins Extract by LC/ESI-MS/MSⁿ, *NSSC Fall Meeting*, Bâle, Switzerland (1999).

ANNEXE 1:

Mécanisme réactionnel de la thiolyle:

