

**Caractérisation de polyphénols stilbéniques et
de dérivés induits ou constitutifs de la vigne
impliqués dans sa défense contre l'agent
pathogène du mildiou de la vigne, *Plasmopara
viticola* (Berk. and Curt.).**

Thèse présentée à la faculté des Sciences par
J. Bernard JEAN-DENIS

Biochimiste diplômé de l'Université Paris-Sud (Orsay)
pour l'obtention du titre de
Docteur ès Sciences

Membres du jury :

Pr R. Tabacchi (Neuchâtel)
Dr R. Pezet (Changins)
Pr J.-L. Wolfender (Genève)

Pr J.-M. Neuhaus (Neuchâtel)
Dr E. Abou-Mansour (Neuchâtel)

Soutenue le 29 août 2005



IMPRIMATUR POUR LA THESE

Caractérisation de polyphénols stilbéniques et de dérivés
induits ou constitutifs de la vigne impliqués dans sa dé-
fense contre l'agent pathogène du mildiou de la vigne,
Plasmopara viticola (Berk. and Curt.)

Julien Bernard JEAN-DENIS

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

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

Mme E. Abou-Mansour Neuchâtel,
MM. R. Tabacchi (directeur de thèse),
J.-M. Neuhaus Neuchâtel,
R. Pezet (Changins)
et J.-L. Wolfender (Genève)

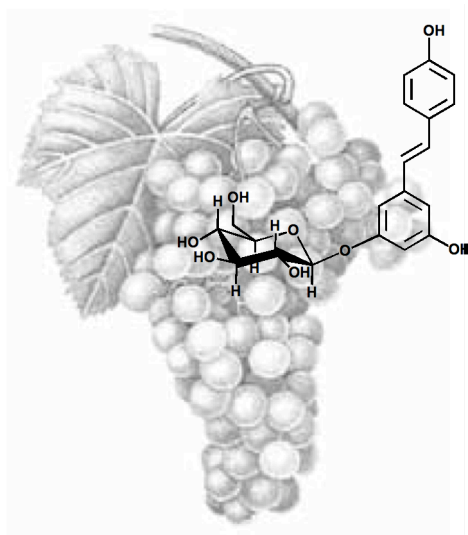
autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 14 novembre 2005

Le doyen :

J.-P. Derendinger

TABLES DES MATIÈRES.



Tables de Matières.

Remerciements.	7
Glossaire et abréviations.	11
Résumé.	21
Abstract.	25
I- Généralités.	27
I-1 La vigne.	29
I-2 Les maladies de la vigne.	30
II- Introduction.	31
II-1 <i>Plasmopara viticola</i> [Berk. & Curt.] Berl & de Toni.	33
II-2 Stratégies de lutte contre le mildiou.	37
II-2-1 Mécanismes de résistance.	37
II-2-2 Lutte conventionnelle.	38
II-2-3 Usage de cultivars interspécifiques.	39
II-2-4 Stimulation biotique et abiotique de la défense de la vigne.	44
II-3 Les stilbènes.	45
III- But du travail.	52
IV- Matériel et méthodes.	58
IV-1 Matériel végétal et composés de référence.	60

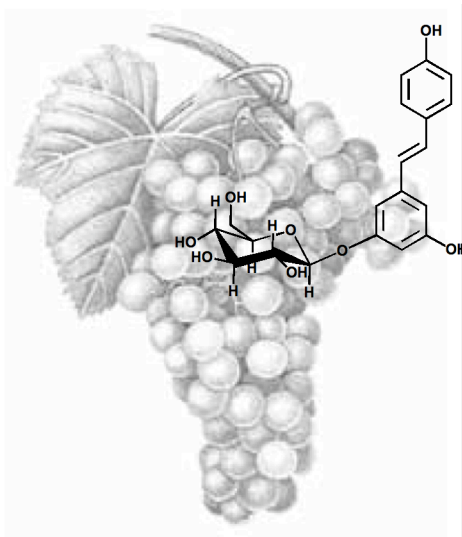
IV-2 Infection artificielle des plantes et des feuilles de vigne.	60
IV-3 Analyses LC-ESI-MS ⁿ et LC-APPI-MS ⁿ des composés phénoliques de Chasselas et Solaris.	64
IV-3-1 Méthodes HPLC-UV.	70
IV-3-1-1 Système HPLC-UV "polyphénols totaux".	70
IV-3-1-2 Système HPLC-UV "stilbènes".	71
IV-3-2 Spectrométrie de Masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS).	71
IV-4 Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).	72
IV-5 Spectrométrie de Masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS).	77
IV-6 Microscopie optique et biotests.	77
V- Résultats et discussion.	80
V-1 Identification de polyphénols et des phytoalexines de la vigne (chasselas et Solaris, <i>V. vinifera</i>).	81
V-1-1 Méthode de détection des stilbènes.	81
V-1-2 Composition phénolique de la feuille de vigne.	85
V-1-3 Mise en évidence de lignanes.	89
V-1-3-1 Tentative d'identification.	89
V-1-3-2 Accumulation de lignanes.	95
V-1-4 Identification de phytoalexines.	95
V-1-4-1 Accumulation de resvératrol et de dérivés monomériques.	98

V-1-4-2 Accumulation de dérivés dimériques du resvératrol et identification de la <i>trans</i> - δ -viniférine.	102
V-1-4-2-1 Le δ -viniférinol.	102
V-1-4-2-2 La <i>trans</i> - δ -viniférine.	103
V-1-4-2-3 Autres dimères du resvératrol.	105
V-1-4-3 Accumulation de dérivés oligomériques (degré de polymérisation supérieur à deux) de resvératrol.	112
V-1-5 Profil stilbénique de feuilles traitées par BABA avec ou sans infection par le mildiou.	117
V-2 Caractérisation de stilbènes et dérivés stilbéniques constitutifs de l'écorce de Chasselas et de Bronner (<i>V. vinifera</i>).	126
V-2-1 <i>Trans</i> -resvératrol et <i>trans</i> - ϵ -viniférine.	131
V-2-2 Ampélopsine A.	134
V-2-3 Vitisine A.	137
V-2-4 Hopeaphénol.	144
V-2-5 Autres oligostilbènes de resvératrol.	149
V-2-5-1 Dimère de resvératrol, X452.	149
V-2-5-2 Tétramère de resvératrol TT2.	150
V-2-6 Biotests.	153
V-2-7 Extraction, isolement et purification de composés constitutifs de l'écorce de Chasselas et Bronner.	155
V-2-7-1 Première méthode.	155
V-2-7-2 Seconde méthode.	157
V-3 Caractérisation de dérivés d'oxydation entre le <i>trans</i> -resvératrol et le <i>trans</i> -pterostilbène.	160
V-3-1 Caractérisation du <i>trans</i> - δ -resvéptérol, <i>trans</i> - δ -isoresvéptérol et du δ -viniférinol.	163
V-3-2 Biotests.	176
V-3-3 Protocole de la synthèse du <i>trans</i> - δ -resvéptérol.	178

V-4 Nouvelle méthode de synthèse du <i>trans</i> -pterostilbène par une double réaction de Heck catalysée par le bis(benzonitrile)dichloropalladium.	183
V-4-1 Protection/déprotection par méthoxyméthylation.	191
V-4-2 Discussion sur l'origine du pterostilbène dans la plante.	194
V-4-3 Protocole de la synthèse du <i>trans</i> -pterostilbène.	197
V-4-3-1 Préparation du bis(benzonitrile)dichloropalladium.	197
V-4-3-2 .Préparation du <i>p</i> -méthoxyméthyl-iodophénol.	197
V-4-3-3.Préparation du 3,5-diméthoxy-iodobenzène.	198
V-4-3-4 Préparation du 4'-méthoxyméthyl- <i>trans</i> -pterostilbène (4'-méthoxyméthyl- <i>trans</i> -4'-hydroxyl-3,5-diméthoxy-stilbène).	199
V-4-3-5 Déprotection du groupe méthoxyméthyle.	200
VI- Tableau récapitulatif.	203
VII- Conclusions et perspectives.	207
VIII- Bibliographie.	212
IX- Inventaire des figures et tableaux.	232
Liste des figures.	233
Liste des tableaux.	239
X- Annexes.	242

Remerciements.

REMERCIEMENTS.



Remerciements.

Remerciements.

Remerciements.

Ce travail a débuté en 2002, année marquée par les prix Nobel de chimie décernés à John B. Fenn, Koichi Tanaka et Kurt Wüthrich, récompensés pour leurs travaux contribuant à l'amélioration de méthodes de détermination structurale de macromolécules biologiques et ouvrant la voie à de nombreuses et nouvelles investigations dans la chimie des substances naturelles.

Il m'a été possible de réaliser ce projet grâce aux interventions directes et indirectes de nombreuses personnes :

Tout d'abord, merci au pôle de recherche NCCR « Survie des plantes » et aux Fonds National Suisse pour leur soutien financier de ce projet.

Merci aux membres du jury, Dr Roger Pezet, Pr Raffaele Tabacchi, Pr Jean-Luc Wolfender, Pr Jean-Marc Neuhaus, Dr Éliane Abou-Mansour, pour avoir accepté d'examiner et de corriger ce travail de thèse.

Merci à mes collègues de laboratoire : "Nico" alias Nicolas Mottier, "Julius" alias Jules D. Djoukeng, "Mus" alias Mustapha Tiouabi et "VAUCHER" alias Jean-Marc Vaucher, Claire-lise Zbinden pour leur camaraderie.

Merci à Dr Saturnin Claude, Dr Armelle Vallat, Dr Olivier Vallat, Dr Mary-Lorène Goddard, Dr Laura Gonzalez Cuervo et Dr Sylvain Burger pour les nombreuses discussions scientifiques, leur disponibilité et leur gentillesse.

Remerciements.

Merci à Heinz Bursian pour les nombreuses analyses RMN effectuées dans la joie et la bonne humeur, puis merci à nos concierges, Philippe Stauffer et André Floreano.

Merci à tous les autres collègues et les chefs de laboratoire de l'Institut de Chimie de Neuchâtel pour les nombreuses discussions échangées.

Merci à Dr Oliver Viret, Dr Katia Gindro, Dr Hannes Richter, Isabelle De Groote et Mihaela Romoscanu (Agroscope, Station Fédérale Recherche en Production végétale de Changins) pour les nombreux partages et leur disponibilité.

Merci à Hamid alias Mollah Md Hamiduzzaman (Laboratoire de Biochimie Végétale de l'Université de Neuchâtel) pour son étroite collaboration et sa participation aux travaux expérimentaux.

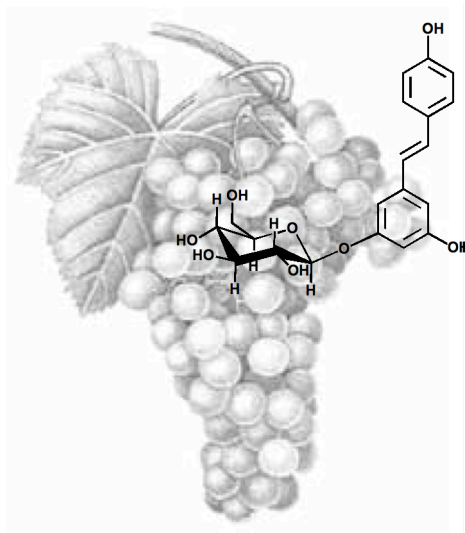
Merci à Dr Chris Davies et Dr Paul Boss (Unité d'horticulture du CSIRO Plant Industry , Glenn Osmond, SA, Australie) pour m'avoir bien accueilli dans leur laboratoire au cours de mon stage à l'étranger et pour leur amitié.

Merci à Dr Ted Turlings et aux autres membres actifs de l'École Doctorale « Les plantes et leur environnement » qui m'ont permis une ouverture et un approfondissement des connaissances en biologie et l'écologie végétale.

Merci à ma chère famille que j'aime et à qui je dois énormément.

Et enfin merci à Dieu, l'unique, pour avoir gardé et conduit l'être imparfait que je suis durant ces périodes laborieuses.

GLOSSAIRE ET ABRÉVIATIONS.



Glossaire et Abréviations.

Glossaire et abréviations.

APCI : Atmospheric pressure chemical ionisation, ionisation chimique à la pression atmosphérique.

API : Atmospheric pressure ionisation, ionisation à la pression atmosphérique.

APPI : Atmospheric pressure photoionisation, photoionisation à la pression atmosphérique.

Aoûtement : Lignification des pousses de la vigne correspondant à un arrêt de croissance et à une accumulation de réserves pour l'hiver.

ARN : Acide ribonucléique.

BABA : β -aminobutyric acid, acide β -aminobutyrique.

Bathochrome (effet) : Déplacement de la bande d'absorption vers les grandes longueurs d'onde.

Biotrophe (ou parasite obligatoire) : Se dit d'un parasite qui ne peut se développer que dans un organisme vivant.

Cafféate 3-O-méthyltransférase (EC 2.1.1.68) : Enzyme catalysant le transfert d'un méthyl sur l'hydroxyle en position 5 du 5-hydroxy-conyferylaldéhyde.

Cafféoyl CoA-3-O-méthyltransférase (EC 2.1.1.104) : Enzyme catalysant le transfert d'un méthyl sur l'hydroxyle en position 3 du cafféoyl-CoA.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CHS (EC 2.3.1.74) : Chalcone synthase, enzyme catalysant la formation de la naringénine à partir de la triple condensation du malonyl-CoA sur le *p*-coumaroyl-CoA.

COSY : (Corrélation SpectroscopY) Séquence RMN à deux dimension homonucléaire permettant de visualiser les couplages entre des noyaux identiques. (Ex : ^1H - ^1H)

Cultivars : Variétés pour une espèce donnée.

Contamination : Première étape du développement d'une maladie durant laquelle l'agent pathogène pénètre dans l'hôte à partir de ses propres ressources.

Débourrement : C'est le début de la phase de croissance. Les bourres s'écartent et laissent apparaître les bourgeons. Les bourres sont une sorte de duvet qui protège les bourgeons du froid pendant l'hiver.

DEPT 135 : (Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer) Séquence permettant d'accroître la sensibilité de noyaux peu sensibles par transfert d'aimantation. Elle permet de visualiser et de différencier les protons reliés directement aux carbones sous forme CH, CH₂ et CH₃.

ED50 : (Effective Dose 50) Concentration minimale nécessaire d'une substance donnée capable de produire un effet quelconque sur 50% d'une population d'un organisme testé.

Electromètre : Appareil à impédance d'entrée élevée permettant la mesure de charges et des courants faibles.

Éliciteur : Biomolécule issue du pathogène ou de la dégradation du tissu végétal par le pathogène, induisant des réactions de défense dans la plante. Sa nature chimique peut être variable (protéine, oligopeptide, oligosaccharide, ...).

ESI : Electrospray ionisation, ionisation electrospray.

Feuillaison : Les feuilles apparaissent et commencent à se développer.

Floraison : C'est la phase de reproduction sexuée de la vigne. C'est à ce moment que la récolte va se décider. En cas de mauvaises conditions climatiques, la fécondation n'aura pas lieu ou que partiellement : ce phénomène est appelé la *coulure*. Certaines années, la fécondation est imparfaite et les ovaires mal fécondés produisent des grains qui restent petits et qui n'atteindront jamais leur maturité. Nous appelons ceci le "millerandage". Si la fécondation a bien eu lieu, l'ovaire va devenir un grain de raisin : cette période s'appelle la "nouaison".

GC(-EI)-MS : Gas chromatography, chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (source d'ionisation par impact électronique).

HMBC : (HEteronuclear Multiple Bond Coherence) Séquence permettant de visualiser des couplages 2J , 3J et 4J entre des noyaux différents (proton-carbone) et proches dans l'espace.

HSQC : (HEteronuclear Single Quantum Coherence) Séquence permettant de visualiser des couplages 1J entre des noyaux différents (proton-carbone) liés.

HPLC : High performance liquid chromatography, Chromatographie liquide à haute performance.

HR : Humidité relative.

Hyperchrome (effet) : Renforcement de l'intensité de l'absorption.

Incubation : Phase durant laquelle un agent infectieux se développe dans un organisme sans que l'infection soit visible (l'incubation suit la contamination et prend fin dès l'apparition des symptômes pathologiques).

Infection : Etablissement d'un agent pathogène dans une plante-hôte sensible.

Inoculum : Pathogène ou partie de celui-ci, pouvant entraîner une contamination.

LC: Liquid Chromatography, chromatographie liquide.

MS et MSⁿ : Mass spectrometry, spectrométrie de masse. MSⁿ désigne des expériences d'isolement et de fragmentation d'ion parents en ions-fils.

Biotrophe (ou parasite obligatoire)

Pérenne : Se dit d'une plante impliquant un programme cultural sur plusieurs années.

Peroxydase (EC 1.11.1.7) : Enzyme catalysant les réactions d'oxydation suivantes, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{RH}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{R}$; $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{RH} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{R}_2$.

Phytoalexines : (du grec, φυτον = plante ; αλεξειν = défendre) Composés de faible poids moléculaire, toxiques pour les phytopathogènes et induits dans la plante infectée ou en état de stress.

pI : Point isoélectrique.

Plasmopara viticola : Agent pathogène responsable de la maladie du mildiou de la vigne.

Pleurs : Remontées de sève au niveau des plaies de tailles. Il n'est pas rare de constater que les pleurs durent près d'un mois ; le temps que les plaies de taille soient cicatrisées. Même si les pleurs sont abondants, la souche de vigne n'est pas affectée ni affaiblie par ces remontées de sève. Par contre ils peuvent mouiller les jeunes bourgeons et ainsi accroître leurs sensibilités au gel.

Oospore : Spore résultant de la reproduction sexuée chez les oomycètes.

Rf : Facteur de rétention. En chromatographie sur couche mince, c'est le rapport de la distance entre le spot d'intérêt et la ligne de dépôt sur la distance parcourue par le système de solvant utilisé.

RH : Réponse ou réaction d'hypersensibilité, résultante de l'expression de gènes de résistance contre un pathogène.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire, absorption de radiations électromagnétiques à une fréquence donnée par un noyau atomique placé dans un champs magnétique. (Ex : ^1H -, ^{13}C -, ^{15}N -, ^{19}F -, ^{31}P -RMN)

RP : (Reverse Phase) Phase inverse, phase apolaire constituant la phase stationnaire d'un système chromatographique. La polarité peut varier suivant la grandeur des chaines carbonées fixées à la silice (RP-18 : chaîne de 18 carbones).

Sporange : Vésicule portée par un sporangiophore et renfermant les spores asexuées.

Spore : Élément reproducteur contenu dans le sporange.

Sporangiophore: Organe du mycélium portant les sporanges.

STS (EC 2.3.1.95) : Stilbène synthase, enzyme catalysant la formation du resvératrol à partir de la triple condensation du malonyl-CoA sur le *p*-coumaroyl-CoA.

Systemique : Se dit d'un produit chimique ou d'un pathogène qui est véhiculé dans tous les organes de la plante de manière intra- ou intercellulaire.

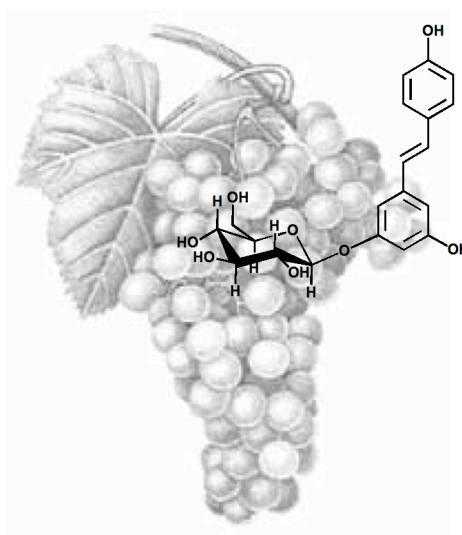
RT : Temps de rétention.

UV (rayonnements) : Radiations électromagnétiques de longueur d'onde de 400 à 100 nanomètres. UV-A (400-320 nm), UV-B (320-280 nm) et UV-C (280-100 nm).

Zoospore : Spore asexuée mobile.

RÉSUMÉ

ABSTRACT.



Résumé / abstract.

Résumé.

Le Mildiou de la vigne, causé par un oomycète parasite obligatoire, *Plasmopara viticola*, est une des maladies les plus redoutées par les viticulteurs.

Son apparition est occasionnée par des éclaboussures de pluie et de terre sur les tissus de la vigne après les fortes précipitations véhiculant les zoospores infectieuses présentes à la surface du sol. Certaines variétés comme le Chasselas (*V. vinifera*) sont sensibles au mildiou et laissent *P. viticola* germer et se développer. D'autres variétés, dont le Solaris, un cépage interspécifique, montrent des caractères de résistance par la formation de nécroses au niveau de sites d'infection et d'enkystement de zoospores de *P. viticola*, empêchant le développement du pathogène. Il est maintenant admis que l'accumulation de stilbènes dans les feuilles de vigne est corrélée à la résistance de la vigne contre le pathogène.

Les méthodes d'analyse chromatographique couplée à la spectrométrie de masse (LC-ESI-MS et LC-APPI-MS) nous ont permis l'identification de nouvelles substances induites lors de la défense de la vigne contre *P. viticola* :

- la *trans*- δ -viniférine, le *trans*- δ -resvépterol et le δ -viniférinol, qui sont aussi des produits obtenus *in vitro* par oxydation enzymatique d'un mélange de *trans*-resvétratol et de *trans*-pterostilbène.

- le *trans*- ϵ -resvépterol, 11 formes de resvétratrolosides, 3 trimères de resvétratol dont l' α -viniférine, 7 dimères de resvétratol ayant des analogies avec l' ϵ -viniférine et 4 lignanes.

Parmi les composés isolés d'écorce de bois de vigne, l'ampélopsine A, l'hopéaphénol, la vitisine A et les tétramères de resvétratol **TT2** et **TT2'**, seul **TT2** étant induit dans la feuille infectée. Néanmoins, l'hopéaphénol, la

Résumé / abstract.

vitisine A et le mélange de **TT2-TT2'** montrent des activités biologiques réduisant la motilité des zoospores de *P. viticola*. L'acide β -aminobutyrique (BABA) induit l'accumulation de lignanes et de stilbènes dans les feuilles de Chasselas infectées.

Une nouvelle stratégie de synthèse du *trans*-pterostilbène a été élaborée grâce à un double couplage de Heck (rendement total : 11%). L'origine du pterostilbène dans la feuille de vigne infectée est aussi discutée.

Abstract.

Downy mildew, caused by an obligatory oomycete, *Plasmopara viticola*, is a worldwide distributed grapevine disease.

This grapevine disease appears after strong rainy periods which allow zoospores migration from the soil to the plant. Some cultivars as Chasselas (*V. vinifera*) are sensitive to downy mildew and cannot avoid *P. viticola* germination and development. Whereas other cultivars as Solaris, an interspecific variety, show resistance capacities with necrosis formation on the infection sites of *P. viticola*, avoiding the pathogen development.

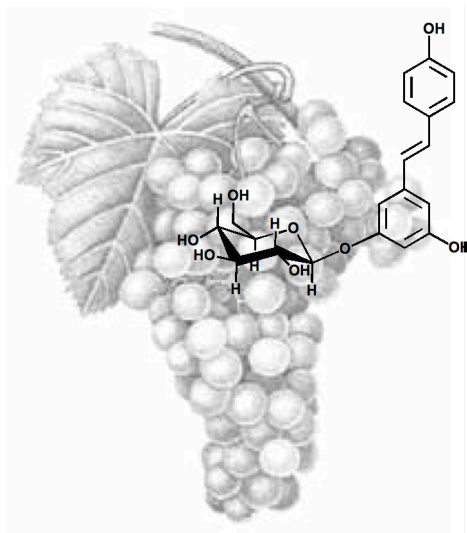
Chromatographic methods coupled to mass spectrometry (LC-APPI-MS and LC-ESI-MS) allowed us to identify new induced substances involved in grapevine plants defense against *P. viticola* :

- *trans*- δ -viniferin, *trans*- δ -resvepterol and δ -viniferinol, that we could obtain by *in vitro* oxidative dimerisation of *trans*-resveratrol and *trans*-pterostilbene.
- *trans*- ϵ -resvepterol, 11 resveratrolsides forms, 3 resveratrol trimers among which the α -viniferin has been identified, 7 resveratrol dehydrodimers as ϵ -viniferin analogues and 4 lignans.

Among isolated compounds from grapevine's bark, ampelopsin A, hopeaphenol, vitisin A and two resveratrol tetramers **TT2** and **TT2'**, only **TT2** should be induced in infected grapevine leaves. However, hopeaphenol, vitisin A and a mixture of **TT2** and **TT2'** show biological activities decreasing the *P. viticola* zoospores mobility. β -Aminobutyric (BABA) induced the accumulation of lignans and stilbenes in infected Chasselas leaves.

A new strategy of *trans*-pterostilbene synthesis has been investigated through a double Heck reaction (overall yield : 11%). The pterostilbene origin in the infected grapevine leaves is discussed.

I- GÉNÉRALITÉS.



I- Généralités.

I Généralités.

I-1 La vigne.

La vigne est une plante pérenne et vivace : sa multiplication se fait essentiellement par bouturage. La reproduction sexuée est utilisée par les sélectionneurs pour créer de nouvelles variétés. La famille *Vitaceae* comprend une dizaine de genres. Celui qui nous intéresse est le genre *Vitis* comportant une cinquantaine d'espèces. Parmi celles-ci, 18 sont d'origine américaine (*Vitis rupestris*, *Vitis riparia*, *Vitis lambrusca*, *Vitis californica*, ...). Certaines sont utilisées comme porte-greffe depuis la crise de la deuxième moitié du XIXe siècle, causée par le phylloxera qui a failli détruire la totalité des vignobles européens. Il existe une seule espèce européenne. Il s'agit de *Vitis vinifera*, comportant plusieurs milliers de variétés, communément appelée cépages (Chasselas, Solaris, par exemple...).

Dans les pays tempérés comme la Suisse, la vigne connaît 2 périodes de développement : une période de repos et une période d'activité qui se décompose en plusieurs phases. La période de repos correspond à l'hiver.

Comme toutes les plantes de nos régions, l'activité extérieure de la vigne démarre au printemps et se manifeste par des **pleurs**. Il s'agit de remontées de sève au niveau des plaies de taille. Les phases suivantes sont le **débourrement** et la **feuillaison**. Deux mois après le débourrement nous assistons à la **floraison** précédant la **fécondation**. Puis le raisin va grossir rapidement pendant quelques semaines, mais les baies vont rester vertes. Au mois d'août, deux phénomènes vont se produire parallèlement. Tout d'abord le phénomène concernant les bois : on parle de l'**aoûtement**, les sarments de l'année changent de couleur et passent

I- Généralités.

du vert au brun et deviennent ligneux. À ce moment, le raisin a reçu la quasi-totalité des matériaux nécessaires à sa maturation et la vigne va commencer à faire ses réserves en amidon. Les grains changent de couleur ; on appelle ce phénomène la **véraison**. C'est à cet instant que les pépins vont se développer et c'est également à ce moment-là que la maturation commence. L'acidité du raisin diminue et la quantité de sucre du fruit augmente. On considère que la **maturation** est atteinte lorsque l'équilibre entre l'acidité et la quantité de sucre dans le raisin est optimum afin d'obtenir un vin équilibré.

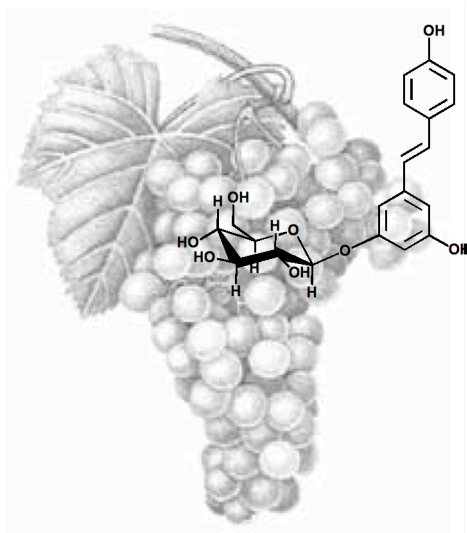
I-2 Les maladies de la vigne.

En Europe, un large spectre de ravageurs attaquent la Vigne ; leur importance varie avec les zones climatiques. De nombreux insectes (pucerons, acariens,...) ont induit autrefois la perte de vignobles européens, mais l'utilisation de porte-greffes résistants ainsi que de pièges sexuels par les services d'avertissements agricoles ont considérablement réduit ces types de nuisances [1,2]. Les nématodes cécidogènes (*Meloidogyne spp.*) engendrent des nodosités sur les racines et transmettent des virus.

De nombreux parasites fongiques s'attaquent également aux vignes dont les plus importants sont : le mildiou de la vigne ou rot-brun, l'oïdium, la pourriture grise, l'esca, l'eutypiose, l'antracnose, l'excoriose et le black-rot.

Le mildiou est d'une grande importance économique. Grâce aux programmes de prévision [3], les traitements actuels sont mieux maîtrisés. La lutte contre le mildiou de la vigne est aussi entreprise par les sélectionneurs qui préparent l'avenir en créant des cultivars résistants. Cette démarche fastidieuse, peut être facilitée par des critères biochimiques et analytiques de résistance aux maladies.

II-INTRODUCTION.



II- Introduction.

II- Introduction.

II-1 *Plasmopara viticola* ([Berk. & Curt.] Berl. & de Toni) [4].

Le mildiou de la vigne est causé par un endoparasite biotrophe obligatoire de la classe des Oomycètes et de l'ordre des Péronosporales, *P. viticola*. Importé d'Amérique en France vers 1878, le mildiou est rapidement devenu l'un des plus redoutables ennemis de la vigne dans les vignobles mondiaux. Cette maladie peut infecter des espèces du genre *Vitis*. Les cultivars de l'espèce *V. vinifera* sont très sensibles alors que les espèces sauvages sont relativement résistantes [5]. Le mildiou peut causer des dommages directs à la vigne en provoquant la déformation des pousses, des vrilles et des grappes ou en provoquant la chute prématurée des feuilles. Même si le nom anglais du mildiou, downy mildew, ressemble à celui d'une autre maladie, powdery mildew (blanc de la vigne ou oïdium), ces deux maladies ne présentent pas les mêmes symptômes et ne demandent pas les mêmes mesures de lutte.

P. viticola hiverne à l'état d'oospores essentiellement à l'intérieur des feuilles mortes (voir l'illustration du cycle biologique, *figure 1*). Au début du printemps, dès que les températures atteignent 8 °C, les oospores germent pour former des sporanges.

Les sporanges contiennent des zoospores (des spores mobiles) qui sont dispersées sur les tissus de la vigne hôte grâce aux éclaboussures de pluie et de

II- Introduction.

terre occasionnées par les fortes précipitations. Ces zoospores pénètrent la face inférieure des feuilles, les vrilles et les pousses tendres par les stomates (petites ouvertures dans les tissus, qui rendent possibles les échanges gazeux). Elles peuvent germer en moins de 90 minutes lorsque les conditions sont optimales (18-24 °C et humidité libre). Une fois à l'intérieur du tissu hôte, *P. viticola* se propage dans le tissu. Si le temps est humide ou pluvieux et doux, il se forme un feutre, ou duvet mycélien blanc cotonneux, sur la rafle ou sur la face inférieure des feuilles.

Ce duvet mycélien blanc ou grisâtre produit de nouveaux sporanges qui, quand il pleut, libèrent des zoospores disséminées par les éclaboussures de pluie à d'autres tissus, provoquant ainsi de nouvelles infections.

Selon les conditions météorologiques, et selon la vulnérabilité des cultivars, on peut observer les symptômes moins de cinq jours après l'infection initiale. La prolifération du mildiou durant la saison dépend de la fréquence des périodes où la vigne reste mouillée et de la présence de tissus hôtes vulnérables.

En fin de saison, des rosées ou des brouillards de longue durée peuvent déclencher des infections. À la fin de la saison de croissance, des oospores se forment à l'intérieur des feuilles mortes et passent ainsi l'hiver à l'abri sur le sol du vignoble jusqu'à ce qu'elles germent le printemps suivant.

II- Introduction.

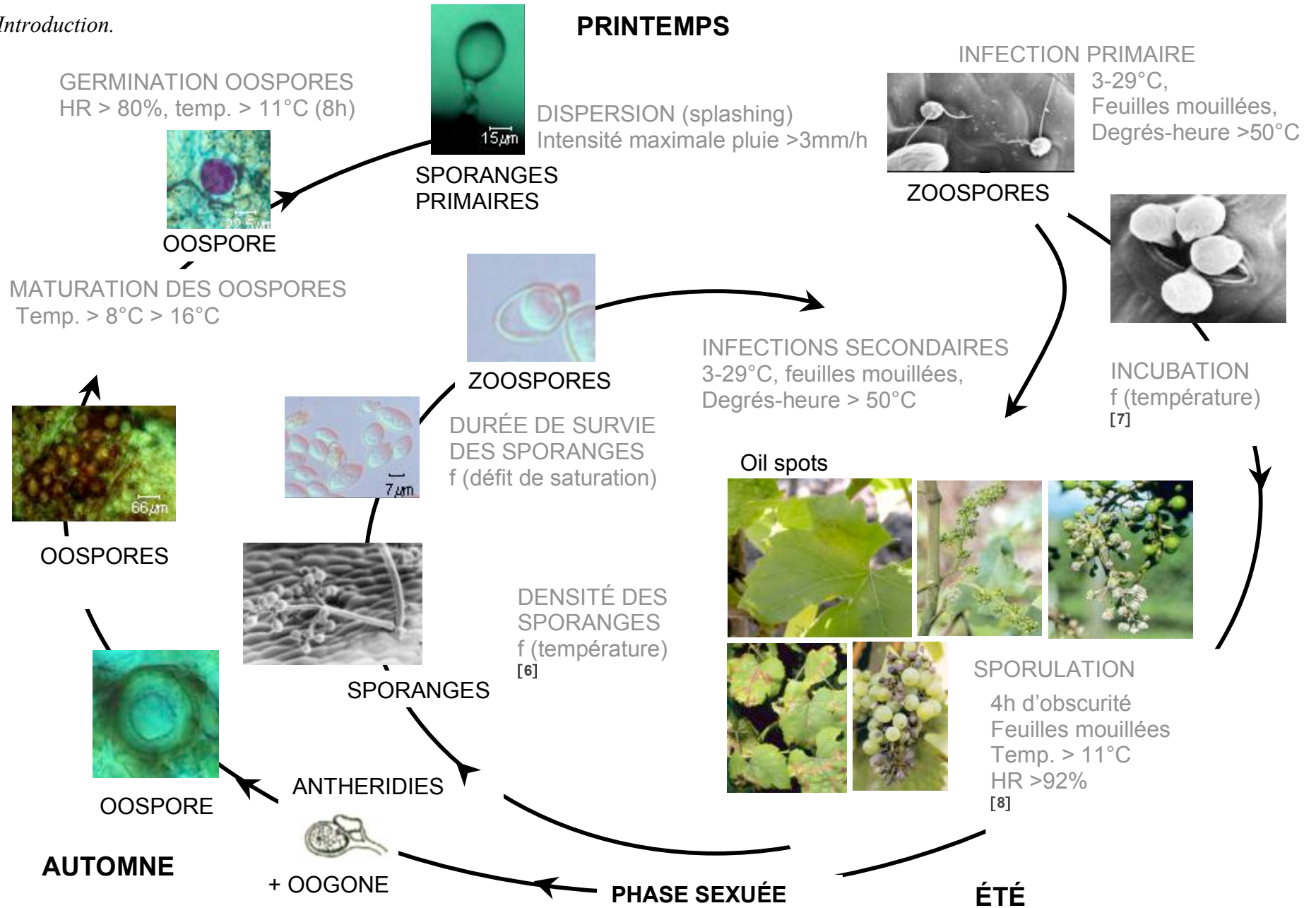


Figure 1 : Cycle de vie de *Plasmopara viticola* [9].

II- Introduction.

Pendant les périodes prolongées de pluie et des températures comprises entre 11 et 24 °C, les lésions de mildiou apparaissent sous forme de petites taches jaunes verdâtres ("tâches d'huile") sur la face supérieure de la feuille (**figure 2A**). Sur le revers des feuilles, se forme un feutrage blanc duveteux (**figure 2B**). Les feuilles gravement infectées peuvent se rider, s'enrouler, puis tomber au sol prématurément. Une fois infectées, les jeunes pousses et les grappes deviennent souvent rabougries, tordues, épaissies et se dessèchent.

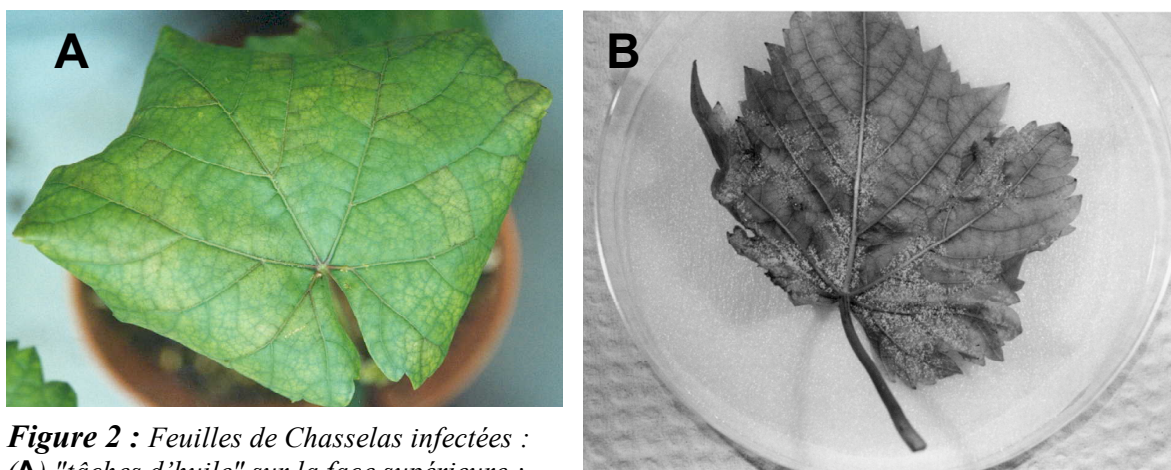


Figure 2 : Feuilles de Chasselas infectées :
(A) "tâches d'huile" sur la face supérieure ;
(B) Développement du mildiou sur la face inférieure.

Des spores provenant des pousses et des feuilles à proximité peuvent contaminer des grains avant la véraison. Les grains deviennent alors brun clair, ramollissent et se détachent facilement de la rafle : on appelle ce phénomène "rot brun".

II-2 Stratégies de lutte contre le mildiou.

II-2-1 Mécanismes de résistance.

La vigne est capable de résister plus ou moins à ce pathogène par des mécanismes de résistances connus chez certaines variétés. La résistance mécanique peut être causée par la présence de longs poils adsorbants réduisant la mouillabilité de la surface inférieure des feuilles. Ces organes peuvent avoir plusieurs fonctions : absorption ou sécrétion. Nous savons qu'ils ont un rôle protecteur contre les fortes insulations, en évitant la transpiration excessive. Kortekamp et Zyprian [10] ont démontré que le milieu hydrophobe créé par l'accumulation des poils adsorbants prévenait la pénétration de microorganismes pathogènes. Les feuilles de Solaris (cépage résistant au mildiou) présentent des feuilles pourvues de longs poils, tandis que les feuilles de Chasselas (cépage sensible au mildiou) sont glâbres. Comme le soulignent Kortekamp et Zyprian, ces poils hydrophobes représenteraient la première stratégie de défense de la vigne contre le mildiou [10].

Des études histochimiques ont révélé la formation de complexes entre des glycoprotéines, des polysacharrides, des composés phénoliques des parois cellulaires et des réactions de lignification, ce qui contribuerait à la résistance en réduisant la plasticité des parois et en créant des barrières mécaniques [10-12]. Lors de la germination des zoospores sur des feuilles de cépages résistants, la principale réaction demeure la réponse ou réaction d'hypersensibilité (RH) restant localisée dans la zone en contact avec le pathogène et généralement

II- Introduction.

visible sous forme de nécroses [13]. RH est le résultat de la mort programmée cellulaire au niveau du site d'infection.

Actuellement, le modèle de Flor [14] sert à expliquer la résistance spécifique entre une plante et un phytopathogène par une interaction éliciteur-récepteur (Avr - R), correspondant respectivement au produit du gène d'avirulence (Avr) de l'agent pathogène et au produit du gène de résistance (R) de la plante [15]. Dans ce modèle, le gène Avr de *P. viticola* serait responsable de la production d'un éliciteur. Cette molécule serait reconnue par un récepteur, produit par le gène R de la vigne. La perception d'éliciteurs par les récepteurs, déclenche une cascade de signalisation aboutissant à l'activation coordonnée de gènes de défense, responsables de la lignification et de la production de radicaux libres, phytoalexines et PR (Pathogen Related)-protéines.

II-2-2 Lutte conventionnelle.

Le meilleur moyen de combattre le mildiou passe par la connaissance de la biologie de *P. viticola* et une pratique culturale intelligente à l'aide de bons produits phytosanitaires [16-21]. La taille et la conduite des vignes dans un système qui améliore la circulation d'air et favorise l'assèchement rapide du feuillage réduisent les risques d'infection.

Nous distinguons deux types de traitements. Le traitement curatif agit efficacement en supprimant une évolution pathologique exprimée. Le produit utilisé pour ce genre de traitement est capable d'inhiber le développement du mycélium dans les tissus (au cours de l'incubation). C'est forcément un produit pénétrant ou systémique. Le traitement préventif n'agit efficacement que lorsqu'il est appliqué avant la pénétration de l'agent pathogène.

II- Introduction.

Un produit préventif inhibe surtout la germination des spores. C'est un produit de surface ou de contact.

Parallèlement à la lutte fongicide, Il est important de débarrasser le vignoble des résidus de culture ou de les incorporer convenablement au sol tôt dans la saison, afin de réduire le nombre de spores qui hivernent. Un désherbage efficace et un bon drainage réduisent l'humidité relative et l'humidité libre propices à la propagation du pathogène. Il faut surveiller systématiquement les cultivars sensibles et utiliser des fongicides "anti-mildiou" efficaces de manière à ne pas favoriser l'apparition de souche de *P. viticola* résistantes à ces derniers. Les périodes cruciales de surveillance du mildiou vont d'un peu avant la floraison jusqu'à 10-14 jours après celle-ci.

D'après Magnien C. [22], il est important que les conditions d'emploi des fongicides soient adaptées aux risques de l'année et modulées par rapport à l'agressivité des souches. La réussite de la protection anti-mildiou est donc étroitement liée à la qualité des prévisions des risques [3,9].

II-2-3 Usage de cultivars interspécifiques.

Selon l'office fédéral de l'agriculture, entre 2000 et 2001, le Chasselas représente près de 80% des cépages blancs cultivés en Suisse (*figure 3*).

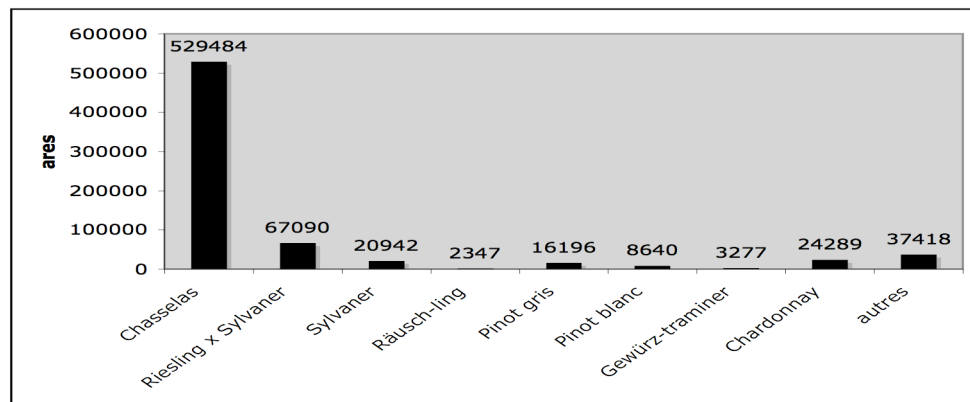
L'origine du Chasselas est très vieille. Il proviendrait de Turquie ou aurait été apporté d'Egypte; de là il aurait suivi les Romains pour atteindre les régions septentrionales. Cultivé depuis fort longtemps, il a donné naissance à de multiples clones et mutants portant son nom ou des noms reflétant certaines de ses qualités particulières, comme le Fendant en Suisse, un chasselas dont la

II- Introduction.

peau se fend sous la pression du doigt sans que le jus ne s'écoule.

Comme pour la majorité des cépages européens très sensibles à la coulure climatique (due au temps frais ou à l'humidité), il nécessite des traitements chimiques contre les maladies, dont le mildiou.

Figure 3 :
Surface viticole des cépages blancs suisses, 2000.



Des résultats statistiques d'une commission européenne nous indiquent que la vigne est la culture qui nécessite le plus d'application de fongicides (**figure 4**). Dans un communiqué de la station de recherche de Changins, Spring [23] affirme que les conditions météorologiques de l'année 1999 ont rappelés, de manière brutale, que le mildiou demeure un des problèmes majeurs pour le

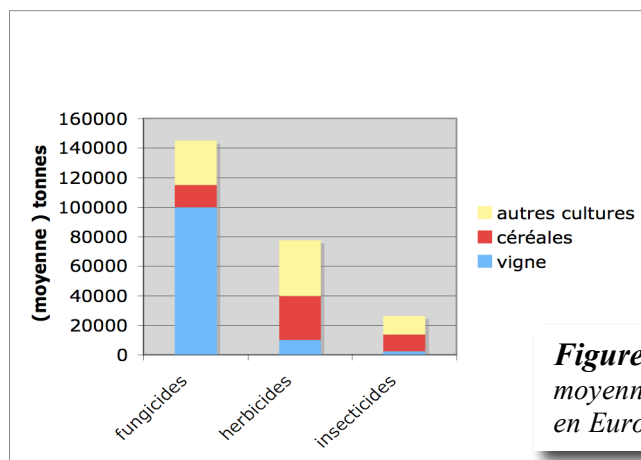


Figure 4 : *Ce graphe montre les quantités moyennes de produits phytosanitaires appliqués en Europe (EU-15) entre 1992 et 1996.*

II- Introduction.

développement de la viticulture biologique. La volonté de réduire l'application de produits phytosanitaires souligne l'urgence de disposer de cépages présentant une résistance élevée aux maladies, en particulier au mildiou, et fournissant des vins d'un niveau qualitatif élevé. Durant ces dernières décennies, différents instituts de recherche dans le monde tentent de relever le défi. Le test de nouveaux cépages résistants aux maladies en provenance de divers instituts a débuté dès 1991 à la Station fédérale de recherche de Changins. Actuellement, ce sont plus de 100 obtentions, issues de croisement entre vignes européennes et vignes américaines ou asiatiques (hybrides) qui sont examinées. Une de ces variétés, demeurant notre sujet d'étude, est le Solaris (*figures 5 et 6*). Cette variété, obtenue par l'institut du vin de Freiburg (Allemagne) est issue d'un croisement entre deux cultivars, eux-mêmes issus de très nombreux croisements successifs (*figure 6*).



Figure 5 : Différence morphologique entre les feuilles de Solaris (résistant au mildiou) et de Chasselas (sensible au mildiou) (Changins, 2002).

II- Introduction.

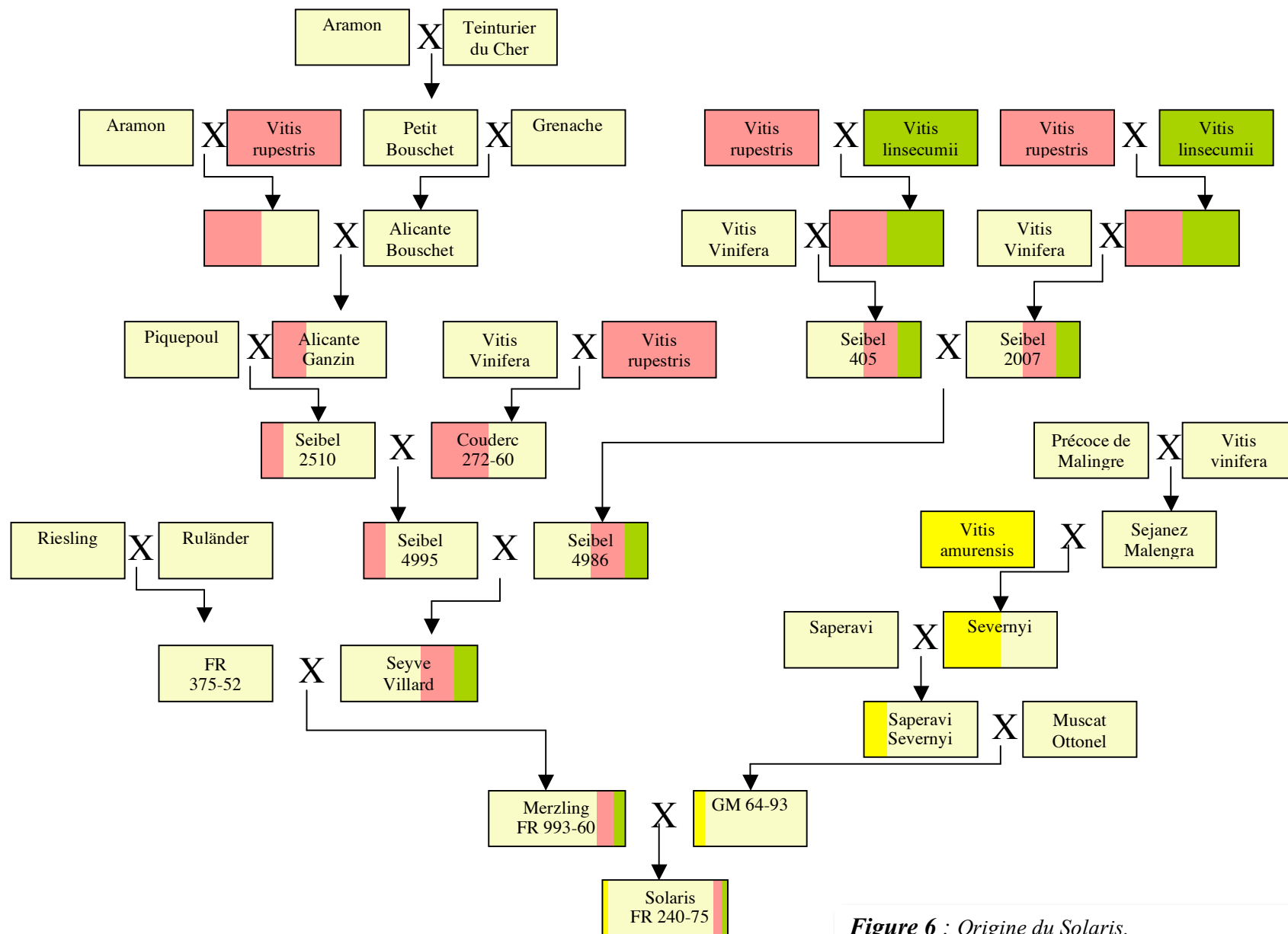
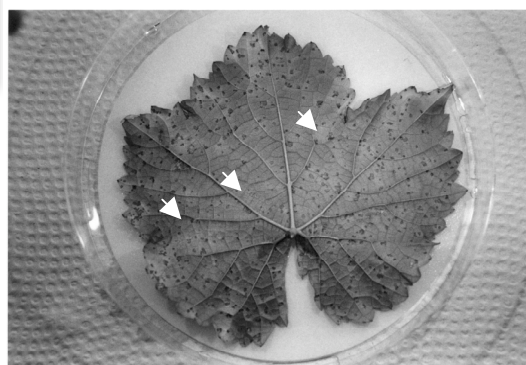


Figure 6 : Origine du Solaris.
Avec l'accord de Pr Jean-Marc Neuhaus.

II- Introduction.

Sur le terrain, il démontre une certaine sensibilité à la coulure et au millerandage, une sensibilité moyenne face à l'oïdium et à la pourriture grise, mais une résistance élevée face au mildiou (*figure 7*). Son vin est plutôt décrit comme sec, puissant et chaleureux avec un bouquet légèrement fruité et une finesse moyenne. Une vendange surmaturée permet d'obtenir un vin doux gardant son caractère puissant avec des arômes complexes.

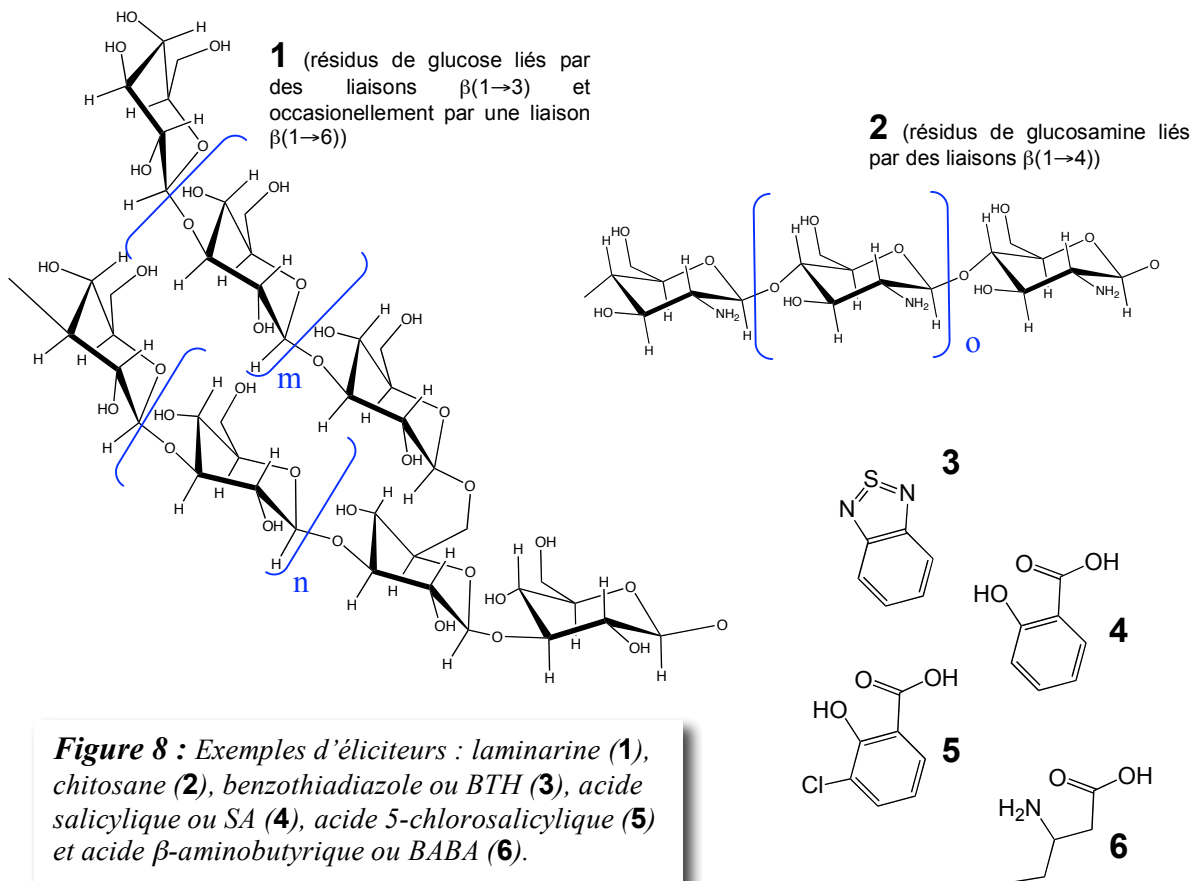
Figure 7 : Feuille de Solaris infectée par *P. viticola*. Apparition de nécroses au niveau des nombreux sites d'infection (→).



Il est clair que les cépages hybrides sont susceptibles de présenter un intérêt, en particulier pour le développement futur de la viticulture biologique. Il convient de souligner que leur résistance au mildiou, bien que supérieure à celle des cépages européens, n'est pas absolue. Selon l'importance de ces maladies, une protection phytosanitaire adaptée peut se révéler indispensable.

II-2-4 Stimulation biotique et abiotique de la défense de la vigne.

La stimulation des défenses naturelles de la vigne par l'application d'éliciteurs (molécules capable de mimer la perception d'un phytopathogène) d'origine biotique [24] ou abiotique [25-29], est un autre moyen d'améliorer la productivité et la qualité de la vigne. Ceci amène l'insertion d'éliciteurs dans un programme de lutte intégrée contre les maladies de la vigne, telles que le mildiou [26-30]. Les éliciteurs (*figure 8*) peuvent être d'origine biologique (*Trichoderma viride*, [24]), physique (traitement UV, [25]) ou chimique (chitosane [26,27], laminarine [28], dérivés d'acide salicylique [27], acide β -aminobutyrique [29,30]).



II-3 Les stilbènes.

Les stilbènes représentent une famille de molécules dont un motif structural (*figure 9, tableau 1*) [31], à l'état monomérique ou polymérique, est constitué d'un groupe diphényléthylène *cis* ou *trans*. Ils sont généralement isolés des plantes sous formes hydroxylés (monomères et oligomères de resvératrol), méthylés (pterostilbène, ...), esterifiés, glycosylés (picéides, ...) ou même prenylés (chiricanines) (voir les références au *tableau 2, p. 49*). Leur solubilité est négligeable dans l'eau et accrue dans la plupart des solvants organiques. Le resvératrol (3,5,4'-trihydroxystilbène), identifié pour la 1ère fois en 1940 dans le rhizome du vérâtre blanc [32], est le précurseur des stilbènes caractérisés, comme des phytoalexines de la vigne, par Langcake et Pryce [33-34] (*figure 10*).

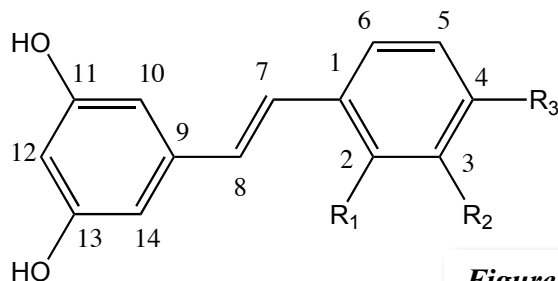


Figure 9 : Structure générale des stilbènes.

Tableau 1: Structure générale des stilbènes.

R ₁	R ₂	R ₃	Précuseur phénolique	Stilbènes
H	H	H	acide cinnamique	pinosylvine
H	H	OH	acide <i>p</i> -coumarique	resvératrol
OH	H	OH	acide 2',4'-dihydroxycinnamique	hydroxyresvératrol
H	OH	OH	acide cafféique	picéatannol
H	OH	OCH ₃	Acide isoférulique	rhapontagénine

II- Introduction.

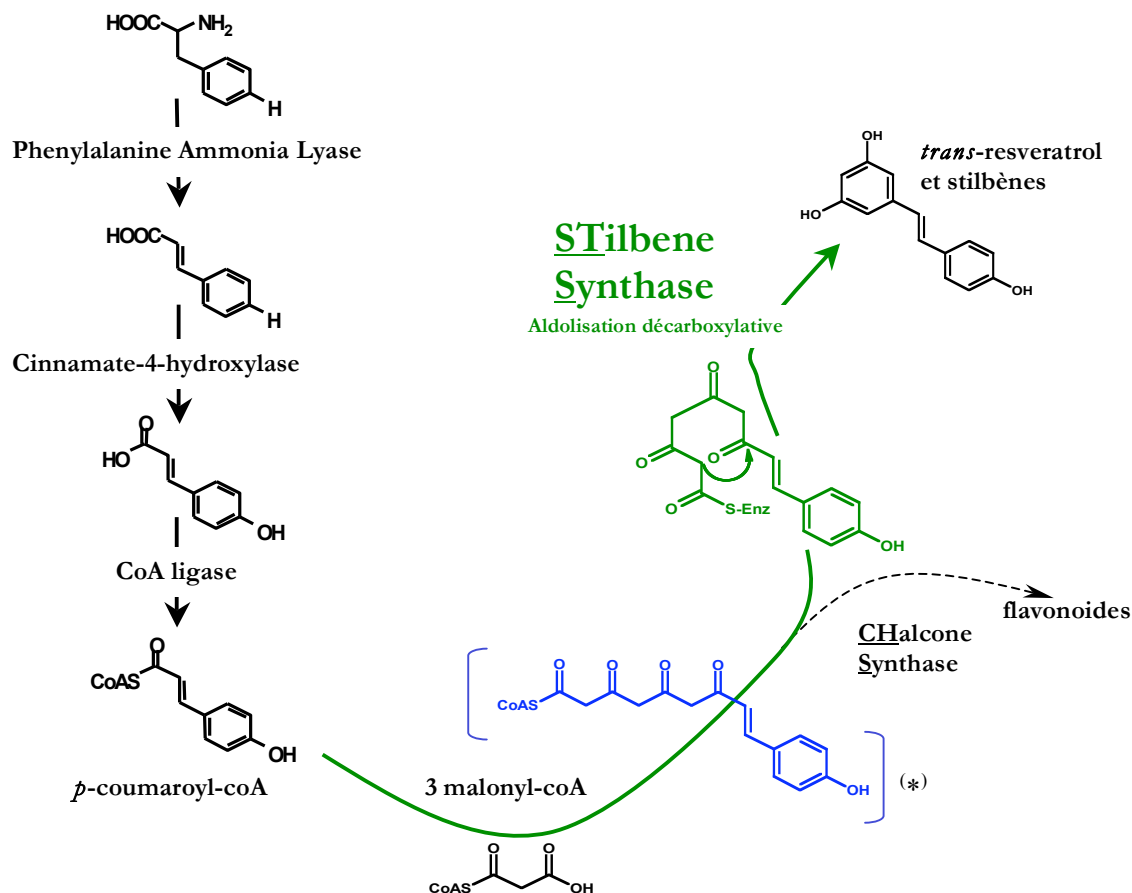


Figure 10 :

Les stilbènes sont induits par la voie de biosynthèse de la L-phénylalanine, elle-même issue de la voie des shikimates. La stilbène synthase (STS) est l'enzyme clé qui favorisera la formation du resveratrol, précurseur monomérique des oligostibènes, à partir de la p-coumaroyl-coA. Une compétition existe entre la STS et la chalcone synthase (CHS) car elles utilisent le même substrat tetracétonique. Les deux enzymes sont capable d'effectuer trois condensations successives du malonyl-coA sur le p-coumaroyl-coA donnant le même substrat (*), mais procèdent à un repliement différent de la queue aliphatique. Ceci sera à l'origine de la formation de différents systèmes aromatiques par différents mécanismes de cyclisation: La STS catalysera plutôt une aldolisation décarboxylative, tandis que la CHS catalyse une cyclisation de type Claisen [35].

II- Introduction.

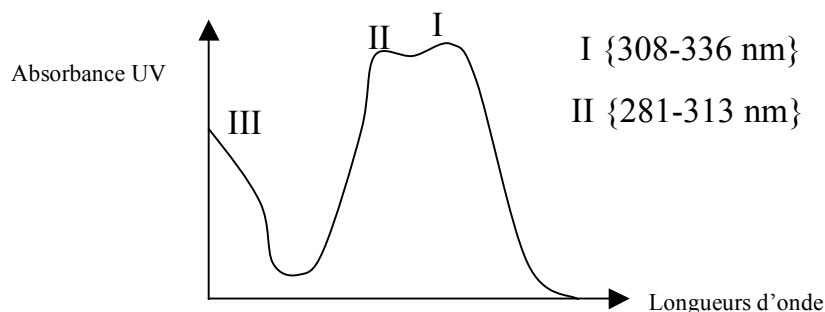


Figure 11 : Profil spectral UV caractéristique de stilbènes.

Sous lumière UV, ces stilbènes peuvent donner une intense fluorescence bleue (**figure 11**) et peuvent être révélés par les réactifs suivants : *p*-nitroaniline, *o*-dianizidine et acide sulphanilique [36] ; IR ν_{\max} (cm^{-1}) : 3200-3600 (O-H), 3000-3100 (C-H aromatique), 2850-2960 (C-H aliphatique), 1590-1640 (C=C), 730-740 (C=C *cis*), 960-970 (C=C *trans*) ; UV λ_{\max} ($\log \epsilon$) : 305 nm. L'addition de NaOH 1N provoque un effet bathochrome et hyperchrome dû à la présence de 4-hydroxyphényle dans leur structure [34]. Les dimères et autres oligomères présentent en général une structure aryl-dihydrobenzofurane (**figure 12**) comme le soulignent Sotheeswaran et Pasupathy [37].

Langcake et Pryce [33-34] ont mis en évidence cette classe de molécules, appelée viniférines (**figure 13**), jouant un rôle dans la défense de la vigne contre des stress biotiques et abiotiques. Ils ont décrit les oligomères du resvératrol suivant : l' ϵ -viniférine (dimère), l' α -viniférine (trimère cyclique), la β -viniférine (tétramère cyclique) et la γ -viniférine (oligomère de haut degré de polymérisation). Les structures des deux derniers sont encore inconnues. D'autres stilbènes sont retrouvés dans un grand nombre d'espèces végétales avec différents degrés de polymérisation (**tableau 2**). Les *trans*-monomères (par exemple, *trans*-resvératrol, resvératrol glucosylé, ...) présentent en général un spectre UV de la forme présentée sur la **figure 11**, tandis que les *cis*-monomères absorbent autour des 280 nm.

II- Introduction.

Les stilbènes ont déjà été identifiés dans la plupart des parties de la plante : fruits [38], écorce [39,40], feuilles.

Dans la plupart des articles concernant les stilbènes caractérisés dans la nature, ces molécules sont très fortement associées à la résistance des plantes qui les produisent contre diverses maladies ou stress environnementaux. En 1993, Hain *et al.* publient dans "Nature" le premier rapport, traitant de l'acquisition d'une résistance plus efficace contre *Botrytis cinerea* de plants de tabac transgéniques, auxquels ils ont ajouté des gènes de STS isolés de la vigne [41].

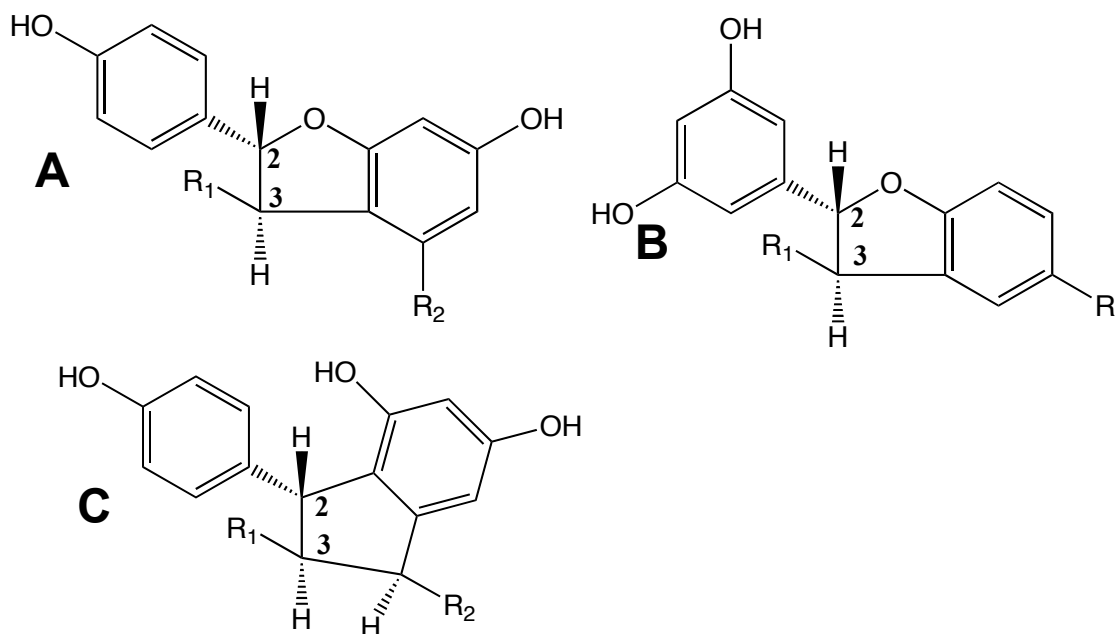


Figure 12 : (A,B) *trans*-2-aryl-2,3-dihydrobenzofurane ; (C) *trans*-2-aryl-2,3-dihydroindène [42]. R1 et R2 représentent d'autres groupements aryles.

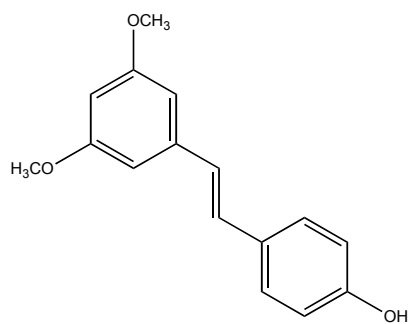
II- Introduction.

Tableau 2 : Revue de littérature non exhaustive sur la caractérisation de dérivés de resvératrol dans les différentes parties anatomiques de plantes parmi les genres suivants : Vitaceae, Dipterocarpaceae, Euphorbiaceae, Leguminosae, Sericeae et Gnetaceae.
Degré de Polym- : degré de polymérisation.

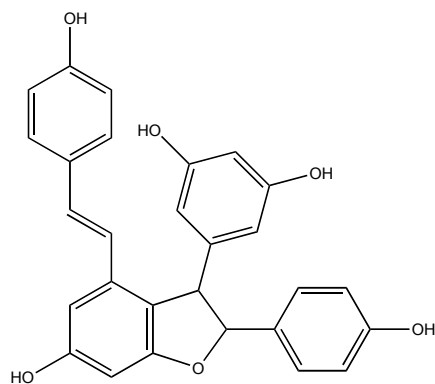
Degré de Polym.	Feuille	Racine
1	Van der Kaaden <i>et al.</i> , [43] (mappaine) ; Langcake and Pryce, [33,34,44] (pterostilbène, resvératrol).	loset <i>et al.</i> , [45] (chiricanines A-E).
2	Dai <i>et al.</i> , [46] (malibitols A-B) ; Langcake and Pryce, [33,34] (ϵ -viniférine). Pezet <i>et al.</i> , [47] (δ -viniférine).	Ducrot <i>et al.</i> , [48] (cyphostémmines A-B) ; Bala <i>et al.</i> , [49] (<i>cis</i> - ϵ -viniférine) ; Luo <i>et al.</i> , [50] (isoampélopsine F, caraphénols B-C, ampélopsine F) ; Ohyama <i>et al.</i> , [51] (leachianols F et G) ; Oshima and Ueno, [52] (ampélopsine D).
3	Pryce et Langcake, [53] (α -viniférine).	Huang <i>et al.</i> , [54] (amurésines C et D) ; Luo <i>et al.</i> , [50] (caraphénol A) ; Oshima and Ueno, [52] (<i>cis</i> -ampélopsine E).
4	Dai <i>et al.</i> , [46] (dibalanocarpol).	Korhammer <i>et al.</i> , [55] (ρ -viniferin) ; Oshima and Ueno, [52] (ampélopsine H).
Supérieur à 4		Huang <i>et al.</i> , [54] (amurésines E et F) ; Ohyama <i>et al.</i> , [56] (davidiol D).

Degré de Polym.	Écorce/bois	Tige/pédoncule	Fruits	(Protoplastes)
1	Aminah <i>et al.</i> , [57] (diptoindonésine A).		Bavaresco <i>et al.</i> , [38] (piceatannol) ; Pezet et Pont, [58] (pterostilbène).	Commun <i>et al.</i> , [65] ; Waffo-Teguo <i>et al.</i> , [66-68] ; Decendit <i>et al.</i> , [69].
2	Lins <i>et al.</i> , [64] (gnétines A-D) ; Tanaka <i>et al.</i> , [65] (parviflorol, ampélopsine A) ; Diyasena <i>et al.</i> , [66] (balanocarpol) ; Ito <i>et al.</i> , [67].	Li <i>et al.</i> , [68] (bétulifols A-B) ; Tanaka <i>et al.</i> , [69] (isoampélopsine F) ; Khan <i>et al.</i> , [70] (pallidol).		Waffo-Teguo <i>et al.</i> , [35].
3	Lins <i>et al.</i> , [64] (Gnetin E) ; Sotheeswaran <i>et al.</i> , [71] (copalliférol A, stemonoporol).	Tanaka <i>et al.</i> , [72] (parthenocissins A-B) ; Iliya <i>et al.</i> , [73] (latifolol).		
4	Ito <i>et al.</i> , [39] (vitisine C) ; Ito <i>et al.</i> , [40] (vitisines A et D) ; Amalfitano <i>et al.</i> , [74] (ampélopsine H).	Ourtoule <i>et al.</i> , [75] ; Yan <i>et al.</i> , [76] (viniférol A) ; Li <i>et al.</i> , [77] (Flexuosol A) ; Yan <i>et al.</i> , [78] (viniférols B-C).		
Supérieur à 4	Ito T. <i>et al.</i> , [67] (pauciflorol D).			

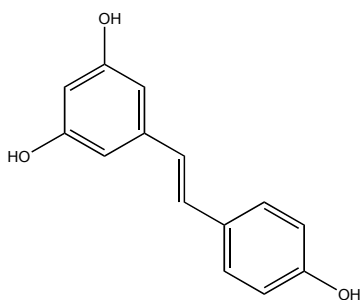
II- Introduction.



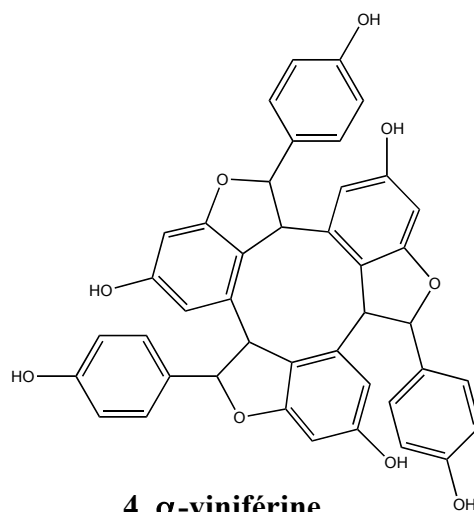
1. trans-pterostilbène



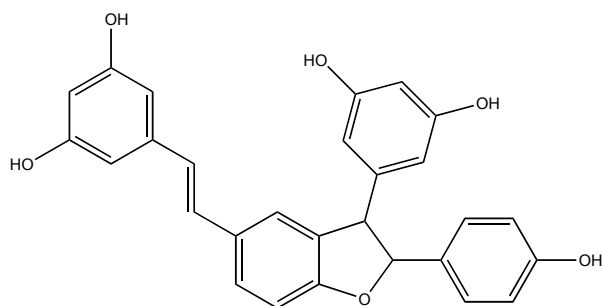
2. trans-ε-viniférine



3. trans-resvératrol



4. α-viniférine

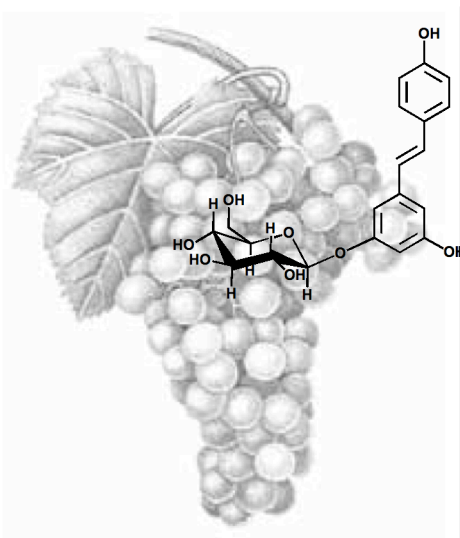


5. trans-δ-viniférine

Figure 13 : Principaux stilbènes de la vigne.

II- Introduction.

III- BUT DU TRAVAIL.



III- But du travail.

III But du travail.

Le mildiou de la vigne est une maladie, malheureusement très répandue dans le monde viticole, détruisant les vignobles. Le fait que *P. viticola*, l'agent pathogène en cause, soit un parasite obligatoire, rend difficiles les investigations analytiques sur les interactions hôte-pathogène au niveau des feuilles. Langcake et Pryce ont décrit le resvératrol et ses dérivés comme des phytoalexines produites par la vigne lors d'une réponse à un stress biotique ou abiotique [33,34]. Mais, les structures de certaines phytoalexines ne sont pas encore clairement élucidées. Le resvératrol est souvent l'objet d'étude pour ses effets bénéfiques sur la santé humaine, par ses propriétés anticancérigènes, antioxydantes, anti-inflammatoires et antivirales [79-86].

Afin d'approfondir nos connaissances sur l'implication de ces stilbènes dans la défense de la vigne contre le mildiou, il nous a fallu, dans un premier temps, mettre au point une méthode d'analyse rapide et sensible, basée sur la technique LC-MS à partir d'un système HPLC développé par Dr Roger Pezet. Nous avons établi l'efficacité de la photoionisation (APPI) par rapport à l'ionisation par électrospray pour la détection de dérivés du resvératrol dans les feuilles de vigne. Puis nous avons montré quelques applications sollicitant cette méthode, à travers la caractérisation et l'identification de composés phénoliques présents dans les feuilles de cépages sensibles et résistants subissant des stress biotiques (infection par *P. viticola*), ainsi que des inductions abiotiques (irradiations UV et acide β -aminobutyrique, BABA) des stilbènes afin de renforcer la résistance naturelle de cultivars sensibles.

III- But du travail.

Étant dépourvu de quantités suffisantes à partir du matériel végétal pour des études structurales de ces substances, nous avons envisagé d'autres moyens, évoqués ci-après, qui nous ont permis de les étudier.

L'aoûttement des sarments est un processus de lignification proche de celui qui est observé aux sites d'infection dans les réactions d'hypersensibilité. La recherche des stilbènes composant l'écorce du bois de vigne, nous aiderait à identifier les stilbènes induits dans les feuilles de vigne. Nous avons donc tenter de retrouver dans les sarments lignifiés des stilbènes différents et surtout en plus grande concentration, facilitant leur analyse, donc leur identification. Ces composés issus du resvératrol sont comparés et leur toxicité a été jugée par des biotests.

La synthèse est parfois le seul moyen d'étudier des stilbènes toxiques présents à de faible concentration *in vivo*. La synthèse enzymatique de la δ -viniférine nous a permis son identification dans la feuille de vigne.

En 2000, Amalfitano *et al.* ont suspecté dans du bois de vigne atteint par l'esca la présence d'un dimère de stilbène contenant du ptérostilbène [87]. Nous décrivons pour la première fois la détection du *trans*- δ -resvépterol (un nouveau stilbène hétérodimérique) et le caractérisons par synthèse biochimique. Son effet toxique sur la mobilité des zoospores de *P. viticola* sera aussi discuté.

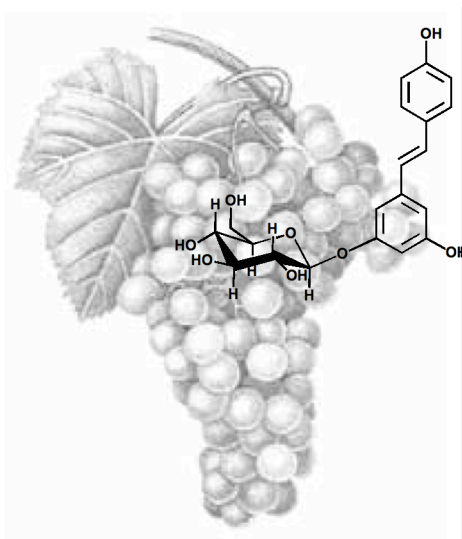
Enfin, nous présentons une nouvelle voie de synthèse chimique du *trans*-pterostilbène (connu comme une des phytoalexines de la vigne et supposé précurseur du *trans*- δ -resvépterol) par une double réaction de Heck. La biosynthèse du pterostilbène n'est pas encore très bien comprise, cependant nous en avons profité pour discuter sur son origine dans la plante infectée en faisant état de quelques hypothèses.

III- But du travail.



III- But du travail.

IV- MATÉRIEL ET MÉTHODES.



IV- Matériel et Méthodes.

IV Matériel et méthodes.

IV-1 Matériel biologique et composés de référence.

Les plants de vigne de variétés Chasselas et Solaris, les sarments de Chasselas et de Bronner, ainsi que des isolats de *P. viticola*, les extraits enzymatiques de *Botrytis cinerea* et du pterostilbène acétylé nous ont été fournis par l'Agroscope (RAC, Station de recherche de Changins). Des plantules de Chasselas de 3 à 5 feuilles ont été obtenues à partir de graines provenant de Syngenta (germination dans vermiculite, 30°C).

L'acide β -aminobutyrique, puis les standards de catéchine, d'épicatéchine et de *trans*-resvératrol proviennent de Sigma-Aldrich (Buchs, Suisse).

Tous les solvants organiques employés sont de qualité analytique.

IV-2 Infection artificielle des plantes et des feuilles de vigne.

- L'infection des plants de vigne a été effectuée, en collaboration avec l'Agroscope, de la manière suivante :

Des plants de Chasselas et de Solaris, ayant poussé sous serre durant 4 mois, sont nettoyés (*figure 14*) et immergés dans un bain contenant une suspension de sporanges sous agitation (*figure 15*). Le nombre estimé de sporanges dans le bain d'infection est de l'ordre de 1 à 5 millions pour 10 L d'eau ; à peu près 50% des sporanges relâcheront leurs zoospores.

IV- Matériel et Méthodes.



Figure 14 :
Nettoyage des plantes (enlèvement des dendrites et les feuilles dégradées).



Figure 15 :
Inoculation par immersion.

Le système est mis à 20°C dans l'obscurité (*figure 16*), pour favoriser l'ouverture des stomates, avant de placer les plantes en chambre climatisée avec 12h de jour (22°C, 50% d'humidité) et 12h de nuit (18°C, 60% d'humidité) (*figure 17*).



Figure 16 : *Processus d'incubation à l'obscurité, 20°C.*



Figure 17 : *Chambre climatisée.*

IV- Matériel et Méthodes.

Les feuilles infectées sont collectées après 7 à 8 jours pour être analysées.

Parallèlement, la face inférieure de feuilles de plantes saines a été exposée pendant 10 min à des radiations UV-C (Philips TUV 30W, $92\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ à 253 nm, à 13 cm des feuilles), maintenue à l'obscurité dans une étuve à 25°C pendant 26h et 56h. Les feuilles ont été collectées pour être analysées.

Les échantillons de feuilles saines, infectées et irradiées sont lyophilisés, extraits par du MeOH 70% dans l'eau, centrifugés, réextraits à l'acétate d'éthyle, évaporés, redissous dans du MeOH et stockés à - 40°C jusqu'aux analyses LC-MS.

- Le traitement des semis et des feuilles de vigne avec BABA a été effectué, en collaboration avec le laboratoire de biochimie végétale de l'Université de Neuchâtel.

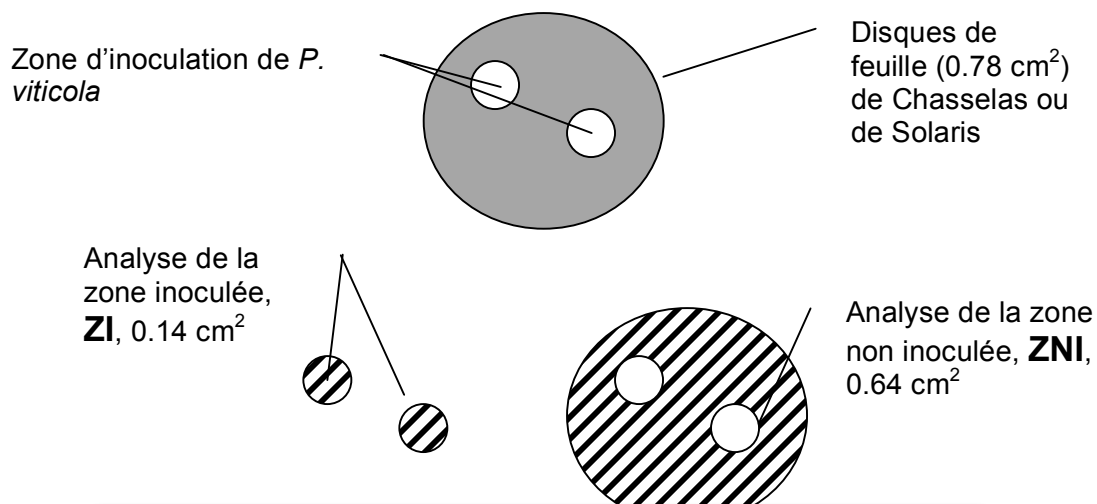


Figure 18 : Schéma représentant les zones étudiées sur les disques de feuilles de Chasselas et Solaris.

IV- Matériel et Méthodes.

Tableau 3 : Conditions de traitement des différents échantillons étudiés. TEAI : temps d'échantillonnage après inoculation ; NN : partie non nécrosée ; N : partie nécrosée ; Ch : Chasselas ; So : Solaris.

Pré-traitements et TEAI	disques ZI de Ch.	disques ZNI de Ch.	disques ZI de So	plantule Ch infectée (NN)	plantule Ch infectée (N)	Plantule Ch saine
Eau, 0h	X		X			
Eau, 3h	X		X			
Eau, 7h	X		X			
Eau, 48h	X	X	X			
Eau, 6 ^{ème} jour	X	X				
Eau, 7 ^{ème} jour	X	X		X		X
BABA, 0h	X		X			
BABA, 3h	X		X			
BABA, 7h	X		X			
BABA, 48h	X	X	X			
BABA, 6 ^{ème} jour	X	X				
BABA, 7 ^{ème} jour	X	X		X	X	X

Des feuilles (Chasselas et Solaris) ont été découpées en disques de 0.78 cm² (**figure 18**) et ont été posées sur leur face inférieure dans des boîtes de Pétri contenant une solution aqueuse de BABA (0.5 mM) ou dans l'eau seul (témoin) pendant 24 heures, à l'obscurité. Les feuilles ont ensuite été lavées une fois avec de l'eau et transférées dans des boîtes de Pétri contenant des filtres humidifiés (Whatman). Ces disques de feuilles ont été inoculés avec deux gouttes (2 x 10µL) d'une suspension de sporanges de *P. viticola* (5x10⁴ sporanges.ml⁻¹, **figure 18**).

Les plantules issues de semis de Chasselas ont été traitées avec une solution aqueuse de BABA et inoculées par immersion dans une suspension de

IV- Matériel et Méthodes.

sporanges (5×10^4 sporanges.ml⁻¹). Toutes les inoculations ont nécessité une incubation à 20°C.

Les témoins sont constitués de feuilles ou de plantules traitées avec de l'eau et/ou non inoculées.

L'échantillonnage s'est effectué suivant le **tableau 3**, puis les échantillons ont été stockés à -80°C.

Les échantillons sont extraits au méthanol (60 µL), dans un mortier en verre (zones inoculées et non inoculées des disques de feuilles de Chasselas et Solaris, puis zones nécrotiques et zones non nécrotiques des feuilles issues des plantules de Chasselas, **figure 18**).

Les extraits sont centrifugés (4000 rpm, 5min) et le surnageant est prélevé pour l'analyse LC-APPI-MS (injection de 20 µL). Une duplication a été réalisée pour chaque prélèvement.

7 composés sont analysés qualitativement et estimés quantitativement (accumulation ionique) pour chaque traitement : 2 resvératrols glycosylés (non identifiées), les *trans*- et *cis*-picéïdes, le *trans*-resvératrol, les *trans*-δ- et *trans*-ε-viniférines.

IV-3 Analyses LC-ESI-MSⁿ et LC-APPI-MSⁿ des composés phénoliques de Chasselas et Solaris.

Afin d'analyser nos divers extraits ou mélanges réactionnels, nous avons souvent utilisé la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse avec une

source d'ionisation à la pression atmosphérique (API) de type electrospray (ESI) ou photoionisante (APPI).

Un spectromètre de masse se décompose en trois parties distinctes : une source où a lieu l'ionisation des molécules, l'analyseur qui assure la séparation des ions suivant leur rapport masse/charge (m/z) et le détecteur qui mesure l'abondance relative de chaque ion.

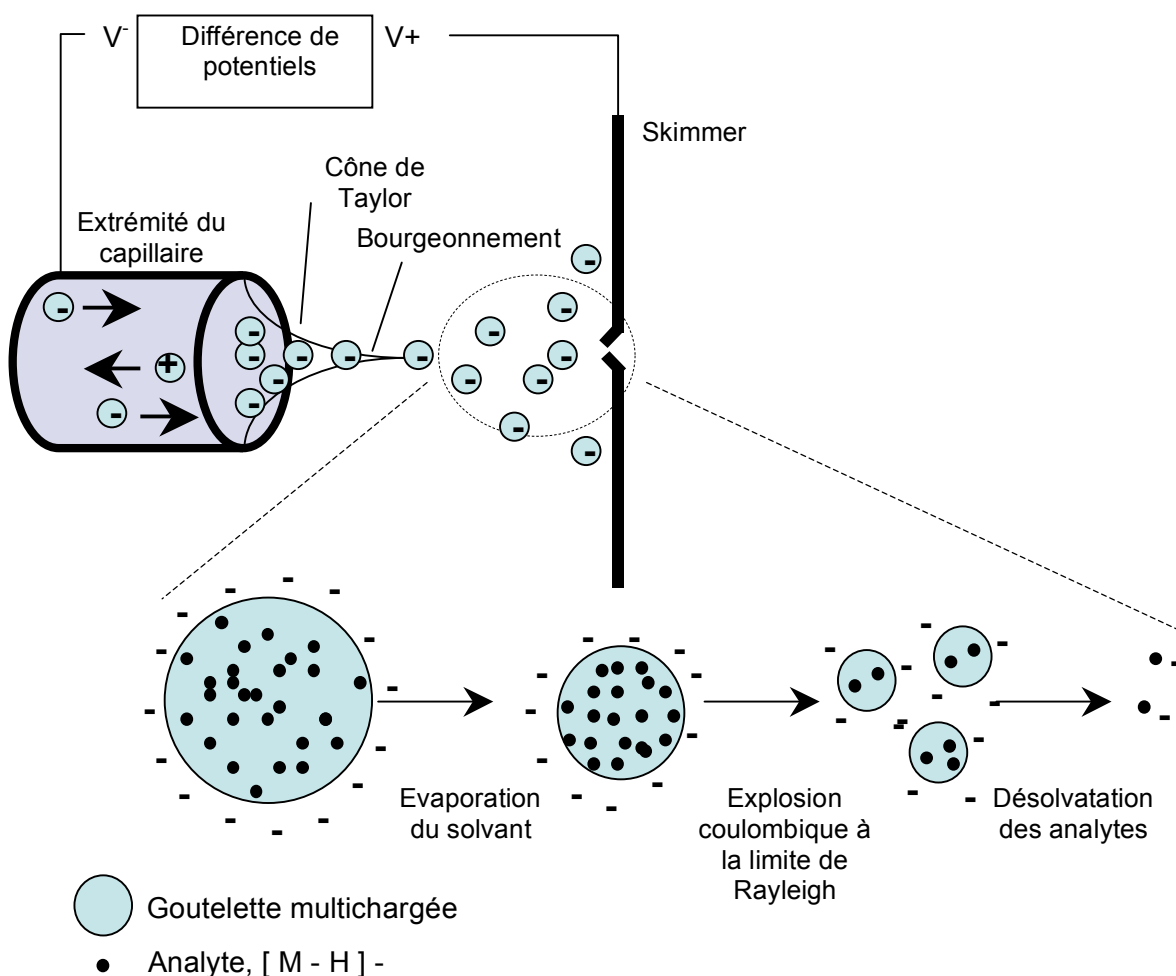


Figure 19 :
Source d'ionisation électrospray.

Basé sur la théorie de Dole *et al.* [88], puis celle d'Iribarne et Thomson [89,90], Fenn *et coll.* ont développé l'ESI comme interface pour la spectrométrie de masse [91-94].

Le principe est le suivant (*figure 19*) [95-99]: Une solution d'analyte est introduite dans un capillaire auquel est appliquée une forte différence de potentiel électrique. Ceci provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Pendant ce transport, la taille des gouttelettes diminue par évaporation du solvant et par explosions "coulombiennes" successives à la limite de Rayleigh (divisions spontanées de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites). L'application d'une pression à l'entrée du capillaire peut faciliter la nébulisation, suivant le débit utilisé et la composition du solvant. De plus, un courant d'azote est appliqué à l'interface pour aider à l'évaporation du solvant.

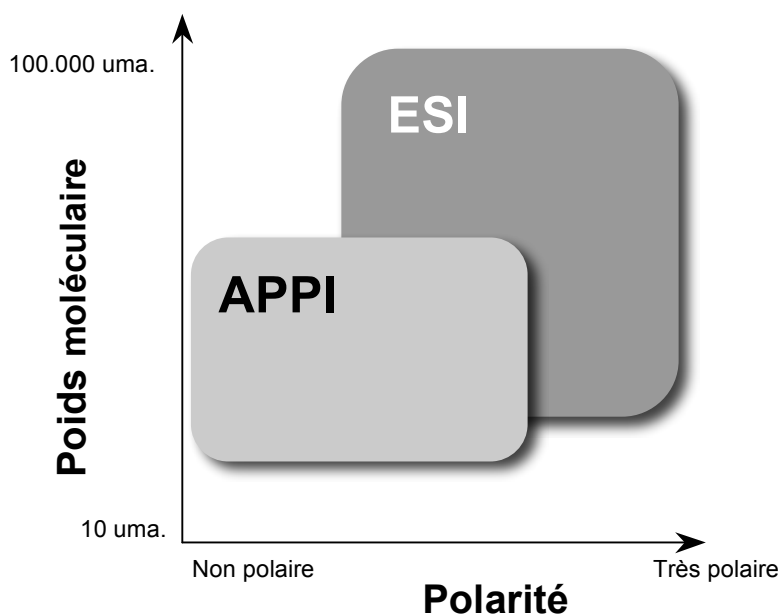
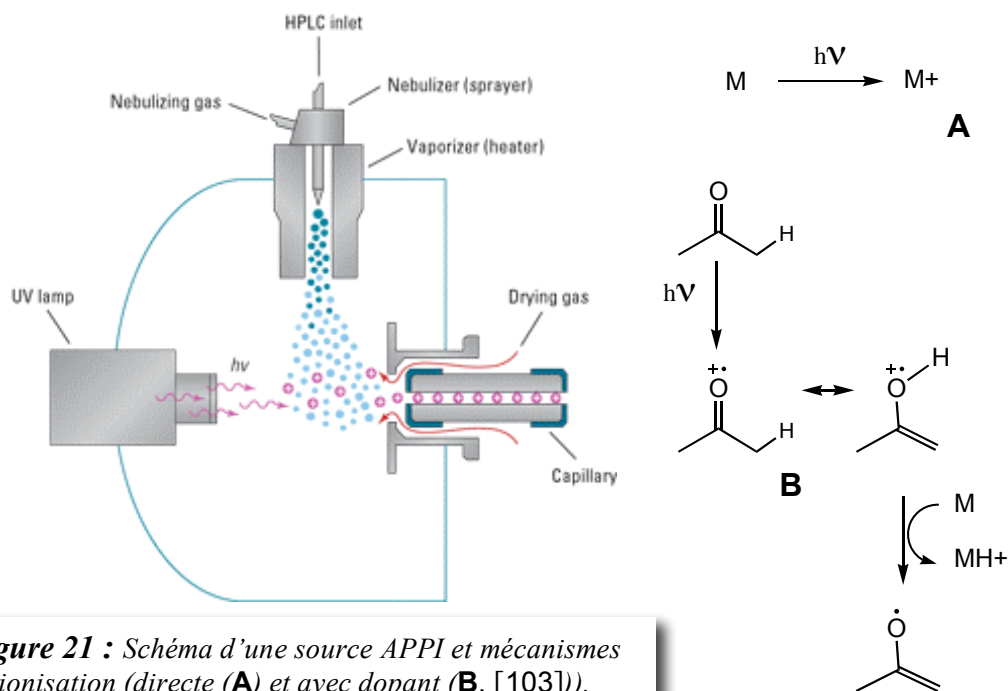


Figure 20 : Zone d'application des techniques ESI et APPI.

L'APPI est une méthode d'ionisation douce et très sensible nous permettant d'analyser des molécules moins polaires (*figure 20*) et s'appuie sur le fait que la plupart des composés organiques ont des potentiels d'ionisation (PI) entre 7 et 10 eV, tandis que la plupart des solvants ont des potentiels d'ionisation plus élevés (eau : 12.6 eV, méthanol : 10.8 eV et acétonitrile : 12.2 eV). L'usage d'une lampe à décharge (lampe UV) produisant des photons (10.0 et 10.6 eV) permet d'ioniser préférentiellement les analytes organiques par rapport aux molécules de solvants, accroissant le rapport signal/bruit.

L'efficacité d'ionisation des analytes peut être accrue par l'usage de dopants tel que l'acétone (9.70 eV) ou le toluène (8.83 eV).

L'ionisation à la pression atmosphérique génère un taux de collision élevé et permet que les photoions du dopant réagissent avec les molécules du solvant éluant et celles des analytes présents dans la chambre d'ionisation [100-102] avant de rentrer dans les analyseurs (*figure 21*).



L'analyseur comprend une trappe ionique quadrupolaire constituée de trois électrodes hyperboliques : une électrode circulaire, une calotte d'entrée et une calotte de sortie (*figure 22A*, [104,105]). La surface interne de l'ensemble de ces trois électrodes forment une structure tridimensionnelle hyperbolique qui permettra, sous l'application d'une différence de potentiel oscillatoire, de créer un champs quadripolaire à trois dimensions et d'accumuler ou de libérer des ions dans une fenêtre de masse souhaitée suivant le diagramme de stabilité de Mathieu (*figures 22B et 22C*).

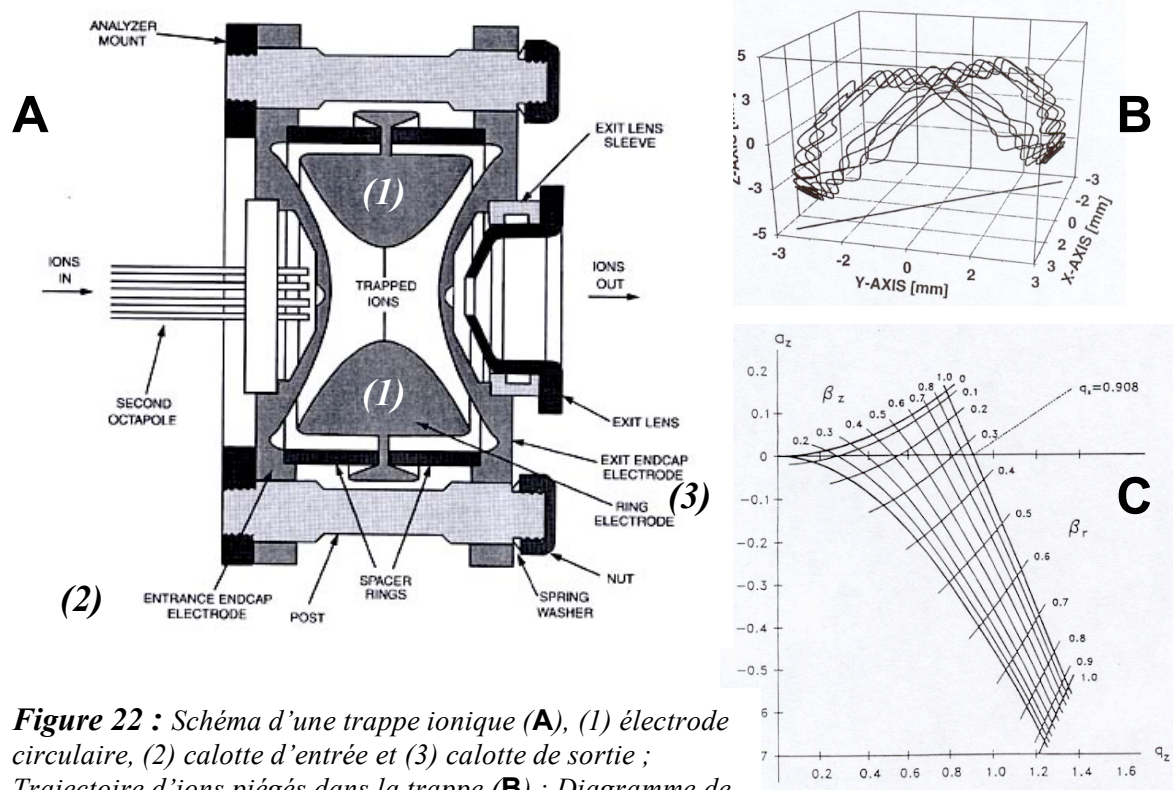


Figure 22 : Schéma d'une trappe ionique (A), (1) électrode circulaire, (2) calotte d'entrée et (3) calotte de sortie ; Trajectoire d'ions piégés dans la trappe (B) ; Diagramme de Mathieu (C), [105].

Le système de détection des ions comporte deux principaux éléments. La dynode et le multiplicateur d'électrons (*figure 23A*). Un ion issu de l'analyseur est dirigé vers la dynode et génère à son contact l'émission de plusieurs particules secondaires (ions, électrons et particules neutres). Ces particules secondaires sont focalisées du fait de la surface concave de la dynode et accélérées par une différence de potentiel vers le multiplicateur d'électrons.

L'impact des particules secondaires sur la paroi interne de la cathode du multiplicateur électronique provoque l'éjection des électrons.

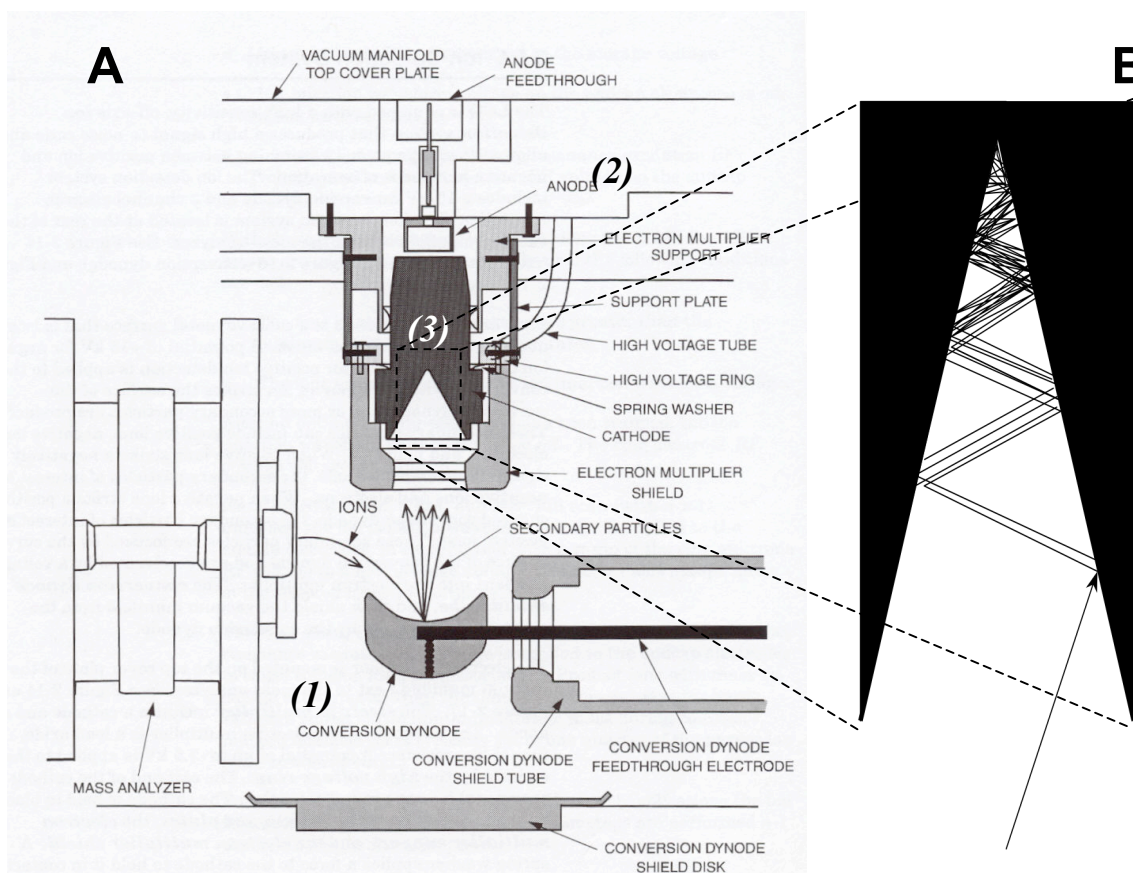


Figure 23 : Schéma d'un détecteur ionique en sortie d'analyseur (A): dynode (1) et multiplicateur d'électrons. Le multiplicateur est constitué d'une anode (2) et d'une cathode (3). Cascade d'électrons produite dans la cathode à partir d'une particule secondaire issue de la dynode (B).

La forme de la cathode et une différence de potentiel permettent l'émission d'une cascade d'électrons (*figure 23B*), à partir des particules secondaires incidentes, produisant un courant électrique mesurable collecté par l'anode (*figure 23A*). Ce courant est ensuite transformé par un électromètre en différence de potentiel, qui sera enregistrée comme signal par le système informatique.

Spectromètres de masse à trappe ionique utilisés au cours de la thèse :

- ESI-MS, Finnigan Mat LCQ, San Jose, Californie, USA.
- ESI-MS ou APPI-MS Agilent, modèle 1100 series LC/MSD Trap.

IV-3-1 Méthodes HPLC-UV.

Appareil chromatographique Agilent 1100 series, autosampler (G1313A), pompes binaires (G1312A), compartiment colonne thermostaté à 30°C (G1316A), détecteur à barrettes diode (G1315A).

IV-3-1-1 Système HPLC-UV "polyphénols totaux".

Colonne Nucleosil, RP-18, 250.0x4.6 mm, 7µm. Solvant A : Eau/Méthanol/acide acétique, 9/1/0.005, v/v/v ; solvant B : Méthanol 100%. 100% de A pendant 5 min, de 100 à 70% de A sur 10 min, de 70 à 65% de A sur 15 min, de 65 à 50% de A sur 5 min, 50% de A pendant 5 min, de 50 à 20% de A sur 10 min, 20% de A durant 20 min. Flux de 1 ml.min⁻¹. λ (nm) : 280, 307 et 320.

Utilisation de catéchine et épicatechine témoins (Sigma-Aldrich).

IV-3-1-2 Système HPLC-UV "stilbènes".

Colonne Lichrospher, RP-18, 250.0x4.0 mm, 5 μ m. Solvant A : Eau/Acétonitrile, 8/2, v/v. Solvant B : Acétonitrile 100%. 100% de A pendant 1 min, de 100 à 25% de A sur 29 min, de 25 à 0% de A sur 2 min, 3 min en isocratique à 0% et de 0 à 100% de A sur 1 min. Flux de 1 ml.min⁻¹. λ (nm) : 280, 307 et 320.

IV-3-2 Spectroscopie de Masse couplée à la chromatographie liquide (LC-MS).

Paramètres d'ionisation ESI-MS, (Finnigan Mat LCQ) : mode négatif (120-1000 m/z), Energie de collision : 20-40%, (Pulvérisation : 75 arb (65 psi), 4.1 kV, température du capillaire : 210°C).

Paramètres d'ionisation ESI-MS (Agilent) : mode négatif, pression du gaz pulvérisateur : 45 psi ; flux du gaz séchant (N₂): 8 L.min⁻¹ ; température du gaz séchant (N₂): 300°C ; différence de potentiel sur le capillaire : 3 kV.

Paramètres d'ionisation APPI-MS (Agilent) : mode négatif, pression du gaz pulvérisateur : 60 psi ; flux du gaz séchant (N₂): 5 L.min⁻¹ ; température du gaz séchant (N₂): 300°C ; température de la chambre d'ionisation : 400°C ; dopant : acétone à 100 μ L.min⁻¹ ; différence de potentiel sur le capillaire : 2 kV ; skimmer 1 : -40 V ; skimmer 2 : 5 V ; voltage en sortie de capillaire : -160 V ; Temps d'accumulation max dans la trappe : 150 ms.

IV-4 Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)*.

La RMN des noyaux ^1H et ^{13}C est déterminante pour l'élucidation de nouvelles structures en phytochimie. Les principes physiques reposent sur l'existence dans certains noyaux atomiques d'un *moment de spin* (impulsion de rotation propre) \mathbf{p} et, par la suite, un *moment magnétique* $\mu = \gamma \times \mathbf{p}$. D'après la théorie quantique :

$$\mathbf{p} = (I(I+1))^{1/2} \cdot h/(2\pi) \quad \text{et} \quad \mu = \gamma \cdot (I(I+1))^{1/2} \cdot h/(2\pi)$$

h , constante de Planck

I est le *nombre quantique d'impulsion de rotation* ou le *nombre quantique de spin* d'un noyau atomique et peut prendre des valeurs entières, demi-entières ou nulles ($I = 0, 1/2, 1, 3/2, 2, 5/2, \dots$).

Dans un champs magnétique statique homogène \mathbf{B}_0 , le vecteur moment de spin \mathbf{p} prend un certain angle par rapport au vecteur \mathbf{B}_0 (quantification de la direction). Dans ces conditions, la composante de \mathbf{p} dans la composante du champ s'élève à :

$$p_B = m \cdot h/(2\pi)$$

Le *nombre quantique d'orientation* ou le *nombre quantique magnétique* m vaut alors : $m = +I, I - 1, I - 2, \dots, -I + 1, -I$.

Les états stationnaires ou propres d'un noyau, au nombre total possible de $2I + 1$, sont énergétiquement séparés. Ces niveaux nucléaires, dits de Zeeman, ont l'énergie :

$$E_m = -\mu_B \cdot \mathbf{B}_0 = -\gamma \cdot p_B \cdot \mathbf{B}_0 = \gamma \cdot m \cdot h/(2\pi) \cdot \mathbf{B}_0$$

$$\text{où } m = +I, \dots, -I$$

* Hesse M., Meier H. and Zeeh B., 1997. *Méthodes spectroscopiques pour la chimie organique*, (traduit de l'allemand par SFez J.), édition Masson.

IV- Matériel et Méthodes.

Pour le noyau d'hydrogène (le proton), $I = 1/2$ et par la suite $m = \pm 1/2$. Nous obtenons alors le schéma des niveaux d'énergie reproduit à la *figure 24*. Dans l'état d'énergie le plus bas, μ précède \mathbf{B}_0 avec la fréquence de Larmor $\nu_0 = |\gamma| \cdot \mathbf{B}_0 / 2\pi$. Dans l'état d'énergie le plus élevé, μ s'oriente à l'opposé selon $-\mathbf{B}_0$ (si l'on définit E_m selon des valeurs positives, on doit alors permuter les nombres quantiques magnétiques m sur la *figure 24*).

A l'équilibre thermique, les noyaux ^1H suivent la distribution de Boltzmann. Comme la différence d'énergie $\Delta E = \gamma \cdot h/(2\pi) \cdot \mathbf{B}_0$ est très petite en comparaison de l'énergie thermique moyenne, l'état le plus bas d'énergie n'est plus fortement occupé que de manière insignifiante. Le rapport d'occupation de l'état fondamental et de l'état excité est :

$$N_{\text{upper}} / N_{\text{lower}} = N_{(m=-1/2)} / N_{(m=+1/2)} = e^{-\Delta E / (k T)}$$

k, constante de Boltzmann

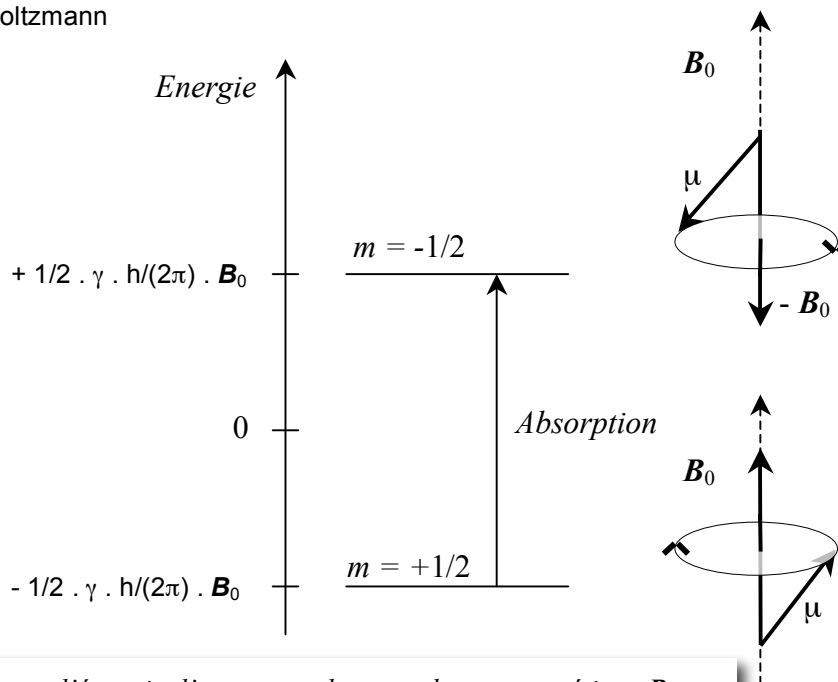


Figure 24 : Niveau d'énergie d'un proton dans un champ magnétique \mathbf{B}_0 .

Les quantas d'énergie irradiés s'élevant à ΔE produisent une inversion de spin. En raison de la différence d'occupation, l'absorption A est dominante. Nous obtenons comme condition de résonance :

$$h\nu = \Delta E = \gamma \cdot h / (2\pi) \cdot B_0 \quad \leftrightarrow \quad \nu = \gamma / (2\pi) \cdot B_0$$

La *fréquence de résonance* pour les protons $\nu = f(B_0)$ se situe pour un champ magnétique de 1.4 tesla (T), à 60 MHz. Lorsque la condition de résonance est remplie, l'absorption supprime la différence d'occupation des deux niveaux nucléaires de Zeeman. On dit que le système est saturé lorsque la *relaxation*, processus de retour, ne s'effectue pas dans des proportions suffisantes.

L'énergie libérée par la transition d'un noyau d'énergétique plus élevé vers un niveau d'énergie plus profond peut être restituée à l'environnement sous forme de chaleur (*relaxation spin-réseau*). Ce processus s'effectue avec une constante de vitesse $1/T_1$. On appelle T_1 le *temps de relaxation longitudinale* parce que, pendant ce temps, la magnétisation des noyaux est modifiée dans la direction du champ. En raison de l'interaction des moments nucléaires entre eux, la magnétisation transversale se modifie dans le temps (*relaxation spin-spin*). Le temps pendant lequel celle-ci s'effectue s'appelle un *temps de relaxation transversale* T_2 .

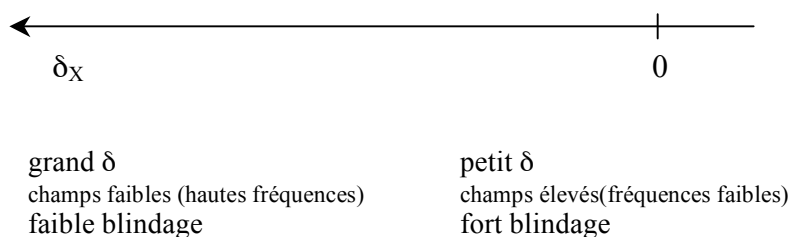
La fréquence de résonance d'une espèce donnée de noyau dépend, de façon caractéristique, de l'environnement nucléaire.

Pour déterminer la position d'un signal RMN, on définit le *déplacement chimique* (δ , chemical shift) d'un noyau X par la valeur numérique : $\delta(X) = 10^6 \cdot \Delta\gamma / \gamma$ où $\delta(\text{composé de référence, tétraméthylsilane, TMS}) = 0$. δ est une grandeur adimensionnelle, indépendante de la fréquence de mesure et caractéristique du

noyau considéré dans son environnement.

A la fréquence de mesure ν , la différence des positions des signaux d'un noyau X étudié et du TMS s'obtient par $\Delta\nu = \nu(X) - \nu(\text{TMS}) = \gamma / (2\pi) \cdot \Delta B$.

Puisque $\Delta\nu$ est très petit devant ν , on a introduit le facteur 10^6 et on exprime δ en ppm (parties par million). L'amplitude de l'échelle s'élève à environ 10 ppm pour la RMN du proton et 200 ppm pour la RMN du ^{13}C .



La sensibilité de δ par rapport aux modifications dans l'environnement des noyaux mesurés est déterminante pour expliciter les structures des composés organiques : la *constante d'écran*, qui détermine la position de résonance, se divisant en trois composantes.

$$\sigma = \sigma_{\text{dia}} + \sigma_{\text{para}} + \sigma'$$

σ_{dia} , *composante diamagnétique*, se rapporte au champ induit par B_0 dans le nuage électronique du noyau considéré ; σ_{para} , terme paramagnétique, correspond à l'excitation des électrons p dans le champ magnétique ; le terme σ' traduit l'influence des groupements voisins qui peuvent augmenter ou affaiblir le champ autour du noyau.

Les nuages électroniques d'un noyau et de ses voisins directs font écran au champ magnétique extérieur B_0 . Si l'on considère une liaison liant le proton à un élément X, le blindage du proton diminuera avec l'augmentation de l'électronégativité de X et l'absorption est déplacée vers les champs faibles.

Le nombre de signaux de RMN se produisant dans un spectre est déterminé par la symétrie des molécules étudiées. Deux noyaux d'une molécule sont équivalents chimiquement s'ils sont convertis l'un l'autre par une opération de symétrie applicable à la molécule ou s'ils deviennent identiques dans le temps par mobilité intramoléculaire rapide. Plus la symétrie est grande, plus le nombre de signaux est petit.

Les spectres de RMN sont habituellement pris en solution dans un solvant dépourvu de protons. La *figure 25* présente le montage d'un spectromètre de RMN. Le champ magnétique créé doit être le plus homogène possible. Cela produit une distribution de niveaux de Zeeman proportionnelle à B_0 . L'échantillon se trouve situé entre les deux pôles, dans un tube de mesure qui tourne autour de son axe longitudinal. Les inhomogénéités de champ horizontales sont ainsi éliminées.

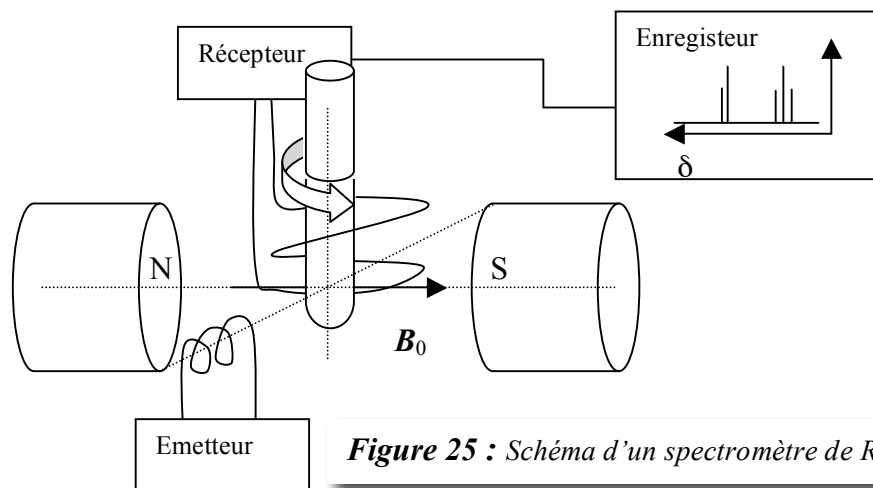


Figure 25 : Schéma d'un spectromètre de RMN.

Les analyses ont été mesurées à l'aide des spectromètres RMN Bruker (^1H , 400 MHz et ^{13}C , 100MHz) et Varian (^1H , 200 MHz). Les expériences utilisées sont les suivantes (voir **glossaire et abbréviations**, p. 11) : ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, ^1H - ^1H -COSY, DEPT 135, ^1H - ^{13}C -HSQC et ^1H - ^{13}C -HMBC.

IV-5 Spectroscopie de Masse couplée la chromatographie en phase gazeuse (GC-MS).

Chromatographe en phase gazeuse TraceGC (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) couplé à un spectromètre de masse muni d'une source d'ionisation à Impact Electronique (EI, -70 eV, 200°C, trappe ionique quadrupolaire Polaris Q, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA). Colonne OV-1, (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm), température injecteur : 220°C, gaz vecteur : Hélium, split : 1.5 ml.min⁻¹.

Programme 1 : 60°C, 1 min ; 10°C.min⁻¹ ; 250°C, 60 min.

Programme 2 : 40°C, 1 min ; 2°C.min⁻¹ ; 50°C, 1 min ; 20°C.min⁻¹ ; 250°C, 60 min.

IV-6 Microscopie optique et biotests.

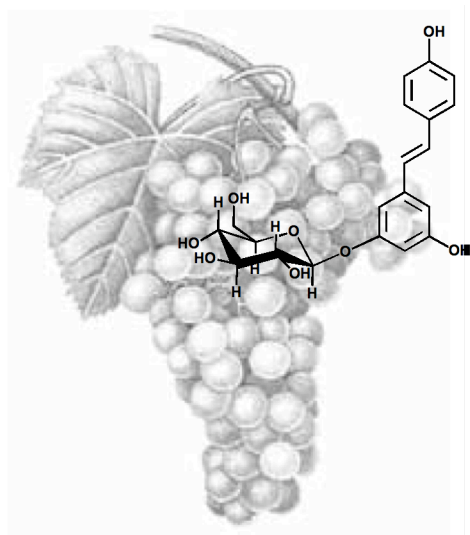
Une goutte de suspension de sporanges (10⁵ sporanges/ml) est déposée sur une lamelle. Les suspensions de sporanges sont traitées avec différentes solutions (1%, v/v) de stilbènes ou dérivés stilbéniques. Le comptage des zoospores mobiles est opéré sur une période d'observation d'1 minute et sur une surface de 0.11 mm² (Leica-Leitz, grossissement 600x), suivant la méthode utilisée par Pezet *et al.*, [122]. Chaque solution est testée sur les suspensions de sporanges suivant trois répétitions.

Dans la partie **V-2-6**, deux expériences conduisant à l'étude de l'inhibition de la motilité des zoospores de *P. viticola* par des stilbènes isolés des sarments de la vigne, ont été menées de manière indépendante à l'aide de deux suspensions de sporanges différentes : usage d'une 1^{ère} suspension de zoospores pour le

IV- Matériel et Méthodes.

mélange **TT2-TT2'** et l' ϵ -viniférine, puis d'une 2nde suspension pour la vitisine A et l'hopéaphénol. La suspension de la 2^{ème} expérience était deux fois plus concentrée en zoospores que celle utilisée pour la 1^{ère}.

V- RÉSULTATS & DISCUSSION.



V-1 Identification de polyphénols et des phytolalexines de la vigne (Chasselas et Solaris, *V. vinifera*).

Identification de la *trans*- δ -viniférine :

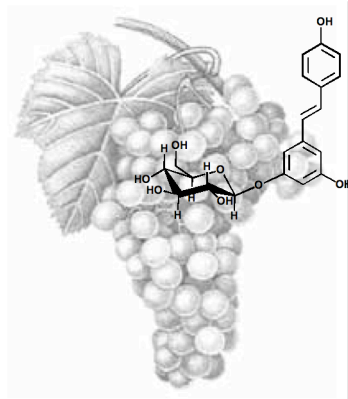
Jean-Denis J.B., Pezet R. and Tabacchi R., 2005. Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew infected grapevine leaves by LC-APPI-MSⁿ. *J. Chromatogr. A*, accepted.

Pezet R., Perret C., Jean-Denis J.B., Tabacchi R., Gindro K. and Viret O., 2003. δ -viniferin, a resveratrol dehydrodimer : one of the major stilbenes synthesised by stressed grapevine leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5488-5492.

Collaboration du laboratoire de biochimie végétale



Hamiduzzaman M.M., Jean-Denis J.B., Jakab G., Tabacchi R., Neuhaus, J.-M. and Mauch-Mani B., Involvement of stilbenes in β -aminobutyric acid-induced resistance in grapevine against downy mildew (*Plasmopara viticola*), in preparation.



V- Résultats et discussion.

V-1 Identification de polyphénols et des phytoalexines de la vigne (Chasselas et Solaris, *V. vinifera*).

V-1-1 Méthode de détection des stilbènes.

Nous avons utilisé la chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse (MS) équipée de sources d'ionisation à la pression atmosphérique (API, Atmospheric Pressure Ionisation) : ESI (Electrospray ionisation) et APPI (Atmospheric Pressure Photoionisation). L'acquisition des données spectrales en mode négatif (fournissant les ions $[M-H]^-$) nous a permis d'obtenir des spectres MS avec un meilleur rapport signal/bruit par rapport au mode positif (fournissant des ions $[M+H]^+$). Nous avons préféré la photoionisation (dopant : acétone) à l'électrospray car elle génère un bruit de fond plus faible avec un seuil de détection légèrement supérieur à l'ESI pour ce qui est de la caractérisation des stilbènes (*figures 26-29*). L'ionisation des analytes à partir de l'éluant (sortie LC) est plus importante avec l'APPI plutôt qu'avec l'ESI. Ceci nous a permis de bien meilleurs résultats lors de nos expériences d'isolement et de fragmentation MS/MS au niveau de la trappe ionique. De plus, les spectres montrent beaucoup moins de signaux associés, dûs à des phénomènes d'addition ou de solvatation, aux ions des produits. L'assignation des signaux est plus facile (*figure 30*).

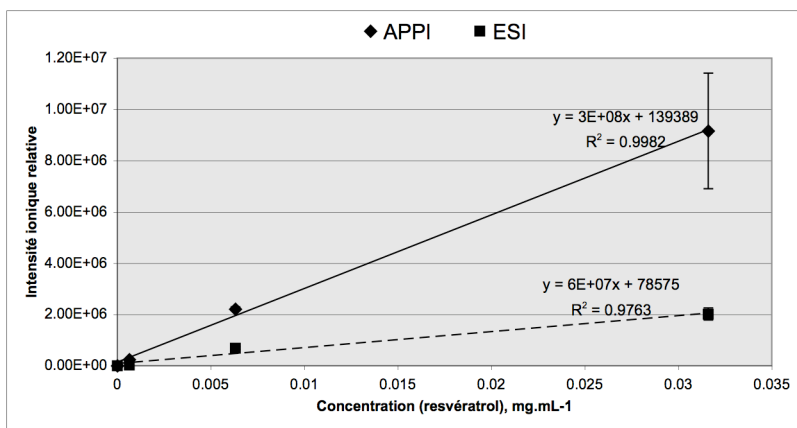


Figure 26 :
 Comparaison des courbes **linéaires** de calibration du trans-resvératrol suivant les deux types d'ionisation ESI et APPI.

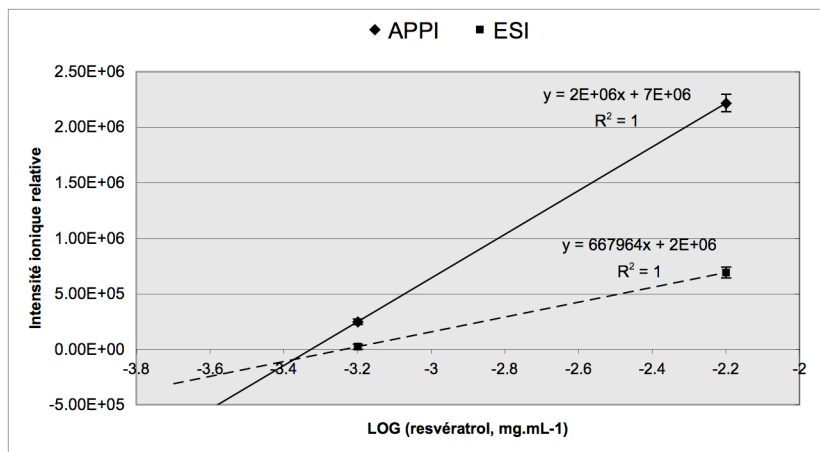


Figure 27 :
 Courbes de la calibration du trans-resvératrol suivant les deux types d'ionisation ESI et APPI. Système HPLC (programme "stilbène"): H₂O/acétonitrile. Les courbes représentent la quantité d'ions formées par rapport au Log C_{resvératrol}.

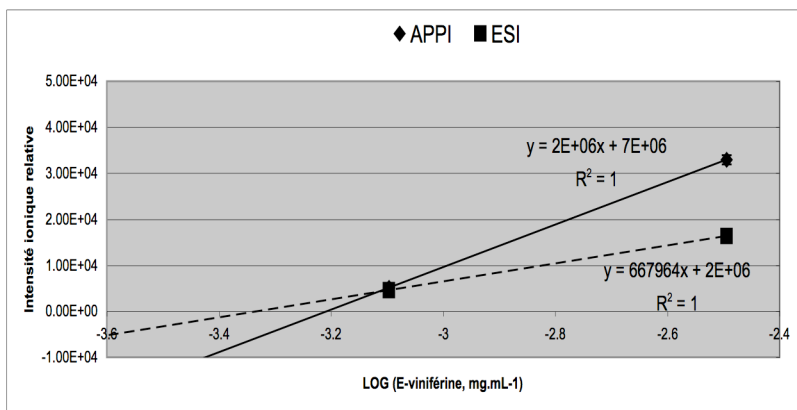


Figure 28 :
 Courbes de la calibration de l'ε-viniférine suivant les deux types de ionisation ESI et APPI. Système HPLC (programme "stilbène"): H₂O/acétonitrile. Les courbes représentent la quantité d'ions formées par rapport au Log C_{ε-viniférine}.

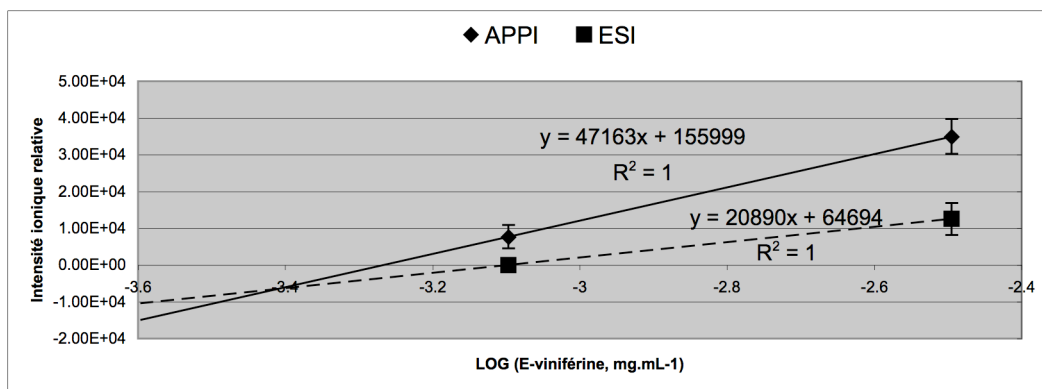


Figure 29 : Comparaison de la calibration de l' ϵ -viniférine suivant les deux types de ionisation ESI et APPI. Système HPLC (programme "stilbène"): ($H_2O+0.5\%$ acide acétique)/acétonitrile. Les courbes représentent la quantité d'ions formées par rapport au Log $C_{\epsilon\text{-viniférine}}$.

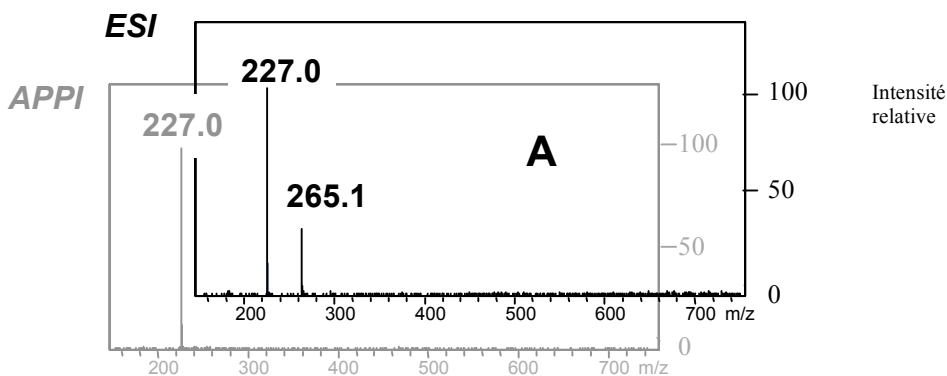
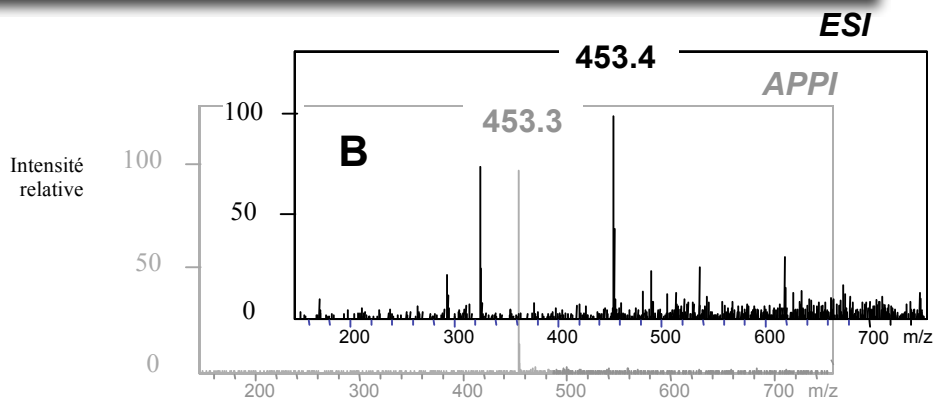


Figure 30 : Comparaison des spectres correspondant aux ions $[M - H]^-$ du resvératrol (m/z 227, **A**) et de l' ϵ -viniférine (m/z 453, **B**) obtenus par ESI et par APPI.



L'addition d'acide acétique dans la phase mobile (0.5%) peut renforcer les signaux des ions par une addition d'acétate, $[M+H_3CCOO^-]$, et de ce fait nous renseigner sur la nature et l'identité des signaux. Mais nous voyons également qu'en comparant les *figures 28 et 29*, les valeurs obtenues sont accompagnées d'un plus grand écart-type, soulignant une certaine instabilité accrue des signaux au niveau des spectres MS après l'ajout de l'acide.

Au cours d'analyses de feuilles soumises aux UV, nous avons observé pour les composés comme les lignanes (voir partie **V-1-3**), que la LC-APPI-MS offre un bruit de fond légèrement inférieur à celui enregistré pour la LC-ESI-MS (*figure 31*). Mais la sensibilité de l'APPI, pour ces mêmes composés, est jusqu'à 4 fois inférieure à celle de l'ESI (*figure 31*). Par contre, une inversion de sensibilité est remarquée pour des dimères du resvératrol induits après traitement UV de feuilles de vigne (*figure 32*). L'APPI permet une ionisation de ces stilbènes (voir partie **V-1-4-3**), jusqu'à 6 fois plus intense que celle effectuée avec la source ESI. Ceci justifie le fait que nous préférons plutôt la photoionisation à l'electrospray, afin d'analyser les dérivés du resvératrol dans nos échantillons.

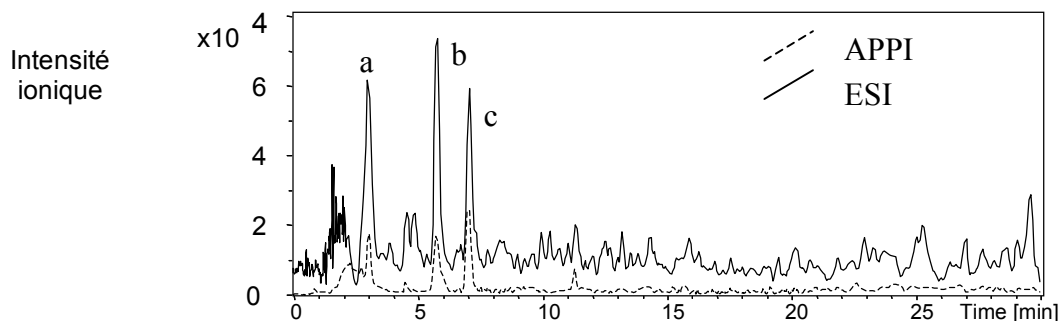


Figure 31 : Chromatogrammes d'une sélection d'ions 521 m/z (a,b) et 519 m/z (c) obtenus par LC-APPI-MS et LC-ESI-MS après induction UV de feuilles de vigne (26h à l'obscurité).

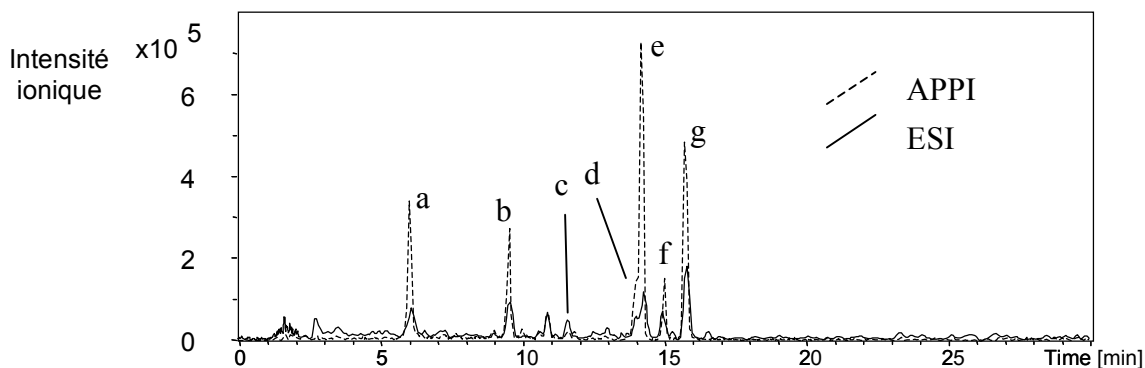


Figure 32 : Chromatogrammes d'une sélection d'ions, 471 m/z (a) et 453 m/z (b-g) obtenus par LC-APPI-MS et LC-ESI-MS après induction UV de feuilles de vigne (26h à l'obscurité).

V-1-2 Composition phénolique de la feuille de vigne.

La composition en polyphénols, des feuilles saines dans les variétés Solaris et Chasselas est très similaire (*tableau 4*). Les principaux composés sont les acides cinnamiques (*figure 33*) avec les acides *cis*- et *trans*-coutarique (14.3 et 15.5 min) et *cis*- et *trans*-caftarique (10.7 et 13.0 min), la catéchine et l'épicatéchine puis la quercétine-3-O-glucuronide (33.4 min) et la quercétine-3-O-glucoside (36.4 min) (*figure 34*). La catéchine et l'épicatéchine ont été distingués avec des standards et leur différent temps de rétention (16.6 et 19.4 min, respectivement).

Noms	R ₁	R ₂
Acide caftarique	OH	H
Acide coutarique	H	H

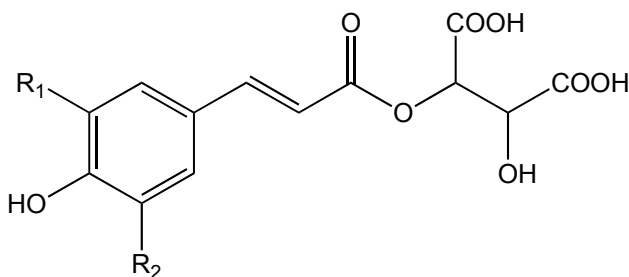


Figure 33 : Dérivés cinnamiques présents dans les feuilles de vignes.

Flavonols	R ₁	R ₂
Kaempférol	H	H
Quercétine	OH	H
Isorhamnétine	OCH ₃	H
Flavanols	R ₁	R ₂
(+)-Catéchine	OH	H
(-)-Épicatéchine	H	OH

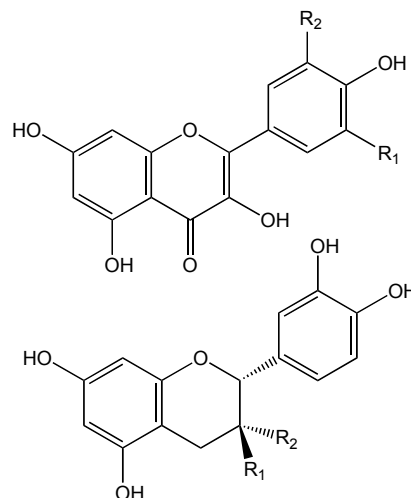


Figure 34 : Quelques flavonols et flavanols des feuilles de vignes.

Tableau 4 : Principaux composés phénoliques totaux de la feuille de Chasselas obtenu par le système HPLC-ESI-MS (LCQ) "polyphénols totaux" (Ces composés ont été identifiés par comparaison avec des standards, des données chromatographiques et MS de la littérature [107-109]). Voir figure 36.

NOMS / temps de rétention (RT)	m/z, (M-H) ⁻	Fragments MS ²
acide <i>cis</i> -caftarique / 10,7 min	311 (179)	179
acide <i>trans</i> -caftarique / 13,0 min	311 (179)	179
acide <i>cis</i> -coutarique / 14,3 min	295 (163)	163
procyanidine B1 / 15,1 min	577	451, 425, 289
acide <i>trans</i> -coutarique / 15,5 min	295 (163)	163
catéchine / 16,6 min	289	245, 205, 179
procyanidine B4 / 17,4 min	577	451, 425, 289
procyanidine B2 / 18,8 min	577	451, 425, 289
dihydrokaempférol-hexoside (trace) / 18,8 min	449	287
épicatéchine / 19,4 min	289	245, 205, 179
taxifoline-3-O-rhamnoside (trace) / 24,1 min	449	303
<i>trans</i> -picéide (trace) / 25,0 min	389 (227)	227
inconnu / 28,3 min	479 (316)	316
isorhamnétine-hexoside / 31,3 min	477	315
<i>cis</i> -picéide (trace) / 31,6 min	389 (227)	227
quercétine-3-O-glucuronide / 33,4 min	477	301
<i>trans</i> -resveratrol (trace) / 36,0 min	227	185, 159, 143
quercétine-3-O-hexoside / 36,4 min	463	301
isorhamnétine-pentoside / 37,8 min	461	315
inconnu / 38,8	447	284
kaempférol-glucuronide / 39,0 min	461	285

D'autres flavonoïdes peuvent être détectées, mais à des quantités moins importantes. C'est le cas du dihydrokaempférol hexoside (18.8 min, **figure 35**), de la taxifoline-3-O-rhamnoside (24.1 min ; [110], **figure 35**), de l'isorhamnétine-hexoside (31.3 min), de isorhamnétine-pentoside (37.8 min) et du kaempférol-glucuronide (39.0 min).

Nous pouvons aussi déceler des traces de stilbènes avec le *trans*-resvératrol (36.0 min) et deux formes glycosylées, les picéïdes de configurations *trans/cis* (25 et 31.6 min, respectivement).

Deux composés, semblant être des hexosides, sont détectables dans nos échantillons et présentent des fragments MS² paires à m/z 316 et m/z 284. (RT de 28.3 et 38.8 min, respectivement).

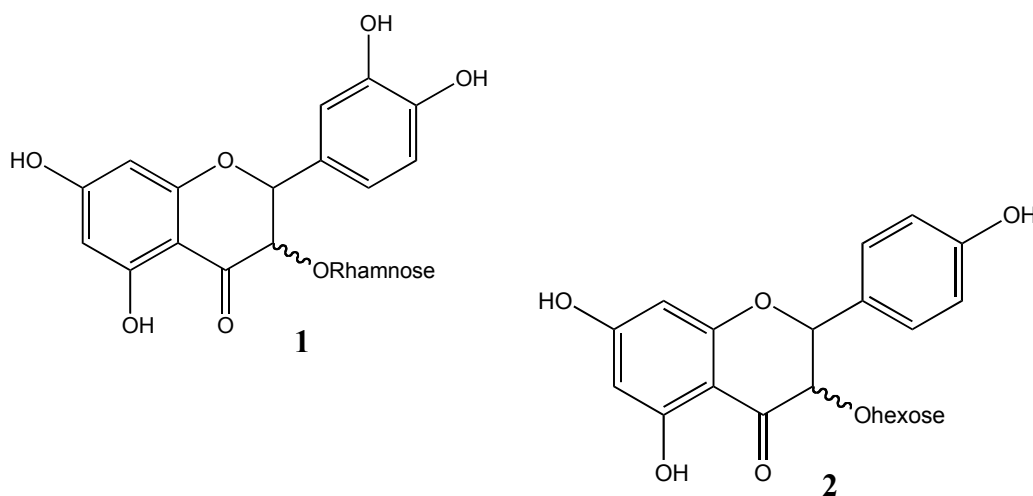


Figure 35 : Structure chimique de la taxifoline-3-O-rhamnoside (**1**) et de l'hexoside du dihydrokaempférol (**2**).

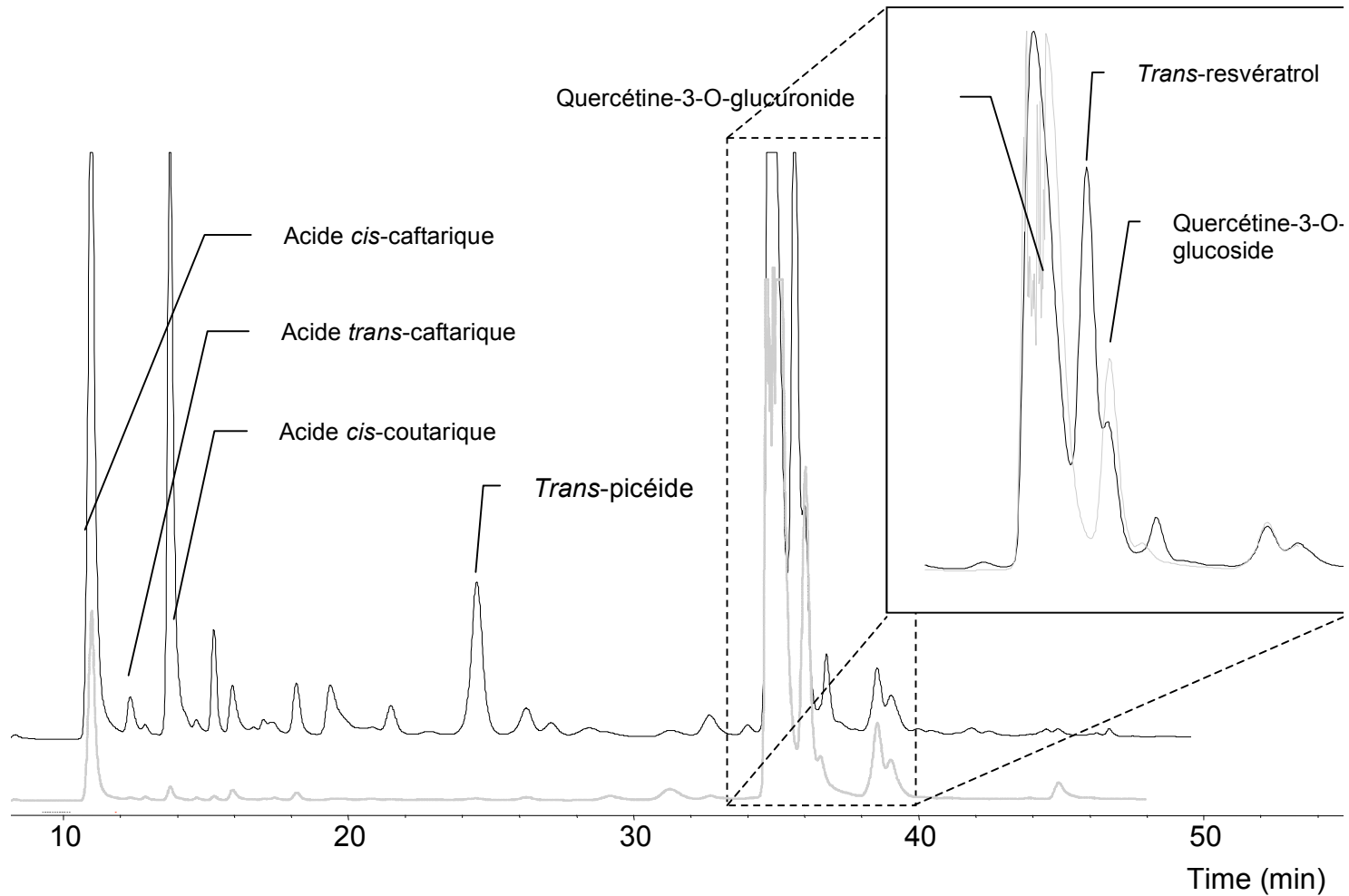


Figure 36 : Chromatogrammes UV d'extrait méthanolique de jeunes feuilles de *Solaris* infectées par *P. viticola*. 307 nm (noir) et 360 nm (gris)

L_a et L_b présentent des spectres MS et MSⁿ similaires.

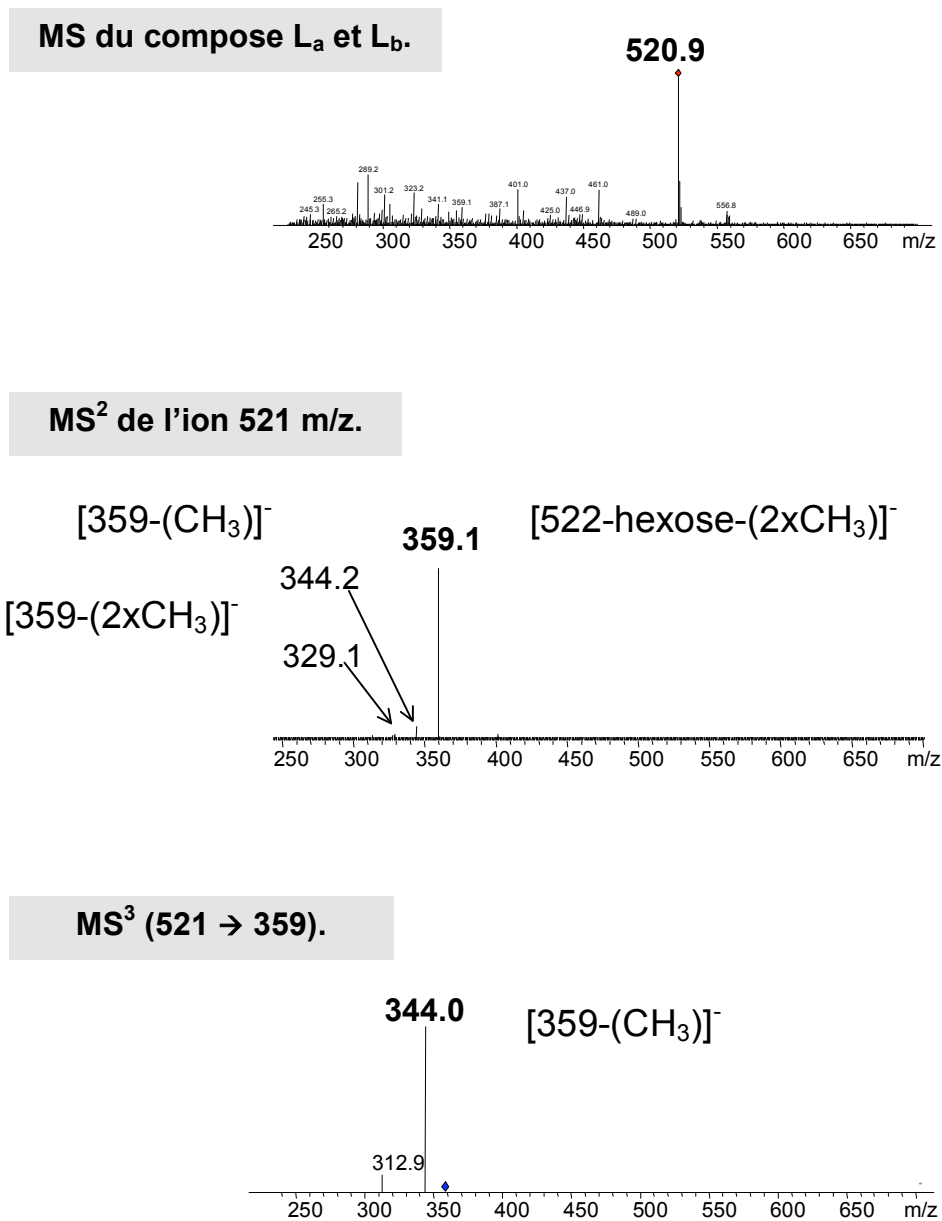
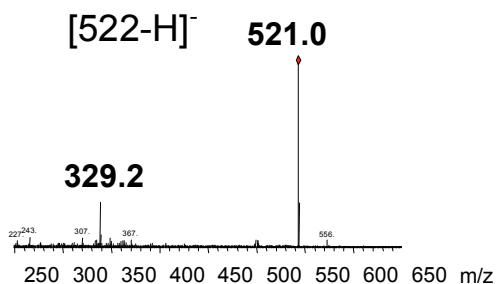


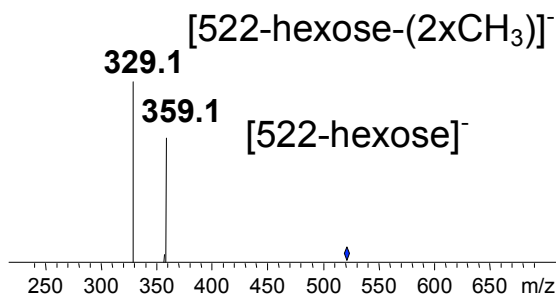
Figure 38 : Spectres MS et MSⁿ des substances L_a et L_b.

L_c a également une masse de 522 uma, mais montre une fragmentation MSⁿ différente de celle de L_a et L_b.

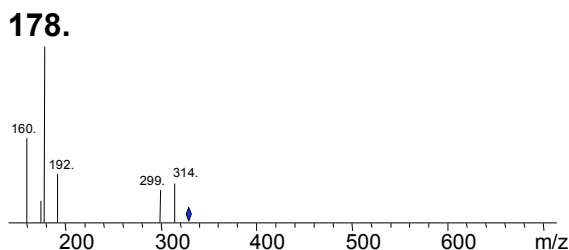
MS du composé L_c de 522 uma.



MS² de l'ion 521 m/z.

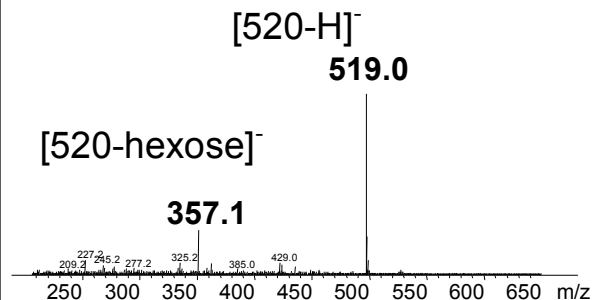


MS³ (521 → 329).



L_d est détecté avec une masse de 520 uma.

MS du composé L_d de 520 uma.



MS² de l'ion 519 m/z.

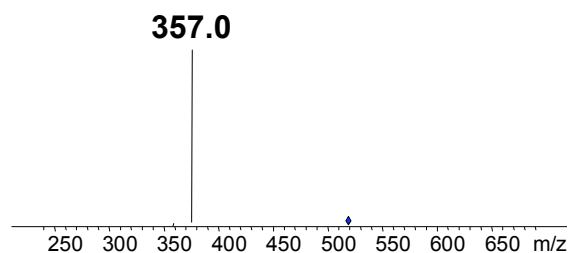


Figure 39 : Spectres MS et MSⁿ des substances L_c et L_d.

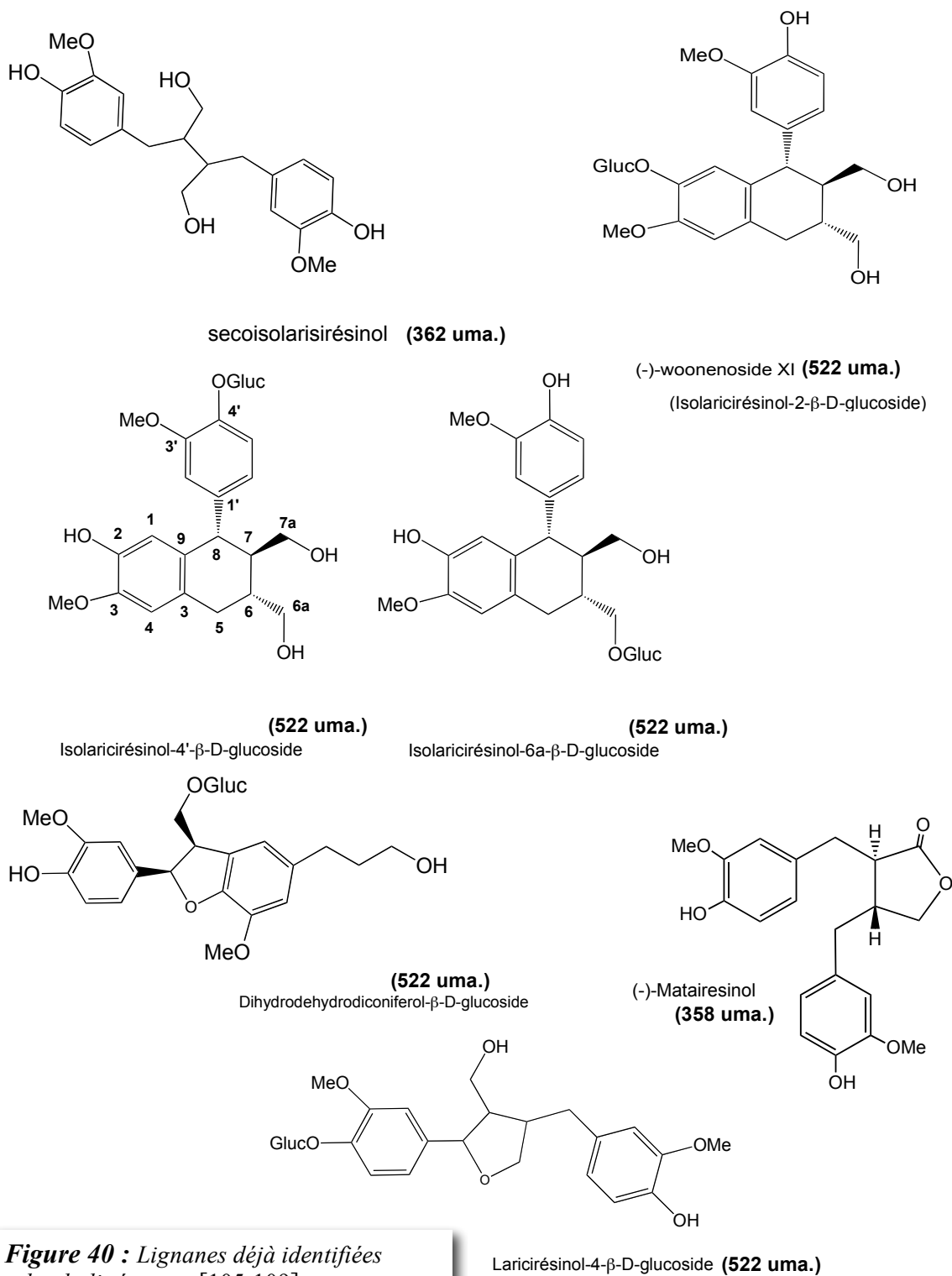


Figure 40 : Lignanes déjà identifiées selon la littérature. [105-109]

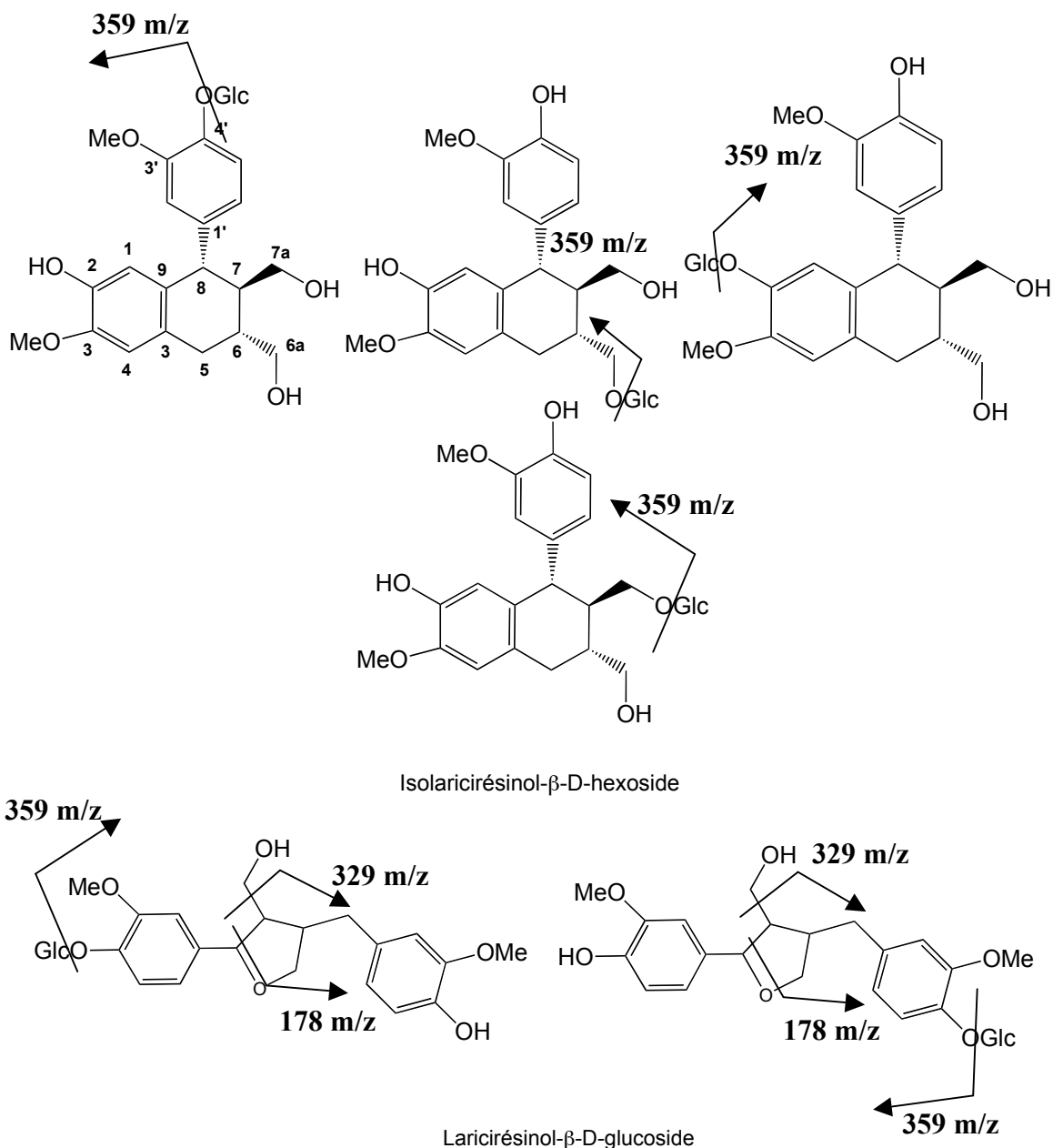


Figure 41 : Les fragmentations présentées arbitrairement sur les formes glycosylées de l'isolaricirésinol et du laricirésinol (lignanes déjà connus possédant une masse de 360 uma), générant les signaux 359, 329 et 178 m/z en mode négatif, sont vraisemblablement celles qui apparaissent dans les molécules L_a , L_b , et L_c en accord avec Marinos et al. [114].

Les composés L_a et L_b sont sans doute des isomères de structures de masse 522 uma. Les spectres MS (*figure 38*) montrent des fragments relatifs aux pertes de leurs groupes méthyles. Ils ont probablement le même aglycone, mais le site de glucosylation doit être différent.

L_c (522 uma, *figure 39*) présente une fragmentation MS^2 différente de celles de L_a et L_b , libérant un fragment 329 m/z, $[M-H-CH_2O]^-$. La structure de L_c doit être différente de celle de L_a et L_b , bien qu'il soit probable qu'il contienne aussi deux groupes méthyles ou méthoxyles.

L_d présenterait un aglycone de 358 uma (*figure 39*).

Des composés qui correspondraient à ces substances que nous tentons d'identifier sont connus dans la nature : les lignanes et néolignanes. La *figure 40* présente quelques-uns d'entre eux qui ont déjà été identifiés dans le vin et des parties anatomiques de la vigne, dont les masses correspondraient avec celles caractérisées par la méthode LC-MS.

En effet, Marinos *et al.* [114] ont montré que des vins de cépages blancs contiennent des lignanes et ont identifié pour la première fois l'isolaricirésinol- β -4'-O-glucoside (522 uma, ions fils en mode positif : 361 et 237 m/z) et le β -hexoside de la seco-isolaricirésinol (524 uma, ions fils en mode positif : 363, 345, 331 m/z $[M+H-CH_2O]^+$) (*figure 41*). Également dans le vin blanc, d'autres composés (522 uma) ont été identifiés : dihydrodehydrodiconiférol- β -D-glucoside, laricirésinol-4- β -O-D-glucoside, isolaricirésinol- β -6a-O-glucoside ([115], *figure 40*).

En accord avec ces dernières données, nos résultats nous permettent de supposer que les composés L_a et L_b correspondraient à des hexosides d'isolaricirésinol, tandis que L_c correspondrait plutôt à un hexoside de laricirésinol. Le signal du composé L_d détecté à 519 m/z pourrait correspondre à

la forme glycosylée du matairesinol (358 uma, *figure 40*), lignane connue comme un phytoestrogène non-stéroïde présente dans certains aliments dont le raisin [116-118].

V-1-3-2 Accumulation de lignanes.

A notre connaissance, la présence de lignanes dans les feuilles de vigne n'est pas reportée dans la littérature. Par nos analyses LC-MS, nous révélons, d'une part la présence constitutive de lignanes glycosylées et d'autre part leur induction en cas d'infection par le mildiou au sein de la feuille.

Suivant leur accumulation ionique (MS), l'induction est vérifiée seulement sur les feuilles de Chasselas traitée par l'acide β -aminobutyrique (BABA), mais aucune variation n'est observée dans les feuilles de Solaris (*figure 42*).

V-1-4 Identification de phytoalexines.

Von Rudolff et Jorgensen [119] proposent la voie de biosynthèse de la pinosylvine et de ses dérivés après les avoir mis en évidence dans les pins (*Pinus resinosa* AIT). Dans la vigne, Langcake et Pryce [33] mettent en évidence des phytoalexines du type stilbène, puis suggèrent qu'ils sont impliqués dans le processus de défense. Grâce à l'utilisation de la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS), nous avons pu détecter et tenter d'identifier un certain nombre de composés qui nous étaient inconnus. La méthode utilisée (voir parties V-4-2 et V-5) nous a permis de mettre en évidence au moins 8 nouveaux dérivés de resvératrol induits dans les feuilles de vigne (*figure 43*). Quatre ont été identifiés durant nos travaux, la *trans*- δ -viniférine, le δ -viniférinol, le *trans*- δ -resvépterol, ainsi que le *trans*- ϵ -resvépterol. Les structures du δ -viniférinol et d'autres molécules dérivées du resvératrol, restent en suspens.

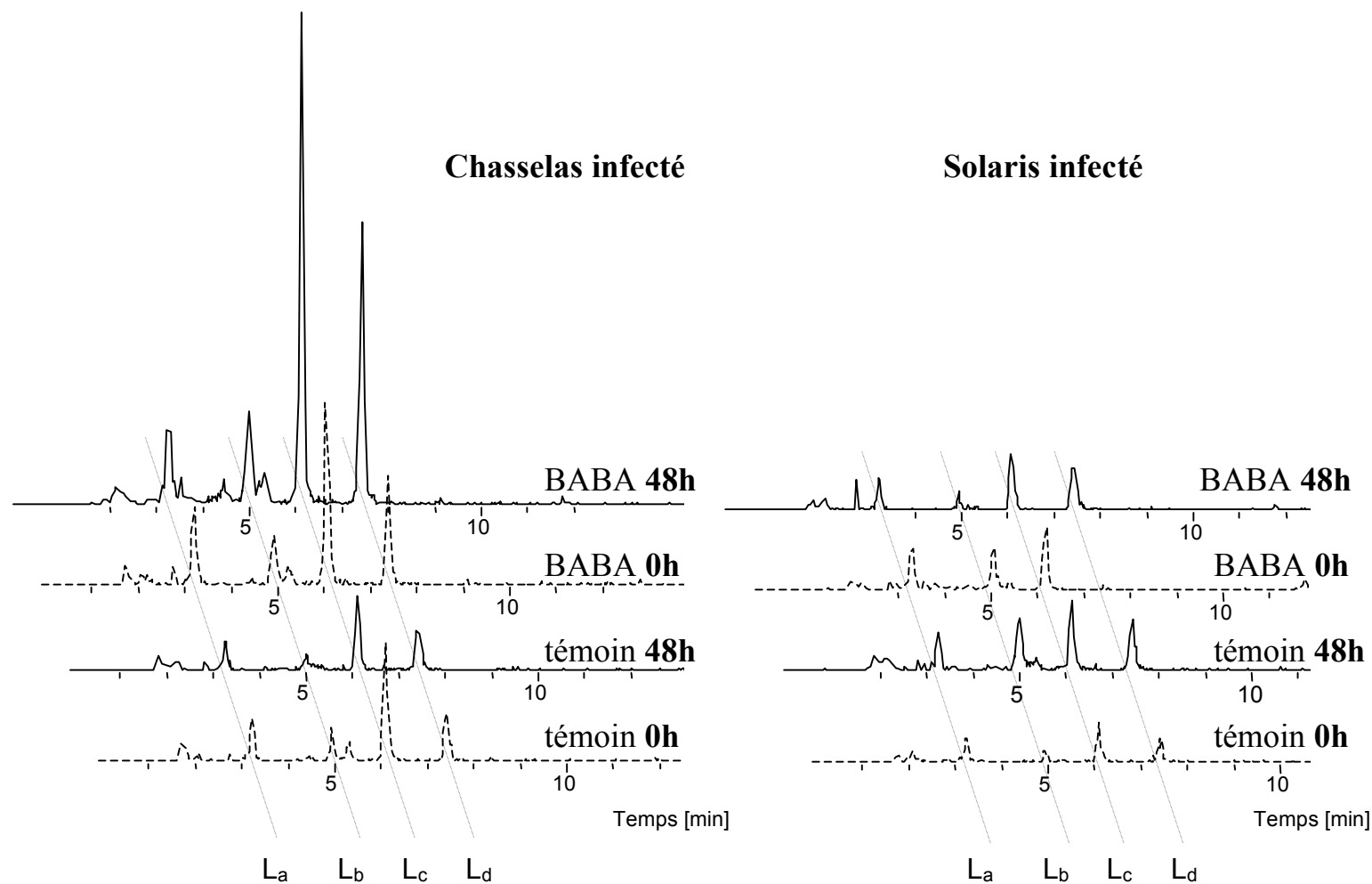


Figure 42 : Profils ioniques des ions correspondants aux signaux 519 et 521 m/z , suspectés d'être associés à des lignanes, dans différentes conditions de prétraitement avant infection de feuilles de Chasselas et de Solaris par *P. viticola*; prétraitement avec une solution aqueuse de BABA ou sans BABA (témoin). Les temps d'échantillonnage après inoculation sont 0 ou 48h.

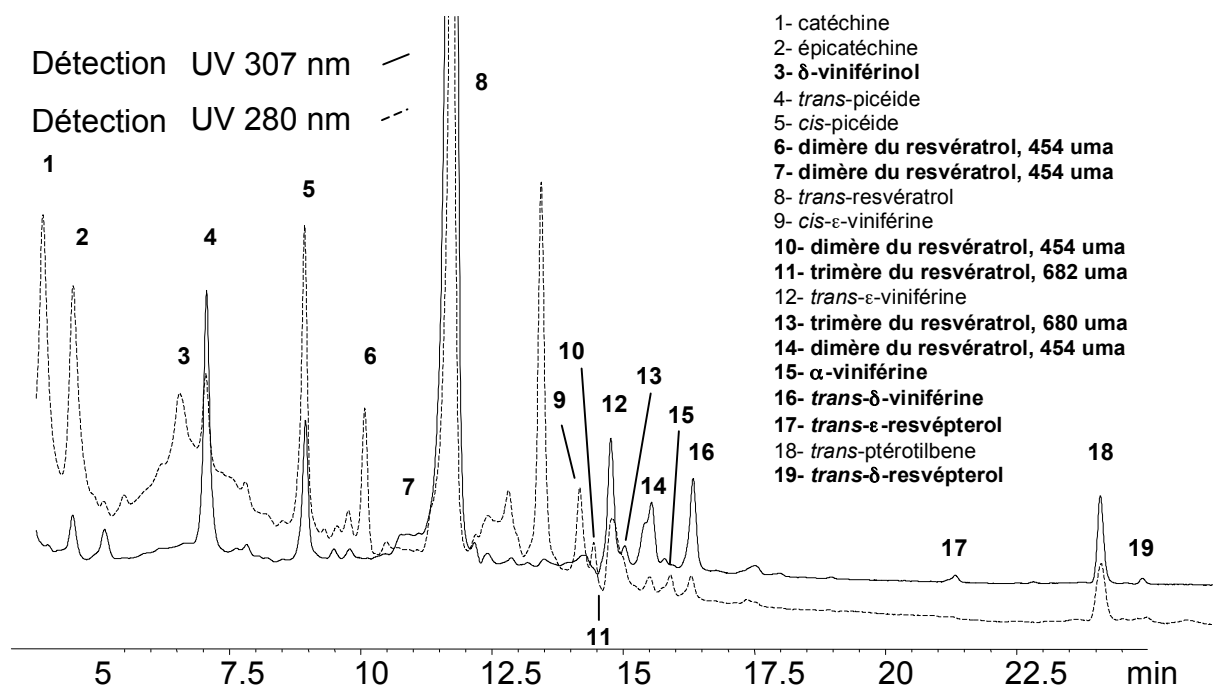


Figure 43 : Profil chromatographique UV (280 et 307 nm) d'extrait méthanolique de feuille de vigne infectée par *P. viticola*.

Ces composés ont été détectés dans un système hôte-pathogène et le fait que *P. viticola* soit un parasite obligatoire nous empêche de le cultiver *in vitro*. Il peut nous être difficile de déterminer l'origine d'un composé car quatre cas de figure peuvent s'observer :

- métabolites provenant du pathogène ;
- métabolites provenant de la plante ;
- métabolites provenant du pathogène et métabolisés par la plante ;
- métabolites provenant de la plante et métabolisés par le pathogène.

Afin de distinguer la biosynthèse de la plante de celle du pathogène, nous nous intéresserons en particulier à l'induction des métabolites de la plante par un traitement abiotique (irradiation UV, induction chimique) (*tableau 5*).

V-1-4-1 Accumulation de resvératrol et dérivés monomériques.

Les feuilles de Chasselas et de Solaris infectés par *P. viticola* ou exposés à des radiations UV accumulent le *trans*-resvératrol sous différentes formes (*tableau 5*). Le resvératrol monomérique peut être détecté à l'état *cis/trans* libre, *cis/trans* glycosylées (dont font partie les picéides) et méthoxylé (*trans*-ptérostilbène).

Tableau 5 : Accumulation des différentes formes de resvératrol monomériques dans les feuilles de Chasselas et Solaris ayant subi des stress biotiques et abiotiques.

	Chasselas		Solaris	
	Traitement UV	Infection*	Traitement UV	Infection*
<i>trans</i> -resvératrol	+++++	+	n.d.	+++++
<i>cis</i> -resvératrol	-	-	n.d.	-
<i>trans</i> -picéide	++	++	n.d.	+
<i>cis</i> -picéide	-	+++	n.d.	++
<i>trans</i> -pterostilbène	-	++	n.d.	-

* infection artificielle par *P. viticola*.

n.d., non déterminé

-, absence

+, accumulation

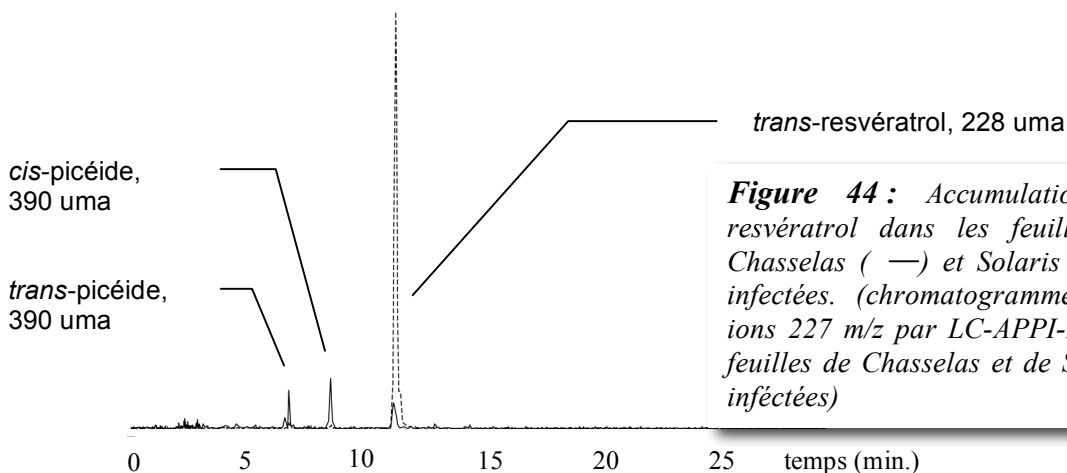


Figure 44 : Accumulation de resvératrol dans les feuilles de Chasselas (—) et Solaris (---) infectées. (chromatogrammes des ions 227 m/z par LC-APPI-MS de feuilles de Chasselas et de Solaris infectées)

Bien que le resvératrol s'accumule dans les feuilles de Chasselas et de Solaris (parties nécrosées) infectées, ce phénomène est beaucoup plus important dans la variété résistante (*tableau 5 et figure 44*). Les radiations UV induisent également l'accumulation de resvératrol dans les feuilles, mais nous ne détectons pas de *trans*-pterostilbène en réponse aux UV, contrairement aux résultats des expériences menées par Douillet-Breuil *et al.* [120] sur trois variétés de *V. vinifera*. Par contre, nous retrouvons du *trans*-pterostilbène dans les feuilles de Chasselas infectées par *P. viticola* en des quantités non négligeables.

Les deux types de stress appliqués aux feuilles influent d'une manière différente sur l'accumulation des picéides, *cis* et *trans*-resvératrol-3-O- β -D-glucoside (*tableau 5, figures 44-47*). Ceci pourrait correspondre à un moyen de stockage du resvératrol dans les cellules foliaires [121,122].

En effet, nous nous apercevons que la *cis*-picéide est absente lors des traitements UV, selon que nous appliquons un stress physique ou un stress biologique aux feuilles de Chasselas (*tableau 5*).

Le resvératrol est connu pour sa faible activité anti-fongique. Il serait, dans la vigne, un précurseur d'autres stilbènes beaucoup plus toxiques [34,47], comme les viniférines.

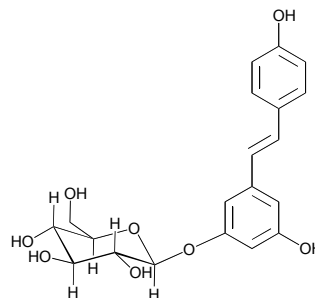


Figure 45 : *trans*-picéide.

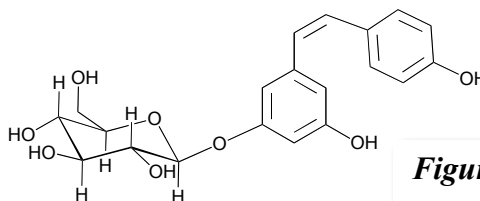


Figure 46 : *cis*-picéide.

La biosynthèse du pterostilbène est probablement possible à partir du resvératrol, mais demeure encore mal connue. Son origine sera discutée dans le chapitre **V-4-2**.

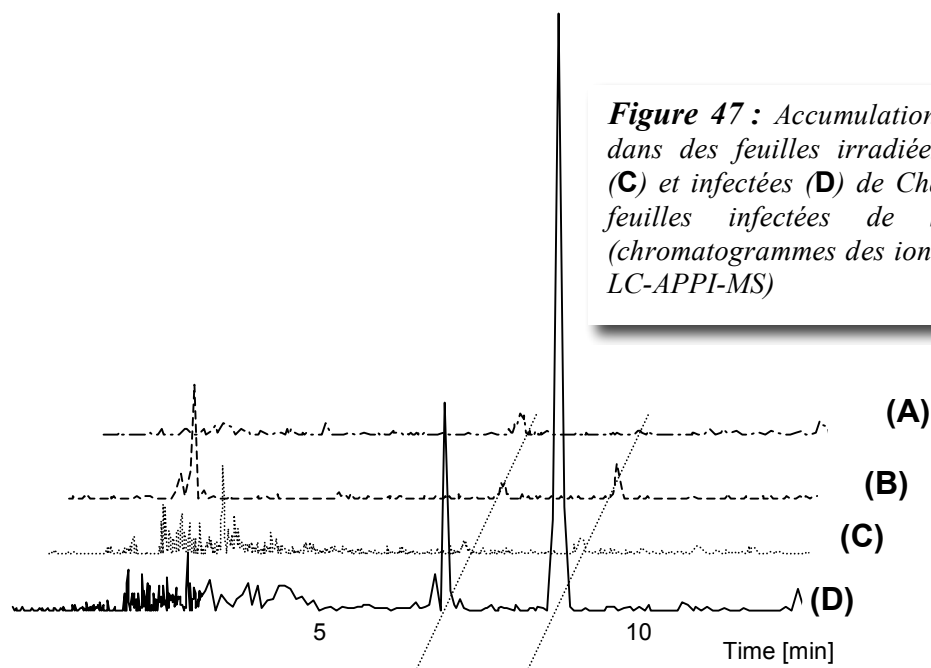


Figure 47 : Accumulation des picéides dans des feuilles irradiées (A), saines (C) et infectées (D) de Chasselas et des feuilles infectées de Solaris (B). (chromatogrammes des ions 389 m/z par LC-APPI-MS)

A partir des échantillons de feuilles de Chasselas et de Solaris que nous avons analysés en collaboration avec le laboratoire de biochimie de l'Université de Neuchâtel, nous avons pu mettre en évidence d'autres formes de glycosides de resvératrol.

Le *cis*-picéide (RT: 8.7 min) est détecté dans tous ces échantillons, la forme *trans* (RT: 7 min) est induite, 48 heures après inoculation en présence de BABA (*figure 48*). Il existe d'autres formes de resvératrolsides de polarité et de fragmentation MS² similaires. Nous détectons dans les huit échantillons 11 formes différentes de resvératrolsides (*figure 48*) présentant un spectre ESI-MS (mode négatif) contenant les signaux 389 m/z et 227 m/z, ainsi qu'un spectre MS² de l'ion 389, [M-H]⁻, libérant un fragment à 227 m/z, [M-hexose]⁻. Leur nombre peut être expliqué par la différente position du sucre [61,63,123], qui pourrait bien être différent du glucose pour certaines de ces molécules, sur les sites hydroxylés du *trans*- ou *cis*-resvératrol. Il serait intéressant de parvenir à synthétiser plusieurs de ces resvératrolsides, puis de tester leurs effets sur les zoospores de *P. viticola*.

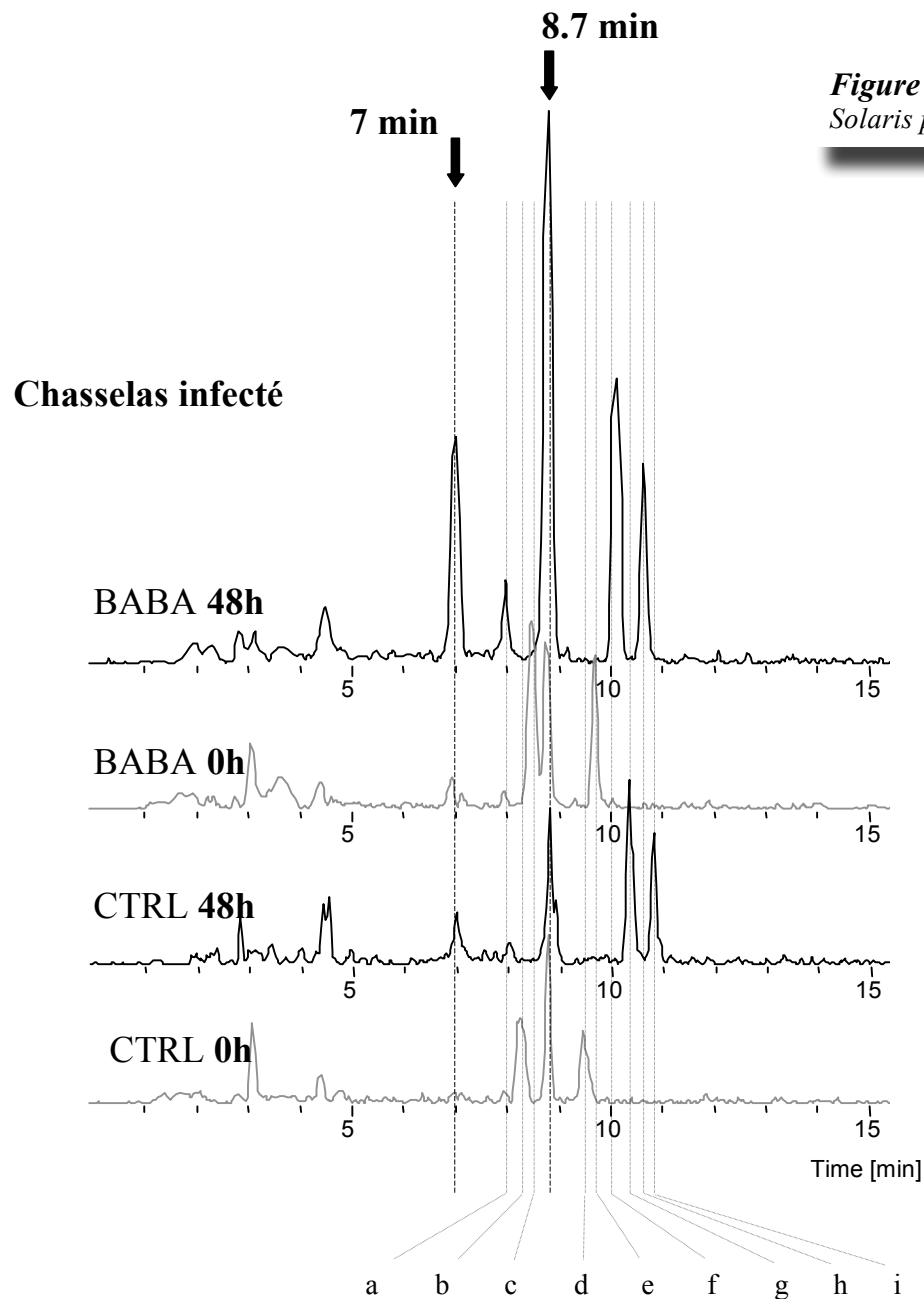
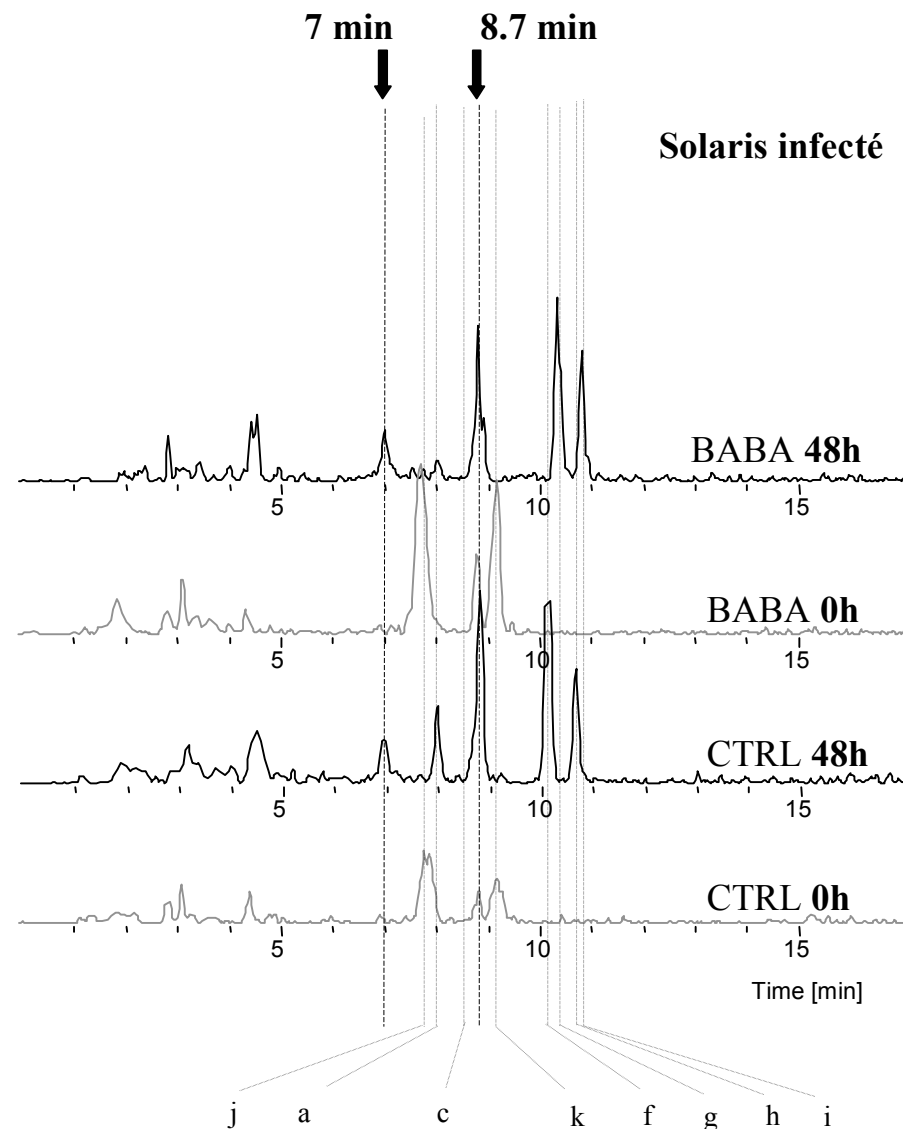


Figure 48 : Détection d'hexosides de resvératrol dans les feuilles de Chasselas et de Solaris prétraitées (BABA) ou non (CTRL) puis infectées par *P. viticola*.



V-1-4-2 Accumulation de dérivés dimériques du resvératrol et identification de la *trans*- δ -viniférine.

L'infection ou l'irradiation [124] des feuilles de vigne induit la formation de stilbènes et dérivés stilbéniques résultant de la dimérisation du resvératrol. Nous reportons la mise en évidence du δ -viniférinol, la *trans*- δ -viniférine et d'autres isomères, biosynthétisés par la vigne.

V-1-4-2-1 Le δ -viniférinol.

L'analyse LC-MS de feuilles (Chassealas ou Solaris) infectées ou irradiées a révélé l'induction d'un composé de masse 472 amu avec un temps de rétention de 6.8 min (programme LC "stilbène", VI-4-2), non détectable dans les feuilles saines (*figures 49 et 50*).

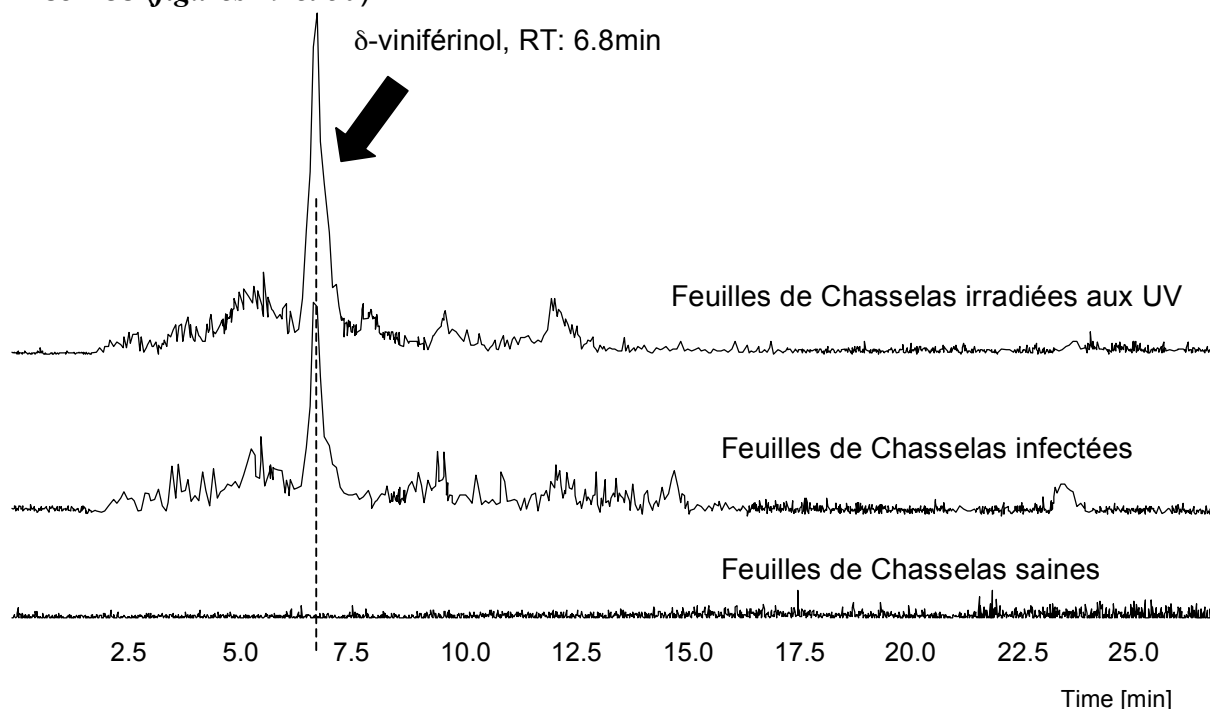


Figure 49 : Induction du δ -viniférinol dans les feuilles de chasselas irradiés aux UV (après 56h dans l'obscurité, 25°C) ou infectées par *P. viticola*.

Nous avons appelé ce composé, δ -viniférinol, car nous l'avons obtenu comme composé secondaire au cours de l'oxydation enzymatique *in vitro* du mélange resvératrol/ptérostilbène, produisant la δ -viniférine et le δ -resvépterol. Sa structure reste encore inconnue (voir partie V-3-1).

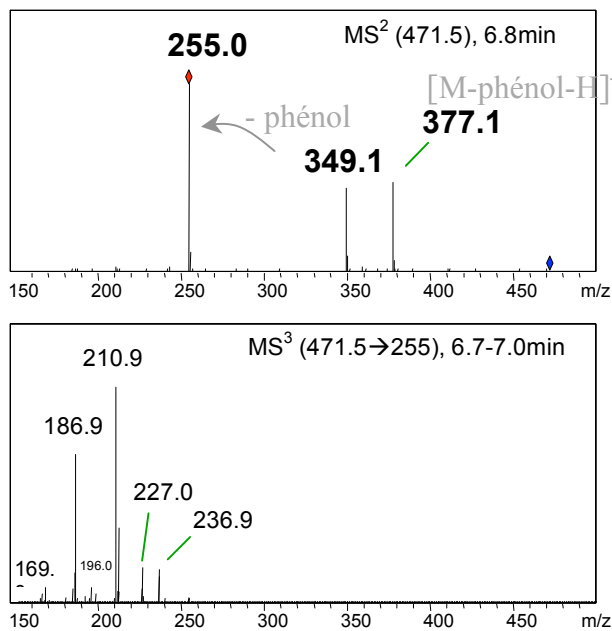


Figure 50 : Spectres MSⁿ à partir du signal 471 m/z correspondant à l'ion [472-H]⁺ isolé de l'extrait des feuilles de vigne "stressées".

Les signaux à 377, 349 et 255 m/z apparaissent lors de la fragmentation de l'ion moléculaire à 471 m/z, [472-H]⁺. Une différence de 94 uma est notée entre l'ion-fils 377 m/z et l'ion-parent 471 m/z, puis entre les ions-fils 349 et 255 m/z : le δ -viniférinol posséderait deux éléments hydroxybenzene. L'ion-fils à 255 m/z contiendrait une molécule de resvératrol, dû à la présence du signal à 227 m/z dans la MS³ (471=>255). Si l'ion-fils à 255 m/z était du pterostilbène, nous aurions à la MS³ un signal à 240 m/z.

V-1-4-2-2 La *trans*- δ -viniférine [47].

En étudiant le profil chromatographique LC-MS des stilbènes des feuilles de Chasselas, soit soumises aux radiations UV, soit infectées par le mildiou, nous avons pu identifier un dimère de resvératrol qui n'a jamais été mis en évidence comme une phytoalexine de la vigne. Ce stilbène a déjà été caractérisé parmi les produits d'oxydation *in vitro* du *trans*-resvératrol par un extrait

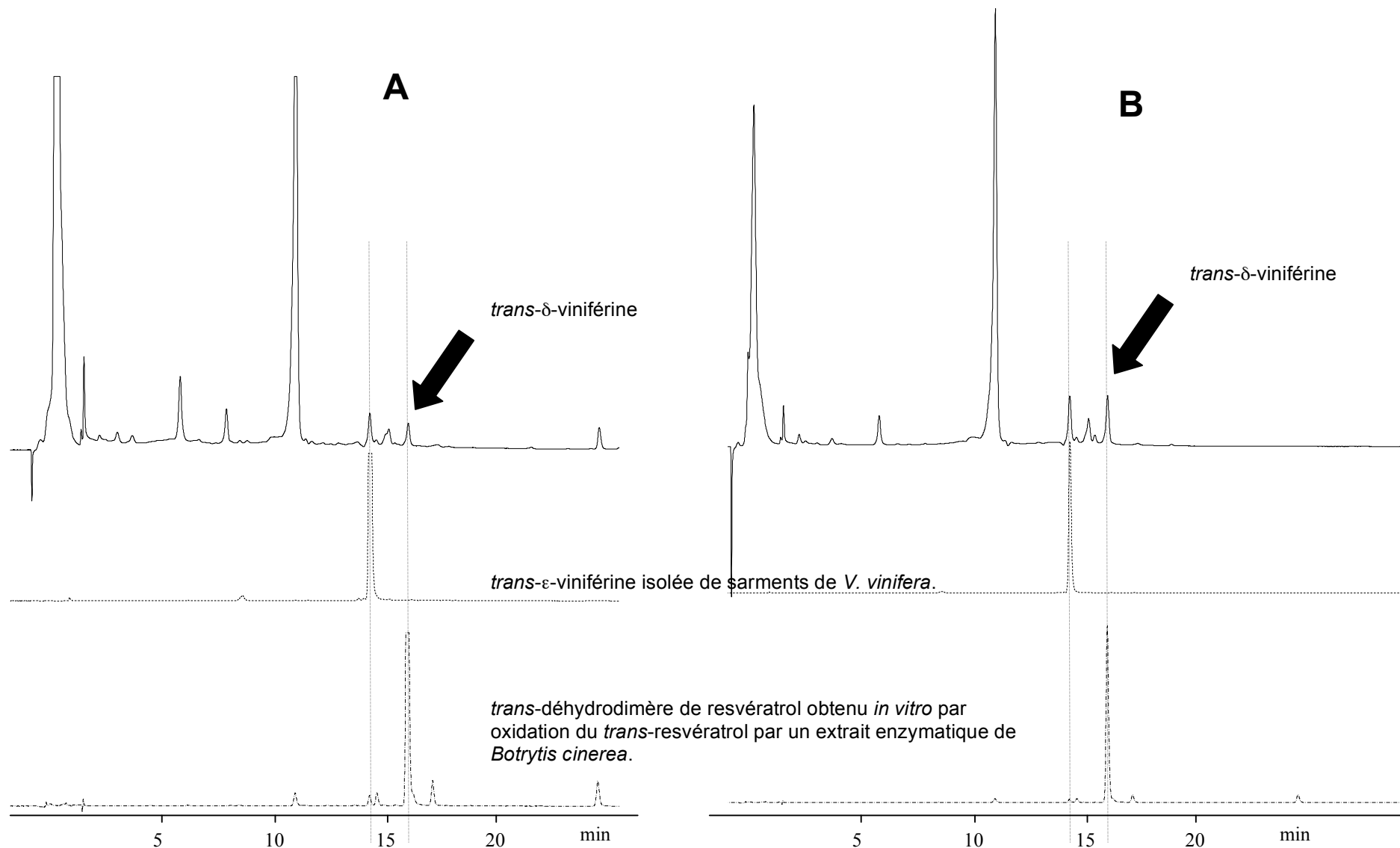


Figure 51 : Profils chromatographiques (307 nm) des stilbènes de feuilles de Chasselas, soit infectées par *P. viticola* (A), soit irradiées par UV-C (B), comparés aux chromatogrammes de standards : *trans-ε-viniférine* et *trans-déhydrodimère de resvératrol* produit *in vitro*.

enzymatique de *Botrytis cinerea* [125-127], parmi les composés stilbéniques du vin [128] et également dans des protoplastes de *V. vinifera* [129].

Nous montrons de ce fait que la plante est capable de biosynthétiser, le *trans*-déhydrodimère du resvératrol, que nous avons appelé *trans*- δ -viniférine (RT= 15.8 min, *figure 51*, [47]), en nous référant à l'appellation "viniférines", donnée pour la première fois à des phytoalexines stilbéniques découvertes par Langcake et Pryce en 1977 dans la vigne [34]. La *trans*- δ -viniférine montre une activité antifongique aussi grande que celle connue du ptérostilbène sur la mobilité des zoospores de *P. viticola* [106]. Des résultats de biotests, présentés à la partie **V-3-2**, comparent les activités biologiques de la *trans*- δ -viniférine et du *trans*- δ -resvépterol, hétérodimère de stilbène nouvellement caractérisé et présent à l'état de trace dans les feuilles de vigne infectées (voir partie **V-3**).

V-1-4-2-3 Autres dimères de resvératrol.

Des traces d'autres stilbènes sont détectées par LC-ESI- ou LC-APPI-MS. C'est ainsi que nous avons pu mettre en évidence, aussi bien dans les variétés de Chasselas ou de Solaris infectés ou irradiés, sept dimères de resvératrol supplémentaires (**DR 10-15**, 453 m/z, [454-H]⁻, *figures 52-62*) différents par leur spectre de fragmentation MS², mais possédant en commun un signal à 359 m/z [454-H-PhOH]⁻, dû à la perte d'un groupe *p*-4-hydroxyphényle.

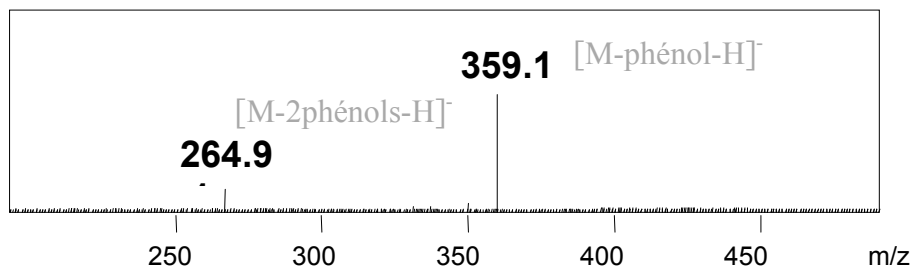


Figure 52 : Spectre MS² de **DR10**, RT : 9.8 min (programme "stilbène").

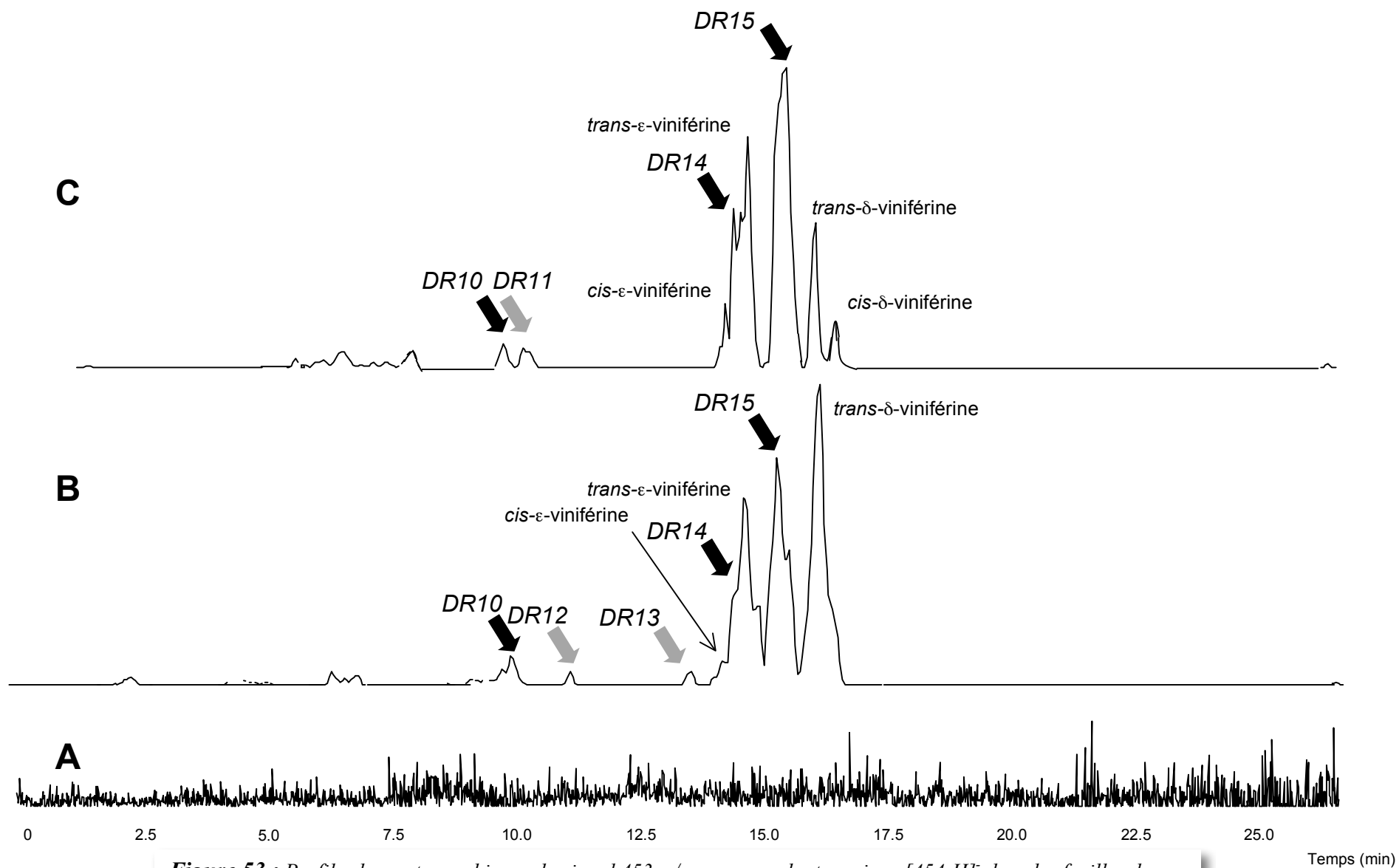


Figure 53 : Profils chromatographiques du signal 453 m/z correspondant aux ions [454-H]⁺ dans les feuilles de Chasselas saines (A), irradiées (B) et infectées (C); LC-ESI-MS.

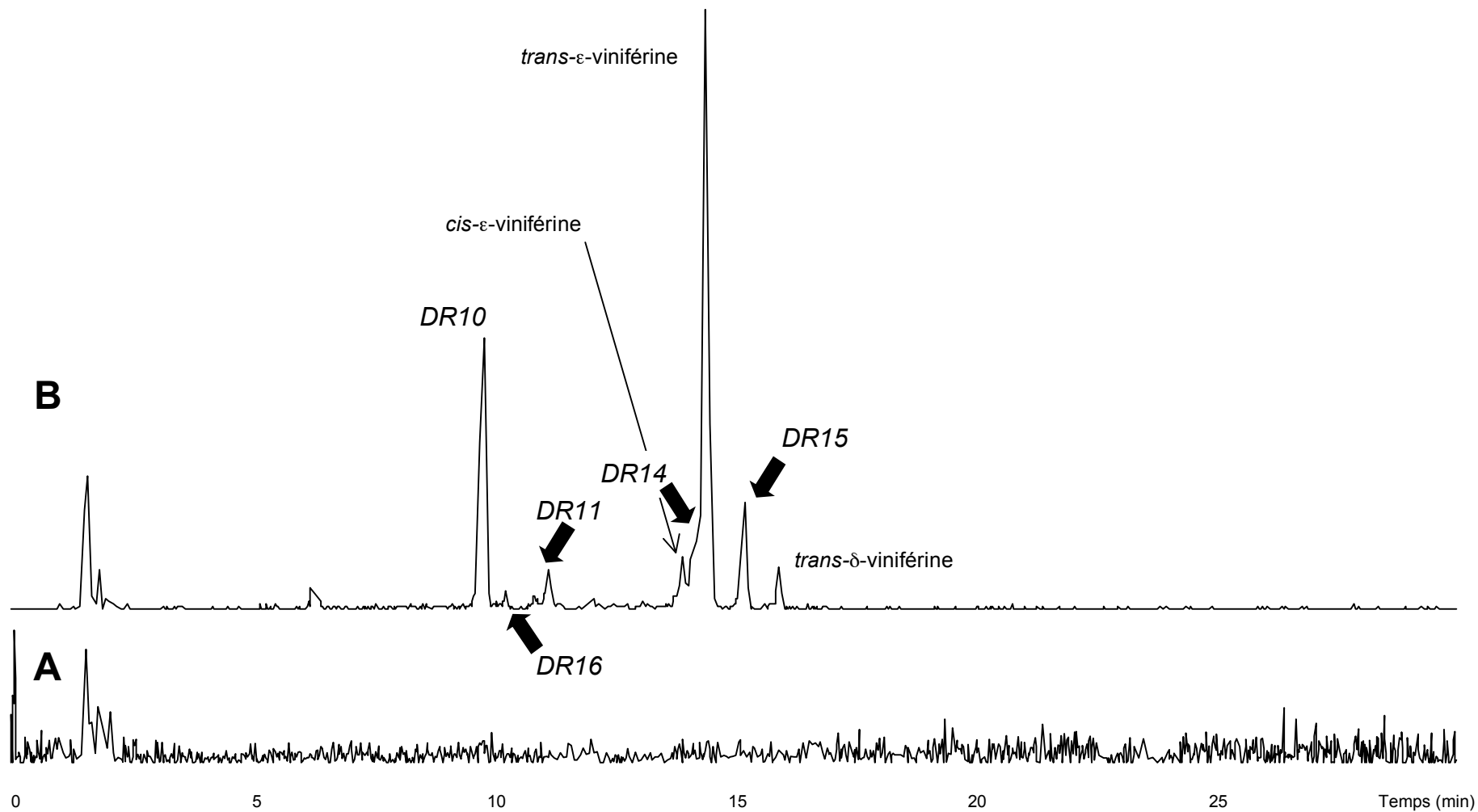


Figure 54 : Profils chromatographiques du signal 453 m/z correspondant aux ions [454-H]⁻ dans les feuilles de *Solaris* saines (**A**) et infectées (**B**); LC-APPI-MS.

Nous supposons que **DR10** (*figure 52*) présente des fragments ayant éliminé deux groupes *p*-4-hydroxyphényle, 359 m/z [454-H-PhOH]⁻ et 265 m/z [454-H-2xPhOH]⁻. La fragmentation MS² de **DR11** diffère avec l'apparition d'un signal à 341 m/z, probablement dû à la perte d'H₂O du fragment 359 m/z (*figure 55*). Les signaux à 289, 347 et 333 m/z restent encore sans explications.

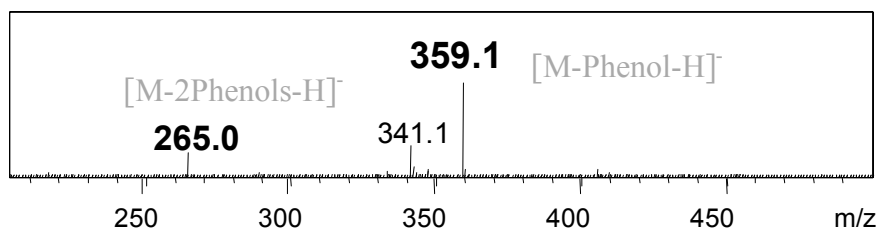


Figure 55 : Spectre MS² de **DR11**, RT : 10.4 min (programme "stilbène").

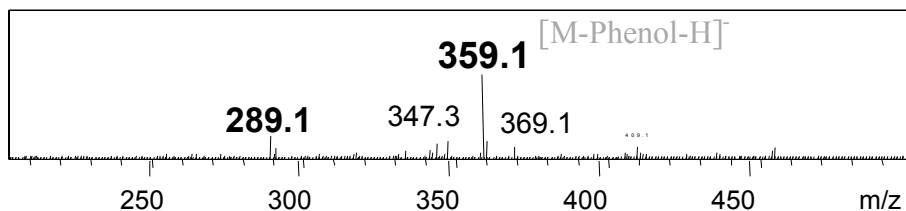


Figure 56 : Spectre MS² de **DR12**, RT : 11.2 min (programme "stilbène").

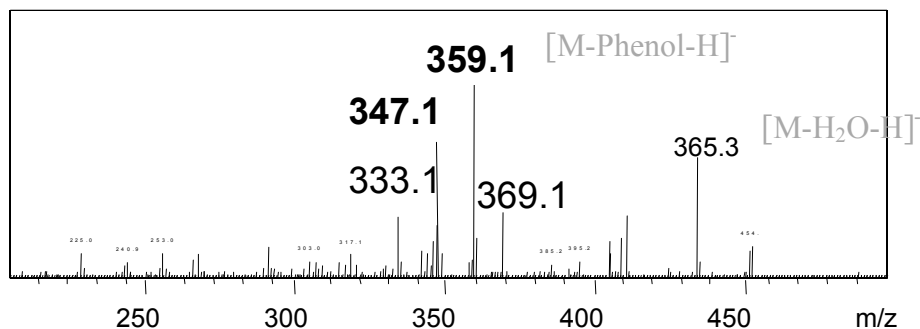


Figure 57 : Spectre MS² de **DR13**, RT : 13.5 min (programme "stilbène").

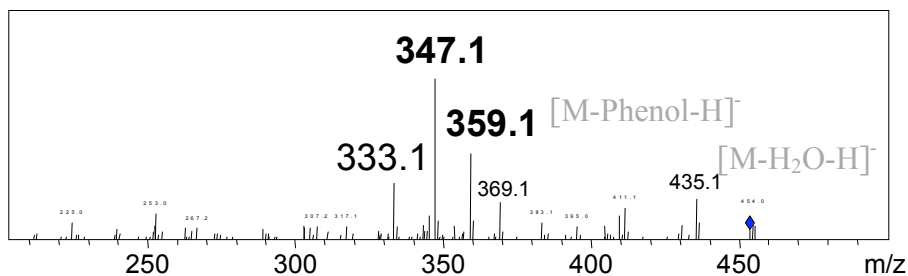


Figure 58 : Spectre MS² de DR14, RT : 14.2 min (programme "stilbène").

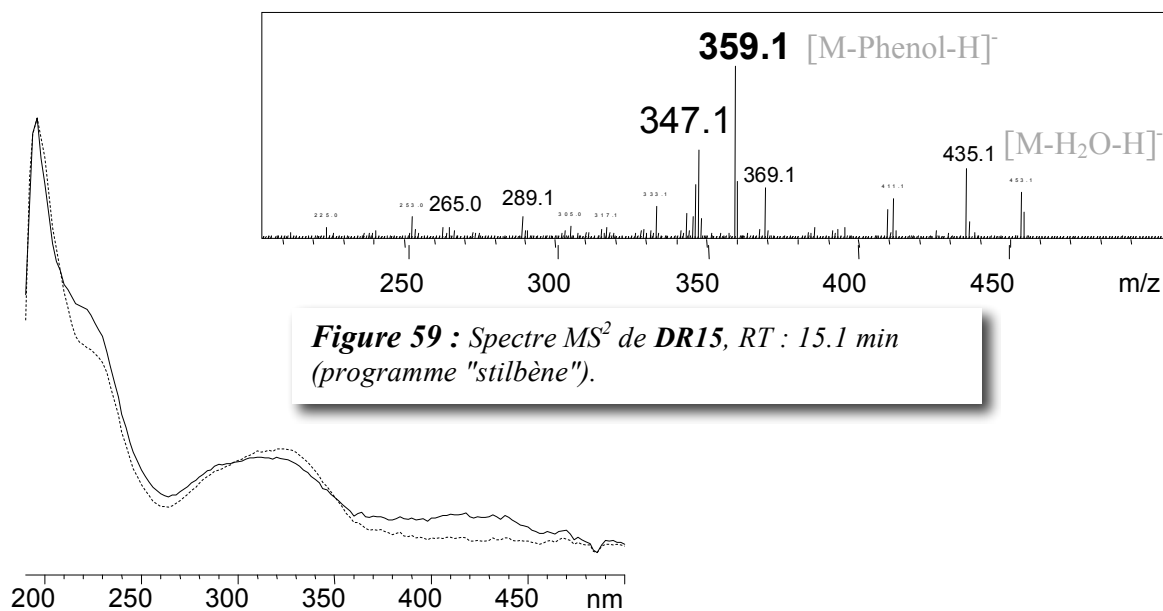


Figure 59 : Spectre MS² de DR15, RT : 15.1 min (programme "stilbène").

Figure 60 : Comparaison des spectres UV de la *trans*-ε-viniférine (---) (RT : 14.5 min) et de DR15 (—) (RT : 15.1 min).

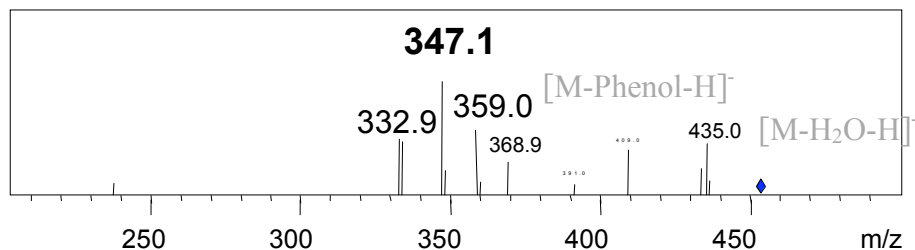


Figure 61 : Spectre MS² de DR16, RT : 10.3 min (programme "stilbène").

DR15 est certainement un isomère dont la structure doit être similaire à celle de la *trans*- ϵ -viniférine, car son spectre de fragmentation MS² est très semblable à celui de l' ϵ -viniférine et leur temps de rétention sont très proches : 14.5 et 15.1 minutes, respectivement pour la *trans*- ϵ -viniférine et **DR15** (*figure 59*). Leur spectre UV sont également similaires (*figure 60*).

Le tableau ci-dessous montre la répartition des dimères du resvératrol dans les différents systèmes où ils ont été mis en évidence :

Tableau 6 : Distribution des dimères de resvératrol dans les différents systèmes foliaires : Chasselas infecté, Chasselas irradié et Solaris infecté.

	Temps de rétention (LC-MS) (min.)	Feuilles de Chasselas		Feuilles de Solaris
		infectées	irradiées	infectées
DR10	9.9	✓	✓	✓
DR11	10.4	✓		
DR12	11.2		✓	
DR13	13.5		✓	
DR14	14.2	✓	✓	✓
DR15	15.1	✓	✓	✓
DR16	10.3			✓

Seulement trois d'entre ces dimères, **DR10**, **DR14** et **DR 15**, sont induits dans les feuilles de Chasselas et de Solaris quelques soient le type de stress subit par la plante. Plusieurs dérivés stilbéniques avec la même masse moléculaire, 454 uma, ont été retrouvés dans des plantes ou issues de réactions d'oxydation enzymatique *in vitro* : les gnétines A et C (Gnetaceae [64]), les ampélopsines B, D et F (Vitaceae [52,130]) et la restrysol C à partir de l'oxydation enzymatique du resvératrol [126]. Certains de ces composés pourraient être induits et présents dans la feuille de vigne infectée par *P. viticola* et correspondre aux dimères de resvératrol détectés.

L'existence d'une voie métabolique induite lors d'un stress de la vigne conduisant à l'oxydation du *trans*-resvératrol pour former des dérivés stilbéniques efficaces contre la propagation du pathogène requiert la participation de peroxydases comme ceci avait déjà été supposé par Langcake et Pryce [131]. Une discussion sur l'activité peroxidasique dans les feuilles de vigne est reportée dans la partie **V-3-1**. En voulant montrer que le *trans*-resvératrol est bien le précurseur des viniférines de la vigne, Langcake et Pryce ont soumis des feuilles de vignes aux UV et ont observé que l'induction et l'accumulation du resvératrol est maximale pour une région spectrale d'irradiation entre 260 et 270 nm appliquée à la surface inférieure des feuilles [132].

Plusieurs travaux et revues nous renseignent sur la potentialité enzymatique des tissus foliaires pour transformer le *trans*-resvératrol en différents produits d'oxydation, comme les restrysols A-C ou des composés décrits comme des analogues de l' ϵ -viniférine [126].

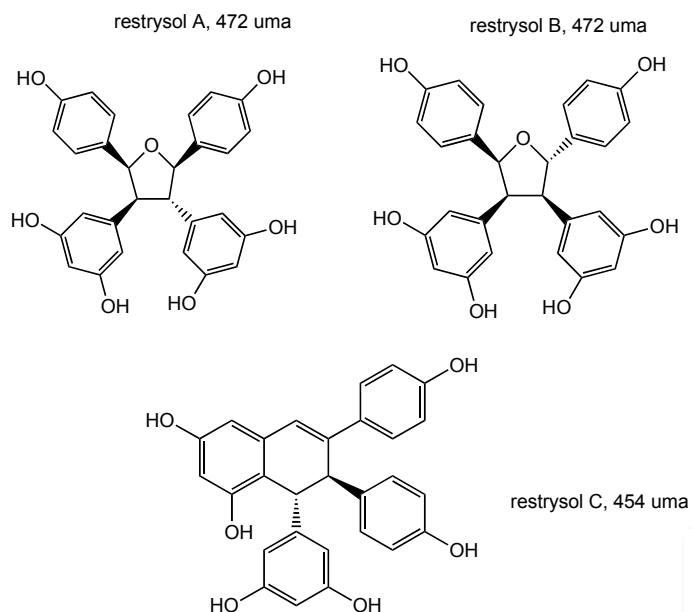


Figure 62 : Analogues de viniférines dimériques.

Les restrysols, résultants de la dimérisation oxydative du *trans*-resvératrol par *Botrytis cinerea* en culture, présentent des masses de 472 et 454 uma et possèdent dans leur structure deux groupes *p*-4-hydroxyphényles (*figure 62*)

La RMN d'une fraction purifiée (*figure non montrée*) contenant le δ -viniférinol nous a permis de constater l'absence de signaux à des déplacements chimiques correspondants à ces restrysols [126]. La structure du δ -viniférinol semble être proche des restrysols A-B. Les feuilles de vigne possèdent donc des activités peroxidasiques lui permettant de produire une large panoplie de stilbènes, dérivés de resvératrol, dotés d'une activité biologique *in vitro*.

V-1-4-3 Accumulation de dérivés oligomériques (degré de polymérisation supérieur à 2) de resvératrol.

Des stilbènes de degré de polymérisation supérieur à 2 ont été détectés par LC-APPI-MS dans les feuilles de Chasselas et Solaris. Nous décrivons la mise en évidence de trois composés phénoliques de 682, 680 et 678 uma avec les temps de rétention respectifs de 13.8, 14.7 et 15.5 min. Ces trois composés seraient des trimères de resvératrol (TR) avec différents degrés d'insaturation au niveau structural (**TR682**, **TR680** et **TR678**). Un tétramère de resvératrol a également été détecté dans la feuille de vigne infectée, il s'agirait très probablement d'un des tétramères que l'on retrouve dans le bois de vigne (voir partie **V-2-5**).

Ces oligomères de resvératrol font partie des stilbènes minoritaires retrouvés dans les feuilles de vigne.

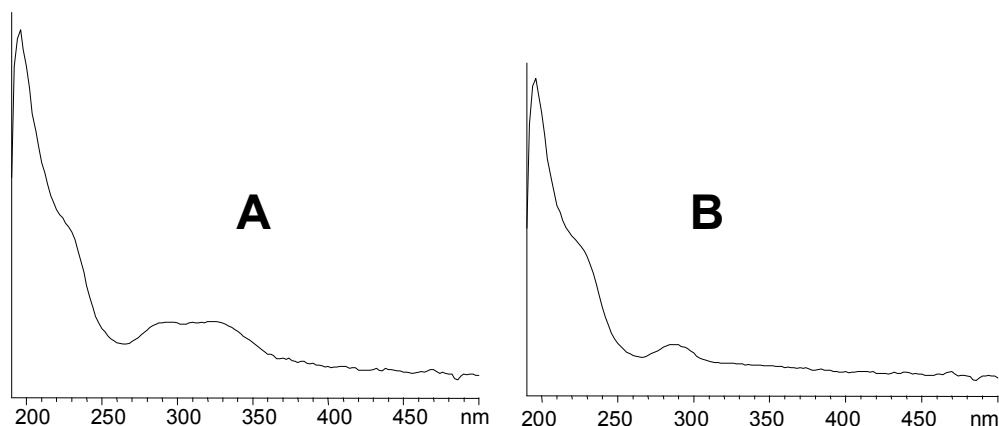


Figure 63 : Spectres UV de TR680 (A), TR682 et TR678 (B).

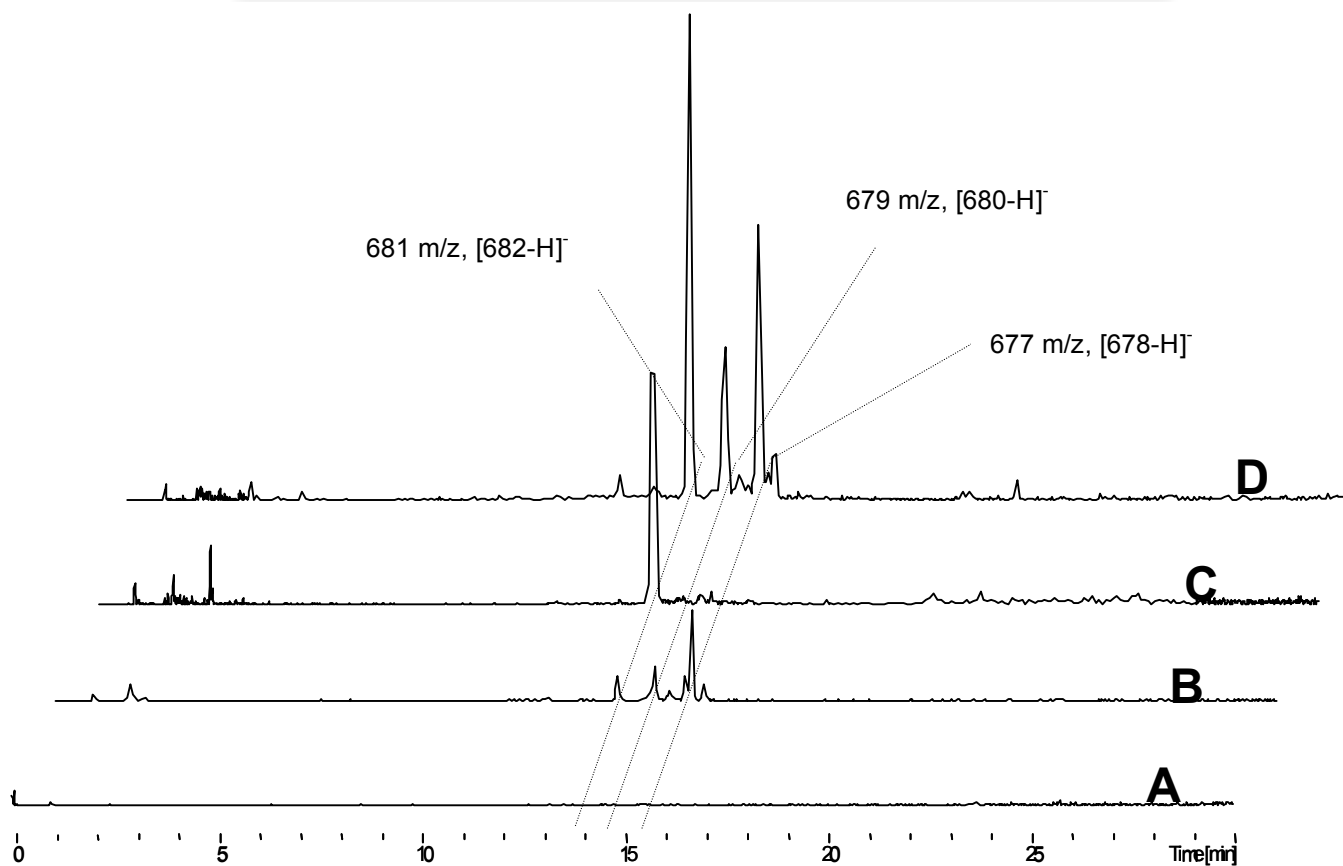


Figure 64 : Profils chromatographiques des ions $[678-H]^-$, $[680-H]^-$, $[682-H]^-$ (programme LC "stilbène") dans les feuilles de Solaris saines (A) et infectées (B), et les feuilles de Chasselas saines (C) et infectées (D).

TR682 et **TR678** montrent les mêmes spectres UV avec un maximum d'absorption à 280 nm, tandis que **TR680** a un spectre UV montrant une absorption maximale entre 280 et 335 nm. **TR680** doit présenter une plus grande aromaticité que celle des deux autres composés (*figure 63*).

TR682 semble être constitutif dans les feuilles de Chasselas. Il est non détectable dans les feuilles de Solaris saines. **TR680** et **TR678** sont induits après infection des feuilles de Solaris et de Chasselas (*figure 64*), mais aussi après exposition sous UV-C (données non présentées).

L'analyse des spectres MS² de **TR682** et **TR680** nous confirme le fait qu'ils sont des oligomères de resvératrol (*figures 65 et 66*) avec la visualisation des signaux correspondant aux ions [M-H-Resv]⁻ et [Resv-H]⁻ reportés dans le *tableau 7*.

Tableau 7 : Signaux générés dans les spectres MS² des composés **TR682**, **TR680** et **TR678**.

	[M-H-H ₂ O] ⁻	[M-H-PhOH] ⁻	[M-H-Resv] ⁻	[Resv-H] ⁻
TR682	663	-	453	227
TR680	661	585	451	227
TR678	-	583	-	-

Unités en m/z

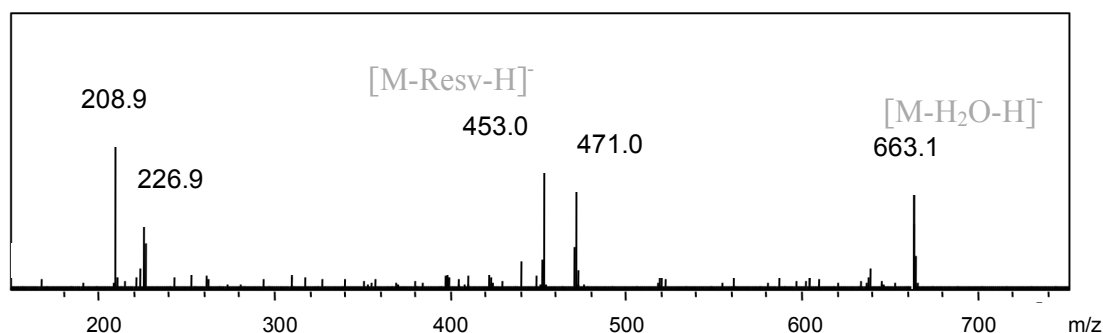


Figure 65 : Spectre MS² (LC-APPI-MS) du composé **TR682**.

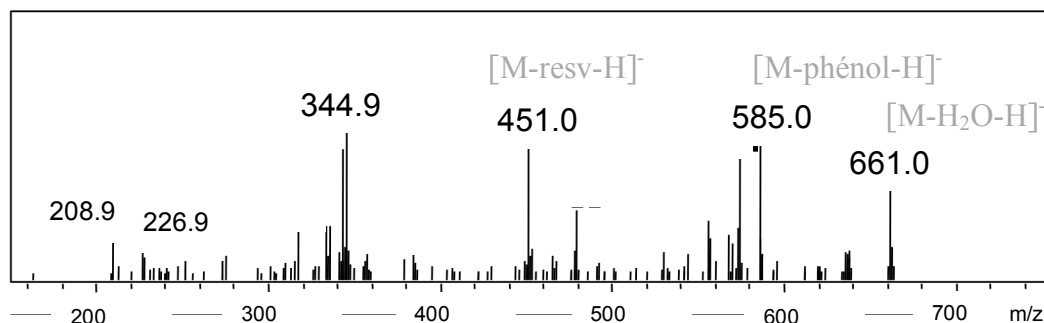


Figure 66 : Spectre MS^2 (LC-APPI-MS) du composé **TR680**.

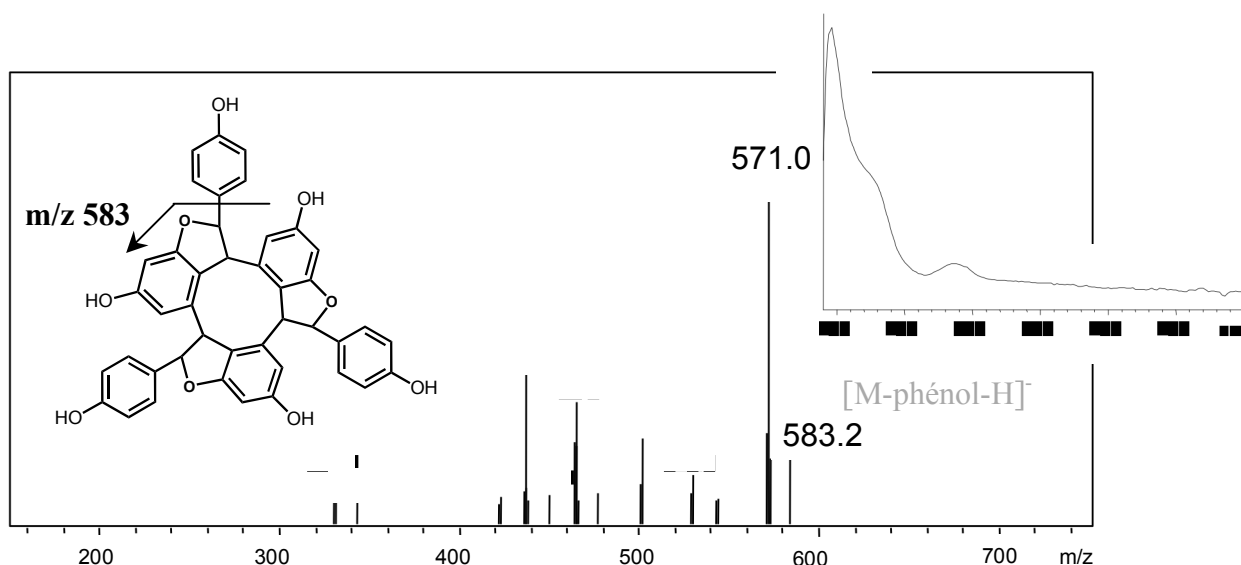


Figure 67 : Spectres UV et MS^2 (LC-APPI-MS) du composé **TR678**.

Le spectre MS^2 de **TR678** reste difficile à expliquer, mais nous savons qu'un trimère de resvératrol cyclique, l' α -viniférine (678 uma), a déjà été mis en évidence dans les feuilles de vignes infectées par *B. cinerea* par Pryce et Langcake [33]. Le spectre UV (maximum d'absorption à 280 nm) de **TR678** (*figure 63*) correspond bien à la structure de l' α -viniférine avec ces groupes 4-hydroxyphényles en périphérie de la molécule (en médaillon dans la *figure 67*), telle qu'elle a été identifiée en 1977 [53].

Les mêmes auteurs décrivent, lors d'induction UV ou d'infection par *B. cinerea* sur *V. vinifera* (Cabernet-Sauvignon), l' ϵ -viniférine et l' α -viniférine comme étant les principaux stilbènes accumulés dans les feuilles [33,34]. Ils notent également la détection d'un tétramère, la β -viniférine, et la présence d'un oligomère de degré de polymérisation supérieur, γ -viniférine. Ce tétramère pourrait correspondre à celui que nous avons tenté de caractériser dans la partie **V-2-5-2 (TT2)**.

La différence entre les positions des feuilles prélevées sur les plantules est un paramètre important qui pourrait expliquer la variabilité de la nature et la concentration des stilbènes lors de leur détection [132]. Une étude a révélé une corrélation entre l'âge croissant des feuilles, les activités β -1,3-glucanase, peroxydase et la réduction de l'efficacité infectieuse de *P. viticola* [133].

Nous avons donc détecté 7 nouveaux dimères et 2 trimères du resvératrol supplémentaires en plus des stilbènes et dérivés de stilbènes déjà connus dans la vigne. Les dimères seraient les analogues des ϵ - et δ -viniférines, issues des voies oxydatives existantes, dont la catalyse serait assurée par des peroxidases. Ces nouveaux composés peuvent être comparés à des métabolites déjà connus et mis en évidence de manière *in vitro* ou *in vitro* : restrysols A et B (dimères de resvératrol de 472 uma, [126]), restrysol C, gnétines A et C, ampélopsines B, D et F (dimères du resvératrol de 454 uma, [52,64,126,130,134], gnétine E, ampélopsines C et E (trimères du resvératrol de 680 uma [52,64,130]) (*figure 68*).

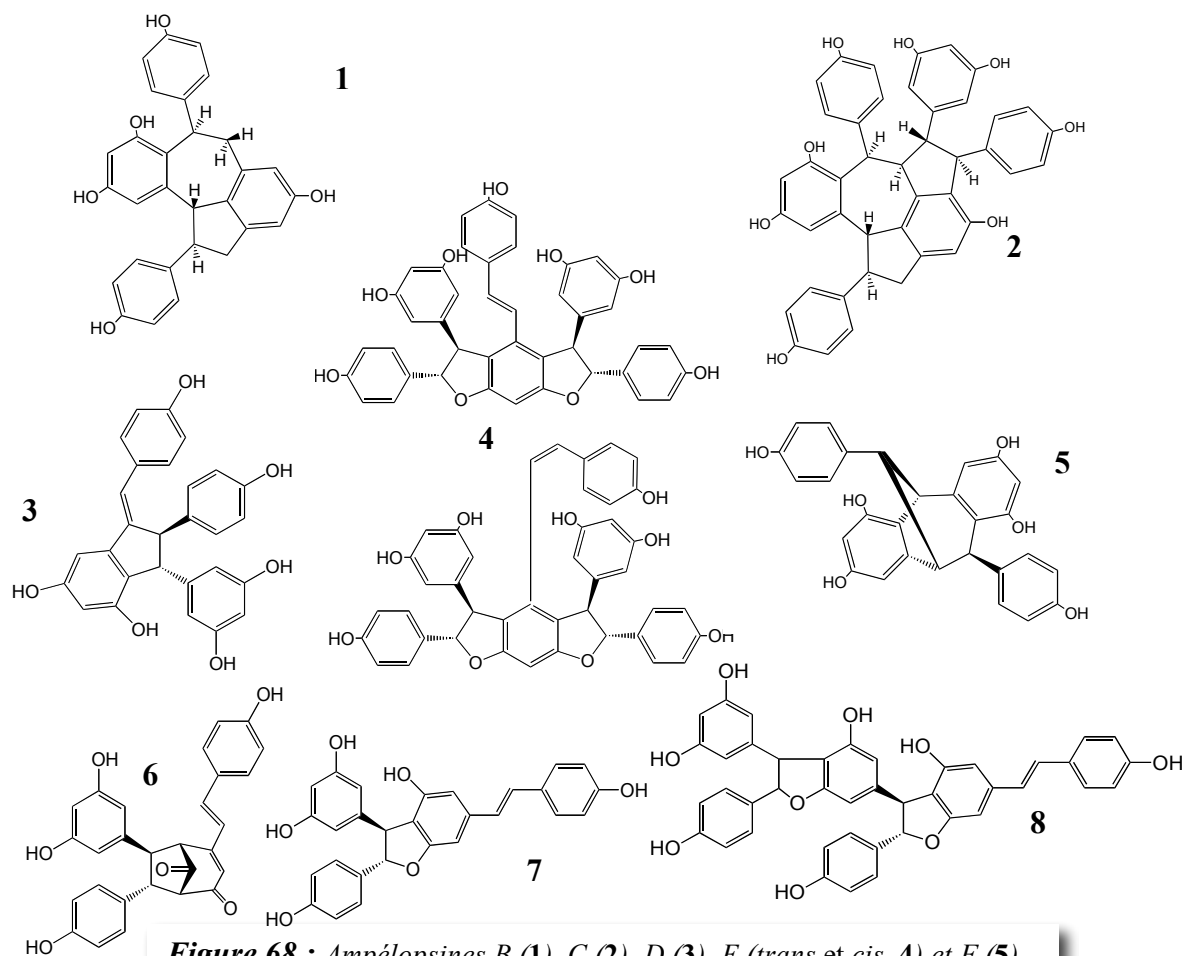


Figure 68 : Ampélopsines B (1), C (2), D (3), E (trans et cis, 4) et F (5), gnétines A (6), C (7) et E (8). [52,64,130,134]

V-1-5 Profil stilbénique de feuilles traitées par BABA avec ou sans infection par le mildiou.

Cette partie du projet a été effectuée dans le cadre d'une collaboration avec Mollah M. Hamiduzzaman (Laboratoire de biochimie végétale, Université de Neuchâtel, Suisse), afin d'appliquer notre méthode LC-MS ("stilbènes") sur les feuilles traitées de manière abiotique et d'y déterminer les profils stilbéniques. Des traitements externes avec des substances naturelles ou artificielles activant

les défenses de la vigne peuvent faire l'objet d'une stratégie de protection contre le mildiou [135].

BABA, acide aminé non protéique, est connu pour la protection de plusieurs plantes contre de nombreux pathogènes [136]. Combiné à des fongicides anti-mildiou sprayés sur les vignes, il montre un effet biologique efficace contre l'infection et la sporulation de *P. viticola* [29].

Le Chasselas est un cépage sensible à *P. viticola*. Le prétraitement de ses feuilles avec BABA induit une défense contre le pathogène beaucoup plus efficace, conduisant à des nécroses et à l'inhibition du développement des zoospores (Hamiduzamann, communication personnel).

L'accumulation du resvératrol est plus grande dans les feuilles de Chasselas traitées avec BABA avant l'infection par *P. viticola* que dans les feuilles témoins (*figure 69*). La concentration de resvératrol est de 4 à 8 fois plus élevée comparée à celles des feuilles non traitées avec BABA, 6 à 7 jours après inoculation (*figure 69*). Le même effet de BABA sur l'accumulation de resvératrol et de ses dimères a été observé dans les feuilles de Solaris prétraitées avec BABA et infectées par la suite (*figure 69*). Nous espérons trouver une quantité de stilbènes bien supérieures dans les feuilles de Solaris, par rapport à celles de Chasselas. Or, la quantité de stilbènes mesurée dans les feuilles de Chasselas (*figure 69*) est supérieure à celle mesurée dans les échantillons de Solaris (*figure 70*). Ceci pourrait être expliqué par le fait que nous avons utilisé des feuilles d'âge et de positions différentes sur les plantules, donc présentant des métabolismes et des réponses différents à l'infection [132]. L'effet de BABA sur les disques de feuilles et plantules (*figure 72*) n'est observée que lorsque la plante est infectée par *P. viticola*.

En présence ou en absence de BABA, nous remarquons dans les feuilles de Chasselas une induction de l'accumulation de composés stilbéniques dans les

zones non en contact avec le pathogène (*figure 71*). La *cis*-picéide est observée en majorité à partir du 6^{ème} jour après l'inoculation. L'application de BABA seul, sur des plantules de Chasselas peut induire quelques petites modifications dans le profil stilbénique de leur feuille (*figure 72*), équivalent à un stress chimique. Aucune différence significative n'est observée, avec ou sans BABA, sans l'infection par *P. viticola*. C'est seulement après l'infection par *P. viticola* que des nécroses se forment sur les plantules prétraitées avec BABA. Leur analyse révèle l'accumulation de resvératrol et de dimères de resvératrol (ϵ - et δ -viniférines). L'analyse de la partie non nécrosée révèle par contre une quantité plus importante d' ϵ -viniférine, certainement synonyme d'une activité oxydative accrue dû à une extension de la défense contre *P. viticola*.

Les grands écart-types obtenus au cours des différents résultats nous indiquent une grande variabilité des réponses des stilbènes au niveau du détecteur de masse. Nous aurions dû analyser un plus grand nombre d'échantillons selon les différentes conditions d'infection des feuilles de vigne afin de réduire cette variabilité des résultats.

BABA induit dans les feuilles de Chasselas la formation de phytoalexines : resvératrol, ϵ -viniférine et δ -viniférine. Le laboratoire de biochimie végétale de l'Université de Neuchâtel a récemment trouvé que BABA induit la résistance contre le mildiou en modulant divers mécanismes comme l'accumulation de callose et les voies biosynthétiques des phénylpropanoïdes et de l'acide jasmonique [30,137].

Il a été montré que la différence entre le Chasselas et le Solaris se situe au niveau de la nature des stilbènes accumulés : Le Chasselas accumule plutôt du picéide alors que le Solaris accumule beaucoup plus de viniférines [138].

L'apparition des stilbènes dans les feuilles de Solaris est beaucoup plus localisée comparée à sa présence diffuse dans les feuilles de Chasselas.

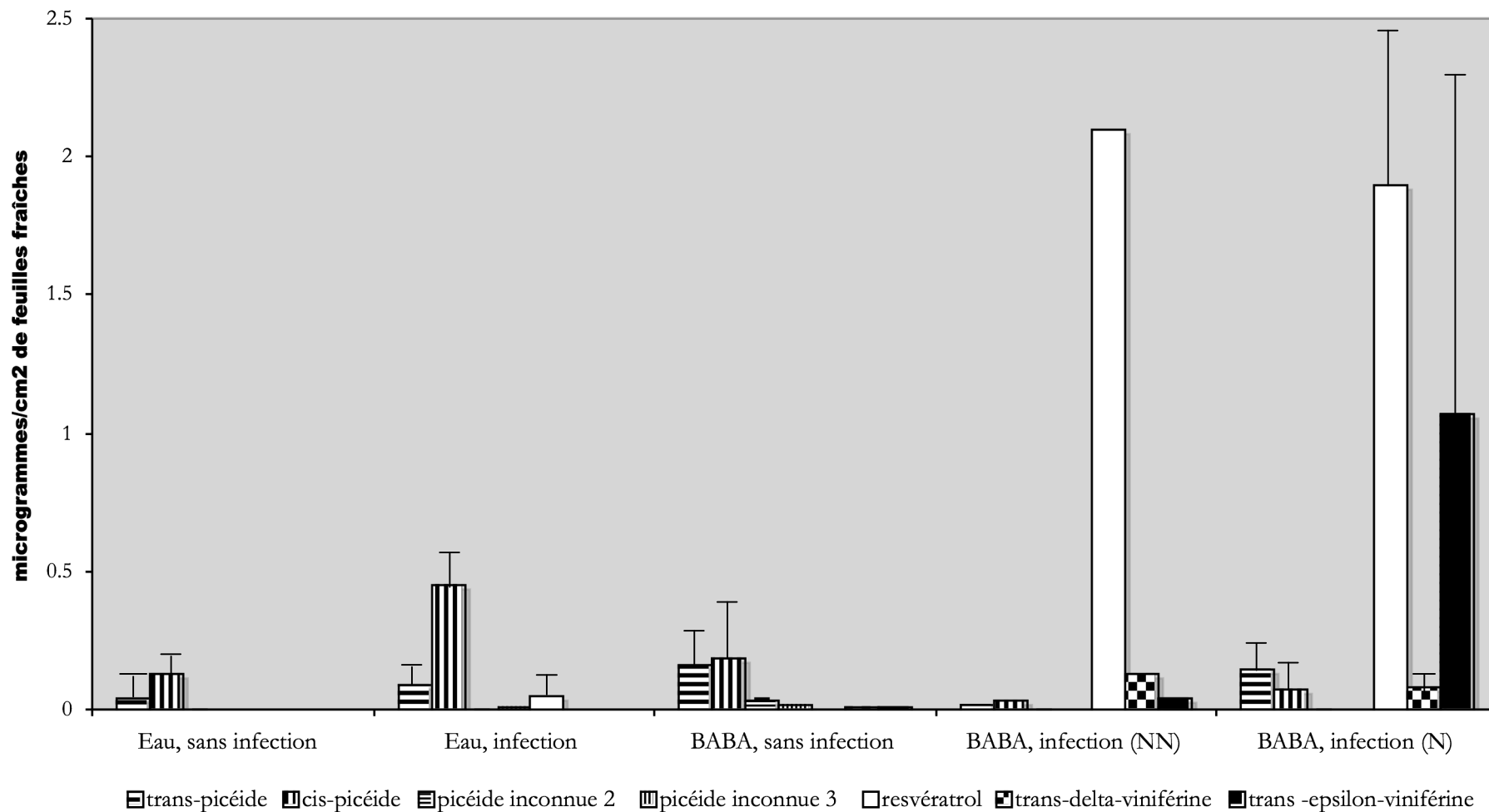


Figure 72 : Profil stilbénique après 7 jours d'incubation de feuilles de plantules (*Chasselas*) saines ou infectées par *P. viticola*, ayant été prétraité par de l'eau ou BABA. (La quantification des composés a été estimée par équivalence avec l'accumulation ionique du trans-resvératrol). N : zone inoculée nécrosée ; NN : zone inoculée non nécrosée.

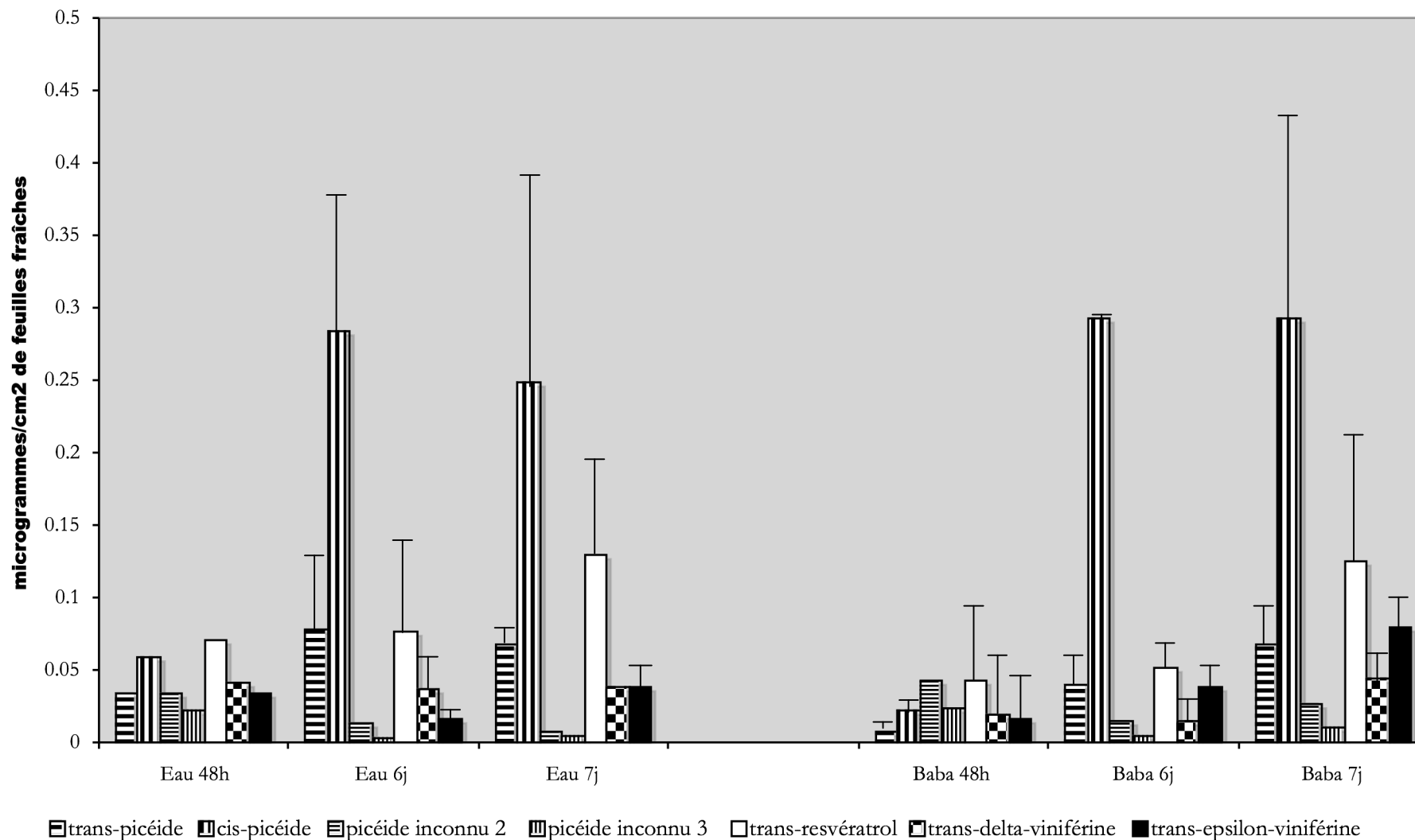


Figure 71 : Profil stilbénique des zones non inoculées de disques de feuilles de *Chasselas* infectées par *P. viticola* et prétraitées avec de l'eau ou BABA. (La quantification des composés a été estimée par équivalence avec l'accumulation ionique du trans-resvératrol).

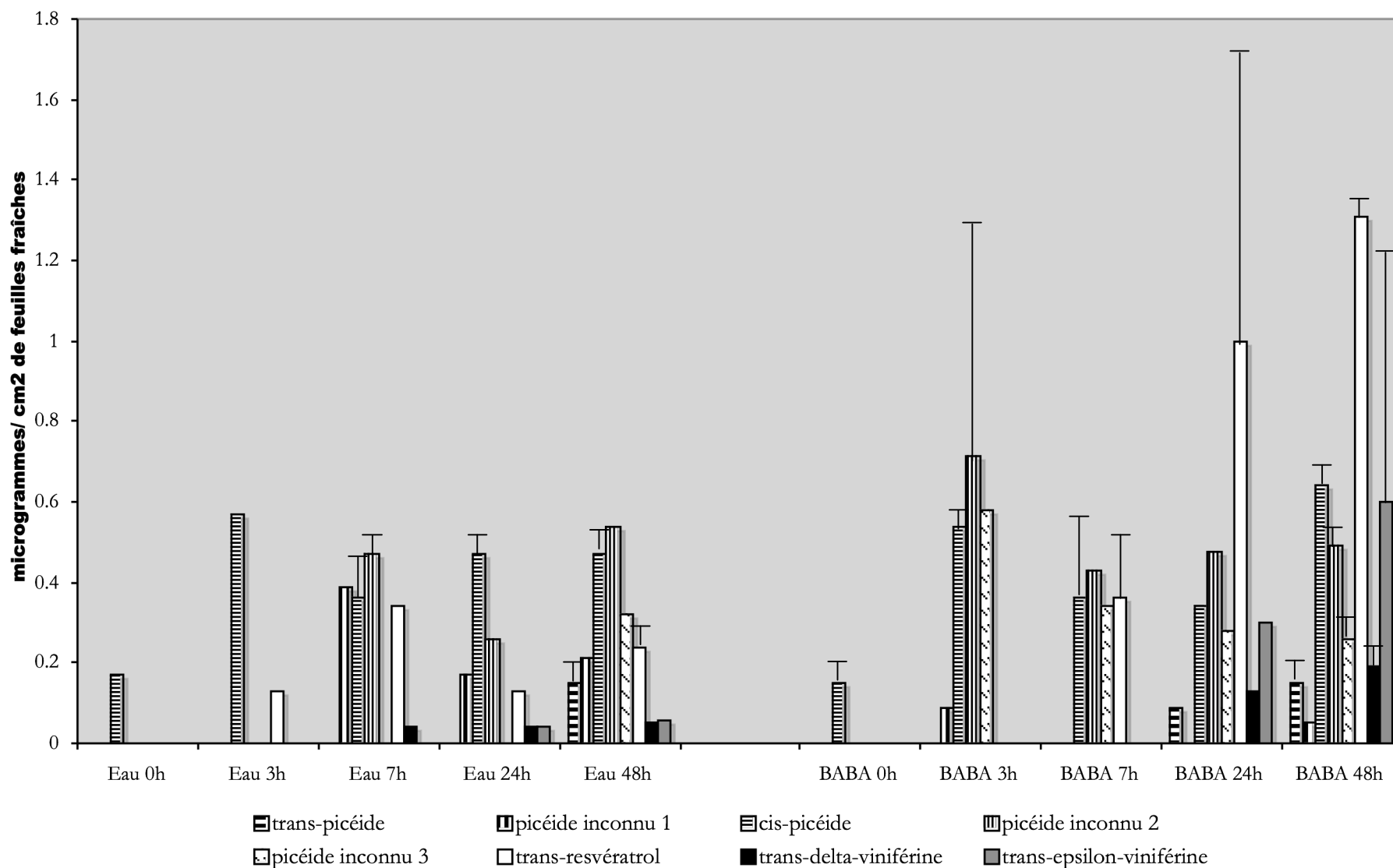


Figure 70 : Profil de quelques composés phénoliques entre 0 et 48h après inoculation dans des feuilles de *Solaris* infectées par *P. viticola* et prétraitées avec de l'eau ou BABA. (La quantification des composés a été estimée par équivalence avec l'accumulation ionique du trans-resvératrol).

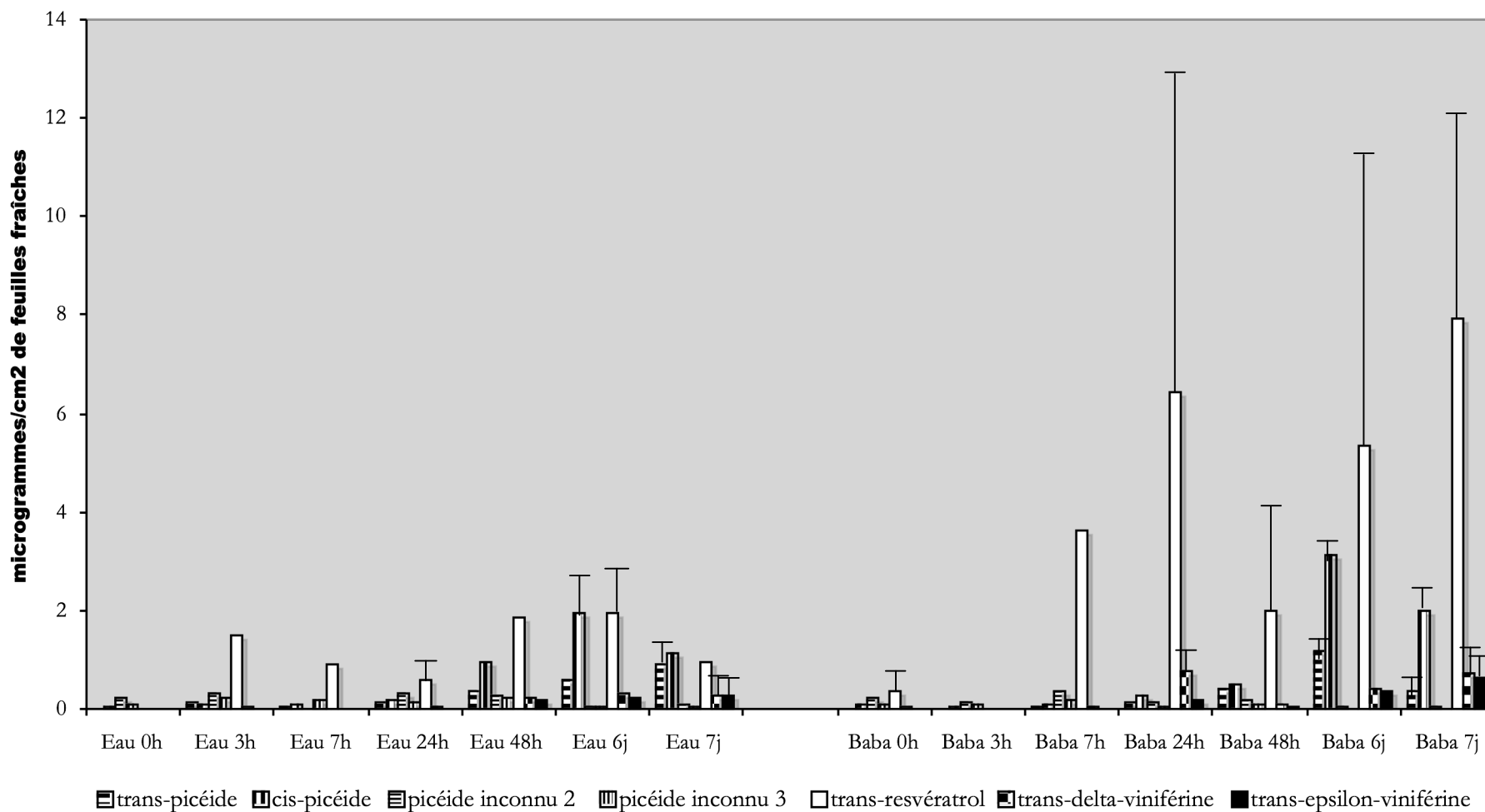


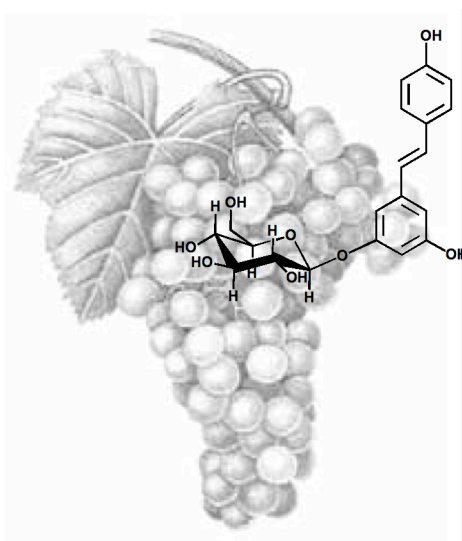
Figure 69 : Profil stilbénique des zones inocuées des disques de feuilles de *Chasselas* infectées par *P. viticola* et prétraitées avec de l'eau ou BABA. (La quantification des composés a été estimée par équivalence avec l'accumulation ionique du trans-resvératrol).

Leur concentration élevée sur un site d'infection serait toxique pour les cellules foliaires qui les accumulent, ce qui causerait le phénomène d'apoptose ou de mort cellulaire (réaction d'hypersensibilité ; [135,139]). Ceci est très important, car *P. viticola* est un parasite obligatoire de la vigne et son développement dépend essentiellement des cellules vivantes avec lesquelles il est en contact. La mort cellulaire est observée dans les nécroses formées en post-infection [11,12, 137,139-141] au niveau des sites d'enkystement et de germination des zoospores, dont la germination et le développement se voient interrompus.

En comparaison avec des stilbènes détectés à des concentrations très importantes et largement nécessaires pour inhiber *P. viticola*, certains stilbènes sont présents en trace dans les feuilles de vigne, tels que les stilbènes hétérodimériques (*trans*- ϵ -resvépterol et *trans*- δ -resvépterol caractérisés dans la vigne infectée et décrits dans la partie **V-3-1**) ou des analogues des viniférines. L'analyse de leur activité biologique contre *P. viticola* montrent que leur toxicité nécessite des concentrations trop importantes par rapport à celle dans les zones étudiées. Par conséquent, ces résultats nous conduisent à penser à une éventuelle interaction ou synergie possible entre diverses substances responsables de la défense de la vigne contre *Plasmopara viticola* dans cette matrice complexe que représente la feuille de vigne.

Finalement nous pouvons imaginer le scénario suivant : Lorsque la feuille se trouve infectée, ceci engendre d'une part l'accumulation de *trans*-resvératrol par l'induction de la STS et la libération de peroxidases vacuolaires d'autre part. Suivant des conditions de pH, l'oligomérisation oxydative du *trans*-resvératrol donne lieu à différents type de stilbènes dimères, hétérodimères, trimères, tétramères, ...

V-2 Caractérisation de stilbènes et dérivés stilbéniques constitutifs de l'écorce de Chasselas et de Bronner (*V. vinifera*).



V-2 Caractérisation de stilbènes et dérivés stilbéniques constitutifs de l'écorce de Chasselas et de Bronner (*V. vinifera*).

L'écorce du bois sain de vigne se révèle être une source de stilbènes (resvératrol et viniférines). Les principales différences entre les variétés Chasselas (sensible au mildiou), Pinot noir (sensible au mildiou) et Bronner (résistant au mildiou) semblent être plutôt quantitatives que qualitatives (*figure 73, tableau 8*). L'étude d'une corrélation entre la quantité de stilbène par poids frais d'écorce et la résistance au mildiou des cépages *V. vinifera* mériterait d'avantage de réflexion, ainsi que l'analyse d'autres cépages existants.

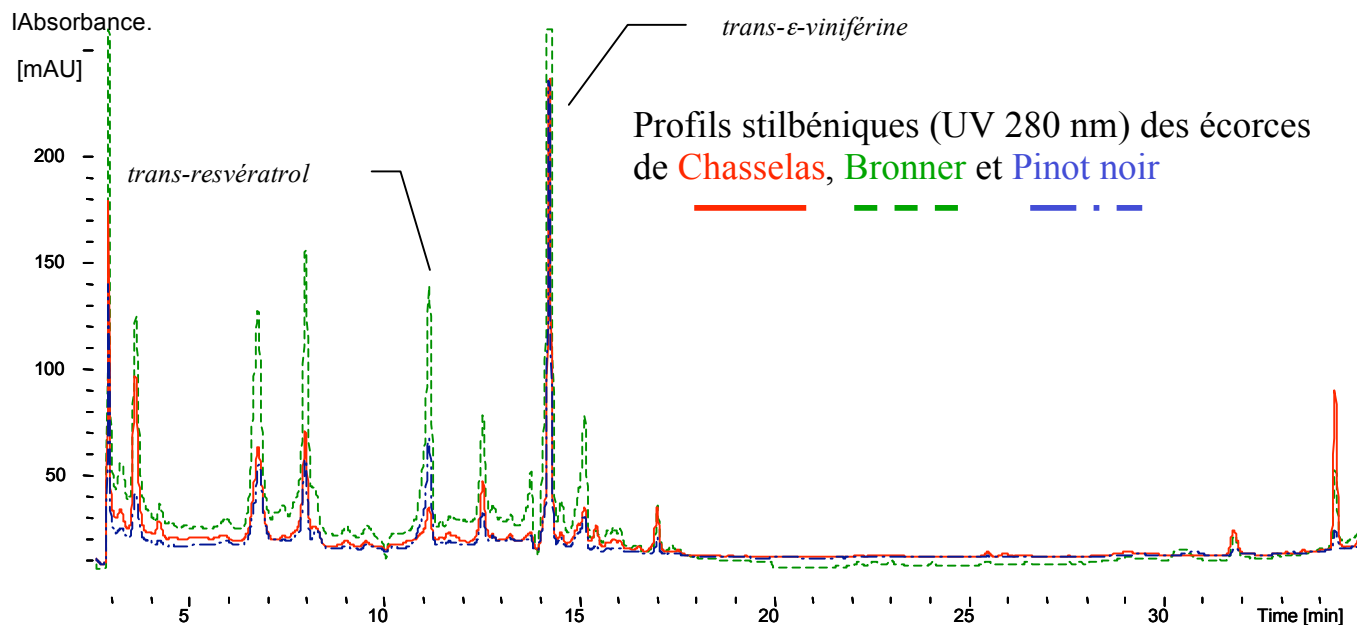


Figure 73 : Caractérisation chromatographique des stilbènes d'écorce de *V. vinifera*.

Tableau 8: Teneur en *trans*-resvératrol et *trans*- ϵ -viniférine d'extraits d'écorces de Chasselas, Pinot Noir et Bronner (*V. vinifera*).

($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ poids frais d'écorce	Chasselas	Pinot noir	Bronner
<i>trans</i> -resvératrol	27.6 \pm 3.4	85.5 \pm 2.5	85.8 \pm 5.4
<i>trans</i> - ϵ -viniférine	957.3 \pm 142.5	1023.4 \pm 3.2	943.3 \pm 384.8

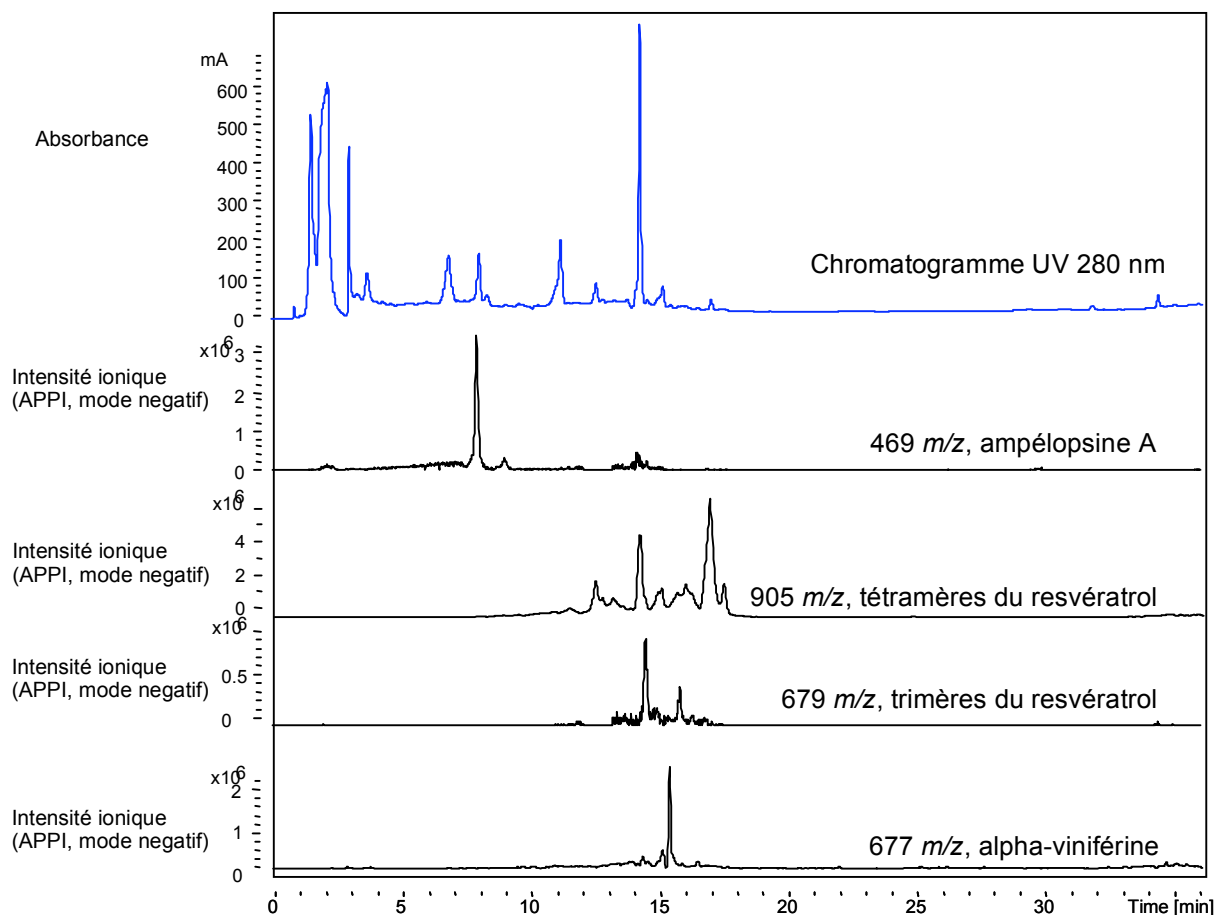


Figure 74 : Visualisation du chromatogramme UV (280 nm) et des profils ioniques $[M-H]$ correspondants aux stilbènes d'écorce de *V. vinifera*. (méthode LC-APPI-MS)

Indépendamment du fait que des stilbènes sont induits dans les feuilles ayant subi des stress biotiques ou abiotiques et que le *trans*-resvératrol, la *trans*- ϵ -viniférine sont des composants constitutifs connus du bois de vigne, nous avons émis comme hypothèse qu'il pourrait exister, de manière constitutive dans le bois de vigne, d'autres composants de la famille des stilbènes de même que d'autres classes de molécules qui pourraient être induites dans la feuille dans le processus de défense contre un microorganisme pathogène, *P. viticola*, en particulier.

La *figure 74* montre que le bois sain de vigne renferme des stilbènes de divers degré de polymérisation, dont le *trans*-resvératrol, la *trans*- ϵ -viniférine et l' α -viniférine (trimère de resvératrol). Ils feront l'objet de notre présent chapitre.

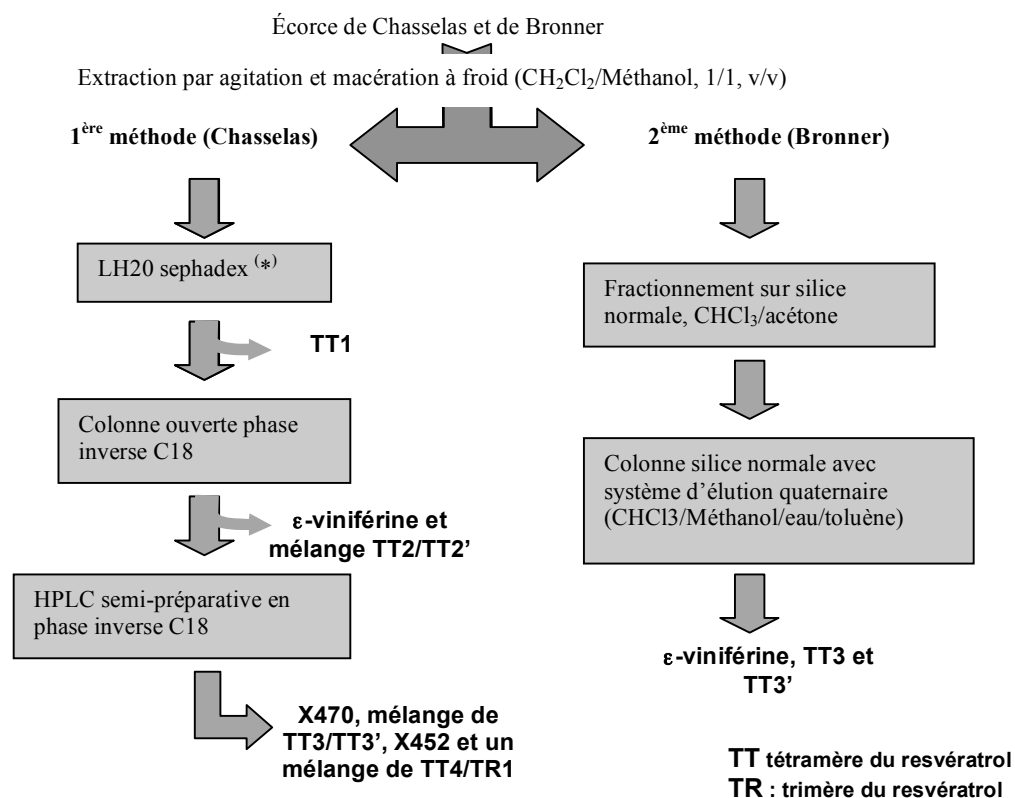


Figure 75 : Méthodes utilisées pour la caractérisation des stilbènes d'écorce de *V. vinifera*.

Nous avons alors entrepris des extractions d'écorces de deux variétés de *V. vinifera*, (Chasselas et Bronner) par deux méthodes (*figure 75*), suivant l'hypothèse que la composition qualitative en stilbène des différentes variétés *V. vinifera* est similaire. Par le fractionnement des extraits, la séparation et la purification, les composés suivants ont été identifiés : *trans*-resvératrol, *trans*- ϵ -viniférine, ampélopsine A, hopeaphénol, vitisine A et quelques oligomères de resvératrol qui ont fait l'objet d'une tentative d'identification. La première méthode nous a permis d'isoler un mélange de tétramères du resvératrol **TT2** et **TT2'**, puis la seconde, la séparation de deux autres tétramères de resvératrol **TT3** et **TT3'**. Nous présentons également les tests de ces substances sur la mobilité des zoospores de *P. viticola*.

La caractérisation et l'identification de ces substances par les méthodes spectroscopiques nous permettent d'affirmer que **TT1** et **TT3** correspondent à la vitisine A, **TT3'** à l'hopéaphénol et **X470** à l'ampélopsine A (*figure 75*). Par contre les composés **TT4**, **TR1**, **X452**, **TT2** et **TT2'** ne correspondent pas à des composés déjà identifiés (*figure 75*). Nous présentons ici l'identification de **X452**, **TT2** et **TT2'**. Par contre les composés **TT4** et **TR1** n'ont pas pu être identifiées car les quantités obtenues étaient très faibles.

Rappel : **TT** \rightarrow tétramères du resvératrol
TR \rightarrow trimères du resvératrol
X452 et **X470** \rightarrow deux oligomères de resvératrol de 452 et 470 uma,
respectivement

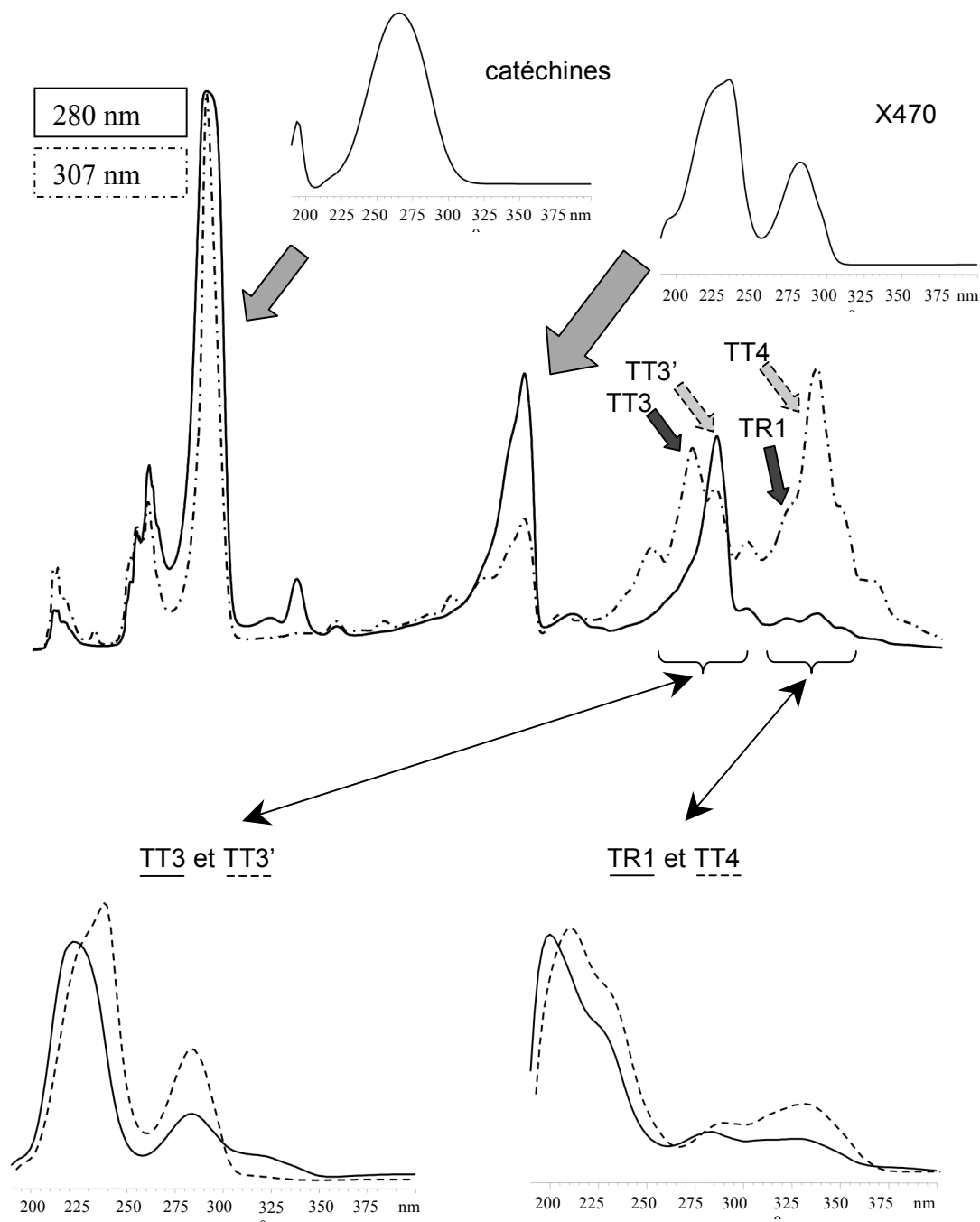


Figure 76 : Spectres UV des catéchines, de X470, de TT3, TT3', TR1 et TT4, résultats de la première méthode (chromatogrammes HPLC semi-préparative).

V-2-1 *Trans*-resvératrol et *trans*- ϵ -viniférine.

Nous confirmons la présence de *trans*-resvératrol (RT à 11.6 min, maxima d'absorption à 305 et 320 nm) et d' ϵ -viniférine (RT à 14.5 min, épaulement à 305-310 nm et maximum d'absorption à 322 nm) dans les écorces.

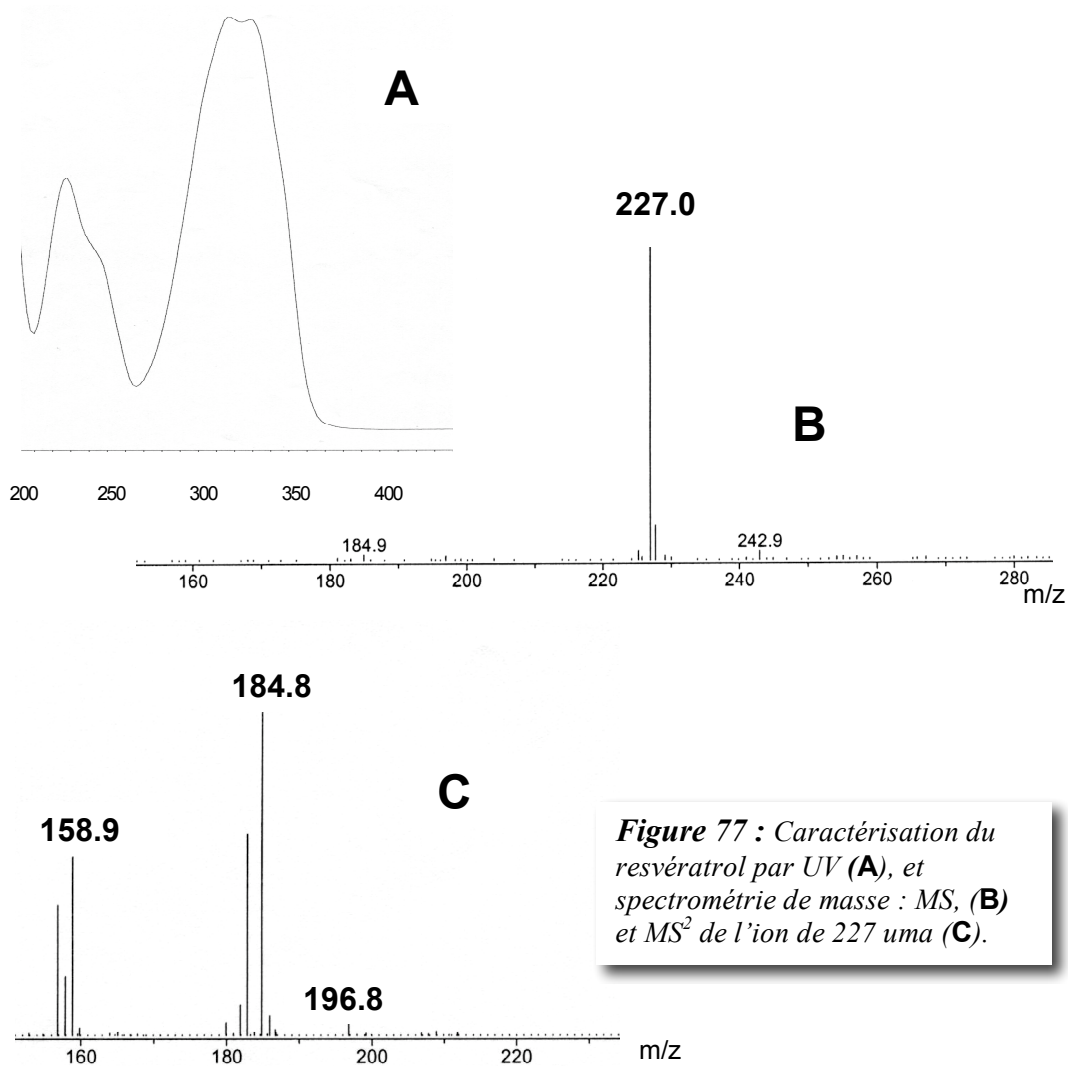
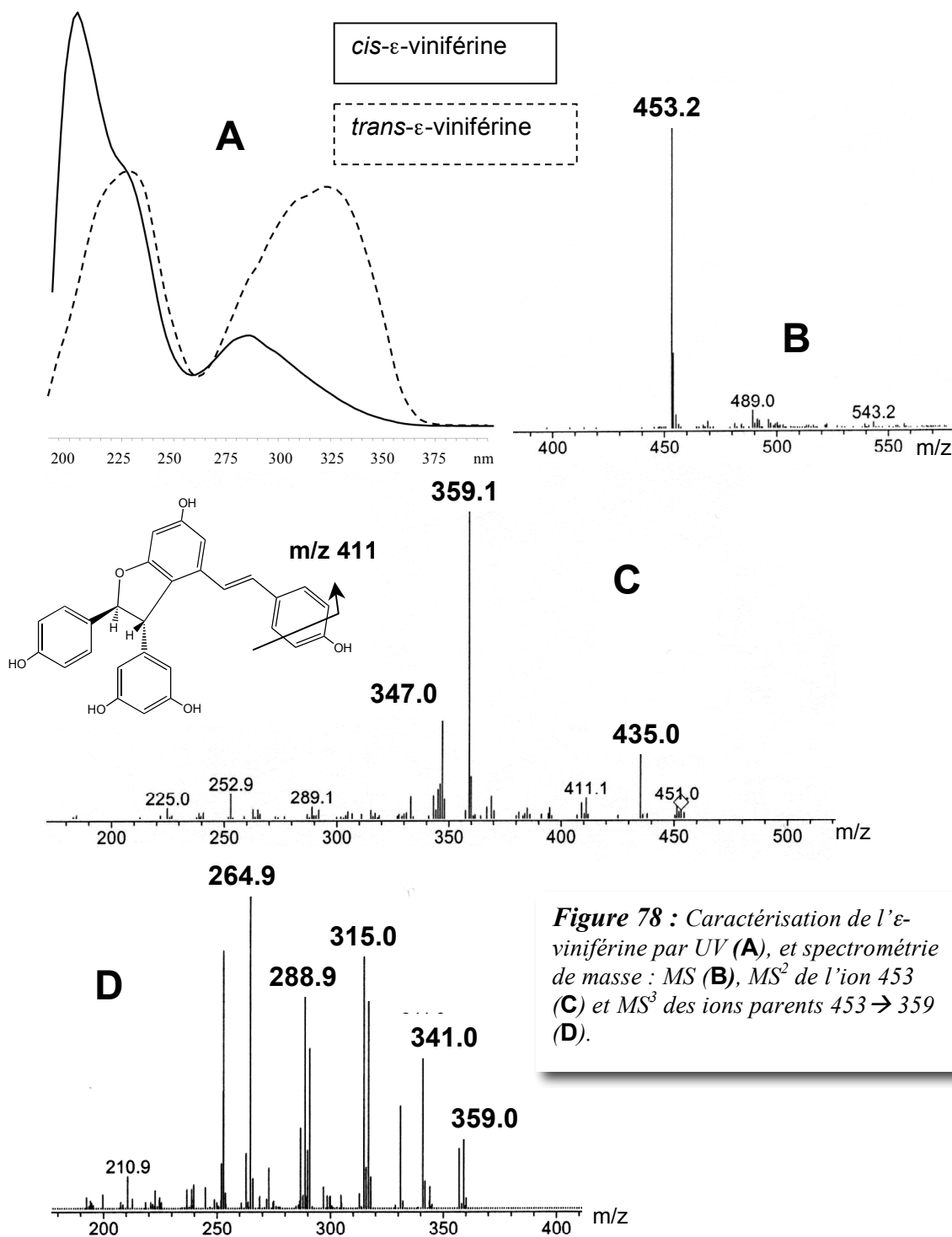


Figure 77 : Caractérisation du resvératrol par UV (A), et spectrométrie de masse : MS, (B) et MS² de l'ion de 227 uma (C).



Nous proposons les fragmentations suivantes pour tenter d'interpréter les spectres MS² du *trans*-resvératrol (*figure 79*) et du *trans*- ϵ -viniférine (*figure 80*) :

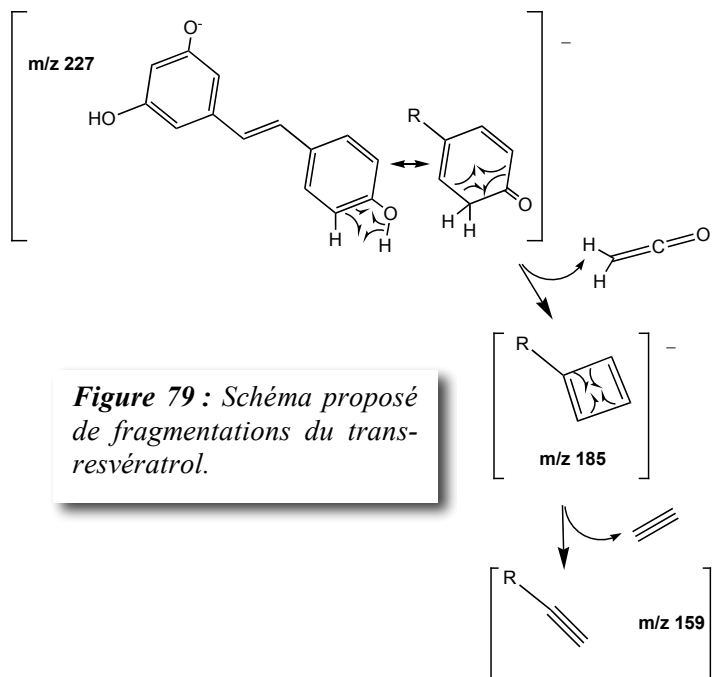


Figure 79 : Schéma proposé de fragmentations du *trans*-resvératrol.

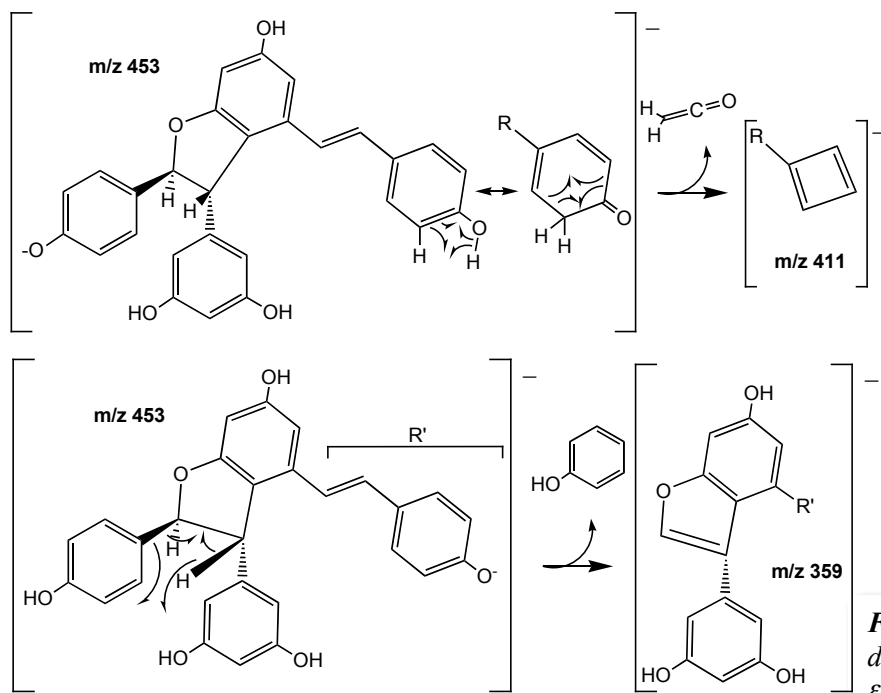


Figure 80 : Schéma proposé de fragmentations du *trans*- ϵ -viniférine.

V-2-2 Ampélopsine A.

La première méthode utilisée avec le bois de Chasselas nous a permis d'isoler cette substance en trois étapes suivant le processus d'extraction décrit à la partie V-2-7.

RT à 8.6 min (programme "stilbènes", maximum d'absorption à 283 nm).

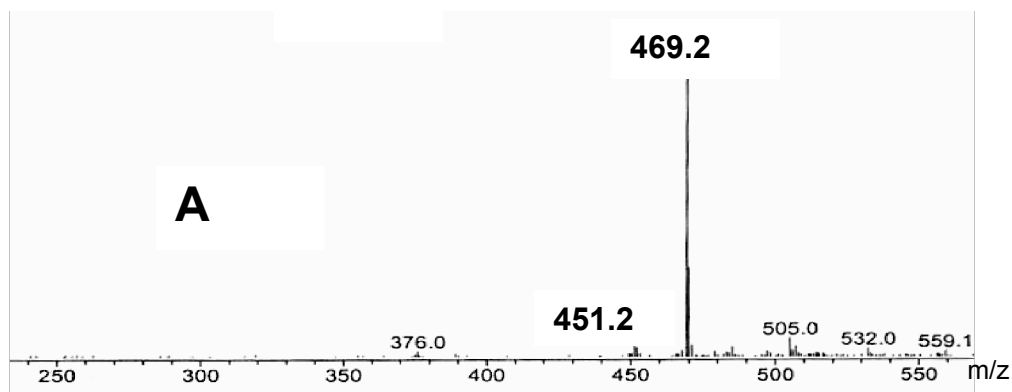
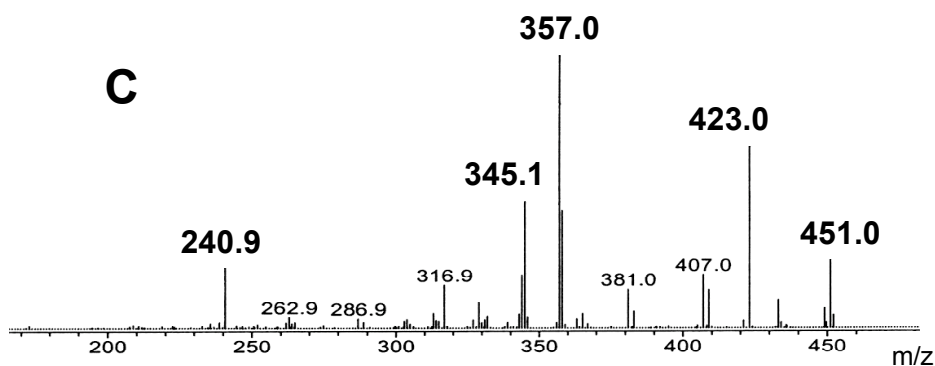
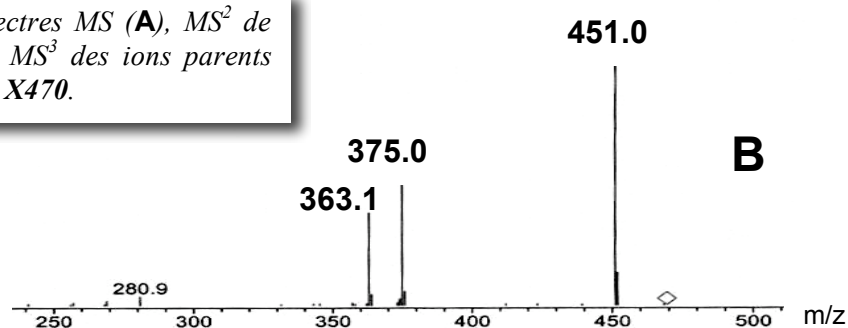


Figure 81 : Spectres MS (A), MS² de l'ion 469 (B) et MS³ des ions parents 469 → 451 (C) de X470.



La substance isolée est un composé phénolique de masse 470 uma (469 [M-H]⁻, 451 [M-H-H₂O]⁻, 375 [M-H-Phéno]⁻, 357 [M-H-H₂O-Phéno]⁻, *figure 81*).

Si nous prenons comme référence la masse d'un dimère de resvératrol de 454 uma, la substance **X470** apparaît comme un dimère de resvératrol tout simplement oxydé ou comme un dimère hydraté et pourvu d'une insaturation supplémentaire.

Tableau 9 : Données RMN-¹H (400 MHz) et RMN-¹³C (100 MHz) du composé à 470 uma.
(a) dans acétone-d₆ (voir le spectre en annexe)

(X470) ampélopsine A (a)				
	δ ¹ H (ppm)	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)	Corrélation HMBC
1a	-	-	130.6	
2a,6a	7.12d	8.6	129.4	158.1, 129.4, 87.9
3a,5a	6.78d	8.6	115.3	115.3, 130.6, 158.1
4a			158.1	
7a	5.76d	11.4	87.9	129.4, 142.7
8a	4.15d	11.4	48.9	87.7, 118.5, 142.7, 130.6
9a	-	-	142.7	
10a	-	-	118.5	
11a	-	-	156.9	
12a	6.43d	2	100.6	104.5, 118.5, 156.9
13a	-	-	156.9	
14a	6.23brd	2	104.5	100.6, 118.5
1b	-	-	132.2	
2b, 6b	6.90d	8.8	128.3	128.3, 155.5
3b, 5b	6.64d	8.7	114.6	114.6, 132.2, 155.5
4b	-	-	155.5	
7b	5.45d	4.7	43.2	140.1, 132.2, 118.5
8b	5.41t	4.7	70.3	
9b	-	-	140.1	
10b	-	-	118.3	
11b	-	-	159.7	
12b	6.15d	2.2	96.3	
13b	-	-	159.7	
14b	6.61d	2.1	110.1	118.3, 96.3
OH aliph.	3.45d	7.62		
OH arom.	8.07brs, 8.13brs, 8.24brs, 8.31brs et 8.45brs			

Deux dérivés de stilbènes bien connus des plantes du genre Vitaceae attirent notre attention, l'ampélopsine A et le balanocarpol. La comparaison des données RMN de **X470** à celles de ces substances permet d'identifier le composé **X470** comme l'ampélopsine A.

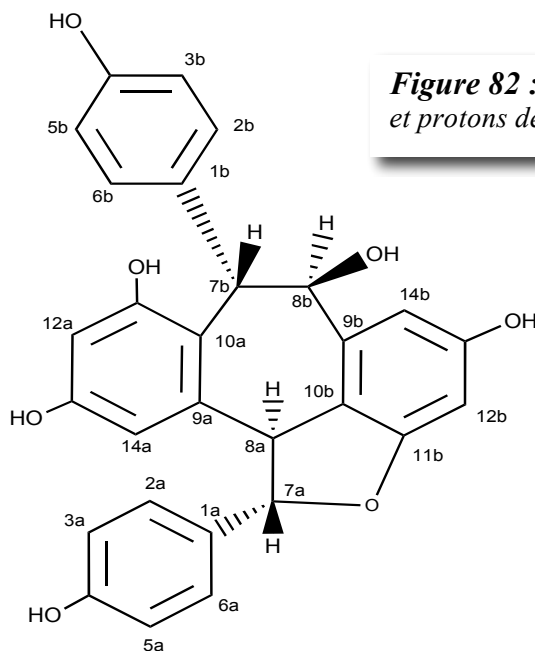


Figure 82 : Attribution des carbones et protons de l'ampélopsine A.

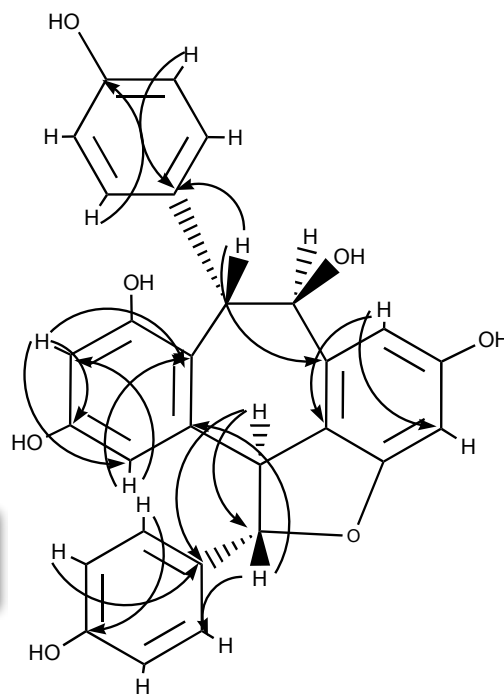


Figure 83 : Corrélation HMBC de l'ampélopsine A.

Quatre paires de protons couplant en *ortho* montrent la présence de deux groupes 4-hydroxyphenyl dans la molécule (*tableau 9, figure 82*) : **2a, 6a** (δ 7.12 ppm) ; **3a, 5a** (δ 6.78 ppm) ; **2b, 6b** (δ 6.90 ppm) ; **3b, 6b** (δ 6.64 ppm).

Nous observons également la présence de deux paires de protons aromatiques couplés en *meta* prouvant la présence de deux noyaux benzéniques tétrasubstitués : **12a, 14a** (δ 6.43 et 6.23 ppm, respectivement) ; **12b, 14b** (δ 6.15 et 6.61 ppm, respectivement).

Les larges signaux dans les champs faibles à 8.07, 8.13, 8.24, 8.31 et 8.45 ppm nous indiquent la présence de 5 hydroxyles phénoliques libres.

Il a été difficile de confirmer les déplacements chimiques des carbones **11b** et **13b** par les résultats de corrélation HMBC obtenues, c'est pour cela que nous leur avons attribué la valeur de déplacement chimique observée dans le spectre de ^{13}C INEPT (*tableau 9*).

Comme le soulignent Huang *et al.* [142], l'ampélopsine A et le balanocarpol ont une structure plane semblable, exceptée au niveau de la configuration *trans* ou *cis* entre les protons **7b** et **8b**. La différence entre les spectres RMN résulterait de la différente conformation du heptacycle dans l'ampélopsine A (pseudo-bâteau) et dans le balanocarpol (pseudo-chaise).

Les données RMN des protons et carbones de **X470**, ci-après (*tableau 10*), ont été comparées avec celles de l'ampélopsine A et du balanocarpol décrites dans la littérature [65,66,134,142-144].

V-2-3 Vitisine A.

Les substances isolées **TT1** (2mg) et **TT3** (21.2 mg) présentent des similitudes dans leurs caractéristiques spectrales et chromatographiques (RT à 15.7 min, programme "stilbènes").

Tableau 10 : Comparaison des données RMN-¹H et RMN-¹³C du composé **X470** avec les données de la littérature. (a) dans acétone-d₆

	X470 (a)			Ampélopsine A ^(*)			Balanocarpol ^(**)		
	$\delta^1\text{H}^a$	J ^b	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}^a$	J ^b	$\delta^{13}\text{C}^a$	$\delta^1\text{H}^a$	J ^b	$\delta^{13}\text{C}^a$
1a	-	-	130.6	-	-	132.3	-	-	133.7
2a,6a	7.12d	8.6	129.4	7.10d	8.4	129.6	7.50d	8.3	130.0
3a,5a	6.78d	8.6	115.3	6.77d	8.4	115.6	6.90d	8.3	116.4
4a	-	-	158.1	-	-	156.9	-	-	158.6
7a	5.76d	11.4	87.9	5.75d	11.4	88.1	5.69d	9.3	93.5
8a	4.15d	11.4	48.9	4.15d	11.4	49.2	5.16brd	9.3	52.3
9a	-	-	142.7	-	-	142.7	-	-	142.3
10a	-	-	118.5	-	-	118.5	-	-	120.4
11a	-	-	156.9	-	-	155.7	-	-	157.4
12a	6.43d	2	100.6	6.42d	2.2	101.1	6.09brs		102.0
13a	-	-	156.9	-	-	158.5	-	-	156.9
14a	6.23brd	2	104.5	6.22brs		105.1	5.96d	2.3	106.8
1b	-	-	132.2	-	-	130.6	-	-	133.5
2b, 6b	6.90d	8.8	128.3	6.88d	8.8	128.3	6.75d	8.3	131.5
3b, 5b	6.64d	8.7	114.6	6.63d	8.4	115.0	6.42d	8.3	115.0
4b	-	-	155.5	-	-	158.1	-	-	155.8
7b	5.45d	4.7	43.2	5.44d	4.8	43.5	4.90brs		50.3
8b	5.41t	4.7	70.3	5.40d	4.8	70.7	5.40brs		73.2
9b	-	-	140.1	-	-	140.1	-	-	140.8
10b	-	-	118.3	-	-	118.0	-	-	113.8
11b	-	-	159.7	-	-	159.8	-	-	159.7
12b	6.15d	2.2	96.3	6.14d	2.2	97.0	6.20brs		95.1
13b	-	-	159.7	-	-	159.8	-	-	159.2
14b	6.61d	2.1	110.1	6.60d	2.2	110.1	6.26d	2	104.4
OH							7.74s, 7.85s, 8.04s, 8.56s		7.97s,

^a en ppm, ^b en Hz, ^(*) données RMN de Takaya *et al.* [134], ^(**) données RMN de Tanaka *et al.* [65] dans acétone-d₆.

L'analyse de **TT1** n'a pu donner lieu qu'à la RMN des protons, la RMN des carbones n'étant pas assez bien résolus. Par contre, l'analyse de **TT3** nous a permis d'effectuer l'attribution des carbones de manière à compléter et à identifier la structure commune de **TT1** et **TT3**. Leur absorption entre 300 et 350 nm nous indique la présence éventuelle dans la structure d'une aromaticité mettant en jeu des phénomènes de mésomérie et nous suggère la présence d'une double liaison (δ 6.40s).

Figure 84 : Identification des protons éthyléniques sur le spectre COSY de **TT3**.

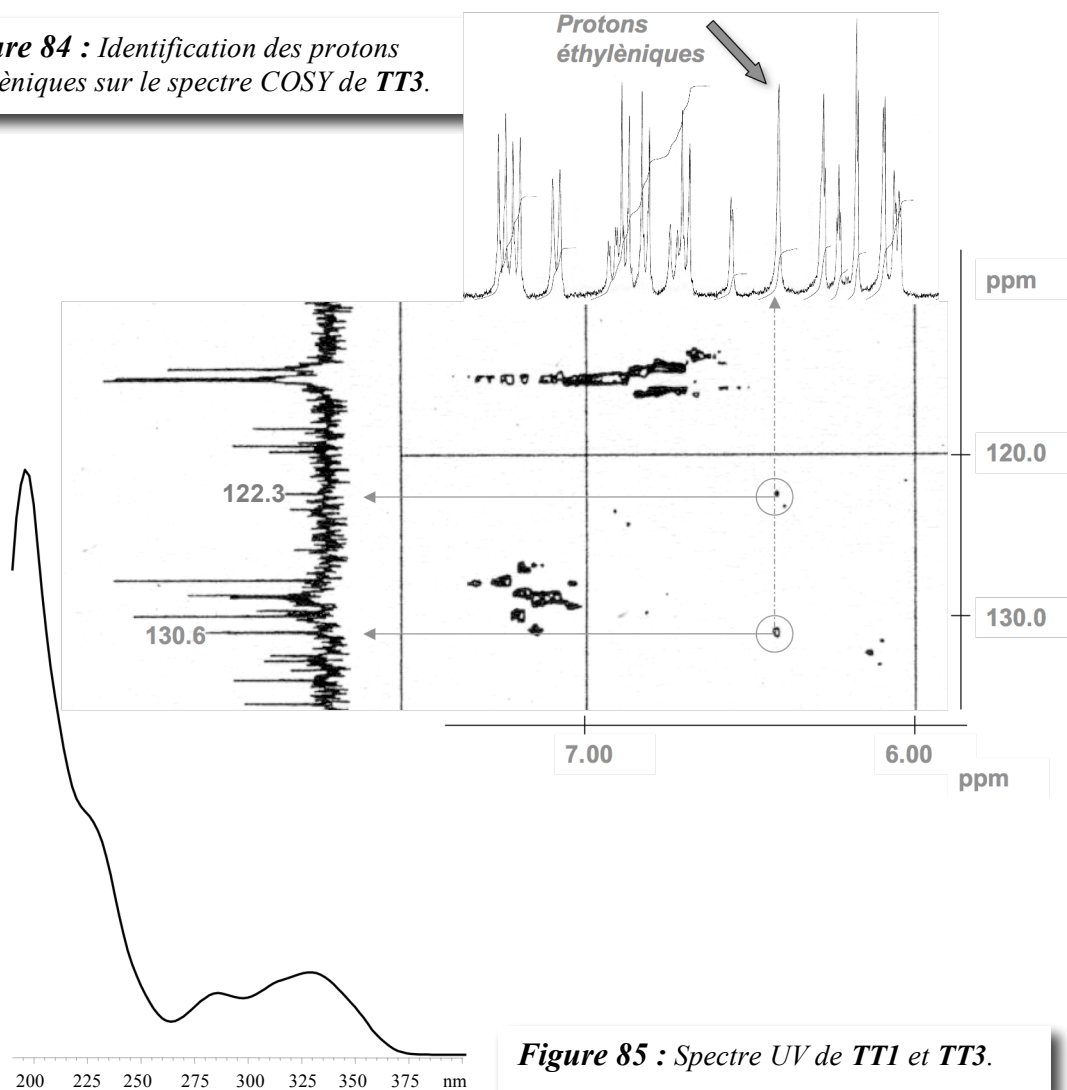


Figure 85 : Spectre UV de **TT1** et **TT3**.

Tableau 11 : Données données RMN-¹H et RMN-¹³C des composés **TT1** et **TT3**.
(voir le **tableau 12** présentant la comparaison entre **TT3** et les données RMN de la vitisine *A* trouvée par Ito et al. [44]). (a) dans acétone-d₆ (voir le spectre de **TT1** en annexe)

	TT1 (a)		TT3 (a)			
	$\delta^1\text{H}^a$	J ^b	$\delta^1\text{H}^a$	J ^b	$\delta^{13}\text{C}^a$	Corrélation HMBC
1a	-	-	-	-	133.4	
2a,6a	7.22d	8.6	7.21d	8.5	127.4	127.4, 158.2, 93.3
3a,5a	6.84d	8.5	6.85d	8.6	115.6	159.0, 115.6, 133.4
4a	-	-	-	-	158.2	
7a	5.37d	5.5	5.37d	5.2	93.3	127.4
8a	4.68d	5.5	4.42d	5.2	56.6	118.4, 106.3, 146.7, 133.4
9a	-	-	-	-	146.7	
10a,14a	6.17d	2.1	6.17d	2.2	106.3	101.5, 106.3, 159.8, 56.6
12a	6.23t	2.1	6.23t	2.1	101.5	106.3
11a,13a	-	-	-	-	159.8	
1b	-	-	-	-	129.3	
2b	6.10d	2.1	6.10d	2.1	132.0	104.4, 119.8
3b	-	-	-	-	?	
4b	-	-	-	-	154.6	
5b	6.70d	8.4	6.72d	8.6	115.4	129.3
6b	6.87dd	8.4,2.2	6.88dd	8.4,2.4	123.2	154.6, 132.0
7b	6.40s	-	6.40brs	-	122.3	} 136.1, 129.3
8b	6.40s	-	6.40brs	-	130.6	
9b	-	-	-	-	136.1	
10b	-	-	-	-	118.4	
11b	-	-	-	-	?	
12b	6.27brd	-	6.27d	1.9	96.0	104,1
13b	-	-	-	-	?	
14b	6.54d	2.1	6.54d	2.1	104.1	118.4
1c	-	-	-	-	130.6	
2c,6c	7.16d	8.6	7.17d	8.6	129.6	129.6, 159.2, 88.0
3c,5c	6.78d	8.6	6.79d	8.6	115.4	130.6, 115.4
4c	-	-	-	-	159.2	
7c	5.90d	11.4	5.90d	11.6	88.0	
8c	4.25d	11.4	4.26d	11.6	49.0	119.8, 141.8
9c	-	-	-	-	141.8	
10c	-	-	-	-	119.8	
11c	-	-	-	-	?	
12c	6.05d	2.2	6.07d	2.2	100.3	146.7
13c	-	-	-	-	?	
14c	6.27d	1.9	6.29brd	-	104.4	119.5
1d	-	-	-	-	133.4	
2d,6d	7.05d	8.4	7.06d	8.7	128.3	128.3, 155.4
3d,5d	6.67d	8.4	6.67d	8.7	114.9	136.1, 114.9, 133.4, 128.3
4d	-	-	-	-	155.4	
7d	5.40d	3.4	5.39d	3.7	40.1	
8d	5.50brd	-	5.51brd	4.1	40.7	
9d	-	-	-	-	?	
10d	-	-	-	-	?	
11d	-	-	-	-	?	
12d	6.10d	2.1	6.11brs	-	95.5	109.5
13d	-	-	-	-	?	
14d	6.06d	2.1	6.07d	2.2	109.5	
OH	7.74s, 8.03s, 8.05s, 8.10s, 8.12s, 8.24s, 8.37s, 8.37s, 8.50s, 8.53s et 8.68s	-	-	-	-	-

a, en ppm, ;b, en Hz

TT1 et **TT3** montrent des spectres RMN très semblables (*tableau 11*). Nous notons cependant que pour le proton attribué au carbone **8a**, ils présentent des déplacements chimiques de 4.68 et 4.42 ppm respectivement. Les protons des carbones **2b** et **12d** présentent le même déplacement chimique, 6.10 ppm.

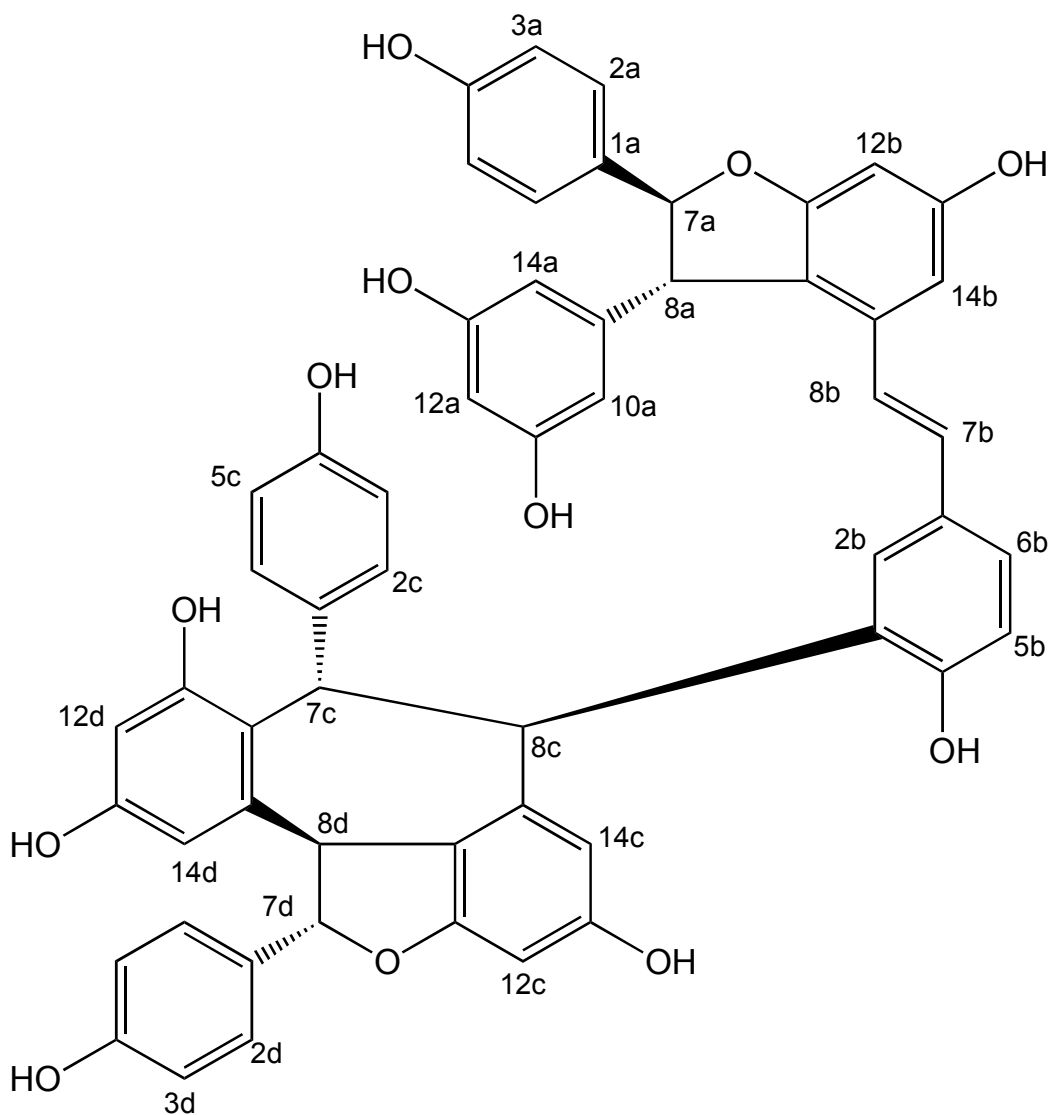
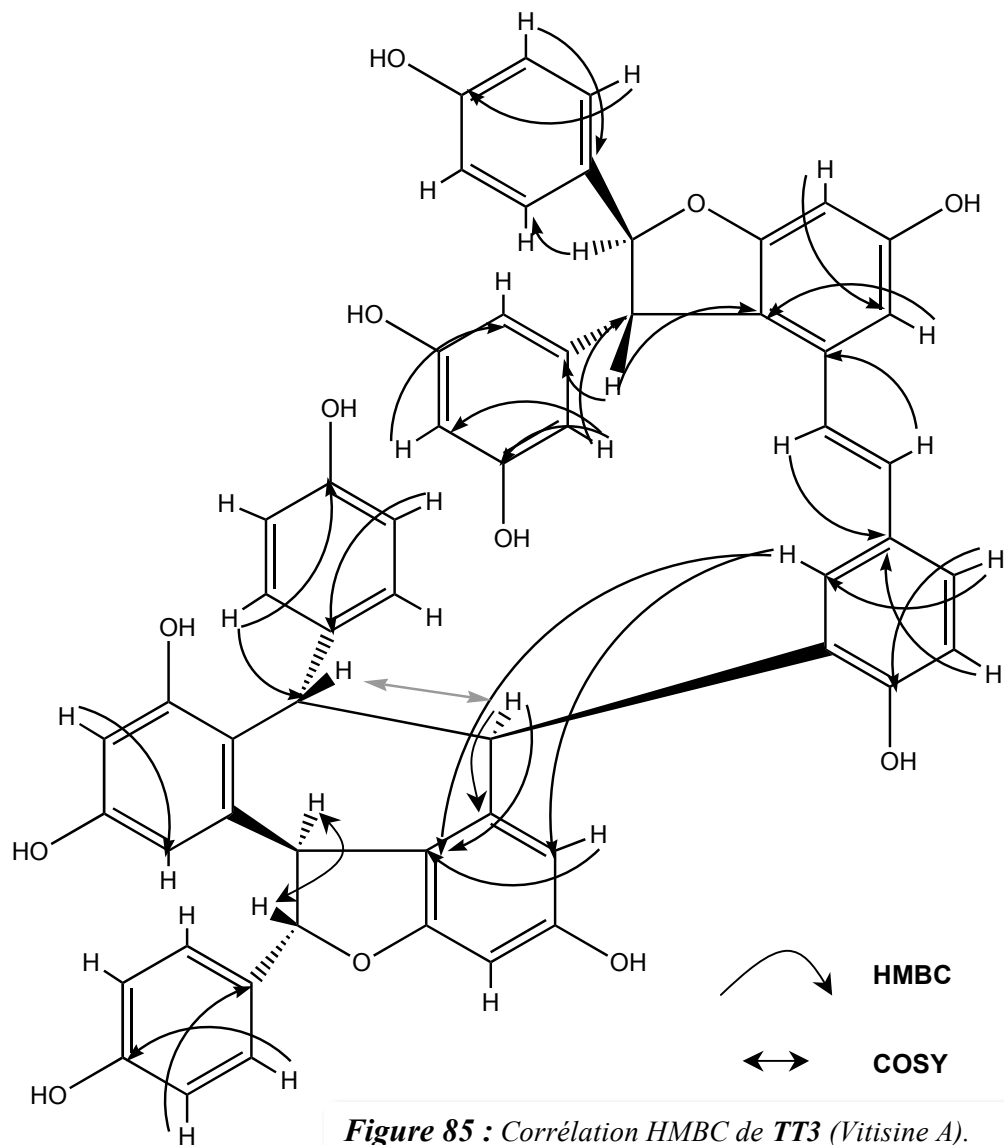


Figure 86 : Assignation des carbones et protons de **TT1** et **TT3** (vitisine A).



Tenant compte de la faible résolution de notre spectre HMBC, nous n'avons pas été en mesure de confirmer la totalité des corrélations entre les protons et les carbones quaternaires de nos molécules (*tableau 11*). **TT3** correspondrait à la vitisine A décrite dans la littérature (*tableau 12*). **TT1** serait un analogue de la vitisine A, différent par la configuration absolue du carbone **8a**.

Tableau 12 : Comparaison des données RMN-¹H et RMN-¹³C du composé **TT3** (vitisine A) avec les données de la littérature.

	(TT3) Vitisine A dans acétone-d6			Données de Ito <i>et al.</i> [40] dans acétone-d6		
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1a	-	-	133.4	-	-	133.8
2a,6a	7.21d	8.5	127.4	7.18d	8.4	127.9
3a,5a	6.85d	8.6	115.6	6.82d	8.4	116.1
4a	-	-	158.2	-	-	158.1
7a	5.37d	5.2	93.3	5.35d	5.5	93.8
8a	4.42d	5.2	56.6	4.40d	5.5	57.0
9a	-	-	146.7	-	-	147.2
10a,14a	6.17d	2.2	106.3	6.16d	2.2	106.8
12a	6.23t	2.1	101.5	6.21t	2.2	102.0
11a,13a	-	-	159.8	-	-	159.7
1b	-	-	129.3	-	-	128.8
2b	6.10d	2.1	132.0	6.07d	2.2	132.5
3b	-	-	?	-	-	132.7
4b	-	-	154.6	-	-	155.1
5b	6.72d	8.6	115.4	6.68d	8.4	115.4
6b	6.88dd	8.4,2.4	123.2	6.84dd	8.4,2.2	123.5
7b	6.40brs	-	122.3	6.38s	-	122.5
8b	6.40brs	-	130.6	6.38s	-	130.9
9b	-	-	136.1	-	-	136.5
10b	-	-	118.4	-	-	119.0
11b	-	-	?	-	-	162.4
12b	6.27d	1.9	96.0	6.25d	2.2	96.5
13b	-	-	?	-	-	159.5
14b	6.54d	2.1	104.1	6.50d	2.2	104.3
1c	-	-	130.6	-	-	130.9
2c,6c	7.17d	8.6	129.6	7.14d	8.4	130.0
3c,5c	6.79d	8.6	115.4	6.77d	8.4	115.9
4c	-	-	159.2	-	-	158.5
7c	5.90d	11.6	88.0	5.87d	11.4	88.4
8c	4.26d	11.6	49.0	4.23d	11.4	49.4
9c	-	-	141.8	-	-	142.2
10c	-	-	119.8	-	-	120.3
11c	-	-	?	-	-	157.9
12c	6.07d	2.2	100.3	6.02d	2.2	100.8
13c	-	-	?	-	-	156.9
14c	6.29brd	-	104.4	6.24d	2.2	104.9
1d	-	-	133.4	-	-	135.3
2d,6d	7.06d	8.7	128.3	7.02d	8.4	128.8
3d,5d	6.67d	8.7	114.9	6.65d	8.4	115.4
4d	-	-	155.4	-	-	155.9
7d	5.39d	3.7	40.1	5.38d	3.3	40.3
8d	5.51brd	4.1	40.7	5.47d	3.3	41.3
9d	-	-	?	-	-	141.1
10d	-	-	?	-	-	120.0
11d	-	-	?	-	-	158.7
12d	6.11brs	-	95.5	6.08d	1.8	96.0
13d	-	-	?	-	-	160.
14d	6.07d	2.2	109.5	6.04d	1.8	110.0

Nous constatons le haut degré d'homologie entre les déplacements chimiques et des constantes de couplages mesurées de **TT3** et de la vitisine A, malgré les déplacements chimiques des carbones quaternaires manquant [40].

V-2-4 Hopeaphénol.

La première méthode d'extraction utilisée pour le bois de Chasselas ne nous avait pas permis d'isoler d'une manière convenable (pureté) cette substance (39.4 mg, RT à 13.5 min avec le programme "stilbènes").

Bien que la spectroscopie de masse nous indique que ce composé phénolique possède une masse de 906 uma (905 m/z [M-H]⁻, 811 m/z [M-H-Phénol]⁻, 717 m/z [M-H-2xPhénol]⁻, *figure 88*), le spectre COSY ne paraît pas très compliqué. Ceci sous-entend la présence d'un élément de symétrie dans la structure moléculaire. Le spectre MS² nous indique, par la présence d'un fragment à 451 m/z, l'éventuelle présence de l'ampélopsine A dans la structure.

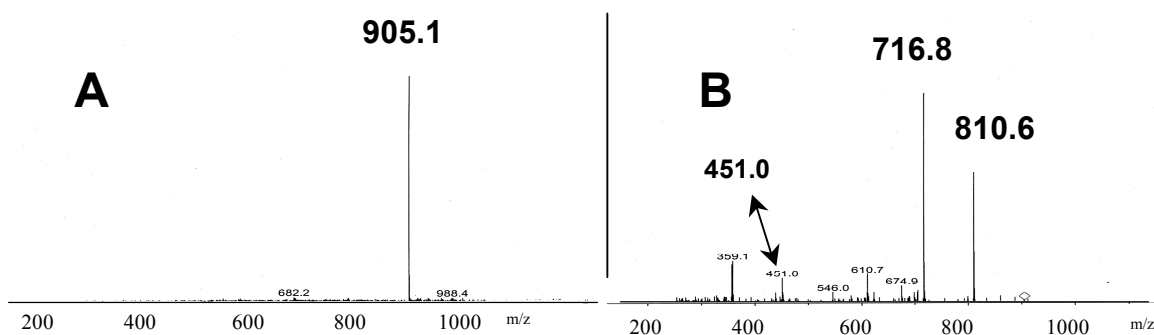


Figure 88 : Spectre MS (A) et MS² (B) de **TT3'** (Hopeaphénol), ESI mode négatif.

(TT3') Hopeaphénol (a)				
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Corrélation HMBC
1a	-	-	130.5	
2a,6a	7.16d	8.6	129.8	87.7, 129.8, 157.9
3a,5a	6.81d	8.6	115.4	115.4, 130.5, 156.7
4a	-	-	157.9	
7a	5.77d	12.1	87.7	129.8, 141.9
8a	4.25d	12.1	49.3	87.7, 118.1, 120.6, 130.5, 141.9
9a	-	-	141.9	
10a	-	-	120.6	
11a	-	-	158.2	
12a	6.57brs	-	100.4	105.8, 120.6, 156.6
13a	-	-	156.6	
14a	6.31d	1.7	105.8	49.3, 100.4, 120.6, 156.6
1b	-	-	134.7	
2b, 6b	6.92d	8.6	128.8	40.7, 128.8, 155.0
3b, 5b	6.57d	8.4	114.6	114.6, 134.7, 155.5
4b	-	-	155.0	
7b	5.83brs	-	40.7	120.6, 140.0, 158.2, 47.7
8b	3.95brs	-	47.7	40.7, 47.7, 118.1, 120.6, 140.0
9b	-	-	140.0	
10b	-	-	118.1	
11b	-	-	156.6	
12b	5.74d	2.2	94.7	110.7, 118.1, 129.8, 156.6
13b	-	-	156.6	
14b	5.19d	2.2	110.7	47.7, 94.7, 118.1, 156.6

Tableau 13 : Données RMN-¹H et RMN-¹³C de (TT3') hopeaphénol. (a), dans acétone-d₆ (voir le spectre dans en annexe)

Dans le spectre RMN, nous notons la présence de :

- deux protons sur la partie aliphatique d'un cycle dihydrofurane, **7a** et **8a** respectivement à δ 5.77 et 4.25 ppm, J (H_{7a}, H_{8a}) = 12.1 Hz (*tableau 13*).
- deux paires de doublets appartenant à deux systèmes AA'/BB' de noyaux phényles *para*-disubstitués. Leur constante de couplage sont 8.4-8.6 Hz (*tableau 13*).
- deux paires de protons en *méta* appartenant à des noyaux benzéniques tetrasubstitués (**12a** et **14a** ; **12b** et **14b**), *tableau 13*.

Les spectres HMBC nous apportent les informations sur la positions des carbones quaternaires par rapport aux protons. Ceci nous a permis d'établir la structure moléculaire de **TT3'**, correspondant à l'hopeaphénol.

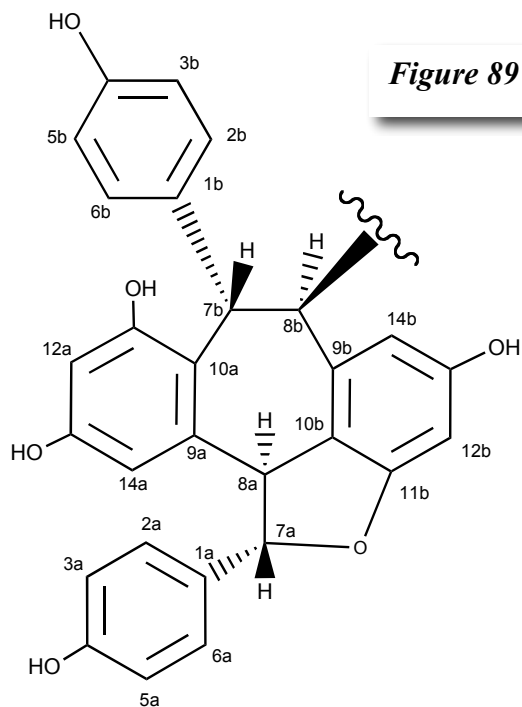


Figure 89 : Hémi-(TT3') hopeaphénol.

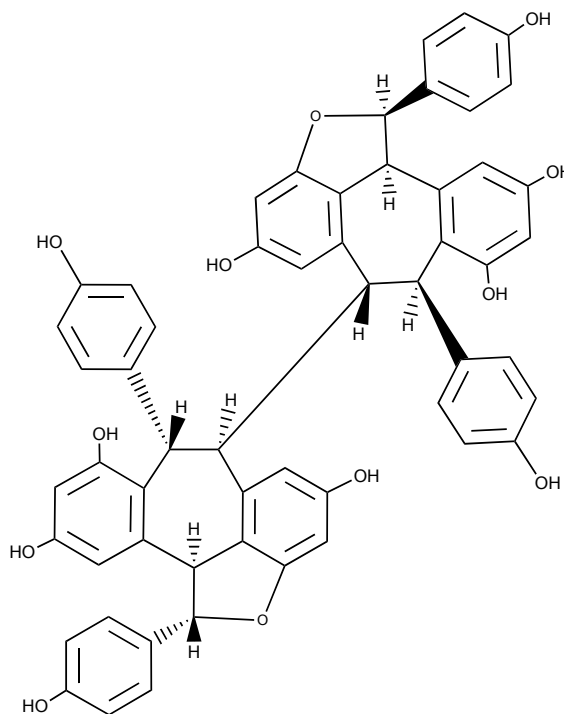


Figure 90 : Structure proposée de l'hopeaphénol.

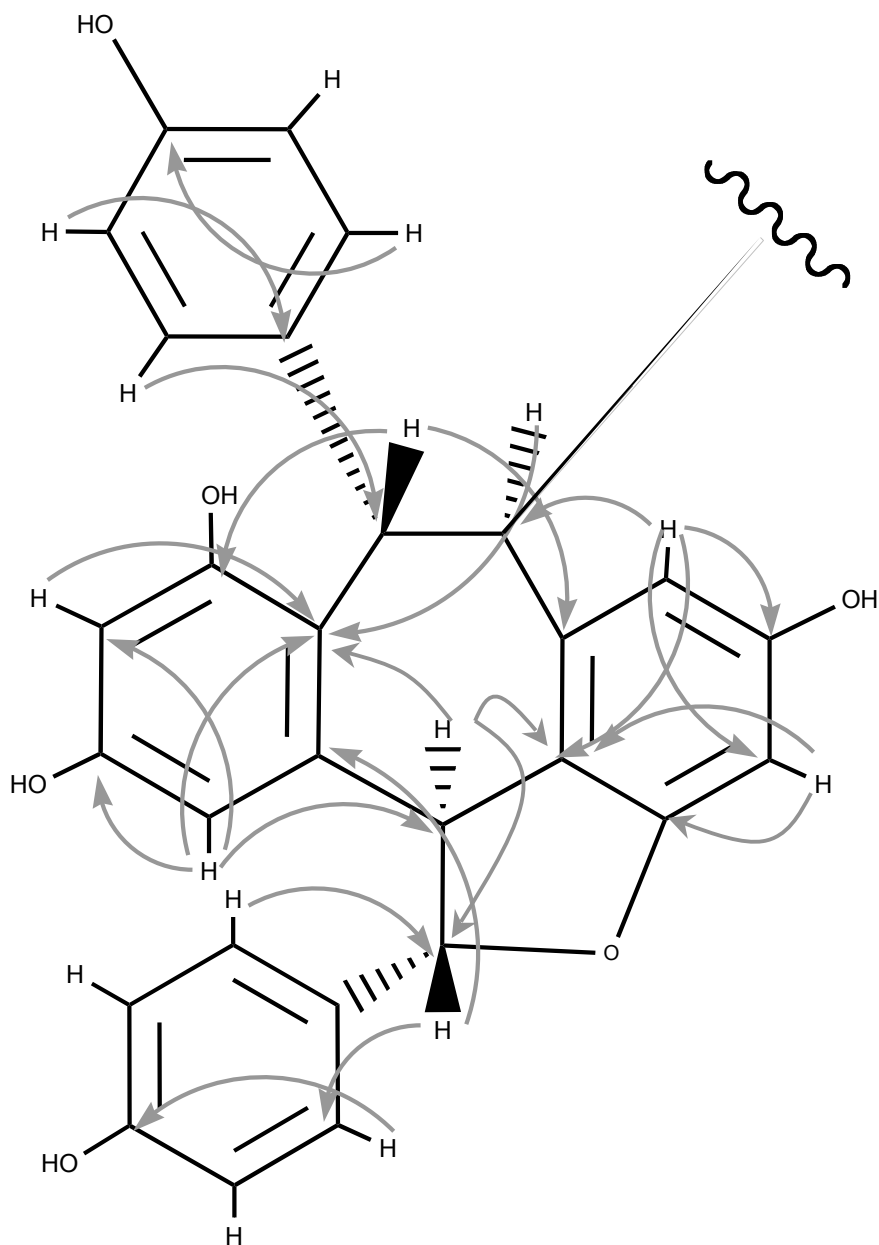


Figure 91 : Corrélation HMBC sur l'hémi-(TT3') hopeaphénol.

Nos données RMN (*tableau 14*) ont été comparées avec celles de Reniero *et al.* [145], qui ont identifié pour la première fois l'hopeaphénol dans les racines du genre *Vitis*. Bezhushvili *et al.* [146] ont aussi décrit le même composé (RMN dans le chloroforme-d6) extrait de jeunes tiges de *V. vinifera* (Rkatsiteli).

Tableau 14 : Comparaison des données RMN-¹H et RMN-¹³C du composé obtenu avec les données de la littérature.
(a), dans acétone-d6

	(TT3') Hopeaphénol (a)			Données de Reniero <i>et al.</i> [145]		
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1a	-	-	130.5	-	-	131.0
2a,6a	7.16d	8.6	129.8	7.16m	-	130.3
3a,5a	6.81d	8.6	115.4	6.78m	-	116.0
4a	-	-	157.9	-	-	158.4
7a	5.77d	12.1	87.7	5.75d	12.0	88.2
8a	4.25d	12.1	49.3	4.22d	12.0	49.7
9a	-	-	141.9	-	-	142.4
10a	-	-	120.6	-	-	121.2
11a	-	-	158.2	-	-	157.2
12a	6.57brs	-	100.4	6.52d	-	101.2
13a	-	-	156.6	-	-	157.2
14a	6.31d	1.7	105.8	6.28d	2.0	106.3
1b	-	-	134.7	-	-	135.0
2b, 6b	6.92d	8.6	128.8	6.88m	-	129.4
3b, 5b	6.57d	8.4	114.6	6.56m	-	115.3
4b	-	-	155.0	-	-	155.6
7b	5.83brs	-	40.7	5.80brs	-	41.2
8b	3.95brs	-	47.7	3.91brs	-	48.2
9b	-	-	140.0	-	-	140.4
10b	-	-	118.1	-	-	118.6
11b	-	-	156.6	-	-	158.7
12b	5.74d	2.2	94.7	5.73d	2.0	95.2
13b	-	-	156.6	-	-	159.2
14b	5.19d	2.2	110.7	5.16d	2.0	111.2

V-2-5 Autres oligomères de resvératrol.

V-2-5-1 Dimère de resvératrol, X452.

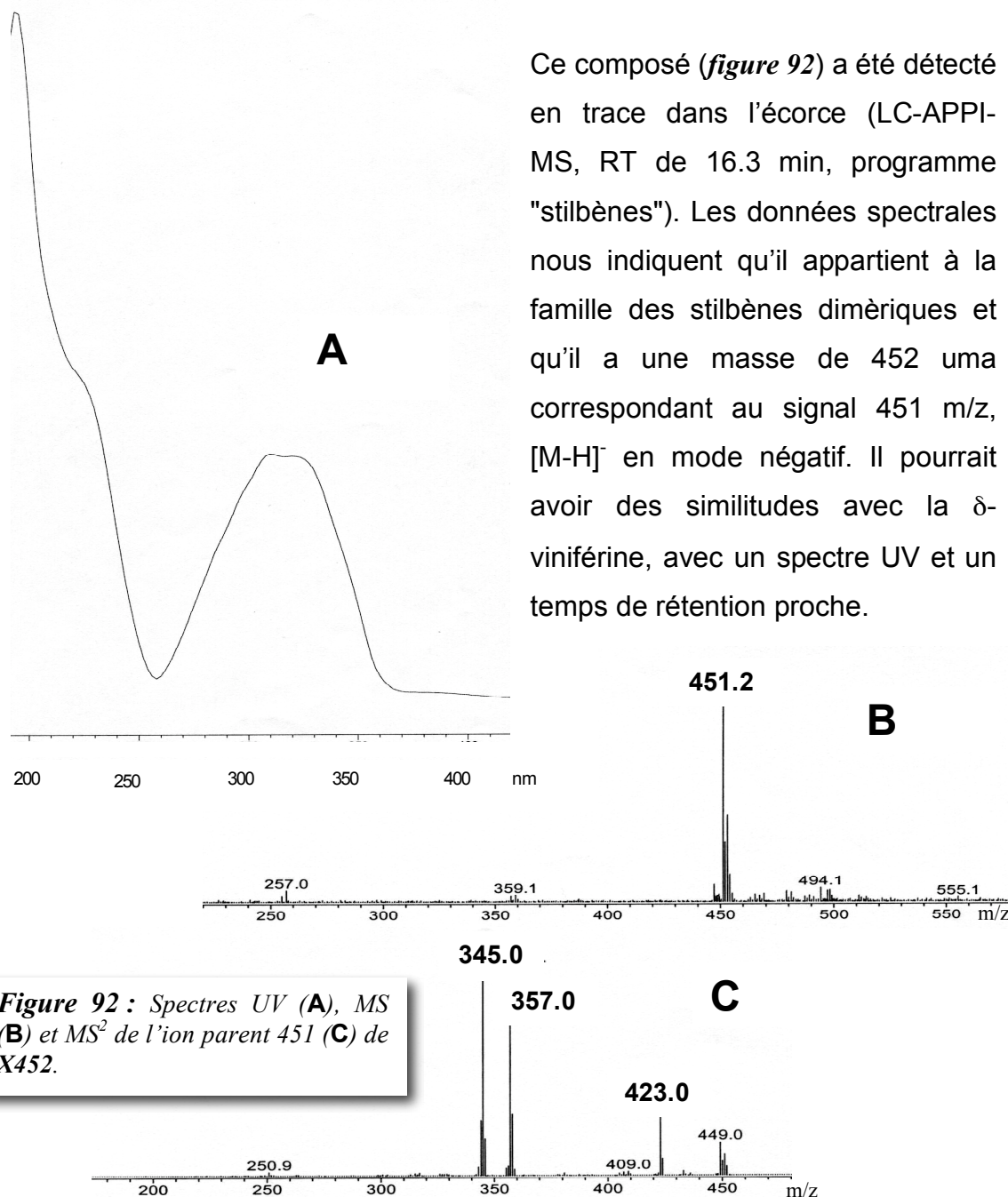


Figure 92 : Spectres UV (A), MS (B) et MS² de l'ion parent 451 (C) de X452.

La forte absorption UV entre 300 et 350 nm nous indique qu'il est probable que la molécule contienne des protons éthyléniques avec une double liaison participant à l'aromaticité. Les fragments générés par MS² nous rappelle le spectre MS³ de l'ampélopsine A (voir partie V-2-2), sous-entendant l'existence d'une partie commune entre cette dernière et X452.

V-2-5-2 Tétramère de resvératrol, TT2.

Figure 93 : Spectre UV de TT2.

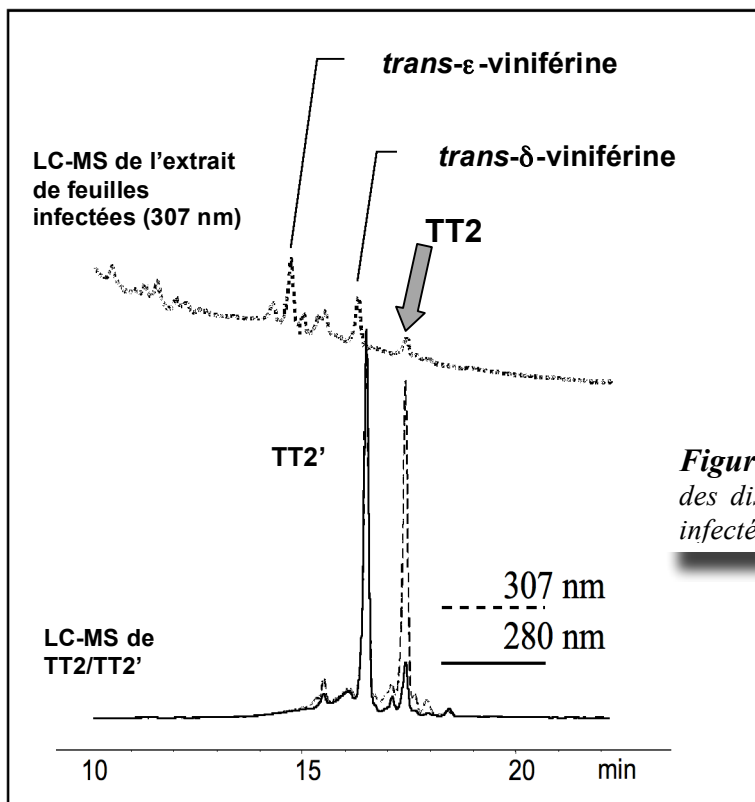
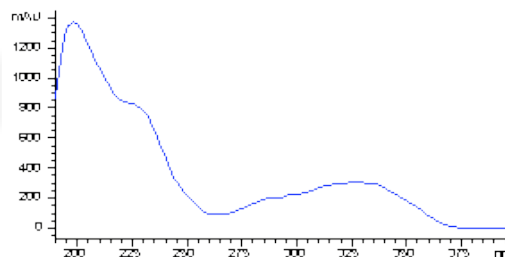


Figure 94 : Détection de TT2 dans des disques de feuilles de chasselas infectées.

La première méthode de caractérisation de stilbènes présents dans l'écorce de chasselas, nous obtenons un mélange de deux tétramères de resvératrol, **TT2'** et **TT2**, possédant des temps de rétention (programme "stilbènes") à 16.5 et 17.4 min, respectivement.

Nous détectons aussi des traces de **TT2** dans des extraits méthanoliques de feuilles de chasselas infectées. La spectroscopie de masse confirme que **TT2** et **TT2'** sont deux isomères de tétramères de resvératrol (ESI-MSⁿ, 905 m/z [M-H]⁻, 887 m/z [M-H-H₂O]⁻, 811 m/z [M-H-phénol]⁻, 799 m/z ?, 781 m/z [799-phénol]⁻).

Tableau 15 : Comparaison des données RMN-¹H et RMN-¹³C (HSQC) du mélange obtenu **TT2/TT2'** avec les données de la littérature. (a) dans acétone-d₆

	(TT2'/TT2) (a)			Données de Li et al. [147] <i>trans-ε-viniférine</i>		
	δ ¹ H (ppm)	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)
1a	-	-	-	-	-	-
2a,6a	7.21d	8.5	127.4	7.21d	7	127.9
3a,5a	6.85d	8.5	115.6	6.83d	7	116.0
4a	-	-	-	-	-	-
7a	5.42d	5.3	93.4	5.44d	5.4	93.6
8a	4.46d	5.3	56.5	4.46d	5.4	57.0
9a	-	-	-	-	-	-
10a	6.25brs	-	106.4	6.24brs	-	106.8
11a	-	-	-	-	-	-
12a	6.25brs	-	101.6	6.24brs	-	101.9
13a	-	-	-	-	-	-
14a	6.25brs	-	106.4	6.24brs	-	106.8
1b	-	-	-	-	-	-
2b, 6b	?	?	?	7.19d	7	128.4
3b, 5b	?	?	?	6.74d	7	116.1
4b	-	-	-	-	-	-
7b	6.78d	16.9	129.8	6.91d	16.2	129.9
8b	6.65d	16.4	123.5	6.71d	16.2	123.2
9b	-	-	-	-	-	-
10b	-	-	-	-	-	-
11b	-	-	-	-	-	-
12b	6.33brd	1.5	96.3	6.33d	2	96.6
13b	-	-	-	-	-	-
14b	6.68d	2.1	103.9	6.77d	2	104

Les spectres RMN des protons et des carbones de ce mélange **TT2/TT2'** nous indiquent la présence de l' ϵ -viniférine dans leur structure (*tableau 15*).

L' ϵ -viniférine serait relié au reste de la molécule par le *para*-phénol juxtaposée à la double liaison. Ceci justifierait les différents déplacements chimiques mesurés des protons éthyléniques *trans* (6.78 et 6.65 ppm, J moyenne = 16.6 Hz) par rapport à ceux de l' ϵ -viniférine (6.91 et 6.71 ppm, J = 16.2 Hz).

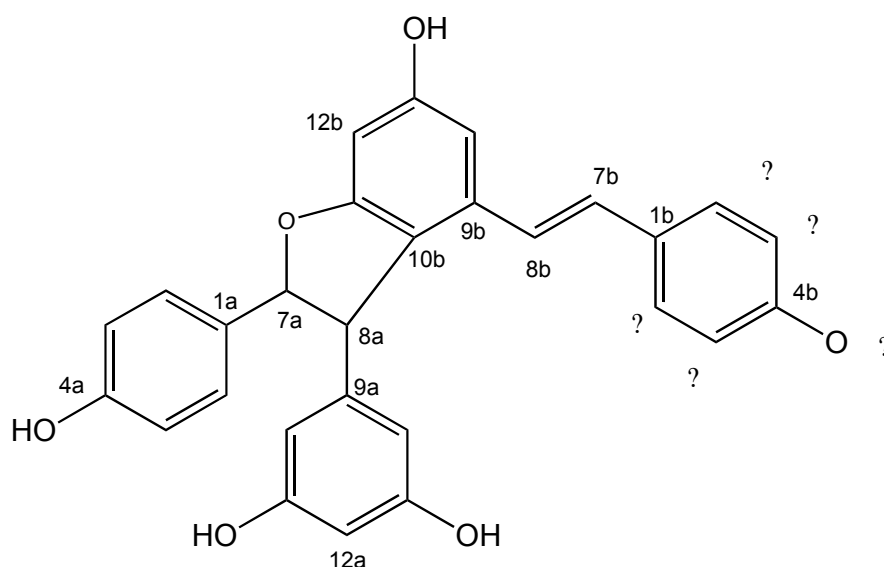


Figure 95 : Partie de **TT2/TT2'** commune avec la *trans*- ϵ -viniférine.

Malheureusement, la faible quantité obtenue et la proximité des temps de rétention de **TT2** et **TT2'** nous ont empêché de purifier les deux composés.

Cependant, **TT2** serait est un autre dérivé stilbénique constitutif du bois de vigne, qui peut être induit dans les feuilles lors d'une infection par *P.viticola* (*figure 94*).

V-2-6 Biotests.

Le mélange **TT2/TT2'**, la vitisine A et l'hopéaphénol ont été testés sur la mobilité des zoospores de *P. viticola* afin d'évaluer leur toxicité, mais aussi leur faculté de diminuer la capacité d'infection du parasite.

Tous les composés isolés montrent une activité biologique réduisant plus ou moins fortement la mobilité des zoospores.

En se basant sur les plus petites concentrations requises afin de diminuer le nombre moyen de zoospores mobiles d'une manière significative par rapport aux expériences témoins, nous pouvons estimer l'activité de ces quatre substances :

Tableau 16 : Estimation des ED50 des composés et des fractions isolés.

substances	ED50 estimée (mM)
TT2/TT2'	≈ 0.001
<i>trans-ε</i> -viniférine	0.01 - 0.001
hopeaphénol	0.1 - 0.01
vitisine A	≈ 1

TT2/TT2' > *trans-ε*-viniférine > hopeaphénol > vitisine A

La mesure l'activité de l'*ε*-viniférine constitue notre test positif, car c'est une des phytoalexines connues de la vigne ; le mélange de tétramères du resvératrol montre un effet biologique supérieur à celui de l'*ε*-viniférine, tandis que l'hopéaphénol et la vitisine A montrent moins d'efficacité.

En parvenant à séparer **TT2** et **TT2'**, Il serait intéressant de savoir, par la suite, si ces tétramères montrent des activités comparables.

Nous rappelons que ces composés sont des stilbènes ou des dérivés de l'oxydation du resvératrol, constitutifs de l'écorce du bois de vigne. Le resvératrol est considéré comme un précurseur des phytoalexines de la classe des stilbènes [33].

Tableau 17 : Activité biologique des stilbènes et dérivés stilbéniques isolés des sarments de vigne sur la mobilité *in vitro* des zoospores de *P. viticola*.

Stilbènes et dérivés du bois de vigne	Concentrations					
	10 mM	5 mM	1 mM	0.1 mM	0.01 mM	0.001 mM
EXPERIENCE 1						
mélange TT2/TT2'	n.m.	n.m.	0.0 ± 0.0	3.3 ± 0.6	3.3 ± 1.5	5.3 ± 2.1
<i>trans</i> -ε-viniférine	n.m.	n.m.	1.7 ± 2.1	4.3 ± 2.5	4.0 ± 1.7	10.3 ± 1.5
Acétone	10.0 ± 2.7					
Eau	8.7 ± 3.1					
EXPERIENCE 2						
vitisine A	0.0 ± 0.0	3.7 ± 0.6	8.0 ± 2.9	9.5 ± 4.7	21.0 ± 5.3	n.m.
hopeaphénol	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	6.5 ± 4.4	4.3 ± 3.6	15.3 ± 8.3	n.m.
acétone	16.0 ± 4.0					

3 réplicants ; 1 ml de suspension de zoospores supplémenté de 10µL d'une solution acétonique ;
n.m., non mesuré

Langcake et Pryce [33] ont montré également l'effet toxique de stilbènes sur la germination des spores de *Botrytis cinerea* et de *P. viticola*, leur effet inhibiteur sur la libération des zoospores de *P. viticola* à partir des sporanges et sur leur mobilité. Ceci est confirmé par les travaux de Pezet *et al.* [106].

V-2-7 Extraction, isolement et purification de composés constitutifs de l'écorce de Chasselas et Bronner.

V-2-7-1 Première méthode.

66g d'écorce de sarments de *V. vinifera* (variété Chasselas, fournis par la station fédérale de recherche de Changins – Agroscope) ont été broyés, séchés et extraits à froid par un système de solvant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 1/1 (v/v), (2l). La phase d'extraction s'est opérée dans l'obscurité en deux étapes : agitation durant 10 min et macération durant 3 jours. Après filtration et évaporation des solvants, les résidus sont élués sur Séphadex LH20 (2x25 cm) (système éluant, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 1/1 (v/v)). La visualisation du contenu des fractions s'opère par chromatographie sur couche mince (CCM, plaque de silicagel 60, F254, épaisseur : 0.1mm, sur feuille d'aluminium, Merck) avec le même système éluant, et révélation par l'acide sulfurique concentré dans du méthanol. La séparation sur Séphadex donne lieu à deux fractions principales : les fractions A ($0.14 \leq R_f \leq 0.52$) et B ($R_f = 0.14$).

La fraction B ($R_f = 0.14$) a été analysée par LC-APPI-MS dans les conditions chromatographiques des stilbènes. Un tétramère de resvératrol **TT₁** (1mg) est purifié par CCM, $\text{CHCl}_3/(\text{H}_3\text{C})_2\text{CO}$, 1/1 (v/v), et séchage sur MgSO_4 .

La fraction A est séparée sur colonne ouverte de silice RP-18 (2x25cm, 32-63 mesh, 60Å, ICN Biomedicals, Eschwege, Suisse) en 6 fractions ($A_1 - A_{VI}$) par 4 systèmes éluants différents (*tableau 18*).

Tableau 18 : Collection des fractions en phase inverse à partir de la fraction A.

N° de fraction	Volume de fraction (ml)	Système éluant CH ₃ OH/H ₂ O, v/v
A _I	100	1 / 1
A _{II}	50	6 / 4
A _{III}	50	6 / 4
A _{IV}	50	7 / 3
A _V	50	7 / 3
A _{VI}	50	1 / 0

La visualisation des fractions obtenues (A_I – A_{VI}) est faite par CCM (CHCl₃/(H₃C)₂CO, 1/1 (v/v)) et la révélation à l'acide sulfurique concentré dans du méthanol. La *trans*-ε-viniférine (15mg) et le *trans*-resvératrol (5mg) sont obtenus à partir de la fraction A_{II} sur une colonne de silice (32-63 mesh, 60Å, Brunschwig, Bâle, Suisse) avec un mélange CHCl₃/(H₃C)₂CO, 8/2, (v/v) comme système éluant et séchés sur MgSO₄.

Du *trans*-resvératrol de chez Sigma-Aldrich (Buchs, Suisse) a été utilisé comme standard pour la LC-MS.

Le **tableau 19** présente la comparaison des données ¹H- et ¹³C-RMN de la *trans*-ε-viniférine isolée avec celles de Li *et al.* [147].

Les tétramères de resvératrol **TT2** et **TT2'** (10mg) sont obtenus à partir de la fraction A_{IV} après purification par CCM et séchage sur MgSO₄.

La séparation des composés de la fraction A_I a été effectuée par HPLC-DAD semi-préparative à l'aide d'une colonne Nucleosil C18, 250x8 mm, 100-7Å. Nous avons obtenu 4 fractions (A_{I1} – A_{I4}). Seul A_{I2} permettra d'obtenir l'ampélopsine A (5mg) purifiée par CCM et séchée sur MgSO₄. La fraction A_{I1}, A_{I3} et A_{I4} contiennent les mélanges présentés dans le **tableau 20**.

Tableau 19 : Comparaison de données RMN-¹H (400 MHz) et RMN-¹³C (100 MHz) dans acétone-d₆.

	<i>trans-ε</i> -viniférine isolée			Données de Li et al., [147]		
	δ ¹ H (ppm)	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H (ppm)	J (Hz)	δ ¹³ C (ppm)
2a,6a	7.22d	8.6	127.5	7.21d	7.0	127.9
3a,5a	6.85d	8.6	115.6	6.83d	7.0	116.0
7a	5.43d	5.4	93.4	5.44d	5.4	93.6
8a	4.50d	5.4	56.6	4.46d	5.4	57.0
10a	6.25brs		106.4	6.24brs		106.8
12a	6.25brs		101.4	6.24brs		101.9
14a	6.25brs		106.4	6.24brs		106.8
2b,6b	7.19d	8.6	127.5	7.19d	7.0	128.4
3b,5b	6.76d	8.8	115.8	6.74d	7.0	116.1
7b	6.93d	16.4	129.6	6.91d	16.2	129.9
8b	6.74d	16.2	122.9	6.71d	16.2	123.2
12b	6.34d	2.0	96.2	6.33d	2.0	96.6
14b	6.75d	1.9	103,6	6.77d	2.0	104.0

Tableau 20 : Mélanges obtenus par le fractionnement de A₁ par la méthode HPLC-DAD semi-préparative.

Fractions obtenues par HPLC préparative	Contenu des fractions
A ₁ 1	Catéchine et procyanidines
A ₁ 3	Les tétramères de resvératrol TT3 et TT3'
A ₁ 4	Le trimère TR1 et tétramère TT4 de resvératrol

V-2-7-2 Seconde méthode.

117g d'écorce de sarments de *V. vinifera* (variété Chasselas, fournis par la station fédérale de recherche de Changins – Agroscope) ont été broyés, séchés et extraits à froid par un système de solvant CH₂Cl₂/CH₃OH, 1/1 (v/v), (2l). La

phase d'extraction a été effectuée dans l'obscurité sous agitation (Labshaker, 157 min^{-1}) continue durant 2 jours. Après filtration et évaporation des solvants, nous avons obtenu, 170 mg d'extait brut, qui ont été directement fractionnés sur une colonne ouverte de silice (Brunschwig, 32-63, mesh, 60\AA , $60 \times 4 \text{ cm}$) éluée par un mélange $\text{CHCl}_3/(\text{H}_3\text{C})_2\text{CO}$, 7/3 (v/v). La visualisation des fractions a été effectuée par CCM (dans du $\text{CHCl}_3/(\text{H}_3\text{C})_2\text{CO}$, 4/6 (v/v)) et révélation par l'acide sulfurique concentré dans du méthanol. Les fractions dont les CCMs montrent des Rfs inférieurs à 0.44 (Rf des procyanidines) ont été rassemblées (fraction C), évaporées et solubilisées dans un petit volume de $\text{CHCl}_3/(\text{H}_3\text{C})_2\text{CO}$, 1/1 (v/v). Les autres fractions (Rfs > 0.45) ont été rassemblées (fraction D), évaporées et solubilisées dans un petit volume de $\text{CHCl}_3/(\text{H}_3\text{C})_2\text{CO}$, 1/1 (v/v). Ces fractions C et D sont ensuite déposées sur silice (Brunschwig, 32-63 mesh, 60\AA , $68 \times 1.5 \text{ cm}$) et éluées en deux temps avec premièrement, 100% de chloroforme, puis dans une seconde étape, un système S_1 .

Préparation du système d'éluion S_1 : une solution (**S**) a été préparée en laissant décanter le mélange $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/35/10, v/v/v) et en récupérant la phase inférieure. Ensuite, 1 volume de toluène est ajouté à 9 volumes de **S** avant de compléter le mélange obtenu par 2% du volume total avec de l'acide acétique.

La visualisation des fractions a été opérée par CCMs au moyen d'un système de solvant S_2 et révélation à l'acide sulfurique concentré dans du méthanol.

Préparation du système d'éluion S_2 : 1 volume d'acétate d'éthyle est ajouté à 9 volumes de **S** avant de compléter le mélange obtenu par 2% du volume total avec de l'acide acétique.

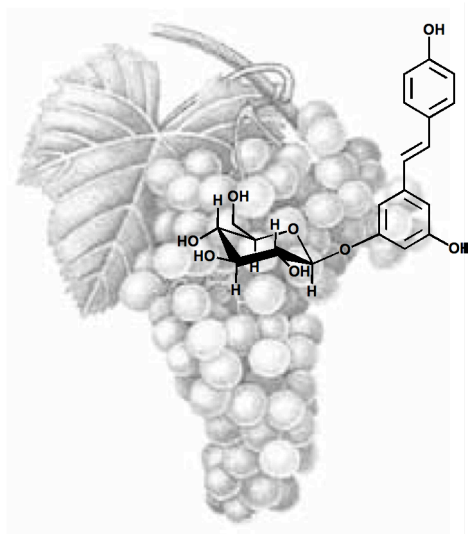
Ceci a permis d'isoler de la fraction C, les tétramères de resvératrol **TT3** (21mg) et **TT3'** (39mg), puis de la fraction D, la *trans*- ϵ -viniférine (19mg).

V-3 Caractérisation de dérivés d'oxydation entre le *trans*-resvératrol et le *trans*-pterostilbène.

Identification du trans-resvéptérol

Jean-Denis J.B., Tabacchi R. and Pezet R.,

Trans-resveptérol, a new dimeric stilbene identified in grapevine leaves infected by downy mildew, J. Agric. Food Chem., submitted.



V-3 Caractérisation de dérivés d'oxydation entre le *trans*-resvératrol et le *trans*-pterostilbène.

D'après les analyses LC-APPI-MSⁿ, nous détectons deux composés qui montrent des propriétés spectroscopiques comparables à celles de la *trans*- δ -viniférine et de la *trans*- ϵ -viniférine, excepté leurs masse et temps de rétention. Ces résultats nous permettent de supposer la présence de deux hétérodimères de stilbènes, résultant d'une dimérisation oxydative entre le *trans*-resvératrol et le *trans*-pterostilbène. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons entrepris leur synthèse afin de les identifier dans nos extraits de feuilles infectés.

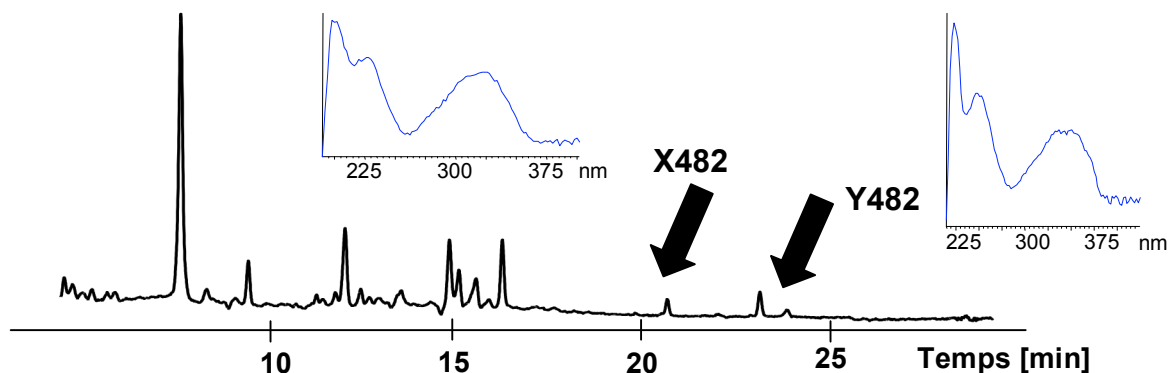


Figure 96 : Chromatogramme UV (307 nm) d'un extrait de feuille de Chasselas infectée par *P. viticola*. Les flèches indiquent la présence de deux hétérodimères de 482 uma, **X482** à 20.5 min et **Y482** à 24 min.

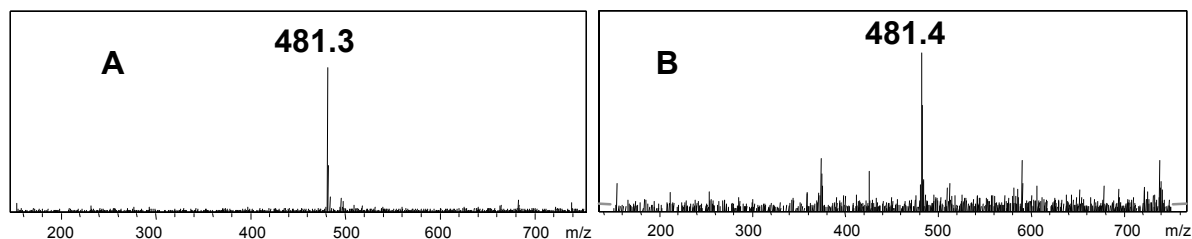
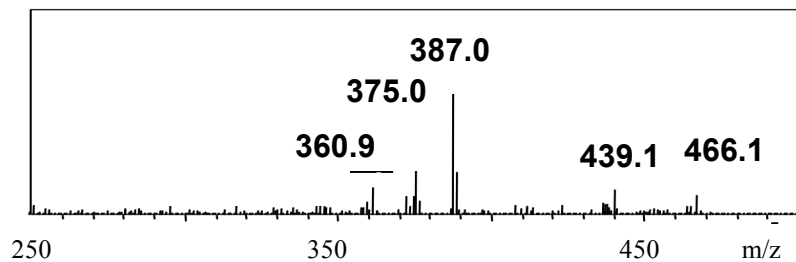
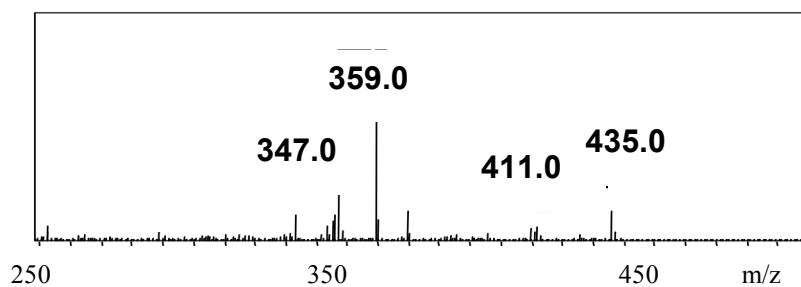


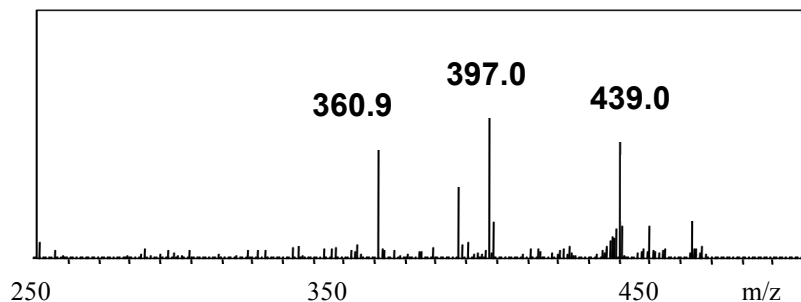
Figure 97 : Spectres MS ($[M-H]^-$, LC-APPI-MS) des composés **X482 (A)** à 20.5 min et **Y482 (B)** à 24 min.



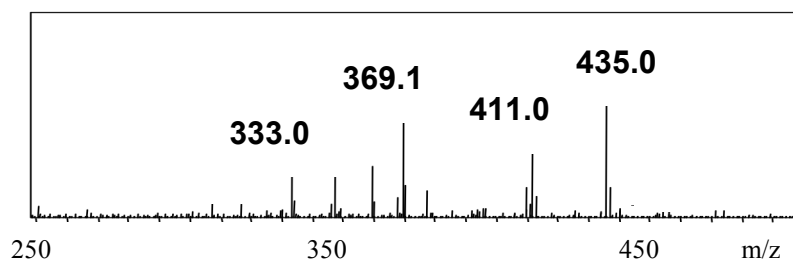
X482, MS² de l'ion 481 [M-H]⁻



ε-viniférine, MS² de l'ion 453 [M-H]⁻



Y482, MS² de l'ion 481 [M-H]⁻



δ-viniférine, MS² de l'ion 453 [M-H]⁻

Figure 98 : Spectres MS² des *trans*-δ-viniférine, *trans*-ε-viniférine, X482 et Y482.

X482 et **Y482** présentent tout deux un spectre MS avec un pic quasi-moléculaire 481 m/z en mode négatif ($[M-H]^-$, *figure 97*). Les spectres MS² sont semblables, dans la distribution des ions et de l'intensité des fragments, à ceux de la *trans-ε-viniférine* et de la *trans-δ-viniférine* (*figure 98*). De plus, le spectre UV de **X482** est très proche de celui de la *trans-ε-viniférine*.

L'étude de la fragmentation MS² nous permet de supposer la présence de dimères de resvératrol possédant deux groupes méthoxy. Nous savons que la vigne peut induire dans ses feuilles lors d'une défense naturelle la production de pterostilbène (voir partie V-1 et partie V-4, [44]) possédant deux groupes méthoxy.

Pour confirmer ses suppositions, nous avons entrepris la synthèse de dimères hétérogènes entre le *trans-resveratrol* et le *trans-pterostilbène* par la voie enzymatique en utilisant la laccase présente dans un extrait de *Botrytis cinerea*.

V-3-1 Caractérisation du *trans-δ-resvépterol*, *trans-δ-iso-resvépterol* et du *δ-viniférinol*.

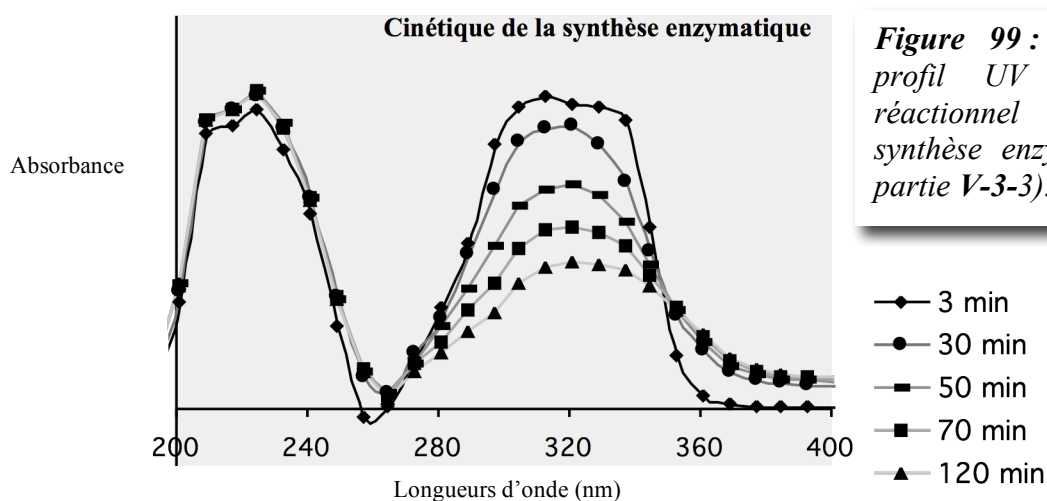


Figure 99 : Variation du profil UV du mélange réactionnel durant la synthèse enzymatique (voir partie V-3-3).

Nous obtenons un mélange d'homodimères et d'hétérodimères : la *trans*- δ -viniférine (resvératrol-resvératrol, 453 m/z, [454-H]⁻), sa forme tétraméthoxylée (ptérostilbène-ptérostilbène, 509 m/z, [510-H]⁻) et deux hétérodimères (resvératrol-ptérostilbène, 481 m/z, [482-H]⁻) dont un possédant le même temps de rétention que **Y482** (figures 99-103).

Cependant, nous n'obtenons pas de *trans*- ϵ -viniférine, ni de composé ayant les mêmes caractéristiques spectroscopiques que **X482**. Ceci nous indique que seulement une certaine forme de couplage entre les stilbènes est privilégiée par la catalyse enzymatique.

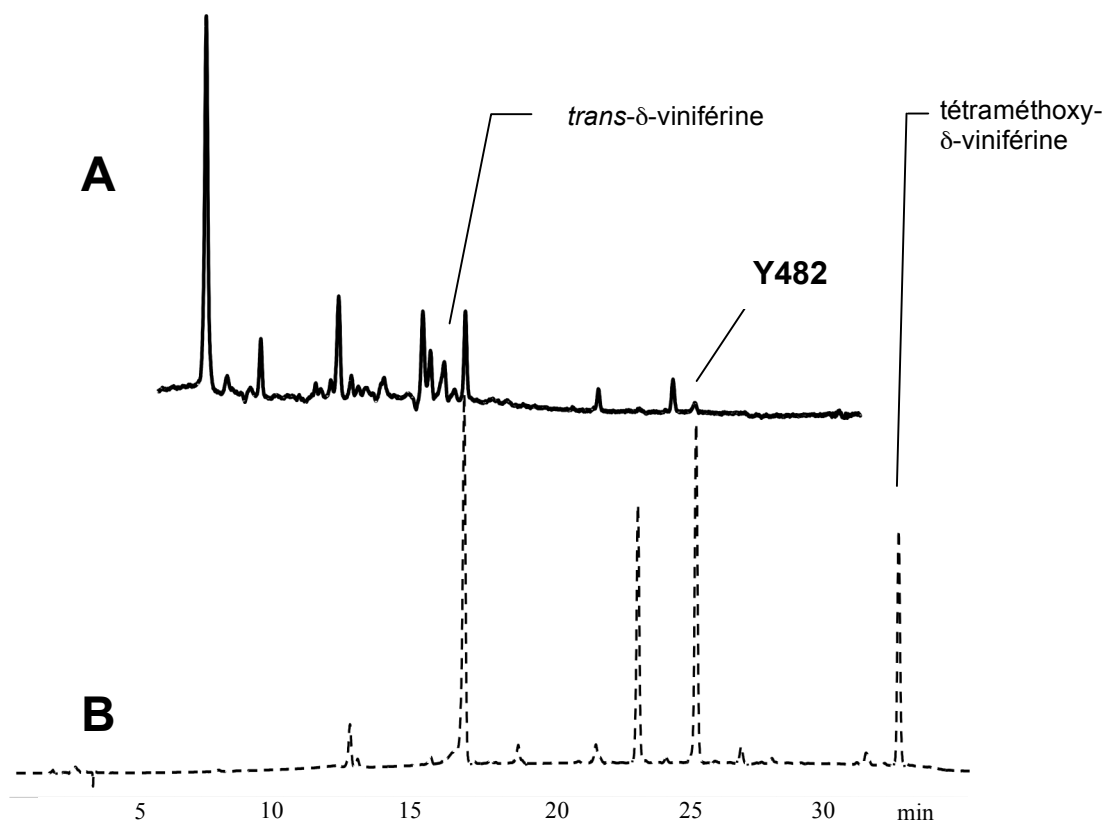
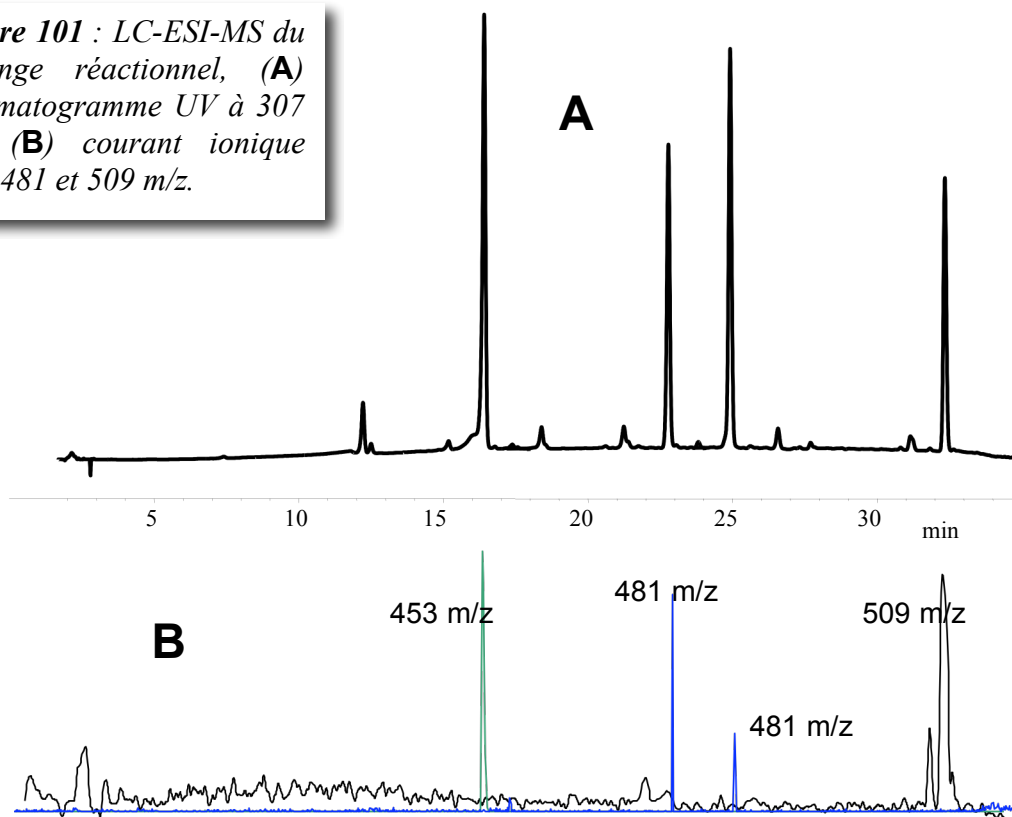


Figure 100 : Chromatogrammes UV (307 nm) de feuilles de Chasselas infectées par *P. viticola* (A) et du mélange réactionnel résultant de la dimérisation enzymatique oxydative entre le *trans*-resvératrol et le *trans*-pterostilbène (B).

Figure 101 : LC-ESI-MS du mélange réactionnel, (A) chromatogramme UV à 307 nm, (B) courant ionique 453, 481 et 509 m/z.



Les structures moléculaires des nouveaux stilbènes, *trans*- δ -isoresvéptérol et *trans*- δ -resvéptérol sont représentées à la *figure 103*.

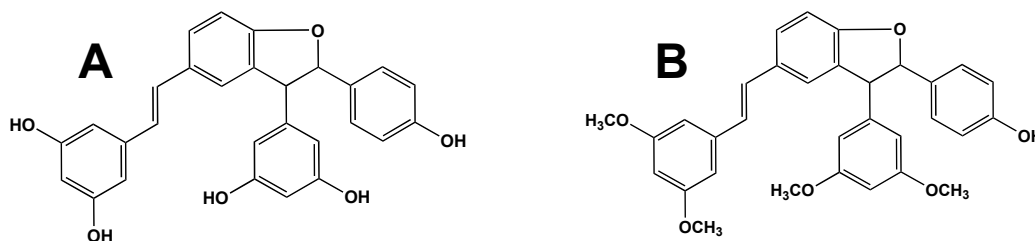


Figure 102 : *Trans*- δ -viniférine, 454 uma (A), *trans*-tétraméthoxy- δ -viniférine, 510 uma (B).

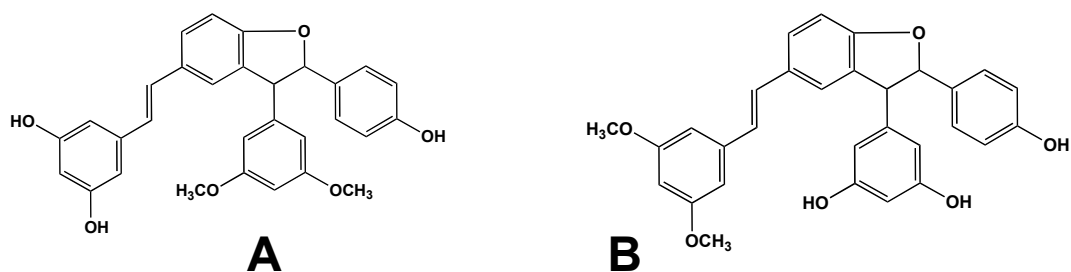


Figure 103 : *Trans-δ-isoresvéptérol (A) et trans-δ-resvéptérol (B), deux isomères de 482 uma.*

Après avoir séparé et purifié les deux isomères de masse 482 uma, nous avons analysé leur spectre RMN (*tableau 21*). Cela nous a permis d'identifier pour la première fois le ***trans-δ-resvéptérol*** et le ***trans-δ-isoresvéptérol***.

L'analyse des données RMN du resvéptérol et de l'isoresvéptérol ainsi que la comparaison avec celles connues de la *trans-δ-viniférine* nous permet de localiser la position des groupes méthoxy (*tableau 21*)

Seul le ***trans-δ-resvéptérol*** est présent dans les feuilles infectées et correspond à **Y482**. Les caractéristiques chromatographiques et spectroscopiques des deux composés sont identiques (*figure 104*).

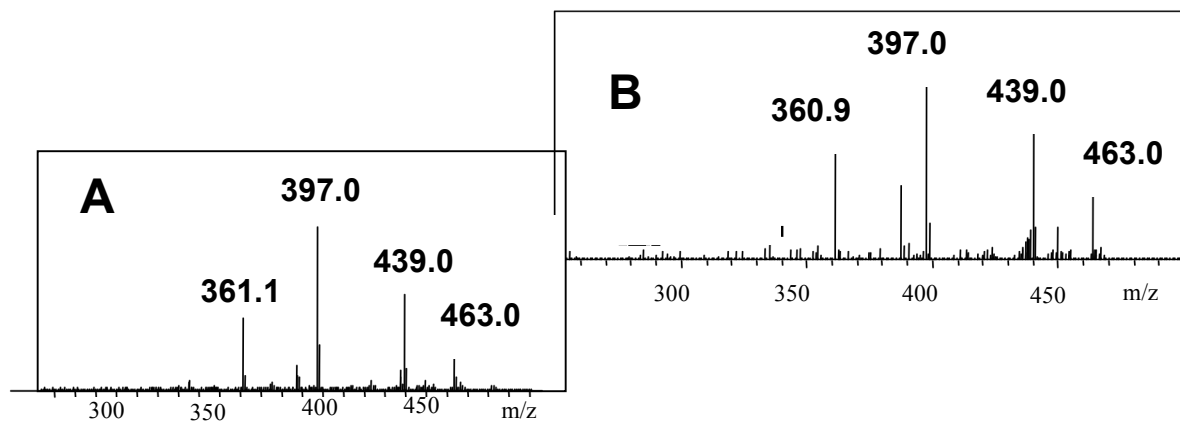


Figure 104 : *Spectres MS² (481 m/z) du trans-δ-resvéptérol synthétisé (A) et détecté dans les feuilles infectées (B).*

Tableau 21 : Comparaison des données spectroscopiques RMN de la δ -viniférine et des resvépteroles synthétisés. (voir spectres des resvépteroles en annexe)

<i>trans</i> - δ -resvépteroles				<i>trans</i> - δ -viniférine				<i>trans</i> - δ -isoresvépteroles		
(ppm)	δ ¹ H	J (Hz)	δ ¹³ C	(ppm)	δ ¹ H	J(Hz)	δ ¹³ C	(ppm)	δ ¹ H	J (Hz)
1	-	-	131.1	1	-	-	131.2	1	-	-
2	7.48dd	8.2,1.9	128.1	2	7.45dd	8.3,1.7	128.2	2	7.46dd	8.4,1.9
3	6.89d	8.4	109.7	3	6.88d	8.1	109.7	3	6.88d	8.4
4	-	-	160.2	4	-	-	160.1	4	-	-
5	-	-	131.1	5	-	-	132.3	5	-	-
6	7.27brs		123.5	6	7.28brs		123.5	6	7.27brs	
7	7.23d	16.1	129.3	7	7.08d	16.4	128.5	7	7.07d	16.1
8	7.02d	16.1	126.4	8	6.91d	16.6	126.7	8	6.91d	16.1
9	-	-	140.3	9	-	-	140.4	9	-	-
10,14	6.76d	2.2	104.5	10,14	6.55d	2.1	105.4	10,14	6.54d	2.2
11,13	-	-	161.6	11,13	-	-	159.1	11,13	-	-
12	6.38t	2.2	99.8	12	6.27t	2.0	102.1	12	6.27t	2.2
1b	-	-	131.8	1b	-	-	132.1	1b	-	-
2b,6b	7.26d	8.4	128.1	2b,6b	7.26d	8.4	127.9	2b,6b	7.26d	8.4
3b,5b	6.87d	8.6	115.7	3b,5b	6.88d	8.1	115.7	3b,5b	6.87d	8.6
4b	-	-	158.0	4b	-	-	158.0	4b	-	-
7b	5.48d	8.2	93.6	7b	5.47d	8.0	93.5	7b	5.48d	8.3
8b	4.49d	8.2	57.4	8b	4.49d	8.1	57.5	8b	4.49d	8.2
9b	-	-	144.6	9b	-	-	144.7	9b	-	-
10b,14b	6.22d	2.2	107.0	10b,14b	6.21d	2.2	106.9	10b,14b	6.43d	1.9
11b,13b	-	-	159.3	11b,13b	-	-	159.2	11b,13b	-	-
12b	6.30t	2.2	101.9	12b	6.29t	2.2	101.9	12b	6.45t	1.9
(-OCH₃)₂	3.81s		55.1	(-OCH₃)₂	-	-	-	(-OCH₃)₂	3.81s	

Tableau 22 : Données RMN-¹H (400 MHz) et RMN-¹³C (100 MHz) du *trans*- δ -viniférine. (acétone-*d*₆)

Attribution	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)	HMBC (ppm)
1	-	131.2	-
2	7.45dd	128.2	123.5, 128.2, 160.1
3	6.88d	109.7	128.2, 132.3
4	-	160.1	-
5	-	132.3	-
6	7.28brs	123.5	160.1
7	7.08d	128.5	123.3, 140.4
8	6.91d	126.7	105.4, 131.2
9	-	140.4	-
10,14	6.55d	105.4	102.1, 105.4, 126.7, 159.1
11,13	-	159.1	-
12	6.27t	102.1	nd.
1b	-	132.1	-
2b,6b	7.26d	127.9	158.0, 93.5
3b,5b	6.88d	115.7	132.1
4b	-	158.0	-
7b	5.47d	93.5	127.9, 144.7
8b	4.49d	57.5	93.5, 106.9, 132.1, 160.1
9b	-	144.7	-
10b,14b	6.21d	106.9	57.5, 101.9, 106.9, 159.2
11b,13b	-	159.2	-
12b	6.29t	101.9	106.9, 159.2

Les spectres HMBC et HSQC de la *trans*- δ -viniférine nous permettent de repérer l'emplacement de certains carbones quaternaires dont la désignation restait encore incertaines [148,125]. Nous avons pu attribuer les carbones **1**, **4** et **5** (δ 131.2, 160.1 et 132.3 ppm, respectivement). Les données HMBC nous confirment que le proton porté par le carbone éthylénique **7** voit préférentiellement, le carbone **6** plutôt que carbone **2** (*figure 105*, *tableau 22*).

Figure 105 : Représentation structurale de la *trans*- δ -viniférine proposée à partir des données HMBC.

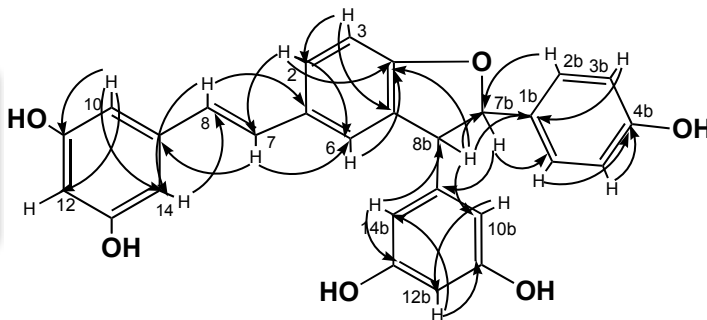
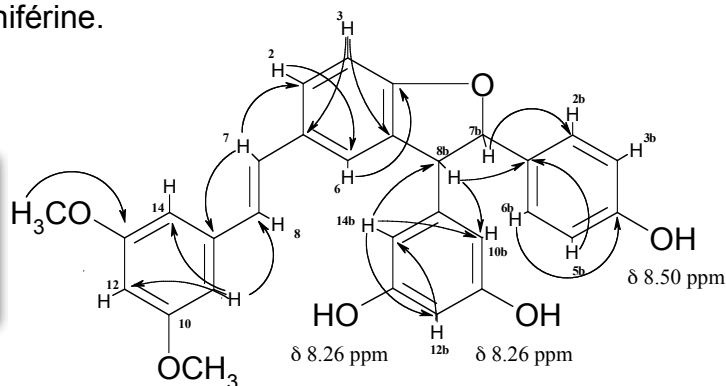


Tableau 23 : Données RMN-¹H (400 MHz) et RMN-¹³C (100 MHz) du *trans*-δ-resvépterol (acétone-d₆).

Attribution	δ ¹ H (ppm)	δ ¹³ C (ppm)	HMBC (ppm)
1	-	131.1	-
2	7.48dd	128.1	123.5
3	6.89d	109.7	131.1
4	-	160.2	-
5	-	131.1	-
6	7.27brs	123.5	160.2
7	7.23d	129.3	140.3, 128.1
8	7.02d	126.4	104.5
9	-	140.3	-
10,14	6.76d	104.5	99.8, 104.5, 126.4
11,13	-	161.6	-
12	6.38t	99.8	nd.
1b	-	131.8	-
2b,6b	7.26d	128.1	158.0
3b,5b	6.87d	115.7	131.8
4b	-	158.0	-
7b	5.48d	93.6	128.1
8b	4.49d	57.4	131.8, 107.0
9b	-	144.6	-
10b,14b	6.22d	107.0	57.4, 101.9, 107.0
11b,13b	-	159.3	-
12b	6.30t	101.9	107.0
(-OCH ₃) ₂	3.81s	55.1	161.6

Les résultats du spectre HMBC du *trans*-δ-resvépterol nous permettent d'assigner la position des différents carbones quaternaires. Seuls les carbones **9b**, **11b** et **13b** donnent lieu à de faibles signaux de corrélations hétéronucléaires ³J (¹H-¹³C). Nous les avons identifiés grâce aux spectres ¹³C-RMN, DEPT 135 et à l'analyse de la RMN de la δ-viniférine.

Figure 106 : Représentation structurale de la *trans*-δ-resvépterol proposée à partir des données HMBC.



Nous n'avons pas pu établir les spectres ^{13}C -RMN de l'isoresvépterol, à cause de la faible quantité purifiée.

Les structures proposées précédemment font abstraction des configurations absolues des carbones aliphatiques **7b** et **8b**. Nous savons cependant par la littérature que d'une part, la *trans*- δ -viniférine possède des carbones aliphatiques de configuration SS [126,129], d'autre part, la configuration *trans* des centres chiraux est confirmée par les constantes de couplage ($J = 8.2$ Hz) entre les protons sur les carbones **7b** (δ 5.48 ppm) et **8b** (δ 4.49 ppm) (*figure 107*).

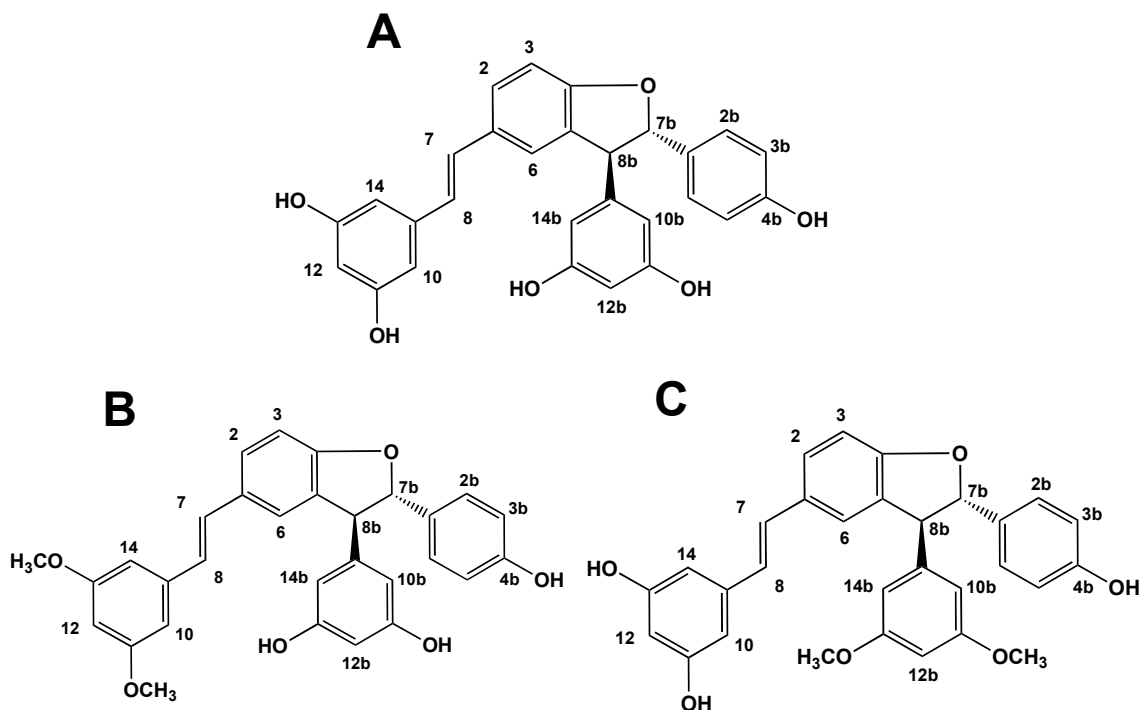
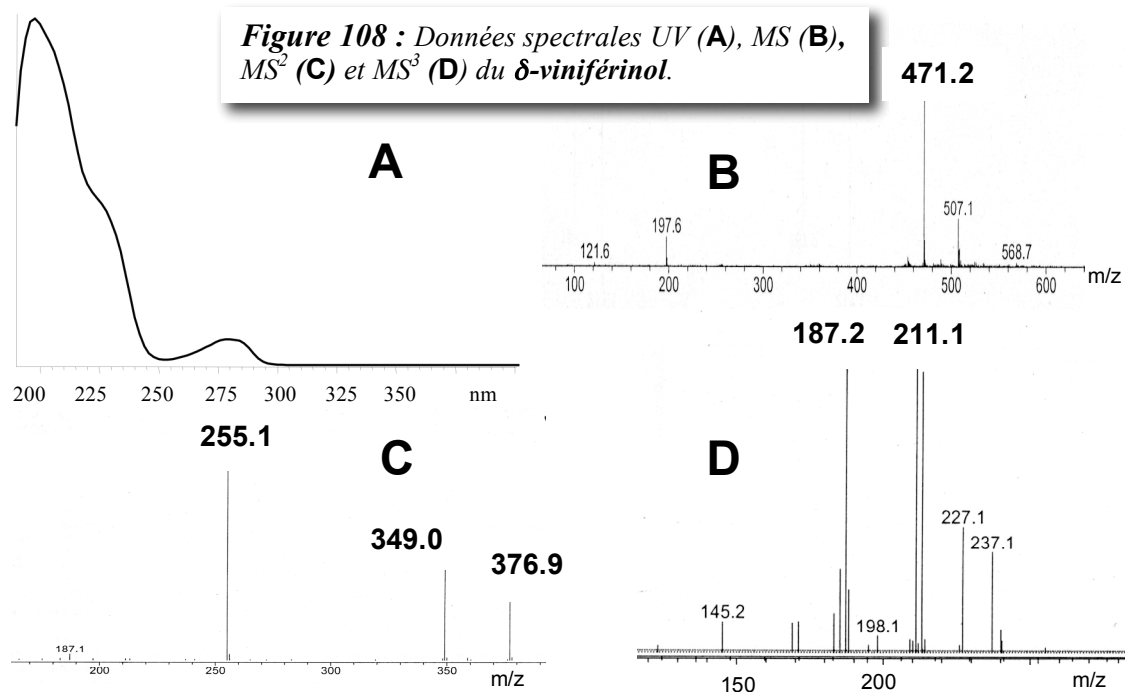


Figure 107 : Configuration absolue *S,S* des carbones aliphatiques de la *trans*- δ -viniférine (**A**), du *trans*- δ -resvérétrol (**B**) et du *trans*- δ -isoresvérétrol (**C**).

Un autre composé a été détecté dans le mélange réactionnel. Par LC-ESI-MS en mode négatif, il est élué à 6.2 min (programme "stilbènes") et possède une masse de 472 uma (471 m/z, [472-H]⁻).

Nous l'avons appelé **δ-viniférinol** car il présenterait un degré d'oxydation supérieur à celui de la *trans*-δ-viniférine, avec 18 uma (H₂O) de plus et une polarité plus importante (élution avec eau/acétonitrile 70/30, v/v). Ses spectres MS et MSⁿ (*figure 108*) nous permettent d'établir qu'il provient de la dimérisation oxydative entre deux monomères de resvératrol car nous ne trouvons pas de fragments indiquant la présence de méthyles. Son spectre UV possède un maximum d'absorption autour de 280 nm, ce qui nous permet d'établir l'absence d'aromaticité dans la molécule autre que celle des groupes phénols, d'où la perte des doubles liaisons des monomères.

Nous avons observé que le δ-viniférinol se trouve induit également dans les feuilles de vigne infectées.



Il nous reste à établir la structure de cette molécule par RMN-2D.

Le δ -viniférinol n'est pas reporté dans la littérature, Cichewicz *et al.* [126] ont identifié deux molécules, les restrysols A et B, possédant une masse de 472 uma et résultantes de la dimérisation oxydative *in vitro* du *trans*-resvératrol par une souche de *Botrytis cinerea* (ATCC 11542) (*figure 109A et 109B*).

Nous proposons la structure (*figure 109C*) pour le ***trans*- ϵ -resvépterol**, correspondant au composé **X482**, que nous avons détecté dans les feuilles de Chasselas infectées. Nous n'avons pas pu l'obtenir *in vitro* à partir d'extrait enzymatique de *B. cinerea*, mais sa synthèse pourrait probablement être réalisée en procédant au couplage oxydatif du resvératrol et du ptérostilbène par un système peroxidase/H₂O₂ [149] ou par FeCl₃·6H₂O dans du méthanol [150].

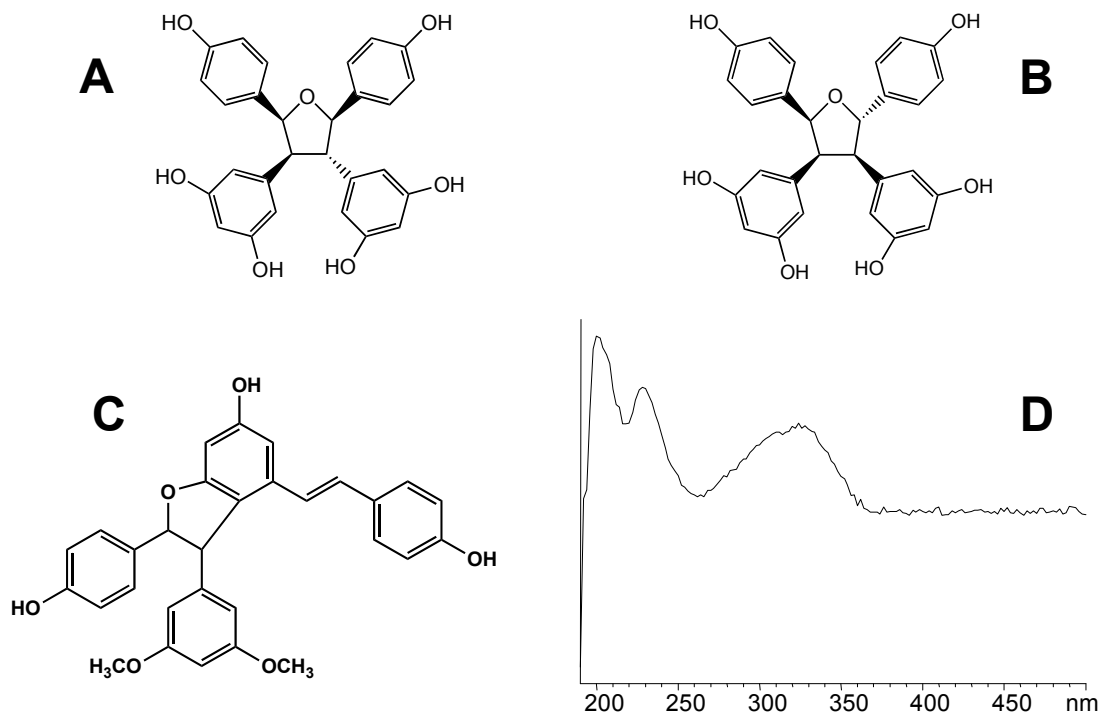


Figure 109 : Restrysols A (**A**) et B (**B**), structure proposée pour le *trans*- ϵ -resvépterol (**C**) ; Spectre UV du (X482) *trans*- ϵ -resvépterol (**D**).

La présence de δ - et ϵ -resvéterol dans les feuilles de vigne peut être expliquée par la biotransformation du resvératrol et du pterotilbène par leurs peroxydases (EC 1.11.1.7) en cas d'infection. Les peroxydases, selon Barcelo *et al.* [151] et Welinder *et al.* [152], sont subdivisés en 3 classes (*tableau 24*).

Tableau 24 : Répartition structurale de la grande famille des peroxydases (1.11.1.7), selon Barcelo *et al.* [151] et Welinder *et al.* [152].

Classe I	Classe II	Classe III
Peroxydases chloroplastiques (plante supérieure)	Peroxydases fongiques sécrétées – glycoprotéines manganèse dépendante)	Peroxydases végétales sécrétées : glycoprotéines localisées dans les vacuoles et la paroi cellulaire)
Peroxydases cytosoliques - ascorbate dépendante (plante supérieure)		
Peroxydases bactériennes		
Peroxydase mitochondriale - cytochrome c dépendante (levure)		

Les peroxydases de la vigne appartenant à la classe III sont classées suivant leur point isoélectrique (pI). La classe des peroxydases basiques ($9,2 < pI < 11,0$) est reconnue comme un marqueur constitutif de la défense de la vigne [149,151]. Elles ont été mises en évidence dans les vacuoles et les parois cellulaires [149,153]. Hoos et Blaich [154] ont été les premiers à démontrer la dimérisation du resvératrol par les peroxydases à partir de cultures cellulaires de *V. vinifera*. Calderon *et al.* [155] ont établis l'implication d'isoperoxydases constitutives et induites dans la biosynthèse de viniférines à partir de 4-hydroxystilbène au niveau des feuilles de vignes infectées par *P. viticola*.

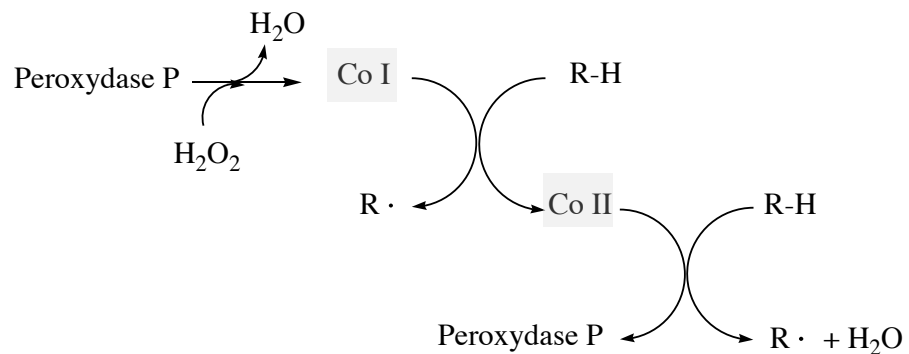


Figure 110 : Formation des formes actives (Co I et Co II) de la peroxydase P, responsables de la formation des espèces radicalaires ER•.

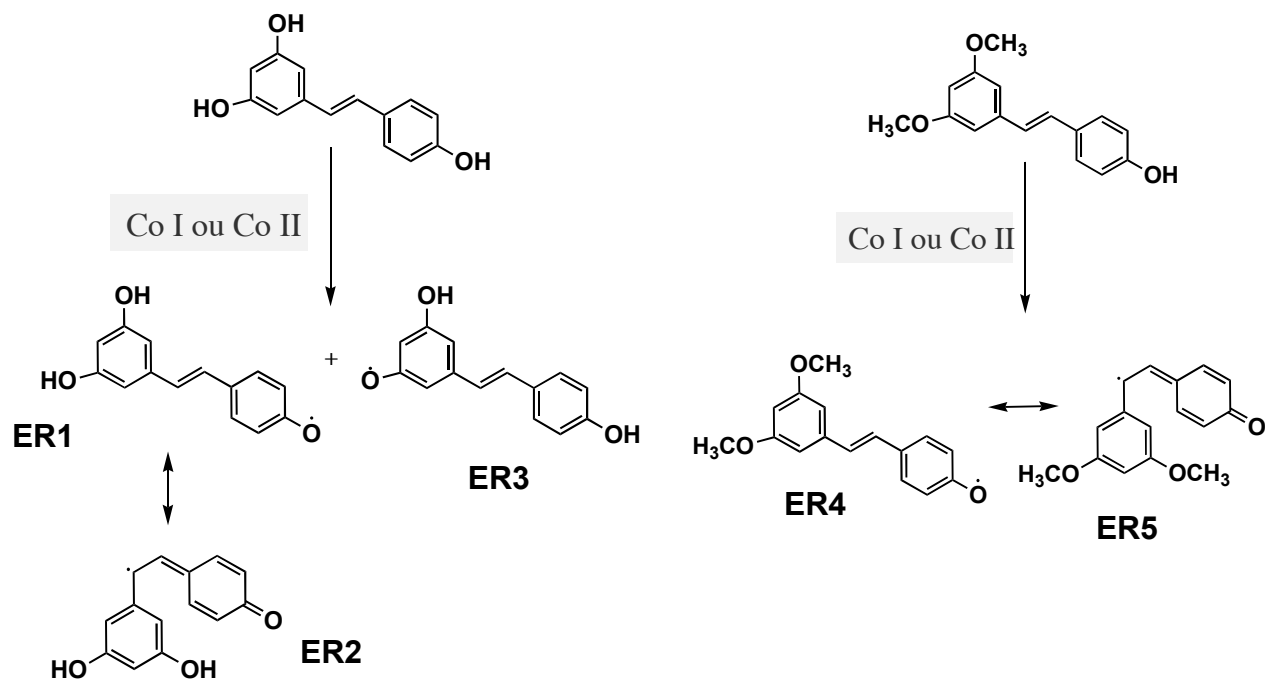


Figure 110 : Formations des espèces radicalaires ER1-5 (R•) à partir du resvératrol et du pterostilbène (RH).

En accord avec Rasmussen *et al.* [156], Pedreno *et al.* [149] proposent un mécanisme réactionnel conduisant aux *trans*- δ - et *trans*- ϵ -viniférines à partir du *trans*-resvératrol. Sur la base de ce mécanisme, nous proposons à notre tour un mécanisme réactionnel expliquant la formation des resvépterols et des viniférines à partir du *trans*-pterostilbène et du *trans*-resvératrol (*figures 110-112*).

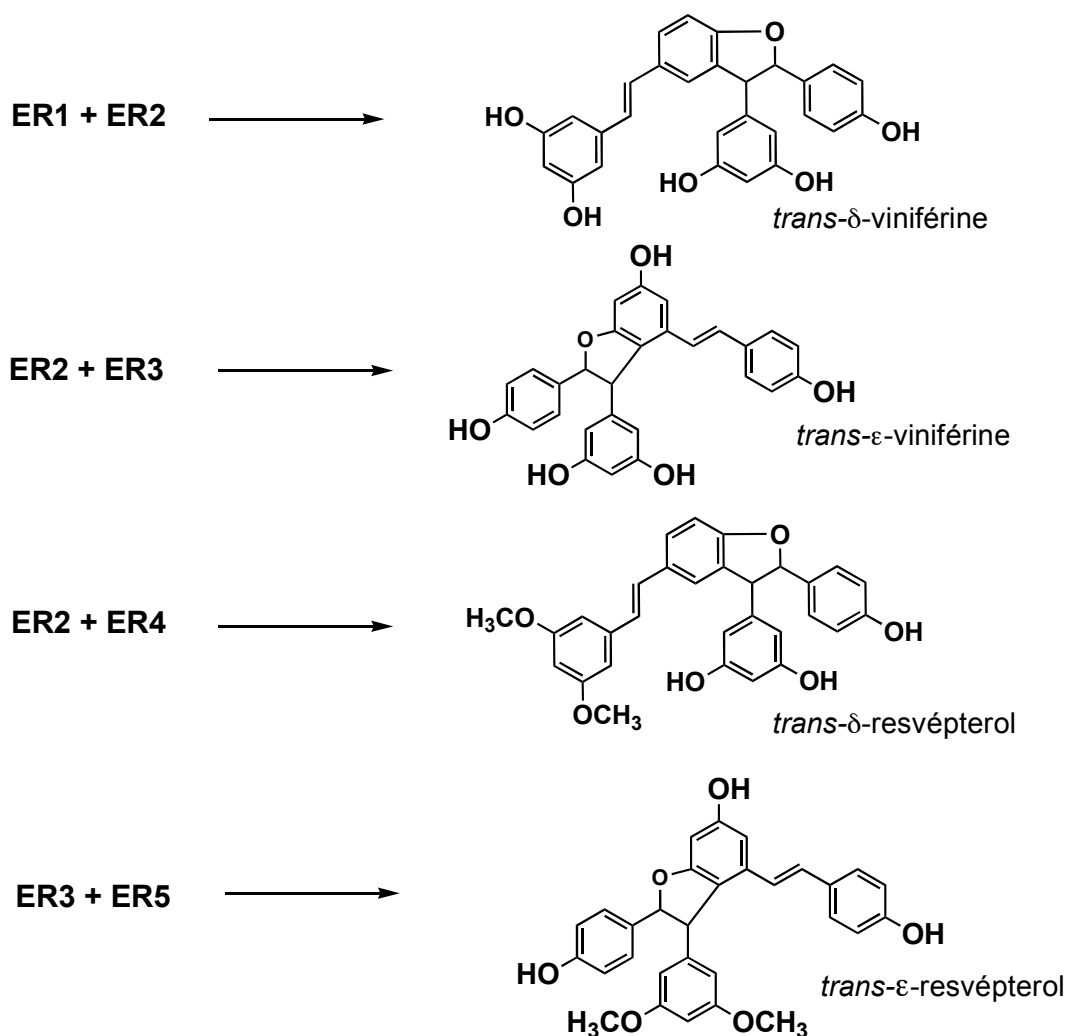


Figure 112 : Association des différentes espèces radicalaires à l'origine des viniférines et des resvépterols.

V-3-2 Biotests.

Il nous semble intéressant d'examiner l'activité biologique des nouveaux composés, le *trans*- δ -resvépterol et le δ -viniférinol, mis en évidence dans la feuille de vigne infectée sur la motilité des zoospores de *P. viticola*. Les résultats sont présentés dans le *tableau 25* où leur effet est comparé à ceux des *trans*- δ - et *trans*- ε -viniférines, phytolalexines actives contre *P. viticola* [106].

Tableau 25 : Evaluation sous microscope optique de la motilité des zoospores de *P. viticola* Chaque valeur représente le nombre moyen de zoospores mobiles compté sur une surface de 0.11 mm² durant 1 minute (3 réplicats).

Stilbènes et dérivés	1 mM	0.1 mM	0.01 mM	0.001 mM	ED50 estimée (mM)
δ -viniférinol	4.3 \pm 3.1	11.3 \pm 3.8	6.3 \pm 3.2	6.0 \pm 1.7	\approx 1
<i>trans</i> - ε -viniférine	1.7 \pm 2.1	4.3 \pm 2.5	4.0 \pm 1.7	10.3 \pm 1.5	0.01-0.001
<i>trans</i> - δ -viniférine	1.0 \pm 1.0	4.7 \pm 3.5	1.7 \pm 1.2	6.0 \pm 2.6	0.01-0.001
<i>trans</i> - δ -resvépterol	0.0 \pm 0.0	2.3 \pm 2.5	2.0 \pm 1.0	6.7 \pm 2.2	0.01-0.001
témoin + eau	8.7 \pm 3.1				-
témoin + acétone	10.0 \pm 2.7				-

D'une manière générale, l'ensemble des composés du *tableau 25* semble affecter plus ou moins la mobilité des zoospores (MZ). Nous montrons, de ce fait, une activité toxique de ces stilbènes sur les zoospores. Cela prouve que ces composés seraient capables de réduire l'efficacité infectueuse de *P. viticola* dans la feuille infectée.

Malgré une faible tendance de diminution de la MZ par le δ -viniférinol aux concentrations 0.001, 0.01 et 1mM, nous ne notons pas vraiment de différences statistiquement significatives par rapport aux témoins. Par contre, nous remarquons que les viniférines (témoins positifs) ainsi que le resvéterol réduisent nettement la population de zoospores mobiles. Seul les δ -viniférine et δ -resvéterol permettent de réduire significativement la MZ pour une faible concentration de 0.01 mM. Le resvéterol semble la substance la plus active sur la MZ aux concentrations 0.1 et 1 mM par rapport aux viniférines.

Le δ -resvéterol peut être considéré comme une phytoalexine de la vigne permettant à celle-ci de se défendre contre le développement de *P. viticola* et de ses conséquences.

Nos résultats sont en accord avec ceux publiés par Pezet *et al.* [106] et Langcake *et al.* [157]. De plus, nous savons que le ptérostilbène a un effet beaucoup plus toxique sur la MZ que le resvéterol. La *trans*- δ -viniférine et le pterostilbène ont été décrit comme les stilbènes les plus efficaces parmi les phytoalexines de la vigne [106]. Langcake et Pryce [33] ont testé l'effet du resvéterol, de l' ϵ -viniférine et de la δ -viniférine (encore inconnue en tant que phytoalexine de la vigne) sur le relargage des zoospores à partir des sporanges en suspension. Ils ont montré également la meilleure efficacité du déhydrodimère du resvéterol (δ -viniférine) par rapport aux autres stilbènes.

V-3-3 Protocole de synthèse du *trans*- δ -resvéterol.

Le *trans*-resvéterol est d'origine commerciale (Sigma-Adrich). Le *trans*-pterostilbène a été obtenu par déacétylation, par du thiophenol dans du DMF [158], du *trans*-ptérostilbène acétylé, synthétisé par Pont V. et Pezet R. et fourni par l'Agroscope de Changins.

-Préparation du *trans*-pterostilbène (*trans*-3,5-diméthoxy-4'-hydroxystilbene):

Un mélange de *trans*-pterostilbène acétylé (628 mg, 2 mmol), de thiophénol (220 mg, 0.205 ml, 2 mmol) et de K₂CO₃ (13.8 mg, 0.1 mmol) dans du DMF (2.5 ml) a été chauffé à reflux pendant 30 min sous azote. Le mélange réactionnel refroidi est rendu basique avec du NaOH 5% aqueux (25 ml) et extrait avec de l'éther diéthylique (2 x 15 ml). La phase aqueuse est ensuite acidifiée par une solution d'HCl 6N dans un bain de glace puis est extraite avec de l'éther diéthylique (3 x 15 ml). Les phases organiques combinées sont lavées avec une solution saturée de NaHCO₃ (2 x 15 ml) et séchées (Drierite ®). Le *trans*-pterostilbène est purifié sur une colonne de silice (1 x 42 cm, 32-63 mesh, 60 Å) éluée par Hexane/Toluène/EtOAc, 7/2/2 (v/v/v), rendement = 44%, (R_f = 0.2). Les données RMN sont présentés dans les *tableaux 27 et 28*; (GC-MS) m/z 256 [M⁺](100), 240(20), 225(35), 210(20), 180(20), RT: 21.5 min.

Tableau 26 : Données RMN-¹H et RMN-¹³C (400 et 100 MHz respectivement) du pterostilbène acétylé dans l'acétone-d₆.

<i>trans</i> -4-O-acétoxy-3,5-diméthoxystilbène				
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Corrélation HMBC
1	-	-	135.4	
2,6	7.63d	8.5	127.7	151.0, 127.7, 128.4
3,5	7.14d	8.7	122.4	135.4, 122.4
4	-	-	151.0	
7	7.28d	16.4	128.4	139.8, 128.4, 127.7
8	7.17d	16.4	129.2	135.4, 104.9
9	-	-	139.8	
10,14	6.80d	2.3	104.9	161.6, 129.2, 104.9, 100.2
11,13	-	-	161.6	
12	6.44t	2.3	100.2	161.6, 104.9
-(OCH ₃) ₂	3.83s	-	55.1	161.6
CO-CH ₃	2.27s	-	20.5	169.1
CO-CH ₃	-	-	169.1	

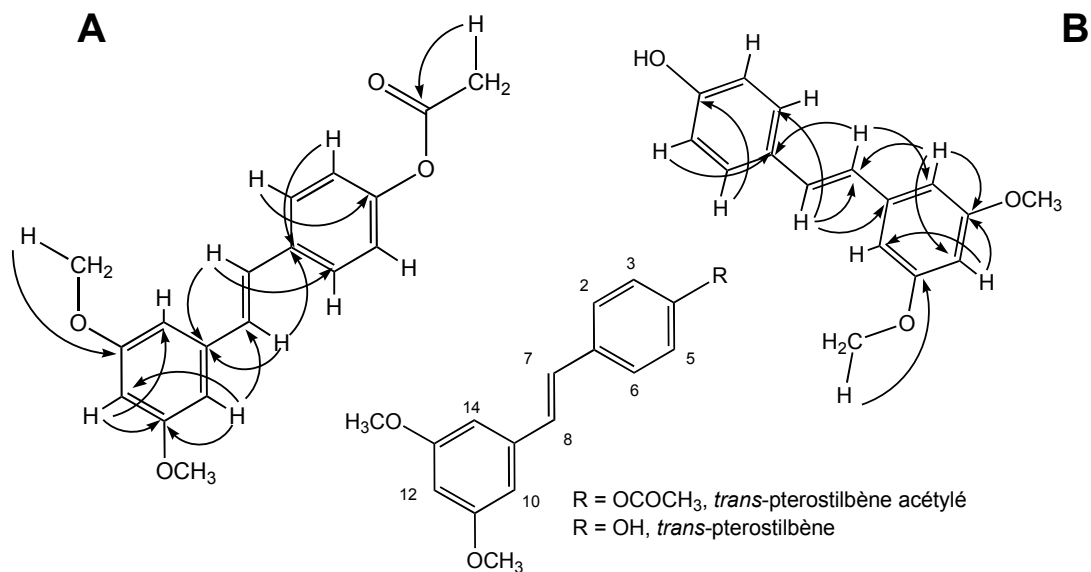
**Figure 113 :** Structures et corrélations HMBC du *trans*-pterostilbène (A) et de son dérivé acétylé (B).

Tableau 27 : Comparaisons de nos résultats avec ceux de la littérature, RMN-¹H (400MHz) et RMN-¹³C (100 MHz) dans l'acétone-d₆.

	<i>trans</i> -pterostilbène déacétylé				Litt. Perret [148]		
	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	Corrélation HMBC	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	-	129.4		-	-	128.8
2,6	7.46d	8.4	128.3	157.8	7.45d	8.6	127.8
3,5	6.88d	8.5	116.0	129.3	6.86d	8.6	115.4
4	-	-	157.8		-	-	157.3
7	7.19d	16.3	129.3	140.4, 128.3, 126.1	7.18d	16.4	?
8	6.99d	16.3	126.1	104.5, 129.4	6.99d	16.4	125.5
9	-	-	140.4		-	-	139.9
10,14	6.75d	2.3	104.5	161.6, 126.1, 104.5, 99.6	6.73d	2.2	104.0
11,13	-	-	161.6		-	-	161.1
12	6.40t	2.2	99.6	161.6, 104.5, 99.6	6.38t	2.2	99.1
-(OCH ₃) ₂	3.81s	-	55.1	161.6	3.82s	-	54.6
OH	8.59s						

- Synthèse et isolement du *trans*- δ -resvéterol :

Deux solutions acétoniques de *trans*-resvétratol (10ml, 5mg.ml⁻¹) et de *trans*-pterostilbène (10ml, 5 mg.ml⁻¹) sont mélangées à de l'eau ultra pure (1 l, eau MilliQ, 30°C, dans l'obscurité), puis l'ensemble est mis sous agitation.

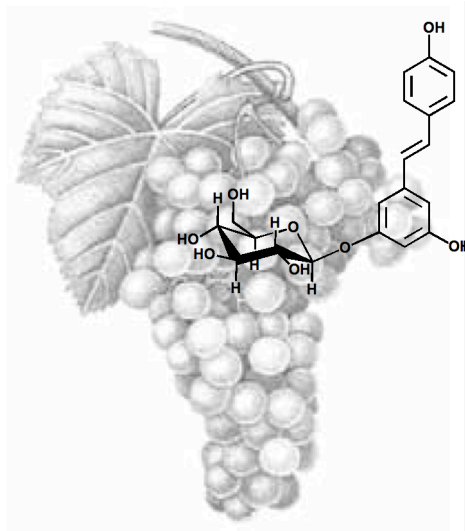
Un extrait enzymatique de *Botrytis cinerea* (souche standard P69, 3 ml, activité de 28.3 mmol.min⁻¹.10 ml⁻¹, fourni par l'Agroscope, Changins, Suisse) est ajouté au mélange réactionnel. Le suivi de la réaction enzymatique a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à barette de diode (DAD, Hewlett Packard 8452A, 190 – 400 nm). Après 80 min, le mélange est extrait à l'acétate d'éthyle (3 x 200 ml). Les phases organiques sont combinées, séchées (Drierite ®), évaporées, dissoutes dans un mélange de solvant H₂O/CH₃OH 7/3 (v/v) et déposées sur

colonne ouverte de silice RP18 (2 x 21 cm). 7 fractions (*tableau 29*) sont obtenues. 18 mg de *trans*- δ -viniférine ont été obtenus à partir de la fraction A₅. Le *trans*- δ -resvépterol, le *trans*- δ -isoresvépterol et la *trans*-tétraméthoxy- δ -viniférine ont été obtenus à partir de la fraction méthanolique A₇, qui ensuite, a été éluée sur une colonne de silice (32-63 mesh, 60 Å, 2 x 42 cm) avec un mélange d'acétate d'éthyle/toluène/cyclohexane, 4/2/4 (v/v/v). 8.3 mg, 10 mg, 13.6 mg respectivement de *trans*- δ -resvépterol, de *trans*- δ -isoresvépterol et de *trans*-tétraméthoxy- δ -viniférine sont obtenus. Leur pureté a été vérifiée par LC-APPI-MS (méthode "stilbènes", voir partie IV-3).

Tableau 28 : Fractionnement du mélange réactionnel sur silice RP-18.

N° de fraction	Volume de fraction (ml)	Système éluant CH ₃ OH/H ₂ O (v/v)
A ₁	50	3 / 7
A ₂	50	3 / 7
A ₃	50	1 / 1
A ₄	50	1 / 1
A ₅	50	7 / 3
A ₆	50	7 / 3
A ₇	50	1 / 0

V-4 Nouvelle méthode de synthèse du *trans*-ptérostilbène par une double réaction de Heck catalysée par le bis(benzonitrile)dichoropalladium.



V-4 Nouvelle méthode de synthèse du *trans*-ptérostilbène par une double réaction de Heck catalysée par le bis(benzonitrile)dichoropalladium.

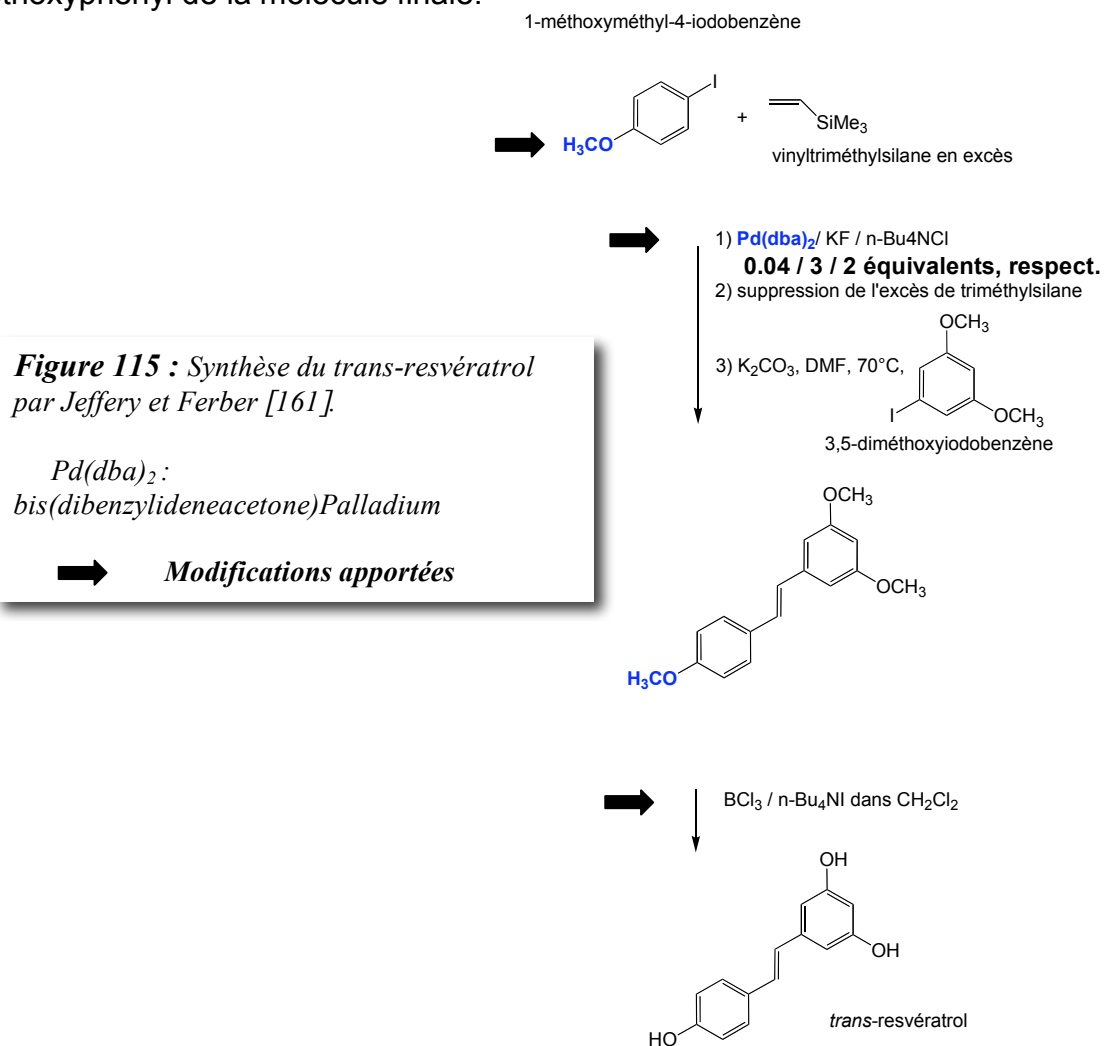
Afin de pouvoir synthétiser une plus grande quantité de δ -resvéptérol et en vue de la synthèse enzymatique de l' ϵ -resvéptérol, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'un de leurs précurseurs, le *trans*-ptérostilbène

De nombreuses méthodes permettent de synthétiser le *trans*-ptérostilbène : à partir du *trans*-resvéptérol par une méthylation partielle ([159], rendement 11 %) ou à partir d'autres précurseurs nécessitant un moyen de coupler un phényle à une oléfine (*tableau 29*). Nous avons voulu allier régiosélectivité et stéréosélectivité lors du couplage de manière à obtenir préférentiellement le *trans*-ptérostilbène avec un rendement convenable.

Tableau 29 : Quelques références concernant la synthèse du resvéptérol ou du ptérostilbène.

Références	Types de réaction	Rendements
Guiso <i>et al.</i> , [160]; Jeffery et Ferber, [161]; Ferré-Filmon <i>et al.</i> , [162].	Heck (<i>trans</i> -resvéptérol)	70-83 %
Lion <i>et al.</i> , [163]	Horner-Wadsworth-Emmons	83 %
Polunin <i>et al.</i> , [164].	Aldolisation (<i>trans</i> -resvéptérol)	50%
Pezet et Pont, [58]; Perret C., [148]; Solladié G. <i>et al.</i> , [165]	Perkins (<i>trans</i> -ptérostilbène et <i>trans</i> -resvéptérol)	44 %
Orsini <i>et al.</i> , [166,167], Polunin <i>et al.</i> , [164].	Wittig (<i>trans</i> -resvéptérol)	32 %
Rimando <i>et al.</i> , [159]	Méthylation partielle (<i>trans</i> -ptérostilbène)	11%
Eddadir <i>et al.</i> , [168]; Ferré-Filmon <i>et al.</i> , [162].	Susuki (<i>trans</i> -resvéptérol et <i>trans</i> -stilbenes analogues)	? %

Nous avons obtenu le *trans*-ptérostilbène à partir d'une double réaction de Heck "One Pot" avec un rendement global de 11% suivant le schéma de la **figure 114**. La protection et déprotection par un groupe méthoxyméthyl de l'hydroxyle du 1-hydroxy-4-iodobenzène nous a permis d'avoir une stéréosélectivité *trans* de 98%. La synthèse du *trans*-resvératrol par Jeffery et Ferber [161] nous a servi de canevas (**figure 115**). Des modifications y ont été apportées au niveau du système catalytique, de la protection/déprotection du groupe hydroxyl du *p*-4-iodophénol afin de préserver en fin de réaction les méthoxy de la partie 3,5-diméthoxyphényl de la molécule finale.



La réaction de Heck permet d'une part, l'insertion d'une oléfine sur un groupe phényl et d'autre part, une sélectivité dominante pour la configuration *trans* de la double liaison lorsque ce groupe allyl néoformé se fixe sur un autre phényl. Cette réaction est, à la base, une substitution vinylique catalysée par le palladium (0). Ziegler et Heck [169] montrent que le rendement de couplage, catalysé par le Pd(0) est plus élevé lorsque l'on utilise des phénols ou dérivés phénoliques iodés.

Le bis(benzonitrile)dichloropalladium, PdCl₂(NPh)₂, a été choisi comme catalyseur. Kostas *et al.* [170] augmentent son effet catalytique sur des réactions de type Heck en y fixant différents ligands. Ils montrent aussi qu'ils obtiennent les plus bas rendements pour le couplage entre un styrène et un bromobenzène possédant en position 4 des groupes donneurs d'électrons. Nous aurions peut-être dû utiliser le catalyseur utilisé par Jeffery et Ferber [161], le bis(dibenzylideneacétone)palladium, Pd(dba)₂, avec lequel ils ont obtenu un grand rendement de la réaction de couplage (72-94%). Ceci nous montre à quel point les ligands du palladium (0), par leur structure chimique, conditionnent la réactivité du palladium dans les réactions d'addition oxydante (*figure 116*).

Les proportions respectives des sels de *n*-tétrabutylammonium et de potassium, deux et trois équivalents, ont été choisis d'après la méthode de Jeffery et Ferber [161]. Ces sels ont un rôle dans la régénération du palladium (0). Selon Jeffery [171,172], ces sels jouent un rôle important dans la catalyse de la désilylation, (l'élimination du triméthylsilyl après l'insertion de l'oléfine sur la *p*-méthoxyméthyl-iodophénol).

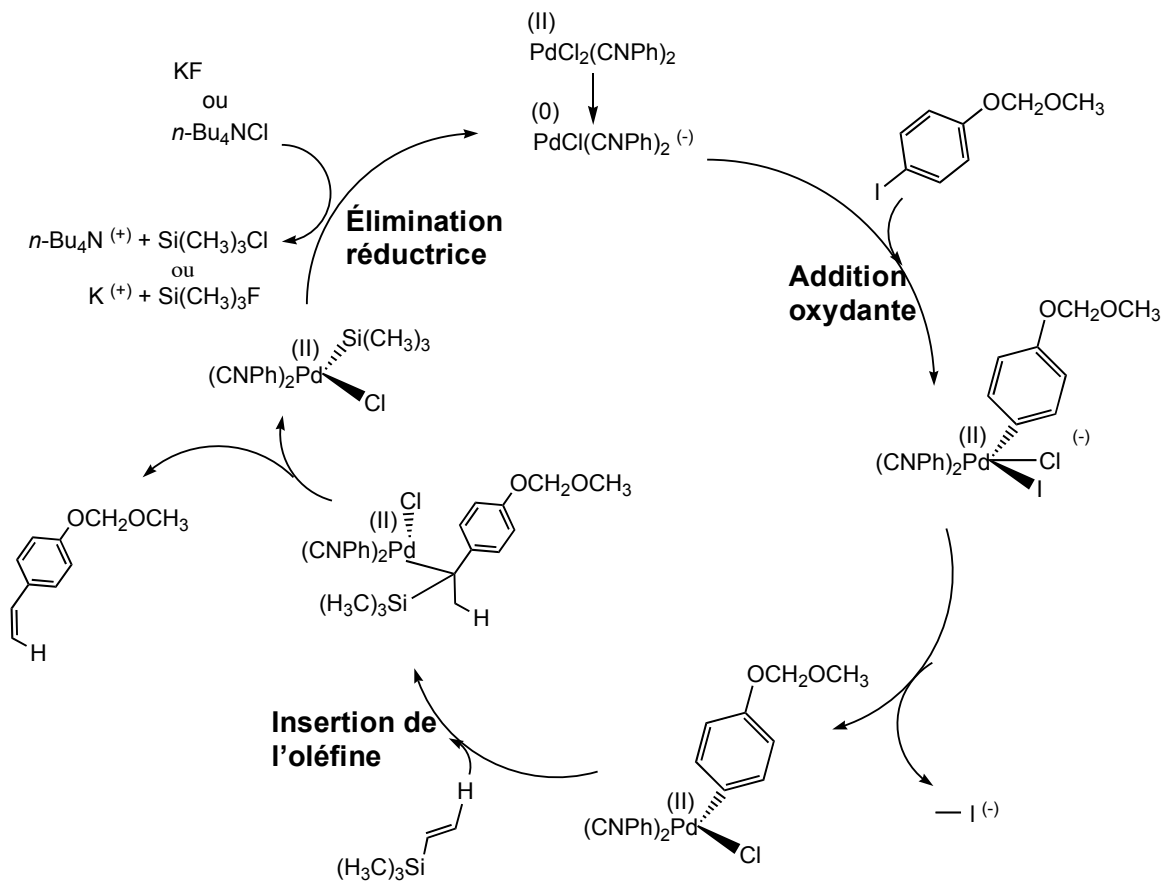


Figure 116 : Mécanisme réactionnel proposé pour la première étape catalytique de la synthèse du *trans*-pterostilbène.

Les *figures 116* et *117* présentent des propositions de mécanismes pour les deux étapes catalytiques des insertions d'oléfines lors de notre double réaction de Heck catalysée par Pd(0).

Nous avons obtenu un rendement de couplage de 35% avec 0.34 g de produits méthoxyméthylés (MOM) formés, dont 4'-méthoxyméthyl-*trans*-pterostilbène (**MOM1**, 32.2%), 4'-méthoxyméthyl-*cis*-pterostilbène (**MOM2**, 37.1%) et 4'-méthoxyméthyl-vinyl-pterostilbène (**MOM3**, 11.7%).

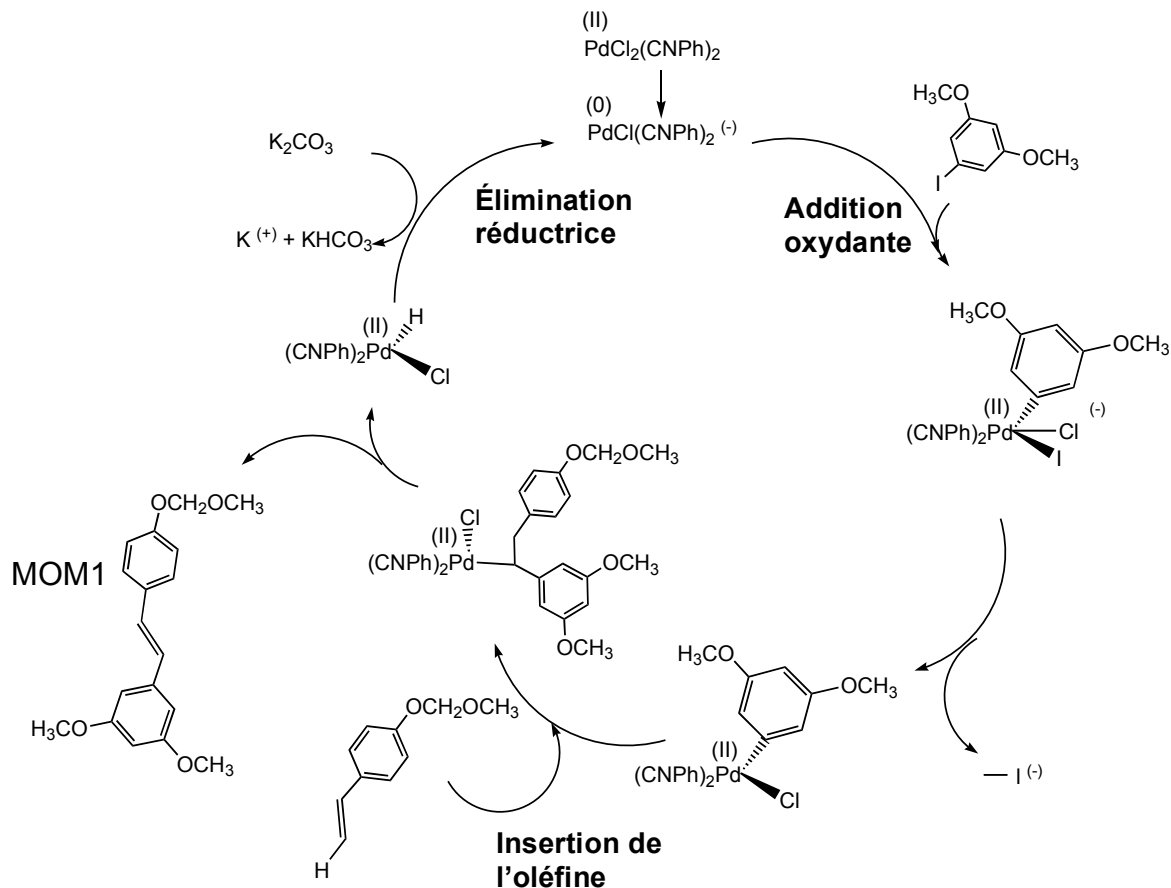


Figure 117 : Mécanisme réactionnel proposé pour la deuxième étape catalytique de la synthèse du *trans*-pterostilbène.

La GC-EI-MS nous permet de constater que **MOM1** et **MOM2** présentent une fragmentation similaire par rapport à **MOM3** (tableau 21). **MOM1** disparaît par la suite au profit du *trans*-pterostilbène lors de l'étape de déméthoxyméthylation. Ceci nous permet d'identifier nos produits présentés à la *figure 118*.

Tableau 30 : Intensités relatives des signaux m/z des produits MOM obtenus ayant une masse de 300 uma (GC-EI-MS).

	m/z						
	[M] ⁺	[M-H ₂ CO] ⁺	?	[M-MOM] ⁺	?	[M-MOM-CH ₃] ⁺	?
	300	270	269	255	254	240	238
MOM1	100	31	-	52	-	54	-
MOM2	100	65	16	37	9	22	6
MOM3	70	29	100	12	41	5	25

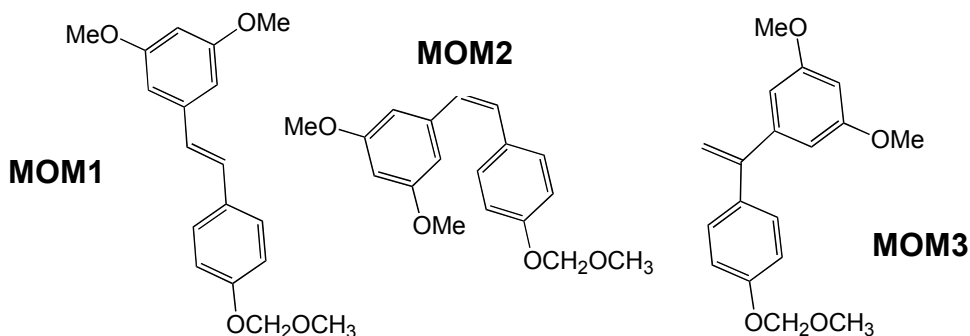


Figure 118 : Produits de la réaction de couplage de Heck.

Selon Jeffery [171-174], le choix approprié d'un système catalytique contenant le Pd(0) et des sels de tétraalkylammonium ou d'argent peut non seulement diriger la régiosélectivité de l'insertion de l'oléfine au cours des réactions de Heck, mais également augmenter le rendement de ces réactions.

Le faible rendement de 35% obtenu peut être expliqué du fait que nous n'avons pas optimisé le système catalytique. Une étude supplémentaire permettrait

d'améliorer ce rendement avec des proportions adéquates de sels et le choix d'un complexe palladium plus efficace.

Nous avons cependant montré que l'obtention du *trans*-ptérostilbène par notre méthode demeure possible et que l'optimisation de cette réaction "one pot" promet une stéréosélectivité maximale tout en préservant une bonne régiosélectivité.

V-4-1 Protection/déprotection par méthoxyméthylation.

L'hydroxyle libre du *p*-iodophénol doit être protégé pour qu'il ne puisse pas désactiver le complexe catalytique du palladium dans les couplages de Heck. Nous avons choisi de procéder à l'étape de déprotection sur le mélange complet, comprenant **MOM1**, **MOM2** et **MOM3**, sur gel de silice additionné de NaHSO₄ hydraté [175] permettant une déprotection sélective de l'hydroxyle en position 4 du *trans*-ptérostilbène (*Figure 119*). Nous savons que la rupture d'un éther de MOM peut s'effectuer dans des milieux très acides (utilisant HCl, BBr₃, *p*-TsOH, ...), mais ces conditions peuvent affecter d'autres groupes fonctionnels tels que les groupes méthoxylés.

Tableau 31 : Résultats obtenus par GC-EI-MS,

(*) le *cis*-ptérostilbène peut être obtenu par photoisomérisation à partir du standard de *trans*-ptérostilbène.

	<i>trans</i> -ptérostilbène	<i>cis</i> -ptérostilbène (*)	vinyl-ptérostilbène
Temps de rétention, GC-EI-MS (prog 1) en minutes	21.3	18.9	20.5
Proportions obtenues (%)	98	1	1
Principaux signaux m/z (intensité relative)	256(100), 240(17), 225(35), 210(18)	256(100), 240(15), 225(35), 210(20)	256(100), 226(87), 211(35)

A notre grande surprise, le *trans*-ptérostilbène (90 mg, 11% de rendement global) a été le produit principal parmi les trois composés attendus dans notre mélange réactionnel, formé à partir de **MOM1** (tableaux 31 et 32).

L'obtention de 98% de *trans*-ptérostilbène, parmi les trois structures attendues, peut être expliqué par les encombrements stériques entre les groupes méthoxylés et méthoxyméthylés (*figure 120*).

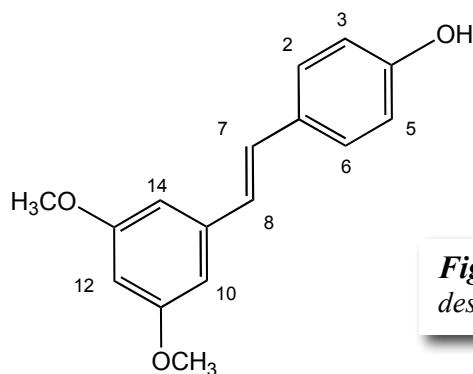
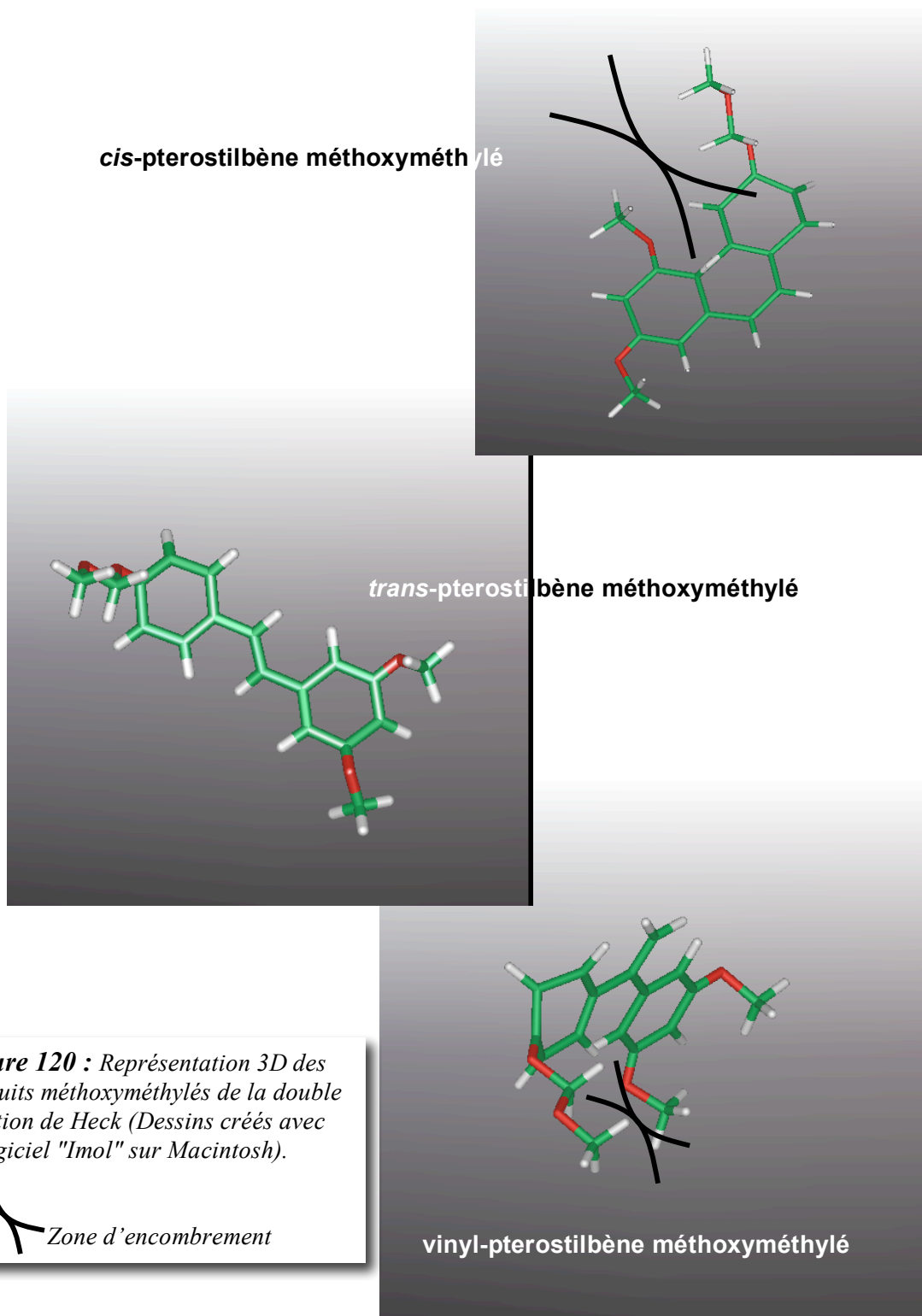


Figure 119 : Attribution des carbones et des protons du *trans*-pterostilbène.

	δ ^1H (ppm)	J (Hz)	δ ^{13}C (ppm)	HMBC (ppm)
1	-	-	130.6	-
2,6	7.46d	8.7	128.3	129.3, 159.1
3,5	6.86d	8.7	115.9	130.6, 115.9
4	-	-	159.1	-
7	7.19d	16.3	129.3	141.7
8	6.99d	16.3	126.0	130.6, 104.5
9	-	-	141.7	-
10,14	6.74d	2.2	104.5	162.9, 126.0
11,13	-	-	162.9	-
12	6.39d	2.2	99.6	162.9, 104.5
-(OCH₃)₂	3.82s	-	55.1	-

Tableau 32 : Données RMN- ^1H (400 MHz) et RMN- ^{13}C (100 MHz) du *trans*-pterostilbène.



V-4-2 Discussion sur l'origine du ptérostilbène dans la plante.

Le ptérostilbène a été tout d'abord mis en évidence en tant que phytoalexine produite par les feuilles de vigne en réponse à un stress biotique ou abiotique par Langcake *et al.* [44]. Pezet et Pont [58] l'ont mis en évidence dans les baies saines de raisin. De récents travaux montrent son effet inhibiteur sur la mobilité *in vitro* des zoospores de *P. viticola* [106].

Rappelons que nous avons montré (voir partie V-1) que ce composé est seulement détectable dans les feuilles de vigne après infection par *P. viticola*, mais demeure non induit après irradiation UV. Sa voie de biosynthèse est mal connue. Il se pourrait qu'il dérive du *trans*-resvératrol en subissant des méthylation d'une manière régiospécifique. Nous connaissons, dans la voie de biosynthèse des lignines, des méthyltransférases capable de méthyler uniquement les fonctions hydroxyles en position 3 ou 5 [176,177]. En sachant que la vigne accumule également, au niveau des sites d'infection, des lignines (révélation par coloration au phloroglucinol), cette hypothèse pourrait être confirmée par l'étude de l'expression des gènes codant pour ces enzymes, dont une ou plusieurs isoformes seraient responsables de l'accumulation du *trans*-ptérostilbène dans la feuille infectée. Deux enzymes impliquées dans la lignification semblent intéressantes (*figure 121*): la cafféoyl CoA-3-O-méthyltransférase (EC 2.1.1.104), et la cafféate 3-O-méthyltransférase (EC 2.1.1.68). Nous proposons donc une voie de biosynthèse du *trans*-ptérostilbène à partir de la biotransformation du *trans*-resvératrol par ces deux enzymes, telle qu'elle se ferait dans les feuilles infectées (*figure 122*).

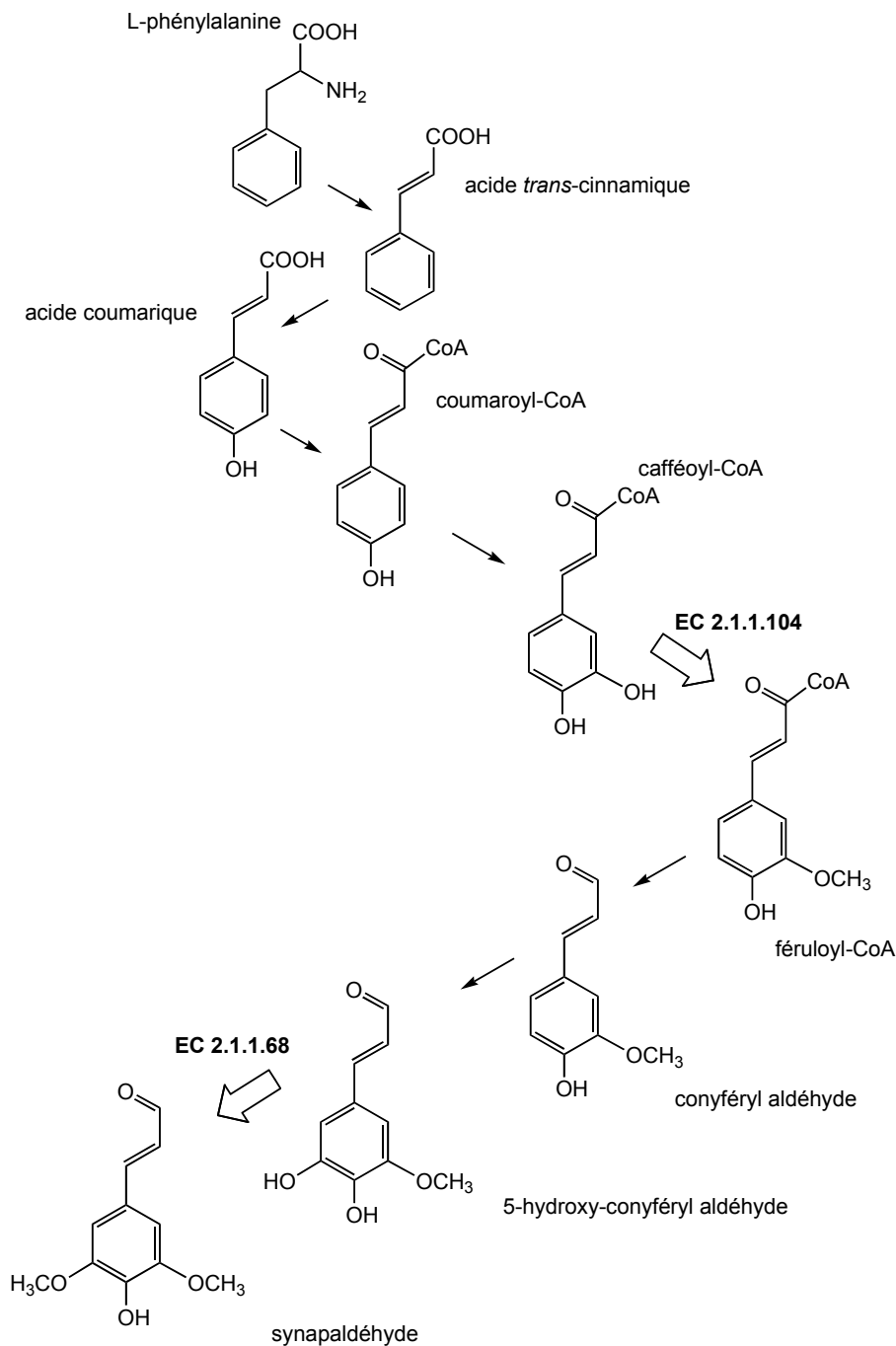


Figure 121 : Implication de la cafféoyl-CoA 3-O-méthyltransférase (EC 2.1.1.104) et de la cafféate 3-O-méthyltransférase (EC 2.1.1.68) dans la lignification. [176,177]

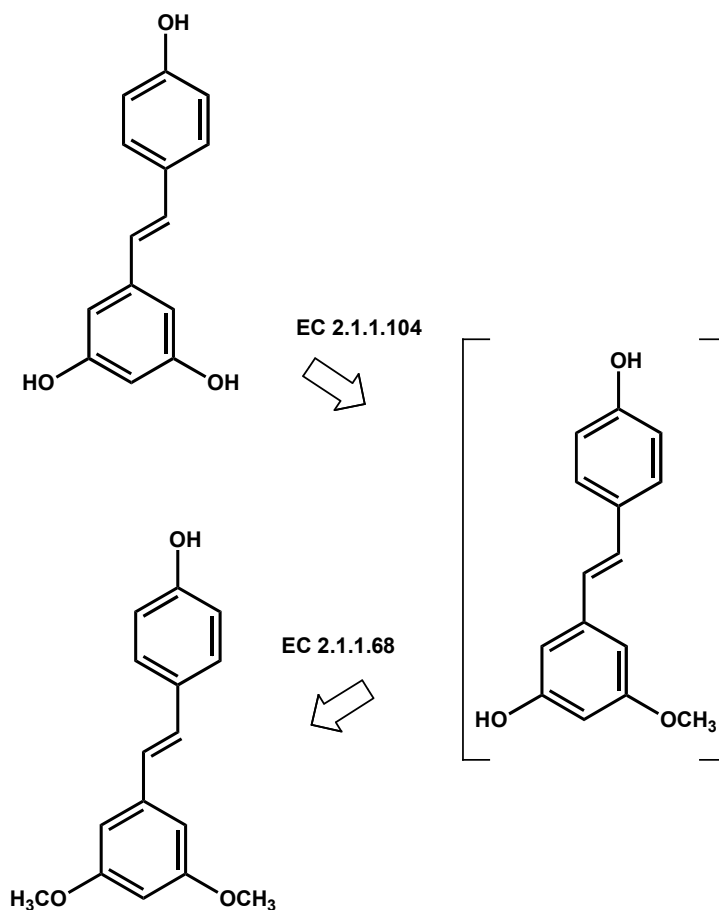


Figure 122 : Implications potentielles de la cafféoyl-CoA 3-O-méthyltransférase (EC 2.1.1.104) et de la cafféate 3-O-méthyltransférase (EC 2.1.1.68) dans la biotransformation du resvératrol en ptérostilbène.

Nous pensons que le *trans*-ptérostilbène pourrait être le produit d'une action combinée entre stilbène synthases (STS) et 3-O-méthyltransférases (OMT) dans la feuille infectée. En 1997, des travaux ont déjà révélé l'implication et l'induction simultanée de ces deux familles de gènes sur des suspensions cellulaires de *V. vinifera* (cv. Gamay) traitées par des levures, inducteurs biotiques du système de défense [178].

V-4-3 Protocole de synthèse du *trans*-pterostilbène.

V-4-3-1 Préparation du bis(benzonitrile)dichloropalladium.

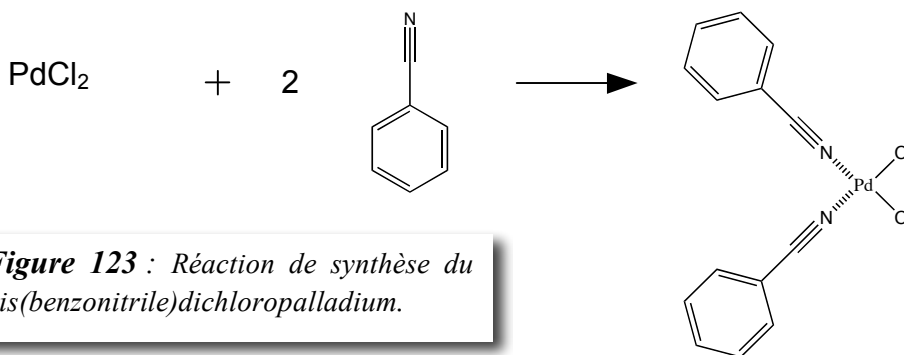


Figure 123 : Réaction de synthèse du bis(benzonitrile)dichloropalladium.

La synthèse est décrite par Anderson et Lin [179].

Nous avons obtenu un solide jaunâtre de point de fusion, 122°C. GC-EI-MS (programme 2): RT : 4.15 min, absence de l'ion moléculaire avec des fragments m/z 179(10), 103(100), 76(45).

V-4-3-2 Préparation du *p*-méthoxyméthyl-iodophénol.

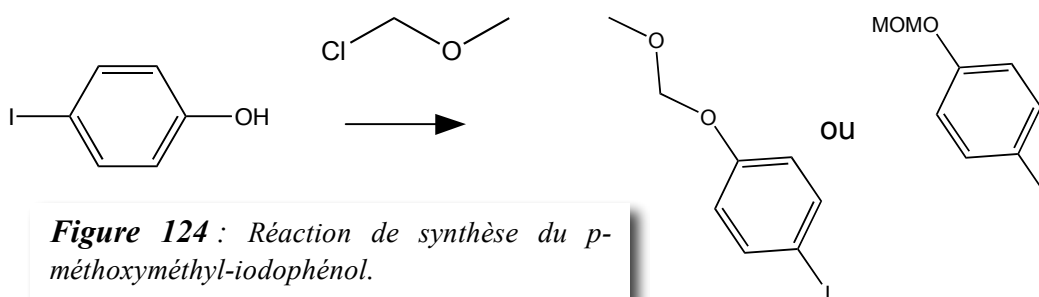


Figure 124 : Réaction de synthèse du *p*-méthoxyméthyl-iodophénol.

Cette méthoxyméthylation a été effectuée d'après la méthode d'Alzeer J. *et al.* [180]. Du *p*-iodophénol (3 g, 13.5 mmol) et 1.2 équivalents de diisopropyléthylamine (DIPEA, 2.1 g, 16.2 mmol) sont mélangés dans 47.2 ml de

dichlorométhane (3,5 mol/mmol) et mis sous agitation. 1.1 équivalents de chlorure de méthoxyméthyle (1.2 ml, 14.8 mmol) dans 7.4 ml de dichlorométhane (0.5 ml/mmol) sont ajoutés au mélange sous agitation en goutte à goutte. Le mélange réactionnel est traité au HCl 5% et lavé avec une solution saturée en NaCl, avant d'être séché et évaporé. La *p*-méthoxyméthyl-iodophénol (2.32 g, rendement de 65%) est purifiée sur colonne de silice (32-63 mesh, 60Å, 3 x 22 cm) éluée par un mélange dichlorométhane/hexane 7/3 (v/v) : Rf de 0.57 ; GC-EI-MS (programme 2): RT de 10.6 min, m/z [M+] 264.2(100), 234,3(40) ; $^1\text{H-RMN}$ (200MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 7.56d (2H, 8.6 Hz, H₃,H₅), 6.82d (2H, 8.6 Hz, H₂,H₆), 5.14s (2H, O-CH₂-O), 3.46s (3H, OCH₃).

V-4-3-3 Préparation du 3,5-diméthoxy-iodobenzène.

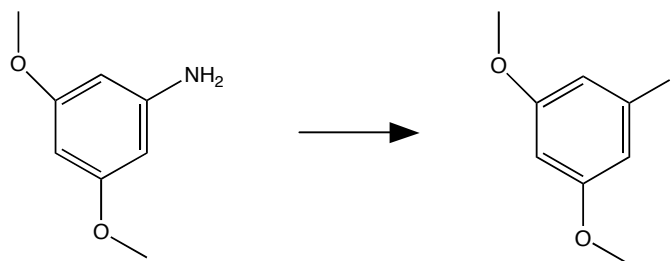


Figure 125 : Synthèse du 3,5-diméthoxy-iodobenzène par la réaction de Sandmeyer.

La réaction de Sandmeyer a été effectuée avec une méthode modifiée inspirée de Clive *et al.* [181].

5 g de nitrite de sodium (72.5 mmol) dans 15 ml d'eau sont ajoutés à un mélange, contenant 5 g de 3,5-diméthoxyaniline (32.7 mmol) dissous dans 60 ml d'eau distillée supplémentée de 8 ml d'HCl concentré, pendant 1 heure entre 0 et 5°C. Ce mélange, prenant une consistance laiteuse légèrement rosée, est

maintenu à 0°C pendant son transfert, via une filtration à froid, dans une solution d'iodure de potassium (KI, 20 g, 120.5 mmol) dans 60 ml d'eau agitée. Le 3,5-diméthoxy-iodobenzène formé sous forme d'un précipité est collecté sur un Büchner avant de le purifier par chromatographie flash (3.15 g, rendement de 37.3%, pureté 93.4%). GC-EI-MS (programme 2) : RT = 11.5 min, m/z [M+] 264.1(100), 137(10), 122(10), 107(10), 108,3(25), $^1\text{H-RMN}$ (200MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 6.86d (2H, 2.3 Hz, H_2, H_6), 6.40t (1H, 2.3 Hz, H_4), 3.76s (6H, $-(\text{OCH}_3)_2$).

V-4-3-4 Préparation du 4'-méthoxyméthyl-*trans*-ptérostilbène (4'-méthoxyméthyl-*trans*-4'-hydroxy-3,5-diméthoxy-stilbène).

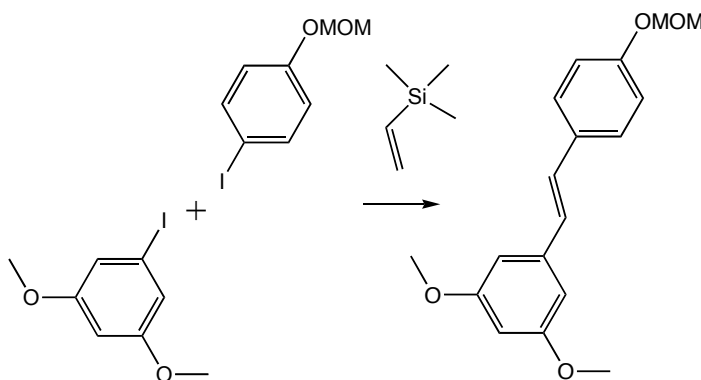


Figure 126 : Réaction de synthèse du 4'-méthoxyméthyl-*trans*-ptérostilbène.

Ce double couplage de Heck a été effectué suivant la méthode de synthèse du *trans*-resvératrol décrite par Jeffery et Ferber [161]. 1 équivalent de *p*-méthoxyméthyl-iodophénol (0.85 g, 3.22 mmol), 0.04 équivalents de dichloropalladium-bis-benzonitrile ($\text{PdCl}_2(\text{PhCN})_2$, 0.069 g, 0.13 mmol) et 5.5 équivalents de vinyl-triméthylsilane (2.8 ml, 1.8 g, 18.12 mmol) sont ajoutés à une

suspension, composée de 3 équivalents de fluorure de potassium anhydre (KF, 0.54 g, 9.31 mmol) et de 2 équivalents de chlorure de tétra-*n*-butylammonium (*n*-Bu₄NCl, 1.65 g, 5.95 mmol) dans 5 ml de toluène anhydre, sous agitation et atmosphère d'azote. Le mélange réactionnel résultant est agité à température ambiante pendant 30 heures.

L'excès de vinyl-triméthylsilane est enlevé du mélange réactionnel sous pression réduite après y avoir ajouté 7 ml de N,N-diméthylformamide (DMF) contenant 3% d'H₂O. 2.5 équivalents de K₂CO₃ et 1 équivalent de diméthoxy-iodobenzène (0.85 g, 3.22 mmol) sont ajoutés au mélange, laissé sous agitation et chauffé à 70°C avec un bain d'huile pendant 24 h. Après refroidissement du mélange, de l'acétate d'éthyle y est ajouté, et le mélange est filtré sur Celite ®. La phase organique est lavée à l'eau, séchée sur MgSO₄ et évaporée. Nous obtenons 0.34 g (rendement : 35%) d'un mélange de 3 produits méthoxyméthylés de masse 300 g.mol⁻¹ (voir les résultats GC-MS et RMN dans la partie **V-4**) après passage sur une colonne de silice (32-63 mesh, 60 Å, 1 x 42 cm) éluée par hexane/toluène/AcOEt, 8/2/1 (v/v/v).

V-4-3-5 Déprotection du groupe méthoxyméthyle.

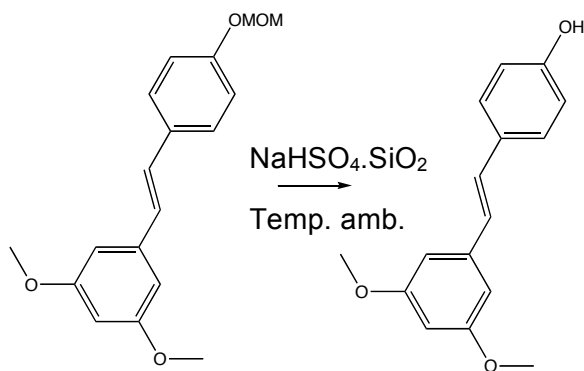


Figure 127: Réaction de déprotection du *trans*-pterostilbène.

Ce processus de déprotection a été réalisé suivant la méthode expérimentale utilisée par Ramesh *et al.* [182].

0.3 g (1mmol) du mélange de produits méthoxyméthylés sont dissous dans 10 ml de CH₂Cl₂, auquel on rajoute 800 mg d'un gel de silice modifié selon la méthode décrite par Breton [175]. La totalité du mélange est mise sous agitation à température ambiante pendant 3 heures. Le mélange réactionnel est ensuite filtré, séché sur MgSO₄, évaporé puis déposé sur colonne de silice (32-63 mesh, 60Å) éluée dans un premier temps, par hexane/toluène/AcOEt 8/2/1 (v/v/v) jusqu'à l'obtention des produits méthoxyméthylés (Rf: 0.3), puis éluée par hexane /toluène/AcOEt 6/2/3 (v/v/v) pour obtenir le *trans*-ptérostilbène (0.1 g, rendement total de 12%, 100% de *trans*). GC-EI-MS (programme 1) : *m/z* [M+] 256 (100), 240 (20), 225 (35). RMN-¹H (400 MHz, acetone-d₆) δ (ppm) : 8.58s (OH), 7.46d (8.7 Hz, H_{2, 6}), 7.19d (16.3 Hz, H₇), 6.99d (16.3 Hz, H₈), 6.86d (8.7 Hz, H_{3, 5}), 6.74d (2.2 Hz, H_{10, 14}), 6.39t (2.2 Hz, H₁₂), 3.82s (6H, (-OCH₃)₂). RMN-¹³C (100 MHz, acetone-d₆) δ (ppm): 162.9 (C_{11, 13}), 159.1 (C₄), 141.7 (C₉), 130.6 (C₁), 129.3 (C₇), 128.3 (C_{2, 6}), 126.0 (C₈), 115.9 (C_{3, 5}), 104.5 (C_{10, 14}), 99.6 (C₁₂), 55.1 (C₁₅).

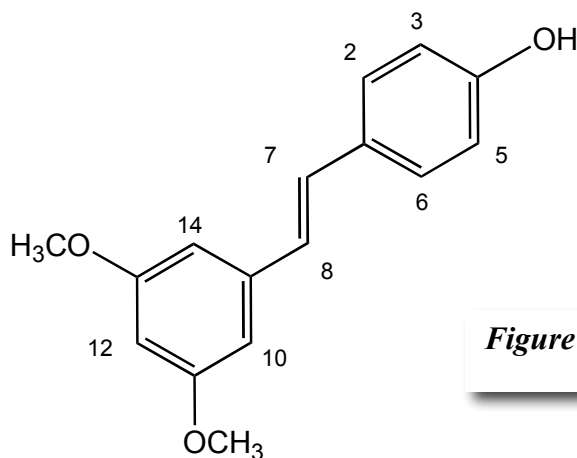


Figure 128 : *Trans*-ptérostilbène.

VI- TABLEAU RECAPITULATIF.

VI- Tableau récapitulatif.

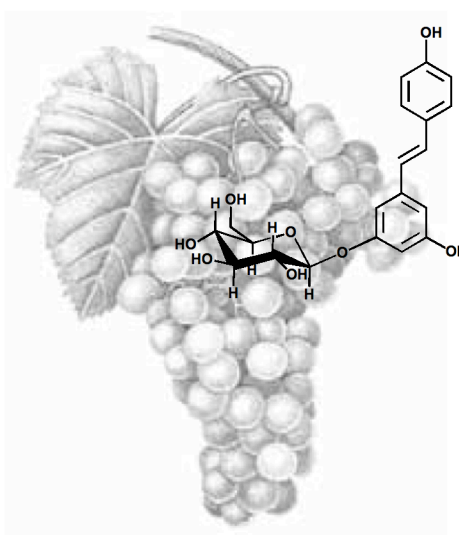
VI- Tableau récapitulatif.

Stilbènes et dérivés détectés	RT (min)	Feuilles						Écorce		
		Chasselas			Solaris			Ch.	Br.	Oxydat. in vitro
		UV	baba	P. v	UV	baba	P. v			
δ-viniférinol	6.8	✓		✓	nm.		✓			✓
trans-picéide	7.0	✓	✓		nm.	✓	✓			
ampélopsine A	8.6				nm.			✓	✓	
cis-picéide	8.7		✓	✓	nm.	✓	✓			
dehydr resv 10	9.9	✓	tr	✓	nm.		✓			
dehydr resv 11	10.4			✓	nm.					
dehydr resv 12	11.2	✓			nm.					
trans-resvétratrol	11.6	✓	✓	✓	nm.	✓	✓	✓	✓	
dehydr resv 13	13.5	✓			nm.					
hopeaphénol	13.5				nm.			✓	✓	
trim resv 682	13.8	✓		✓	nm.		✓			
dehydr resv 14	14.2	✓		✓	nm.		✓			
trans-ε-viniférine	14.5		✓	✓	nm.	✓	✓	✓	✓	
trim resv 680	14.7	tr.		✓	nm.		✓			
dehydr resv 15	15.1	✓	tr	✓	nm.		✓			
α-viniférine	15.5			✓	nm.		✓			
trans-δ-viniférine	15.8	✓	✓	✓	nm.	✓	✓			✓
vitisine A	15.8				nm.			✓	✓	
X452	16.3				nm.			✓		
tetram resv 2 ' 4	16.5				nm.			✓		
tetram resv 2	17.4			✓	nm.			✓		
trans-ε-resvéptérol	20.5			✓	nm.					
trans-pterostilbene	23.5			✓	nm.		✓			
trans-δ-resvéptérol	24.0			✓	nm.					✓

tr. : traces nm. : non mesuré dehydr : déhydrodimère du resvétratrol, trim : trimère, tétram : tétramère.
Ch., Chasselas ; Br., Bronner ; Oxid. *in vitro*, oxydation du resvétratrol et du pterostilbène.

VI- Tableau récapitulatif.

VII- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.



VII- Conclusions et perspectives.

VII- Conclusions et perspectives.

La vigne est une plante généralement exploitée pour son fruit et son vin. La qualité des vendanges implique une grande rigueur dans la lutte contre des maladies comme le mildiou. Le développement de cépages naturellement résistants au mildiou parallèlement à des programmes préventifs de lutte, basées sur les prévisions météorologiques, demeure une solution prometteuse pour réduire les risques d'infection secondaire et diminuer l'usage abusif de fongicides pouvant nuire, à long terme, au rendement de production viticole et à la santé humaine.

Les méthodes de spectrométrie utilisant des sources API sont beaucoup utilisées en chimie des substances naturelles. Parmi elles, l'APPI-MS et ESI-MS sont des méthodes qui ont montré, au cours de nos analyses, une grande sensibilité pour les molécules dérivés du resvératrol à partir des feuilles de vigne traitées de manière biotique et abiotique. L'APPI a été préférée à l'ESI car elle s'est révélée à l'origine de meilleurs spectres de masse et d'une sensibilité supérieure pour les stilbènes induits, tels que des dimères du resvératrol, dans les feuilles de vigne infectées ou traitées par les UV. Ceci nous a permis de mettre au point une méthode LC-APPI-MS rapide, qualitative et sensible nous permettant d'établir un large profil des stilbènes présents dans nos échantillons à partir de faible quantité de matériel (quelques milligrammes de feuilles). Il nous a été permis de procéder à de nombreuses expériences MSⁿ, tout en conservant un rapport signal/bruit élevé. L'addition d'un dopant (acétone) entre l'HPLC et le détecteur MS augmente également ce rapport. Nous pouvons imaginer que cet outil analytique puisse profiter aux viticulteurs pour la sélection de variétés de vigne capable de biosynthétiser des phytoalexines efficaces contre *P. viticola* et d'autres pathogènes.

VII- Conclusions et perspectives.

Nous avons identifié, pour la première fois dans la feuille de vigne infectée la *trans*- δ -viniférine, le *trans*- δ -resvépterol, le *trans*- ϵ -resvépterol et le δ -viniférinol. De la même manière, nous avons détecté 4 lignanes, 11 formes de resveratrolosides, 3 trimères de resvératrol dont l' α -viniférine et 7 dimères de resvératrol montrant des analogies avec l' ϵ -viniférine et la δ -viniférine. La *trans*- δ -viniférine et la *trans*- δ -resvépterol montrent des effets inhibiteurs sur la mobilité des zoospores de *P. viticola*, laissant à penser que le *trans*- δ -resvépterol serait une nouvelle phytoalexine caractérisée dans la feuille de vigne infectée. L'ampélosine A, l'hoephénol, la vitisine A et deux tétramères de resvératrol ont été isolés de l'écorce de vigne. L'hoephénol, la vitisine A et le mélange des deux tétramères de resvératrol sont aussi capables de réduire la motilité des zoospores de *P. viticola*. Un des tétramères caractérisés, mais non encore identifié, correspond par son temps de rétention et son spectre UV à un composé présent en trace dans les feuilles de Chasselas infectées. BABA, un inducteur chimique, peut induire l'accumulation de lignanes, resvératrol, ϵ - et δ -viniférines dans les feuilles de vigne. BABA induit également une accumulation de stilbènes dans les parties des feuilles qui ne sont pas au contact avec l'agent pathogène. À l'action de ces stilbènes, s'ajouteraient celles des calloses et d'autres composés de type phénolique et terpénique, que nous n'avons pas étudié et qui sont présents dans la feuille de vigne. L'ensemble de ce mélange de substances complexes pourrait la défense naturelle de la vigne contre *P. viticola*.

De manière à fabriquer du *trans*-pterostilbène, un des précurseurs des *trans*- ϵ - et *trans*- δ -resvépterol, nous avons appliqué une nouvelle voie de synthèse chimique pour obtenir ce stilbène. Cette synthèse a nécessité la protection par méthoxyméthylation d'un des produits de départ afin de permettre l'activité catalytique du palladium dans un double couplage de Heck "One pot". La double réaction de Heck catalysée par le bis(benzonitrile)palladium a conduit à

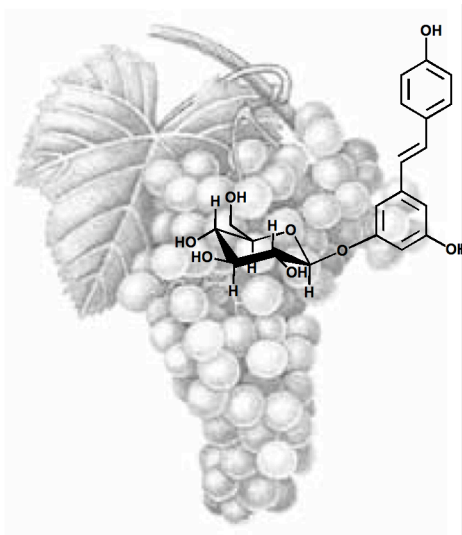
VII- Conclusions et perspectives.

l'obtention de 0.39 g de produits méthoxyméthylés avec un rendement total de couplage de 35% (couplage *trans*, 32.2% ; couplage *cis*, 37.1% ; couplage vinyl, 11.7%). Cependant, la déprotection effectuée sur le mélange obtenu (déméthoxyméthylation) a donné lieu, principalement, au *trans*-ptérostilbène (98%) au dépens du *cis*-ptérostilbène (1%) et du vinyl-ptérostilbène (1%). Les conditions de synthèse du *trans*-ptérostilbène ne nous ont pas permis d'obtenir un bon rendement réactionnel (11%). L'optimisation du système catalytique et le choix d'un complexe palladium approprié nous permettrait d'augmenter d'une manière non négligeable la régiosélectivité et le rendement de réaction. Le ptérostilbène proviendrait, dans la plante infectée par *P. viticola*, de l'action combinée de stilbène synthases et de méthyl-transférase.

Afin de compléter ces travaux, il serait intéressant de poursuivre les biotests effectués par des tests sur la germination des zoospores de *P. viticola* ou sur la libération des spores par les sporanges en suspension ou sur d'autres agents pathogènes. Bien que ce travail mette de la clarté dans la dénomination de stilbènes de la vigne, de nombreuses structures restent encore à être établies et complétées : celles du δ -viniférinol, des dimères de resvératrol (analogues d' ϵ - et δ -viniférines), du tétramère **TT1** (analogue de la vitisine A), des tétramères **TT2** et **TT2'** (dérivés de l' ϵ -viniférine). L'étude de leur toxicité vis-à-vis de *P. viticola* serait aussi très informative par rapport aux interactions hôte-pathogène.

Quelques questions restent en suspens : Pourquoi le processus d'aoûtement induit les stilbènes comme peut le faire localement un parasite ou une induction abiotique ? Peut-on considérer que les stilbènes sont au centre des mécanismes de résistances ? Quels sont les modes d'action *in situ* des phytoalexines mises en évidence ?

VIII- BIBLIOGRAPHIE.



VIII- Bibliographie.

VIII- Bibliographie.

- 1- Beauvais F., Biwer G. and Charmillot P.J. (1977). Test on sexual trapping of *Grapholitha janthinana* Dup., with a mixture of (Z)- and (E)-8-dodecenyl acetate. *Ann. Zool. Ecol. Anim.*, **9**, 457-467.
- 2- Charmillot P.J. (1990). Mating disruption technique to control codling moth in Western Switzerland. In *Behavior-modifying chemicals for insect management*, Ridgway R.L., Silverstein R.M. and Inscoc M.N., ed. (New York: Marcel Dekker), pp. 165-182.
- 3- " <http://www.agrometeo.ch/index1.htm> ".
- 4- Viret O. and Siegfried W. (1996). Fiche technique sur le mildiou. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hort.*, **28**.
- 5- Pearson R.C. and Goheen A.C. (1988). Compendium of grapes diseases, St-Paul M.N. Edition (American Phytopathological Society).
- 6- Hill G.K. (1989). Effect of temperature on sporulation efficiency of oilspots caused by *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt, ex de Bary) Berl. & de Toni in vineyards. *Vitic. Enol. Sci.*, **44**, 46-90.
- 7- Müller K. and Sleumer M. (1934). Biologische untersuchungen über die eronosporakrankheit des weinstockes mit besonderer berücksichtigung ihrer bekämpfung nach inkubationszeitmethode. *Landwirtschaftlichees Jachbuch*, **79**, 502-573.
- 8- Bläser M. and Weltzien H.C. (1979). Epidemiologische studien an *Plasmopara viticola* zur verbesserung der spritzterminbestimmung. *Z. Pflanzenkrank. Pflanzenschutz*, **86**, 489-498.
- 9- Viret O., Bloesch B., Tailens J., Siegfried W. and Dupuis D. (2001). Prévision et gestion des infections du mildiou de la vigne (*Plasmopara viticola*) à l'aide d'une station d'avertissement. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hort.*, **33**, 1-12.
- 10- Kortekamp A. and Zyprian E. (1999). Leaf hairs as a basic protective barrier against downy mildew of grape. *J. Phytopathol.*, **147**, 453-459.

VIII- Bibliographie.

- 11- Dai G.H., Andary C., Cosson-Modolot L. and Boubals D. (1995). Histochemical response of leaves of in vitro plantlets of *Vitis* spp. to infection with *Plasmopara viticola*. *Phytopathol.*, **85**, 149-154.
- 12- Dai G.H., Andary C., Cosson-Modolot L. and Boubals D. (1995). Histochemical studies on the interactions between three species of grapevine, *V. vinifera*, *Vitis rupestris* and *Vitis rotundifolia* and the downy mildew fungus, *Plasmopara viticola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **46**, 177-188.
- 13- Kamoun S., Huitema E. and Vleeshouwers V.G.A.A. (1999). Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response. *Trends in Plant Science*, **4**, 196-200.
- 14- Flor H.H. (1955). Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. *Phytopathol.*, **45**, 680-685.
- 15- Keen N.T. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Ann. Rev. Genetics*, **24**, 447-463.
- 16- Viret O. and Siegfried W. (2002). Application des produits phytosanitaires en viticulture. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hort.*, **34**, 23-25.
- 17- Viret O. (1996). Utilisation du cuivre en viticulture. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hort.*, **28**, 145-146.
- 18- Delabays N., Gut D., Linder Ch., Höhn H., Viret O. and Siegfried W. (2005). Index phytosanitaire pour la viticulture 2005. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hort.*, **37**, supplement (15 p.).
- 19- Gullino M.L., Leroux P. and Smith C.M. (2000). Used and challenges of novel compounds for plant disease control. *Crop Protection*, **19**, 1-11.
- 20- Andrieu N., Jaworska G., Genet J.-L. and Bompeix G. (2001). Biological mode of action of Famoxadone on *Plasmopara viticola* and *Phytophthora infestans*. *Crop Protection*, **20**, 253-260.
- 21- Andrieu N., Genet J.-L., Jaworska G. and Bompeix G. (2000). Behaviour of famoxadone deposits on grape leaves. *Pest. Manag. Sci.*, **56**, 1036-1042.

VIII- Bibliographie.

- 22- Magnien C. (1994). Le mildiou, quelques enseignements des dernières années. *Phytoma - La défense des végétaux*, **466**, 21-23.
- 23- Spring J.-L. (2005). Cépages résistants aux maladies. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hort.*, **37**, 71.
- 24- Barcelo A.R., Zappata J.M. and Calderon A.A. (1996). A basic peroxidase isoenzyme, marker of resistance against *Plasmopara viticola* in grapevines, is induced by an elicitor from *Trichoderma viride* in susceptible grapevines. *J. Phytopathol.*, **144**, 309-313.
- 25- Langcake P. and Pryce R.J. (1976). Production of resveratrol by *V. vinifera* and other members of *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.*, **9**, 77.
- 26- Amborade A., Aziz A., Trotel-Aziz P., Quantinet D., Dhulcq L. and Vernet G. (2004). Stimulation des défenses naturelles de la vigne, essais d'emploi du chitosan contre *Botrytis cinerea*. *Phytoma - La défense des végétaux*, **571**, 26-29.
- 27- Duxbury M., Hotter G., Reglinski T. and Sharpe N. (2004). Effect of chitosan and 5-chlorosalicylic acid on total phenolic content of grapes and wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **55**, 191-194.
- 28- Aziz A., Poinssot B., Daire X., Adrian M., Bezier A., Lambert B., Joubert J.M. and Pugin A. (2003). Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol. Plant - Microbe Interactions*, **16**, 1118-1128.
- 29- Reuveni M., Zahavi T. and Cohen Y. (2001). Controlling Downy Mildew (*Plasmopara viticola*) in field-grown grapevine with β -aminobutyric acid (BABA). *Phytoparasita*, **29**, 125-133.
- 30- Hammiduzzaman M.M., Jakab G., Barnavon L., Neuhaus J.-M. and Mauch-Mani B. (2005). β -Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentialisation of callose formation and jasmonic acid signalling. *Mol. Plant - Microbe Interactions*, **18**, 819-829.

VIII- Bibliographie.

- 31- Cassidy A., Hanley B., Lamuela-Raventos R.M. (2000). Review: Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health, *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1044-1062.
- 32- Takaoka M.J., 1940. *J. Faculty Sci. Hokkaido Imperial U*, **3**, 1.
- 33- Langcake P. and Pryce R.J. (1977). A new class of phytoalexins. *Experientia*, **33**, 151-152.
- 34- Langcake P. and Pryce R.J. (1977). The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochem.*, **16**, 1193-1196.
- 35- Morita H., Noguchi H., Schröder J. and Abe I. (2001). Novel polyketides synthesized with a higher plant stilbene synthase. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3759-3766.
- 36- Hart J.H. (1981). Role of Phytostilbenes in decay and disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **19**, 437-458.
- 37- Sotheeswaran S. and Pasupathy V. (1993). Distribution of resveratrol oligomers in plants. *Phytochem.*, **32**, 1083-1092.
- 38- Bavaresco L., Fregoni M., Trevisan M., Mattivi F., Vrhovsek U. and Falchetti R. (2002). The occurrence of the stilbene piceatannol in grapes. *Vitis*, **3**, 133-136.
- 49- Ito J. and Niwa M. (1996). Absolute structures of new Hydroxystilbenoids, vitisin C and viniferal, from *V. vinifera* "Kyohou". *Tetrahedron*, **52**, 9991-9998.
- 40- Ito J., Gobaru K., Shimamura, Niwa M., Takaya Y. and Oshima Y. (1998). Absolute configurations of some oligostilbenes from *Vitis coignetiae* and *V. vinifera* "Kyohou". *Tetrahedron Let.*, **54**, 6651-6660.
- 41- Hain R., Reif H.J., Krause E, Langebartels R., Kindl H., Vornam B., Wiese W., Schmelzer E., Schreier P.H., Stocker R.H. and Stenzel K. (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, **361**, 153-156.

VIII- Bibliographie.

- 42- Waffo-Teguo P., Lee D., Cendet M., Mérillon J.-M., Pezzuto J.M. and Kinghorn A.D. (2001). Two new stilbene dimer glucosides from Grape (*V. vinifera*) Cell cultures. *J. Nat. Prod.*, **64**, 136-138.
- 43- Van der Kaaden J.E., Hemscheidt T.K. and Mooberry S.L. (2001). Mappain, a new cytotoxic prenylated stilbene from *Macaranga mappa*. *J. Nat. Prod.*, **64**, 103-105.
- 44- Langcake P., Cornford C.A. and Pryce R.J. (1979). Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *V. vinifera* leaves. *Phytochem.*, **18**, 1025-1027.
- 45- Ioset J.-R., Marston A., Gupta M.P. and Hostettmann K. (2001). Five new prenylated stilbenes from the root bark of *Lonchocarpus chiricanus*. *J. Nat. Prod.*, **64**, 710-715.
- 46- Dai J.-R., Hallock Y.F., Cardellina II J.H. and Boyd M.R. (1998). HIV-Inhibitory and cytotoxic oligostilbenes from the leaves of *Hopea malibato*. *J. Nat. Prod.*, **61**, 531-551.
- 47- Pezet R., Perret C., Jean-Denis J.B., Tabacchi R., Gindro K. and Viret O. (2003). δ -viniferin, a resveratrol dehydromer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 5488-5492.
- 48- Ducrot P.-H., Kollmann A., Bala A.E., Majira A., Kerhoas L., Delorme R. and Einhorn J. (1998). Cyphostemmins A-B, two new antifungal oligostilbenes from *Cyphostemma crotalarioides*. *Tetrahedron Let.*, **39**, 9655-9658.
- 49- Bala A.E.A., Kollmann A., Ducrot P.-H., Majira A., Kerhoas L., Delorme R. and Einhorn J. (2000). Cis- ϵ -viniferin: a new antifungal resveratrol dehydromer from *Cyphostemma crotalarioides* roots. *J. Phytopathol.*, **148**, 29-32.
- 50- Luo H.-F., Zhang L.-P. and Hu C.-Q. (2001). Five novel oligostilbenes from the roots of *Caragana sinica*. *Tetrahedron*, **57**, 4849-4854.
- 51- Ohyama M., Tanaka T. and Ilinuma M. (1995). Five resveratrol oligomers from roots of *Sophora leachianau*. *Phytochem.*, **38**, 733-740.

VIII- Bibliographie.

- 52- Oshima Y. and Ueno Y. (1993). Ampelopsins D, E, H and *cis*-ampelopsin E, oligostilbenes from *Ampelopsis brevipedunculata* var. *hancei* roots, *Phytochem.*, **33**, 179-182.
- 53- Pryce R.J. and Langcake P. (1977). α -viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochem.*, **16**, 1452-1454.
- 54- Huang K.-S., Lin M., Yu L.-N. and Kong M. (2000). Four novel oligostilbenes from the roots of *Vitis amurensis*. *Tetrahedron*, **56**, 1321-1329.
- 55- Korhammer S., Reniero F. and Mattivi F. (1995). An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochem.*, **38**, 1501-1504.
- 56- Ohyama M., Ichise M., Tanaka T., Iinuma M. and Burandt Jr C.L. (1996). Davidiol D, first naturally occurring resveratrol pentamer isolated from *Sophora davidii*. *Tetrahedron Let.*, **37**, 5155-5158.
- 57- Aminah N.S., Achmad S.A., Aimi N., Ghisalberti E.L., Hakim E.H., Kitajima M., Syah Y.M. and Takayama H. (2002). Diptoindonesin A, a new C-glucoside of ϵ -viniferin from *Shorea seminis* (*Dipterocarpaceae*). *Fitoterapia*, **73**, 501-507.
- 58- Pezet R. and Pont V. (1988). Mise en évidence de ptérostilbène dans les grappes de *V. vinifera*. *Plant Physiol. Biochem.*, **26**, 603-607.
- 59- Commun K., Mauro M.-C., Chupeau Y., Boulay M., Burrus M. and Jeandet P. (2003). Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiol. Biochem.*, **41**, 317-323.
- 60- Waffo-Teguo P., Decendit A., Vercauteren J., Deffieux G. and Mérillon J.-M. (1996). *Trans*-resveratrol-3-O- β -glucoside (piceid) in cell suspension cultures of *V. vinifera*. *Phytochem.*, **42**, 1591-1593.
- 61- Waffo-Teguo P., Decendit A., Krisa S., Deffieux G., Vercauteren J. and Mérillon J.-M. (1996). The accumulation of stilbene glucosides in *V. vinifera* cell suspension cultures. *J. Nat. Prod.*, **59**, 1189-1191.
- 62- Waffo-Teguo P., Fauconneau B., Deffieux G., Huguet F., Vercauteren J. and Mérillon J.-M. (1998). Isolation, identification and antioxidant activity of three stilbene glucosides newly extracted from *V. vinifera* cell cultures. *J. Nat. Prod.*, **61**, 655-657.

VIII- Bibliographie.

- 63- Decendit A., Waffo-Teguo P., Richard T., Krisa S., Vercauteren J., Monti J.-P., Deffieux G. and Mérillon J.-M. (2002). Galloylated catechins and stilbene diglucosides in *V. vinifera* cell suspension cultures. *Phytochem.*, **60**, 795-798.
- 64- Lins A.P., De S. Ribeiro M.N., Gottlieb O.R. and Gottlieb H.E. (1982). Gnetins: resveratrol oligomers from *Gnetum* species. *J. Nat. Prod.*, **45**, 754-761.
- 65- Tanaka T., Ito T., Ido Y., Son T.-K., Nakaya K., Iinuma M., Ohyama M. and Chelladurai V. (2000). Stilbenoids in the stem bark of *Hopea parviflora*. *Phytochem.*, **53**, 1015-1019.
- 66- Diyasena N.M.C., Sotheeswaran S., Surendrakumar S., Balasubramanian S., Bokel M. and Kraus W. (1985). Balanocarpol, a new polyphenol from *Balanocarpus zeylanicus* (Trimen) and *Hopea jucunda* (Thw.) (*Dipterocarpaceae*). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1807-1809.
- 67- Ito T., Tanaka T., Iinuma M., Nakaya K.-I., Takahashi Y., Sawa R., Murata J. and Darnaedi D. (2004). Three new resveratrol oligomers from the stem bark of *Vatica pauciflora*. *J. Nat. Prod.*, **67**, 932-937.
- 68- Li W.-W., Li B.-G. and Chen Y.-Z. (1998). Oligostilbenes from *Vitis betulifolia*. *Phytochem.*, **49**, 1393-1394.
- 69- Tanaka T., Ohyama M., Morito K., Asai F. and Iinuma M. (1998). A resveratrol dimer from *Parthenocissus tricuspidata*. *Phytochem.*, **48**, 1241-1243.
- 70- Khan M.A., Nabi S.G., Prakash S. and Zaman A. (1986). Pallidol, a resveratrol dimer from *Cissus pallida*. *Phytochem.*, **25**, 1945-1948.
- 71- Sotheeswaran S., Sultanbawa M.U.S., Surendrakumar S. and Bladon P. (1983). Polyphenols from Dipterocarp species. Copalliferol A and Stemonoporol. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 699-702.
- 72- Tanaka T., Iinuma M., Murata H. (1998). Stilbene derivatives in the stem of *Parthenocissus quinquefolia*. *Phytochem.*, **48**, 1045-1049.

VIII- Bibliographie.

- 73- Iliya I, Ali Z., Tanaka T., Iinuma M., Furusawa M., Nakaya K.-I., Murata J. and Darnaedi D. (2002). Stilbenoids from the stem of *Gnetum latifolium* (*Gnetaceae*). *Phytochem.*, **61**, 959-961.
- 74- Amalfitano C., Peduto F., Mugnai L., Evidente A. and Surico G. (2005). Chemical characterisation of stilbenic polyphenols from esca wood and their role in defence mechanisms, *4th international workshop on grapevine trunk diseases (Esca and Grapevine declines)*, January 20-21, 2005, University of Stellenbosch, South Africa.
- 75- Ourtoule J.-C., Bourhis M. and Vercauteren J. (1996). First symmetrical bicyclo(6.6.0)tetradecane resveratrol tetramer from stalks of *V. vinifera* (*Vitaceae*). *Tetrahedron Let.*, **37**, 4697-4700.
- 76- Yan K.-X., Terashima K., Takaya Y. and Niwa M. (2001). A novel oligostilbene named (+)-viniferol A from the stem of *V. vinifera* "Kyohou". *Tetrahedron*, **57**, 2711-2715.
- 77- Li W.-W., Li B.-G. and Chen Y.-Z. (1998). Flexuosol A, a new tetrastilbene from *Vitis flexuosa*. *J. Nat. Prod.*, **61**, 646-647.
- 78- Yan K.-X., T.K., Takaya Y. and Niwa M. (2002). Two new stilbenes tetramers from the stem of *V. vinifera* "Kyohou". *Tetrahedron*, **58**, 6931-6935.
- 79- Frémont L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sci.*, **66**, 663-673.
- 80- Docherty J.J., Fu M.M.H., Stiffler B.S., Limperos R.J., Poklaba C.M. and DeLucia A.L. (1999). Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. *Antiviral Res.*, **43**, 135-145.
- 81- Revel A., Raanani H., Younglai E., Xu J., Rogers I., Han R., Savouret J.-F. and Casper R.F. (2003). Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects lung from DNA damage and apoptosis caused by benzo[a]pyrene. *J. Applied Toxicol.*, **23**, 255-261.
- 82- Atten M.J., A.B.M., Milson T. and Holian O. (2001). Resveratrol-induced inactivation of human gastric adenocarcinoma cells through a protein kinase C-mediated mechanism. *Biochem. Pharmacol.*, **62**, 1423-1432.

VIII- Bibliographie.

- 83- Jang M. and Pezzuto J.M. (1998). Effect of resveratrol on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced oxidative events and gene expression in mouse skin. *Cancer Let.*, **134**, 81-89.
- 84- Petit G.R., Grealish M.P., Jung M.K., Hamel E., Petit R.K., Chapuis J.-C. and Schmidt J.M. (2002). Antineoplastic Agents. 465. Structural Modification of resveratrol: Sodium resverastatin phosphate. *J. Med. Chem.*, **45**, 2534-2542.
- 85- Jang M., Cai L., Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas K.F., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Fransworth N.R., Kinghorn A.D., Mehta R.G., Moon R.C. and Pezzuto J.M. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, **275**, 218-220.
- 86- Billard C., Izard J.C., Roman V., Kern C., Mathiot C., mentz F. and Kold J.P. (2002). Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, epsilon-viniferin and vine-shots derived polyphenols (vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leukemia & Lymphoma*, **43**, 1991-2002.
- 87- Amalfitano C., Evidente A., Surico G., Tegli S., Bertelli E. and Mugnai L. (2000). Phenols and stilbene polyphenols in the wood of esca-diseased grapevines, *Phytopathol. Mediterr.*, **39**, 178-183.
- 88- Dole M., Mack L.L., Hines R.L., Mobley R.C., Ferguson L.D. and Alice M.B. (1968). Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.*, **49**, 2240-2249.
- 89- Iribarne J.V. and Thomson B.A. (1976). Evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys.*, **64**, 2287-2294.
- 90- Thomson B.A. and Iribarne J.V. (1979). Field-induced ion evaporation from liquid surface at atmospheric pressure. *J. Chem. Phys.*, **71**, 4451-4463.
- 91- Yamashita M. and Fenn J.B. (1984). Negative ion production with the electrospray ion source. *J. Chem. Phys.*, **88**, 4671-4675.
- 92- Yamashita M. and Fenn J.B. (1984). Electrospray ion source - another variation on the free-jet theme. *J. Chem. Phys.*, **88**, 4451-4459.
- 93- Wong S.F., Meng C.K. and Fenn J.B. (1988). Multiple charging in electrospray ionization of poly(ethylene glycols). *J. Chem. Phys.*, **92**, 546-550.

VIII- Bibliographie.

- 94- Fenn J.B., Mann M., Chin Kai Meng, Shek Fu Wong and Whitehouse C.M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**, 64-71.
- 95- Wilm M.S. and Mann M. (1994). Electrospray and Taylor-cone theory, does beam of macromolecules at last. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **136**, 167-180.
- 96- Fenn J.B. (1993). Ion Formation from charged droplets: Roles of geometry, energy and time. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **4**, 524-535.
- 97- Nlessen W.M.A. (1989). Electrospray interfacing. In *Liquid chromatography - mass spectrometry*. (Marcel Dekker, Inc.), pp. 314-336.
- 98- Wilson S.R. and Wu Y. (1993). Application of electrospray ionization mass spectrometry to neutral organic molecules including fullerenes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **4**, 596-603.
- 99- Gaskell S.J. (1997). Electrospray: Principles and Practice. *J. Mass Spectrom.*, **32**, 677-688.
- 100- Robb D.B., Covey T.R. and Bruins A. (2000). Atmospheric pressure photoionisation: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **72**, 3653-3659.
- 101- Hayen H and Karst U. (2003). Strategies for the liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of non-polar compounds. *J. Chromatogr. A*, **1000**, 549-565.
- 102- Kebarle P. (2000). A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **35**, 804-807.
- 103- Entretien oral avec le Pr Jean-Claude Tabet, UMR 7613 CNRS-Université Pierre et Marie Curie, "Synthèse, structure et fonction de molécules bioactives", tabet@ccr.jussieu.fr, BP 45, 4 place Jussieu, 75252, Paris CEDEX 05, France.
- 104- March R.E. (1998). Quadrupole ion mass spectrometry: Theory, simulation, recent developments and applications. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 1543-1554.

VIII- Bibliographie.

- 105- March R.E. (1997). An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **32**, 351-369.
- 106- Pezet R., Gindro K., Viret O. and Richter H. (2004). Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis*, **42**, 145-148.
- 107- Delaunay J.-C., Castagnino C., Chèze C. and Vercauteren J. (2002). Preparative isolation of polyphenolic compounds from *V. vinifera* by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, **964**, 123-128.
- 108- Rauha J.-P., Vuorela H. and Kostianen R. (2001). Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionisation mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, **36**, 1269-1280.
- 109- Chen M., Song F., Guo M., Liu Z., Liu S. (2002). Analysis of flavonoid constituents of *Acanthopanax senticosus* harms by electro spray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 264-271.
- 110- Goetz G., Fkyerat A., Métais N., Kunz M., Tabacchi R., Pezet R. and Pont V. (1999). Resistance factors to grey mould in grape berries: identification of some phenolics inhibitors of *Botrytis cinerea* stilbene oxidase. *Phytochem.*, **52**, 759-767.
- 111- Revilla E. and Ryan J.-M. (2000). Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *J. Chromatogr. A*, **881**, 461-469.
- 112- Lee C.Y. and Jaworski A. (1987). Phenolic compounds in white grapes grown in New York. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 277-281.
- 113- Singleton V.L., Timberlake C.F. and Lea A.G.H. (1978). The phenolic cinnamate of white grapes and wine. *J. Sci. Food Agric.*, **29**, 403-410.
- 114- Marinos V.A., Tate M.E. and Williams P.J. (1992). Lignan and phenylpropanoid glycerol glucosides in wines. *Phytochem.*, **31**, 4307-4312.

VIII- Bibliographie.

- 115- Baderschneider B. and Winterhalter P. (2001). Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2788-2798.
- 116- Milder I.E.J., Arts L.C.W., Venema D.P., Lasaroms J.J.P., Wahala K. and Hollman P.C.H. (2004). Optimization of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol and pinoresinol in foods. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 4643-4651.
- 117- Mazur W. (1998). Phytoestrogen content in foods. *Bailleres Clin. Endocrinol. Met.*, **12**, 729-742.
- 118- Mazur W. and Adlercreutz H. (1998). Naturally occurring oestrogens in food. *Pure Applied Chem.*, **70**, 1759-1776.
- 119- Von Rudloff E. and Jorgensen E. (1963). The biosynthesis of pinosylvin in the sapwood of *Pinus resinosa* AIT. *Phytochem.*, **2**, 297-304.
- 120- Douillet-Breuil A.-C., Jeandet P., Adrian M. and Bessis R., (1999). Changes in phytoalexin content of various *Vitis* Ssp. in response to ultraviolet C Elicitation. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4456-4461.
- 121- Jeandet P., Breuil A.-C., Adrian M., Weston L.A., Debord S., Meunier P., Maume G. and Bessis R. (1997). HPLC Analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Anal. Chem.*, **69**, 5172-5177.
- 122- Adrian M., Daire X., Jeandet P., Breuil A.C., Weston L.A., Bessis R., Boudon E. (1997). Comparisons of stilbene synthase activity (resveratrol amounts and stilbene synthase mRNAs levels) in grapevine leaves treated with biotic and abiotic phytoalexin inducers. *Am. J. Enol. Vitic.*, **48**, 394-395.
- 123- Jeandet P., Anne-Breuil A.-C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M. and Adrian M. (2002). Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2731-2741.

VIII- Bibliographie.

- 124- Versari A., Parpinello G.P., Tornielli G.B., Ferrarini R. and Giulivo C. (2001). Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting and UV treatment in grape cv. Corvina. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5531-5536.
- 125- Breuil A.C., Adrian M., Pirio N., Meunier P., Bessis R. and Jeandet P. (1998). Metabolism stilbenes phytoalexins by *Botrytis cinerea*: Characterization of a resveratrol dehydrodimer. *Tetrahedron Let.*, **39**, 537-540.
- 126- Cichewicz R.H., Kousi S.A. and Hamann M.T. (2000). Dimerization of resveratrol by grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.*, **63**, 29-33.
- 127- Pezet R., Pont V. and Hoang-Van K. (1991). Evidence for oxidative detoxication of pterostilbene and resveratrol by laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **39**, 441-450.
- 128- Adrian M., Jeandet P., Breuil A.C., Levite D. Debord S. and Bessis R. (2000). Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.*, **51**, 37-41.
- 129- Waffo-Teguo P., Lee D., Cendet M., Mérillon J.-M., Pezzuto J.M. and Kinghorn A.D. (2001). Two new stilbene dimer glucosides from Grape (*V. vinifera*) Cell cultures. *J. Nat. Prod.*, **64**, 136-138.
- 130- Oshima Y. and Ueno Y. (1993). Ampelopsin D, E, H and *cis*-ampelopsin E, oligostilbène from *Ampelopsis brevipedunculata* var. *hancei* roots. *Phytochem.*, **33**, 179-182.
- 131- Langcake P. and Pryce R.J. (1977). Oxidative dimerisation of 4-hydroxystilbenes *in vitro*: Production of a grapevine phytoalexin mimic. *J. Chem. Soc.: Chem. Comm.*, 208-210.
- 132- Pool R.M., Creasy L.L. and Frackelton A. (1981). Resveratrol and the viniferins, their application to screening for disease resistance in grape breeding programs. *Vitis*, **20**, 136-145.

VIII- Bibliographie.

- 133- Reuveni M. (1998). Relationship between leaf age, peroxidase and β -1,3-glucanase activity and resistance to downy mildew. *J. Phytopathol.*, **146**, 525-530.
- 134- Takaya Y., Yan K.-X., Terashima K., Ito J. and Niwa M. (2002). Chemical determination of absolute structures of resveratrol dimers, ampelopsins A, B, D and F. *Tetrahedron*, **58**, 7259-7265.
- 135- Klarzynski O. and Fritig B. (2001). Stimulation des défenses naturelles des plantes. *Life Sci.*, **324**, 953-963.
- 136- Zimmerli L., Métraux J.-P. and Mauch-Mani B. (2001). β -aminobutyric acid-induced against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.*, **126**, 517-523.
- 137- Gindro K., Pezet R. and Viret O. (2003). Histological study of the responses of two *V. vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiol. Biochem.*, **41**, 846-853.
- 138- Pezet R., Gindro K., Viret O. and Spring J.-L. (2005). Glycosylation and oxidative dimerisation of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, *in press*.
- 139- Ponchet M., Panabières F., Milat M.L., Mikes V., Montillet J.L., Suty L., Triantaphylidès C., Tirilly Y. and Blein J.P. (1999). Are elicitors cryptograms in plants-fungi communications? A review of the plant and cell responses to elicitor treatments and analysis of involved signalling pathways. *Cell Mol. Life Sci.*, **56**, 1020-1047.
- 140- Beckman C.H. (2000). Phenolic-storing cells: key to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defense responses in plants? *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **57**, 101-110.
- 141- Derks W. and Creasy L.L. (1989). The significance of stilbene phytoalexins in *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **34**, 189-202.
- 142- Huang K.-S., Lin M. and Cheng G.-F. (2001). Anti-inflammatory tetramers of resveratrol from the roots of *Vitis amurensis* and the conformations of the seven-membered ring in some oligostilbenes. *Phytochem.*, **58**, 357-362.

VIII- Bibliographie.

- 143- Oshima Y., Ueno Y., Hikino H., Yang L.-L. and Yen K.-Y. (1990). Ampelopsin A, B and C, new oligostilbenes of *Ampelopsis brevipedunculata* var. *hancei*. *Tetrahedron*, **46**, 5121-5126.
- 144- Felicio J.D., da S. Santos R. and Gonçalez E. (2001). Chemical constituents from *V. vinifera* (Viticeae). *Arq. Inst. Biol.*, **68**, 47-50.
- 145- Reniero F., Rudolph M., Angioni A., Bernreuther A., Cabras P. and Mattivi F. (1996). Identification of two stilbenoids from *Vitis* roots. *Vitis*, **35**, 125-127.
- 146- Bezuashvili M.G., Mudzhiri L.A., Shashkov A.S., Chizhov O.S. and Stomakhin A.A. (1997). Stilbene Tetramers from One-Year Grape-Vine Shoots. *Russian J. of Bioorganic Chem.*, **23**, 866-873.
- 147- Li W.-W., Ding L.-S., Li B.-G. and Chen Y.-Z. (1996). Oligostilbenes from *Vitis heyneana*. *Phytochem.*, **42**, 1163-1165.
- 148- Perret C. (2001). Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea* pers.: Fr., Université de Neuchâtel, Neuchâtel, Suisse.
- 149- Pedreño M.A., Morales M., Calderón A.A., Zapataz J.M. and Barceló A.R. (1996). A *trans*-resveratrol oxidizing basic peroxidase isoenzyme from *V. vinifera*. In *Plant peroxidases: Biochemistry and Physiology*. Obinger C., Ebermann R., Penel C. and Greppin H., ed. (University of Geneva), pp. 338-344.
- 150- Yao C.-S., Lin M. and Wang Y.-H. (2004). Synthesis of the active stilbenoids by photooxidation reaction of *trans*- ϵ -viniferin. *Chinese J. Chem.*, **22**, 1350-1355.
- 151- Barcelo A.R., Pomar F., Lopez-Serrano M. and Pedreno M.A. (2003). Peroxidase: a multifunctional enzyme in grapevines. *Functional Plant Biol.*, **30**, 577-591.
- 152- Wellinder K.G., Mauro J.M. and Norskovlauritsen L. (1992). Structure of plant and fungal peroxidases. *Biochem. Soc. Trans.*, **20**, 337-340.
- 153- Morales M. et Barcelo A.R. (1997). A basic peroxidase isoenzyme from vacuoles and cell walls of *V. vinifera*. *Phytochem.*, **45**, 229-232.

VIII- Bibliographie.

- 154- Hoos G. and Blaich. (1988). Metabolism of stilbene phytoalexins in grapevines: Oxidation of resveratrol in single-cell cultures. *Vitis*, **27**, 1-12.
- 155- Calderon A.A., Zapata J.M., Pedreno M.A., Munoz R. and Ros Barcelo A. (1992). Levels of 4-hydroxystilbene-oxidizing isoperoxidases related to constitutive disease resistance in vitro-cultured grapevine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, **29**, 63-70.
- 156- Rasmussen C.B., Dunford H.B. and Welinder K.G. (1995). Rate enhancement of compound-I formation of Barley peroxidase by ferulic acid, caffeic acid and coniferyl alcohol. *Biochem.*, **34**, 4022-4029.
- 157- Langcake P. and McCarty W.V. (1979). The relationship of the resveratrol production to infection of grapevines leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, **18**, 244-253.
- 158- Chakraborti A.K., Nayak M.K. and Sharma L. (1999). Selective deprotection of aryl acetates, benzoates, pivalates and tosylates under nonhydrolytic and virtually neutral conditions. *J. Org. Chem.*, **64**, 8027-8030.
- 159- Rimando A.M., Cuendet M., Desmarchelier C., Mehta R.G., Pezzuto J.M. and Duke S.O. (2002). Cancer chemopreventive and antioxidant activities of Pterostilbene, a naturally occurring analogue of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 3453-3457.
- 160- Guiso M., Marra C. and Farina A. (2002). A new efficient resveratrol synthesis. *Tetrahedron Let.*, **43**, 597-598.
- 161- Jeffery T. and Ferber B. (2003). One-pot palladium-catalyzed highly chemo-, regio-, and stereoselective synthesis of *trans*-stilbenes derivatives. A concise and convenient synthesis of resveratrol. *Tetrahedron Let.*, **44**, 193-197.
- 162- Ferré-Filmon K., Delaude L., Demonceau A. and Noels A.F. (2004). Catalytic methods for the synthesis of stilbenes with an emphasis on their phytoalexins. *Coord. Chem. Rev.*, **248**, 2323-2336.
- 163- Lion C.J., Matthews C.S., Stevens M.F.G. and Westwell A.D., (2005). Synthesis, antitumor evaluation, and apoptosis-inducing activity of hydroxylated (*E*)-stilbenes. *J. Med. Chem.*, **48**, 1292-1295.

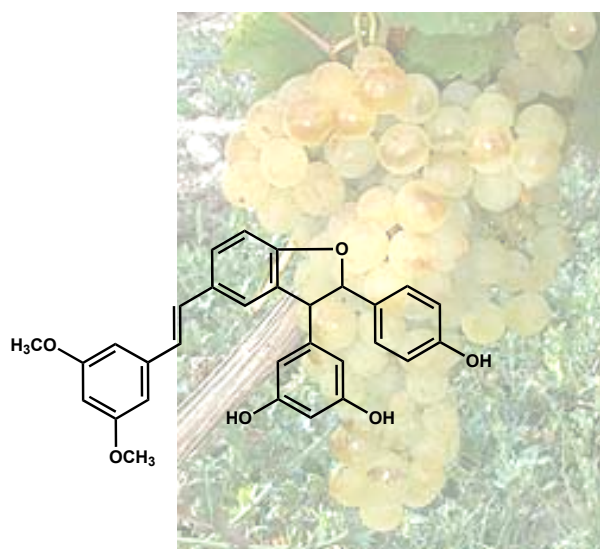
VIII- Bibliographie.

- 164- Polunin K.E., Schmalz H.G. and Polunina I.A. (2002). Chromium arene complexes in synthesis of *trans*-resveratrol. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.*, **51**, 1319-1323.
- 165- Solladié G., Pasturel-Jacopé Y. et Maignan J. (2003). A re-investigation of resveratrol synthesis by Perkins reaction. Application to the synthesis of aryl cinnamic acids. *Tetrahedron*, **59**, 3315-3321.
- 166- Orsini F., Pelizzoni F., Bellini B. and Miglierini G. (1997). Synthesis of biologically active polyphenolic glycosides (combrestatin and resveratrol series). *Carbohydr. Res.*, **301**, 95-109.
- 167- Orsini F., Pelizzoni F., Verotta L., Aburjai T. and Rogers C.R. (1997). Isolation, synthesis and antiplatelet aggregation activity of resveratrol-3-O- β -D-glucopyranoside and related compounds. *J. Nat. Prod.*, **60**, 1082-1087.
- 168- Eddadir S., Abdelhadi Z. and Rolando C. (2001). Fluorinated resveratrol and pterostilbene. *Tetrahedron Let.*, **42**, 9127-9130.
- 169- Ziegler C.B and Heck R.F. (1978). Palladium-catalysed vinylic substitution with highly activated aryl halides. *J. Org. Chem.*, **43**, 2941-2946.
- 170- Kostas I.D., Steele B.R., Terzis A. and Amosova S.L. (2003). A palladium complex with a new hemilabile amino- and sulfur-containing phosphinite ligand as an efficient catalyst for the Heck reaction of aryl bromides with styrene. The effect of the amino group. *Tetrahedron*, **59**, 3467-3473.
- 171- Jeffery T. (1996). On the efficiency of tetraalkylammonium salts in Heck type reactions. *Tetrahedron*, **52**, 10113-10130.
- 172- Jeffery T. (2000). Tetraalkylammonium salt-based catalyst systems for directing Heck-type reactions. Arylation of allyltriméthylsilane. *Tetrahedron Let.*, **41**, 8445-8449.
- 173- Jeffery T. and David M. (1998). [Pd/Base/QX] catalyst systems for directing Heck-type reactions. *Tetrahedron Let.*, **39**, 5751-5754.
- 174- Jeffery T. (1999). Tetraalkylammonium salt-based catalyst systems for directing the arylation of vinyltriméthylsilane. *Tetrahedron Let.*, **40**, 1973-1676.

VIII- Bibliographie.

- 175- Breton G.W. (1997). Selective monoacetylation of unsymmetrical diols catalyzed by silica gel-supported sodium hydrogen sulfate. *J. Org. Chem.*, **62**, 8952-8954.
- 176- Zubieta C., Kota P., Ferrer J.-L., Dixon R.A. and Noel J.P. (2002). Structural Basis for the modulation of Lignin monomer methylation by caffeic acid/5-hydroxyferulic acid 3,5-O-methyltransferase. *Plant Cell Preview*, **14**, 1265-1277.
- 177- Toquin V., Grausem B., Geoffroy P. and Legrand M. (2003). Structure of the tobacco caffeic acid O-méthyltransferase (COMT) II gene: identification of promoter sequences involved in gene inducibility by various stimuli. *Plant Mol. Biol.*, **52**, 495-509.
- 178- Busam G., Junghanns K.T., Kneusel R.E., Kassemeyer H.-H. and Matern U. (1997). Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme a 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *V. vinifera* L. *Plant Physiol.*, **115**, 1039-1048.
- 179- Anderson G.K. and Lin M. (1990). Bis(benzonitrile)dichloro complexes of palladium and platinum. *Inorg. Synthesis*, **28**, 60-63.
- 180- Alzeer J., Nock N., Wassner G. and Masciadri R. (1996). MOM-protected 3-hydroxy-5-phenyl-isoxazole: regioselective preparation and synthetic application. *Tetrahedron Let.*, **37**, 6857-6860.
- 181- Clive D.L.J., Angoh A.G. and Bennett S.M. (1987). Radical spirocyclisation: synthesis of an appropriately oxygenated spiro compound related to the antitumor antibiotic fredericamycin A. *J. Org. Chem.*, **52**, 1339-1342.
- 182- Ramesh C., Ravindranath N. and Das B. (2003). Simple, efficient and selective deprotection of phenolic methoxymethyl ethers using silica-supported sodium hydrogen sulfate as a heterogeneous catalyst. *J. Org. Chem.*, **68**, 7101-7103.

IX- INVENTAIRE DES FIGURES ET TABLEAUX.



Liste des figures :

fig1: *cycle de vie de plasmopara viticola.*

fig2: *feuilles de Chasselas infectées (A et B).*

fig3: *surface viticole des cépages suisses, 2000*

fig4: *Quantité moyennes de produits sanitaires appliqués en Europe (EU-15 entre 1992 et 1996)*

fig5: *Différence morphologique entre les feuilles de Solaris (résistant au mildiou) et de Chasselas (sensible au mildiou) (Changins, 2002).*

fig6: *Origine du Solaris. Avec l'accord de Pr Jean-Marc Neuhaus.*

fig7: *Feuille de Solaris infectée par P. viticola : Apparition de nécroses au niveau des nombreux sites d'infection.*

fig8: *Exemples d'éliciteurs : laminarine (1), chitosane (2), benzothiadiazole ou BTH (3), acide salicylique ou SA (4), acide 5-chlorosalicylique (5) et acide Beta-aminobutyrique ou BABA (6).*

fig9: *Structure générale des stilbènes.*

fig10: *Les stilbènes sont induits par la voie de biosynthèse de la L-phénylalanine, elle-même issue de la voie des shikimates. La stilbène synthase (STS) est l'enzyme clé qui favorisera la formation du resveratrol, précurseur monomérique des oligostilbènes, à partir de la p-coumaroyl-coA. Une compétition existe entre la STS et la chalcone synthase (CHS) car elles utilisent le même substrat tetracétonique. Les deux enzymes sont capable d'effectuer trois condensations successives du malonyl-coA sur le p-coumaroyl-coA donnant le même substrat (*), mais procèdent à un repliement différent de la queue aliphatique. Ceci sera à l'origine de la formation de différents systèmes aromatiques par différents mécanismes de cyclisation: La STS catalysera plutôt une aldolisation décarboxylative, tandis que la CHS catalyse une cyclisation de type Claisen.*

fig11: *Profil spectral UV caractéristique de stilbènes.*

fig12: *(A,B) trans-2-aryl-2,3-dihydrobenzofurane ; (C) trans-2-aryl-2,3-dihydroindène 35. R1 et R2 représentent d'autres groupements aryles.*

fig13: *Principaux stilbènes de la vigne.*

fig14: *Nettoyage des plantes (enlèvement des dendrites et les feuilles dégradées).*

fig15: *Inoculation par immersion.*

fig16: *Processus d'incubation à l'obscurité, 20°C.*

fig17: *Chambre climatisée.*

fig18: *Schéma représentant les zones étudiées sur les disques de feuilles de Chasselas et Solaris.*

fig19: *Source d'ionisation électrospray.*

IX- Inventaire des figures et tableaux.

fig20: Zone d'application des techniques ESI et APPI.

fig21: Schéma d'une source APPI et mécanismes de ionisation (directe (**A**) et avec dopant (**B**, 94)).

fig22ABC: Schéma d'une trappe ionique (**A**), (1) électrode circulaire, (2) calotte d'entrée et (3) calotte de sortie ; Trajectoire d'ions piégés dans la trappe (**B**) ; Diagramme de Mathieu (**C**).

fig23AB: Schéma d'un détecteur ionique en sortie d'analyseur (**A**): dynode (1) et multiplicateur d'électrons. Le multiplicateur est constitué d'une anode (2) et d'une cathode (3). Cascade d'électrons produite dans la cathode à partir d'une particule secondaire issue de la dynode (**B**).

fig24: Niveau d'énergie d'un proton dans un champs magnétique B_0 .

fig25: Schéma d'un spectromètre de RMN.

fig26: Comparaison des courbes **linéaires** de calibration du trans-resvératrol suivant les deux types d'ionisation ESI et APPI.

fig27: Courbes de la calibration du trans-resvératrol suivant les deux types d'ionisation ESI et APPI. Système HPLC (programme "stilbène"): $H_2O/acétonitrile$. Les courbes représentent la quantité d'ions formées par rapport au

$\text{Log } C_{\text{resvératrol}}$

fig28: Courbes de la calibration de l'épsilon-viniférine suivant les deux types de ionisation ESI et APPI. Système HPLC (programme "stilbène"): $H_2O/acétonitrile$. Les courbes représentent la quantité d'ions formées par rapport au $\text{Log } C_{\text{epsilon-viniférine}}$

fig29: Comparaison de la calibration de l'épsilon-viniférine suivant les deux types de ionisation ESI et APPI. Système HPLC (programme "stilbène"): ($H_2O+0.5\%$ acide acétique)/acétonitrile. Les courbes représentent la quantité d'ions formées par rapport au $\text{Log } C_{\text{epsilon-viniférine}}$

fig30: Comparaison des spectres correspondant aux ions $M - H^-$ du resvératrol (m/z 227, **A**) et de l'-viniférine (m/z 453, **B**) obtenus par ESI et par APPI.

fig31: Chromatogrammes d'une sélection d'ions 521 m/z (**a,b**) et 519 m/z (**c**) obtenus par LC-APPI-MS et LC-ESI-MS après induction UV de feuilles de vigne (26h à l'obscurité).

fig32: Chromatogrammes d'une sélection d'ions, 471 m/z (**a**) et 453 m/z (**b-g**) obtenus par LC-APPI-MS et LC-ESI-MS après induction UV de feuilles de vigne (26h à l'obscurité).

fig33: Dérivés cinnamiques présents dans les feuilles de vignes.

fig34: Quelques flavonols et flavanols des feuilles de vignes.

fig35: Structure chimique de la taxifoline-3-O-rhamnoside (**1**) et de l'hexoside du dihydrokaempférol (**2**).

fig36: Chromatogrammes UV d'extrait méthanolique de jeunes feuilles de Solaris infectées par *P. viticola*. 307 nm (noir) et 360 nm (gris)

fig37: Chromatogrammes des ions 519 et 521 m/z dans des extraits de feuilles saines de

IX- Inventaire des figures et tableaux.

Chasselas et Solaris.

fig38: Spectres MS et MSⁿ des substances L_a et L_b.

fig39: Spectres MS et MSⁿ des substances L_c et L_d.

fig40: Lignanes déjà identifiées selon la littérature.

fig41: Les fragmentations présentées arbitrairement sur les formes glycosylées de l'isolaricirésinol et du laricirésinol (lignanes déjà connues possédant une masse de 360 uma), générant les signaux 359, 329 et 178 m/z en mode négatif, sont vraisemblablement celles qui apparaissent dans les molécules L_a, L_b, et L_c en accord avec Marinou et al.

fig42: Profils ioniques des ions correspondants aux signaux 519 et 521 m/z, suspectés d'être associés à des lignanes, dans différentes conditions de prétraitement avant infection de feuilles de Chasselas et de Solaris par *P. viticola*; prétraitement avec une solution aqueuse de BABA ou sans BABA (témoin). Les temps d'échantillonnage après inoculation sont 0 ou 48h.

fig43: Profil chromatographique UV (280 et 307 nm) d'extrait méthanolique de feuille de vigne infectée par *P. viticola*.

fig44: Accumulation de resvératrol dans les feuilles de Chasselas et Solaris infectées. (chromatogrammes des ions 227 m/z par LC-APPI-MS de feuilles de Chasselas et de Solaris infectées)

fig45: *trans*-picéide.

fig46: *cis*-picéide.

fig47: Accumulation des picéides dans des feuilles irradiées (**A**), saines (**C**) et infectées (**D**) de Chasselas et des feuilles infectées de Solaris (**B**). (chromatogrammes des ions 389 m/z par LC-APPI-MS)

fig48: Détection d'hexosides de resvératrol dans les feuilles de Chasselas et de Solaris prétraitées (BABA) ou non (CTRL) puis infectées par *P. viticola*.

fig49: Induction du -viniférinol dans les feuilles de chasselas irradiés aux UV (après 56h dans l'obscurité, 25°C) ou infectées par *P. viticola*.

fig50: Spectres MSⁿ à partir du signal 471 m/z correspondant à l'ion [472-H]⁻ isolé de l'extrait des feuilles de vigne "stressées".

fig51: Profils chromatographiques (307 nm) des stilbènes de feuilles de Chasselas, soit infectées par *P. viticola* (**A**), soit irradiées par UV-C (**B**), comparés aux chromatogrammes de standards : *trans*-epsilon-viniférine et *trans*-déhydrodimère de resvératrol produit in vitro.

fig52: Spectre MS² de **DR10**, RT : 9.8 min (programme "stilbène").

fig53: Profils chromatographiques du signal 453 m/z correspondant aux ions [454-H]⁻ dans les feuilles de Chasselas saines (**A**), irradiées (**B**) et infectées (**C**); LC-ESI-MS.

fig54: Profils chromatographiques du signal 453 m/z correspondant aux ions [454-H]⁻ dans les feuilles de Solaris saines (**A**) et infectées (**B**); LC-APPI-MS.

fig55: Spectre MS² de **DR11**, RT : 10.4 min (programme "stilbène").

fig56: Spectre MS² de **DR12**, RT : 11.2 min (programme "stilbène").

IX- Inventaire des figures et tableaux.

fig57: Spectre MS² de **DR13**, RT : 13.5 min (programme "stilbène").

fig58: Spectre MS² de **DR14**, RT : 14.2 min (programme "stilbène").

fig59: Spectre MS² de **DR15**, RT : 15.1 min (programme "stilbène").

fig60: Comparaison des spectres UV de la trans-epsilon-viniférine (RT : 14.5 min) et de **DR15** (RT : 15.1min).

fig61: Spectre MS² de **DR16**, RT : 10.3 min (programme "stilbène").

fig62: Analogues de viniférines dimériques.

fig63: Spectres UV de **TR680 (A)**, **TR682** et **TR678 (B)**.

fig64: Profils chromatographiques des ions [678-H]⁺, [680-H]⁺, [682-H]⁺ (programme LC "stilbène") dans les feuilles de *Solaris* saines (**A**) et infectées (**B**), et les feuilles de *Chasselas* saines (**C**) et infectées (**D**).

fig65: Spectre MS² (LC-APPI-MS) du composé **TR682**.

fig66: Spectre MS² (LC-APPI-MS) du composé **TR680**.

fig67: Spectres UV et MS² (LC-APPI-MS) du composé **TR678**.

fig68: Ampélopsines B (**1**), C (**2**), D (**3**), E (trans et cis, **4**) et F (**5**), gnétines A (**6**), C (**7**) et E (**8**).

fig69: Profil stilbénique des zones inoculées des disques de feuilles de *Chasselas* infectées par *P. viticola* et prétraitées avec de l'eau ou BABA. (La quantification des composés a été estimée par équivalence avec l'accumulation ionique du trans-resvératrol).

fig70: Profil de quelques composés phénoliques entre 0 et 48h après inoculation dans des feuilles de *Solaris* infectées par *P. viticola* et prétraitées avec de l'eau ou BABA. (La quantification des composés a été estimée par équivalence avec l'accumulation ionique du trans-resvératrol).

fig71: Profil stilbénique des zones non inoculées de disques de feuilles de *Chasselas* infectées par *P. viticola* et prétraitées avec de l'eau ou BABA. (La quantification des composés a été estimée par équivalence avec l'accumulation ionique du trans-resvératrol).

fig72: Profil stilbénique après 7 jours d'incubation de feuilles de plantules (*Chasselas*) saines ou infectées par *P. viticola*, ayant été prétraité par de l'eau ou BABA. (La quantification des composés a été estimée par équivalence avec l'accumulation ionique du trans-resvératrol).
N : zone inoculée nécrosée ; NN : zone inoculée non nécrosée.

fig73: Caractérisation chromatographique des stilbènes d'écorce de *V. vinifera*.

fig74: Visualisation du chromatogramme UV (280 nm) et des profils ioniques M-H correspondants aux stilbènes d'écorce de *V. vinifera*. (méthode LC-APPI-MS)

fig75: Méthodes utilisées pour la caractérisation des stilbènes d'écorce de *V. vinifera*.

fig76: Spectres UV des catéchines, de **X470**, de **TT3**, **TT3'**, **TR1** et **TT4**, résultats de la première méthode (chromatogrammes HPLC semi-préparative).

fig77: Caractérisation du resvératrol par UV (**A**), et spectrométrie de masse : MS, (**B**) et MS²

IX- Inventaire des figures et tableaux.

de l'ion de 227 uma (C).

fig78: *Caractérisation de l'-viniférine par UV (A), et spectrométrie de masse : MS (B), MS² de l'ion 453 (C) et MS³ des ions parents 453 359 (D).*

fig79: *Schéma proposé de fragmentations du trans-resvératrol.*

fig80: *Schéma proposé de fragmentations du trans-epsilon-viniférine.*

fig81: *Spectres MS (A), MS² de l'ion 469 (B) et MS³ des ions parents 469451 (C) de X470.*

fig82: *Attribution des carbones et protons de l'ampélopsine A.*

fig83: *Corrélation HMBC de l'ampélopsine A.*

fig84: *Identification des protons éthyléniques sur le spectre COSY de TT3.*

fig85: *Spectre UV de TT1 et TT3.*

fig86: *Assignation des carbones et protons de TT1 et TT3 (vitisine A).*

fig87: *Corrélation HMBC de TT3 (Vitisine A).*

fig88: *Spectre MS (A) et MS² (B) de TT3' (Hopeaphénol), ESI mode négatif.*

fig89: *Hémi-(TT3') hopeaphénol.*

fig90: *Structure proposée de l'hopeaphénol.*

fig91: *Corrélation HMBC sur l'hémi-(TT3') hopeaphénol.*

fig92: *Spectres UV (A), MS (B) et MS² de l'ion parent 451 (C) de X452.*

fig93: *Spectre UV de TT2.*

fig94: *Détection de TT2 dans des disques de feuilles de chasselas infectées.*

fig95: *Partie de TT2/TT2' commune avec la trans-epsilon-viniférine.*

fig96: *Chromatogramme UV (307 nm) d'un extrait de feuille de Chasselas infectée par P. viticola. Les flèches indiquent la présence de deux hétérodimères de 482 uma, X482 à 20.5 min et Y482 à 24 min.*

fig97: *Spectres MS (M-H⁻, LC-APPI-MS) des composés X482 (A) à 20.5 min et Y482 (B) à 24 min.*

fig98: *Spectres MS² des trans-delta-viniférine, trans-epsilon-viniférine, X482 et Y482.*

fig99: *Variation du profil UV du mélange réactionnel durant la synthèse enzymatique (voir partie VI-4).*

fig100: *Chromatogrammes UV (307 nm) de feuilles de Chasselas infectées par P. viticola (A) et du mélange réactionnel résultant de la dimérisation enzymatique oxydative entre le trans-resvératrol et le trans-pterostilbène (B).*

fig101: *LC-ESI-MS du mélange réactionnel, (A) chromatogramme UV à 307 nm, (B) courant ionique 453, 481 et 509 m/z.*

fig102: *Trans-delta-viniférine, 454 uma (A), trans-tétraméthoxy-delta-viniférine, 510 uma (B).*

IX- Inventaire des figures et tableaux.

fig103: *Trans-delta-iso-resvéptérol (A) et trans-delta-resvéptérol (B), deux isomères de 482 uma.*

fig104: *Spectres MS² (481 m/z) du trans-delta-resvéptérol synthétisé (A) et détecté dans les feuilles infectées (B).*

fig105: *Représentation structurale de la trans-delta-viniférine proposée à partir des données HMBC.*

fig106: *Représentation structurale de la trans-delta-resvéptérol proposée à partir des données HMBC.*

fig107: *Configuration absolue S,S des carbones aliphatiques de la trans-delta-viniférine (A), du trans-delta-resvéptérol (B) et du trans-delta-iso-resvéptérol (C).*

fig108: *Données spectrales UV (A), MS (B), MS² (C) et MS³ (D) du delta-viniférinol.*

fig109: *Restrylsols A (A) et B (B), structure proposée pour le trans-epsilon-resvéptérol (C) ; Spectre UV du (X482) trans-epsilon-resvéptérol (D).*

fig110: *Formation des formes actives (Co I et Co II) de la peroxydase P, responsables de la formation des espèces radicalaires ER•.*

fig111: *Formations des espèces radicalaires ERI-5 (R•) à partir du resvéptérol et du ptérostilbène (RH).*

fig112: *Association des différentes espèces radicalaires à l'origine des viniférines et des resvéptérols.*

fig113: *Structures et corrélations HMBC du trans-ptérostilbène (A) et de son dérivé acétylé (B).*

fig114: *Stratégie de synthèse du trans-ptérostilbène par double réaction de Heck.*

fig115: *Synthèse du trans-resvéptérol par Jeffery et Ferber.*

fig116: *Mécanisme réactionnel proposé pour la première étape catalytique de la synthèse du trans-ptérostilbène.*

fig117: *Mécanisme réactionnel proposé pour la deuxième étape catalytique de la synthèse du trans-ptérostilbène.*

fig118: *Produits de la réaction de couplage de Heck.*

fig119: *Attribution des carbones et des protons du trans-ptérostilbène.*

fig120: *Représentation 3D des produits méthoxyméthylés de la double réaction de Heck.*

fig121: *Implication de la caféoyl-CoA 3-O-méthyltransférase (EC 2.1.1.104) et de la caféate 3-O-méthyltransférase (EC 2.1.1.68) dans la lignification.*

fig122: *Implications potentielles de la caféoyl-CoA 3-O-méthyltransférase (EC 2.1.1.104) et de la caféate 3-O-méthyltransférase (EC 2.1.1.68) dans la biotransformation du resvéptérol en ptérostilbène.*

fig 123: *Réaction de synthèse du bis(benzonitrile)dichloropalladium.*

IX- Inventaire des figures et tableaux.

fig124: Réaction de synthèse du *p*-méthoxyméthyl-iodophénol.

fig125: Synthèse du 3,5-diméthoxy-iodobenzène par la réaction de Sandmeyer.

fig126: Réaction de synthèse du 4'-méthoxyméthyl-trans-pterostilbène.

fig127: Réaction de déprotection du trans-pterostilbène.

fig128: Trans-pterostilbène.

fig129: Chromatogrammes UV d'extrait méthanolique de jeunes feuilles de Solaris infectées par *P. viticola*. 307 nm (noir) et 360 nm (gris)

Inventaire des tableaux:

tab1: Structure générale des stilbènes

tab2: Revue de littérature non exhaustive sur la caractérisation de dérivés de resvératrol dans les différentes parties anatomiques de plantes parmi les genres suivants : Vitaceae, Dipterocarpaceae, Euphorbiaceae, Leguminosae, Sericeae et Gnetaceae. Degré de Polym- : degré de polymérisation.

tab3: Conditions de traitement des différents échantillons étudiés. TEAI : temps d'échantillonnage après inoculation ; NN : partie non nécrosée ; N : partie nécrosée ; Ch : Chasselas ; So : Solaris.

tab4: Principaux composés phénoliques totaux de la feuille de Chasselas obtenu par le système HPLC-ESI-MS (LCQ) "polyphénols totaux" (Ces composés ont été identifiés par comparaison avec des standards, des données chromatographiques et MS de la littérature).

tab5: Accumulation des différentes formes de resvératrol monomériques dans les feuilles de Chasselas et Solaris ayant subi des stress biotiques et abiotiques.

tab6: Distribution des dimères de resvératrol dans les différents systèmes foliaires : Chasselas infecté, Chasselas irradié et Solaris infecté.

tab7: Signaux générés dans les spectres MS² des composés **TR682**, **TR680** et **TR678**.

tab8: Teneur en trans-resvératrol et trans-epsilon-viniférine d'extraits d'écorces de Chasselas, Pinot Noir et Bronner (*V. vinifera*).

tab9: Données RMN-¹H (400 MHz) et RMN-¹³C (100 MHz) du composé à 470 uma. (a) dans acétone-d₆ (**voir le spectre en annexe**)

tab10: Comparaison des données RMN-¹H et RMN-¹³C du composé **X470** avec les données de la littérature. (a) dans acétone-d₆

tab11: Données données RMN-¹H et RMN-¹³C des composés **TT1** et **TT3**. (voir le **tableau 12** présentant la comparaison entre **TT3** et les données RMN de la vitisine A). (a) dans acétone-d₆ (**voir le spectre de TT1 en annexe**)

tab12: Comparaison des données RMN-¹H et RMN-¹³C du composé **TT3** (vitisine A) avec les données de la littérature.

tab13: Données RMN-¹H et RMN-¹³C de (**TT3'**) hopeaphénol. (a), dans acétone-d₆

IX- Inventaire des figures et tableaux.

(voir le spectre dans en annexe)

tab14: *Comparaison des données RMN-¹H et RMN-¹³C du composé obtenu avec les données de la littérature. (a), dans acétone-d₆*

tab15: *Comparaison des données RMN-¹H et RMN-¹³C (HMQC) du mélange obtenu TT2/TT2' avec les données de la littérature. (a) dans acétone-d₆*

tab16: *Estimation des ED50 des composés et des fractions isolés.*

tab17: *Activité biologique des stilbènes et dérivés stilbéniques isolés des sarments de vigne sur la mobilité in vitro des zoospores de P. viticola.*

tab18: *Collection des fractions en phase inverse à partir de la fraction A.*

tab19: *Comparaison de données RMN-¹H (400 MHz) et RMN-¹³C (100 MHz) dans acétone-d₆.*

tab20: *Mélanges obtenus par le fractionnement de A₁ par la méthode HPLC-DAD semi-préparative.*

tab21: *Comparaison des données spectroscopiques RMN de la delta-viniférine et des resvéptérols synthétisés. (voir spectres des resvéptérols en annexe)*

tab22: *Données RMN-¹H (400 MHz) et RMN-¹³C (100 MHz) du trans-delta-viniférine. (acétone-6)*

tab23: *Données RMN-¹H (400 MHz) et RMN-¹³C (100 MHz) du trans-delta-resvéptérol (acétone-d₆).*

tab24: *Répartition structurale de la grande famille des peroxidases (1.11.1.7).*

tab25: *Evaluation sous microscope optique de la motilité des zoospores de P. viticola. Chaque valeur représente le nombre moyen de zoospores mobiles compté sur une surface de 0.11 mm² durant 1 minute (3 réplicats).*

tab26: *Données RMN-¹H et RMN-¹³C (400 et 100 MHz respectivement) du ptérostilbène acétylé dans l'acétone-d₆.*

tab27: *Comparaisons de nos résultats avec ceux de la littérature, RMN-¹H (400MHz) et RMN-¹³C (100 MHz) dans l'acétone-d₆.*

tab28: *Fractionnement du mélange réactionnel sur silice RP-18.*

tab29: *Quelques références concernant la synthèse du resvératrol ou du ptérostilbène.*

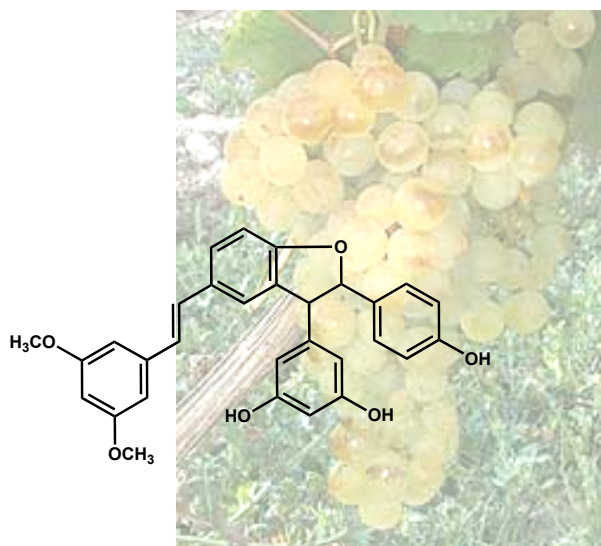
tab30: *Intensités relatives des signaux m/z des produits MOM obtenus ayant une masse de 300 uma (GC-EI-MS).*

tab31: *Résultats obtenus par GC-EI-MS,*

tab 32: *Données RMN-¹H (400 MHz) et RMN-¹³C (100 MHz) du trans-pterostilbène.*

IX- Inventaire des figures et tableaux.

X- ANNEXES.



δ -Viniferin, a Resveratrol Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthesized by Stressed Grapevine Leaves

ROGER PEZET,*[†] CAMILLE PERRET,[‡] JULIEN BERNARD JEAN-DENIS,[‡]
 RAFFAELE TABACCHI,[‡] KATIA GINDRO,[†] AND OLIVIER VIRET[†]

Swiss Federal Agricultural Research Station for Plant Production of Changins (RAC-Changins),
 Route de Duillier, CH-1260 NYON, Switzerland, and Institute of Chemistry,
 University of Neuchâtel (UNI-NE), Avenue de Bellevaux 51, CH-2007 Neuchâtel, Switzerland

δ -Viniferin is a resveratrol dehydrodimer, an isomer of ϵ -viniferin. This compound has been reported as a molecule produced *in vitro* by the oxidative dimerization of resveratrol by plant peroxidases or fungal laccases. It was also recently identified in wines and in grape cell cultures. We have now identified this dimer by NMR, high-performance liquid chromatography–diode array detection (HPLC-DAD), and HPLC-mass spectrometry (MS) in grapevine leaves infected by *Plasmopara viticola* (downy mildew) or UV-C irradiated. Its concentration was higher than that of ϵ -viniferin and constitutes one of the most important phytoalexins derived from resveratrol.

KEYWORDS: Stilbenes; *Vitis vinifera*; resveratrol; viniferins; HPLC; LC-MS; NMR; UV spectra

INTRODUCTION

Langcake and Pryce (1, 2) have demonstrated that resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) is a phytoalexin synthesized by grapevine leaf tissue following fungal infection and UV light irradiation. These authors have also identified oxidation products of resveratrol as ϵ -, α -, β -, and γ -viniferin, respectively, as a dimer, trimer, tetramer, and a more highly polymerized oligomer (3). Pterostilbene (3,5-dimethoxy-4'-hydroxystilbene) was also isolated from *Vitis vinifera* leaves infected by *Plasmopara viticola* (downy mildew) (4). This compound was later identified in healthy grapevine berries as a constitutive stilbene (5).

To study the oxidative dimerization of resveratrol, Langcake and Pryce (6) demonstrated that horseradish peroxidase oxidized resveratrol into an ϵ -viniferin mimic, the resveratrol dehydrodimer, which was not identified by these authors in grapevine leaves. This compound can also be produced, *in vitro*, by a laccaselike stilbene oxidase of *Botrytis cinerea* (7, 8). This dimer was recently detected in wines (9) and in grape cell cultures (10) but never identified as a grapevine phytoalexin. We now describe δ -viniferin, an analogue of the resveratrol dehydrodimer, as a major resveratrol dimer with ϵ -viniferin, synthesized by *P. viticola*-infected or UV-C-irradiated grapevine leaves.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material. Lignified canes (2 years old) of *V. vinifera* var. Gamaret were collected during the winter time in the vineyard of the Swiss Federal Agricultural Research Station for Plant Production of

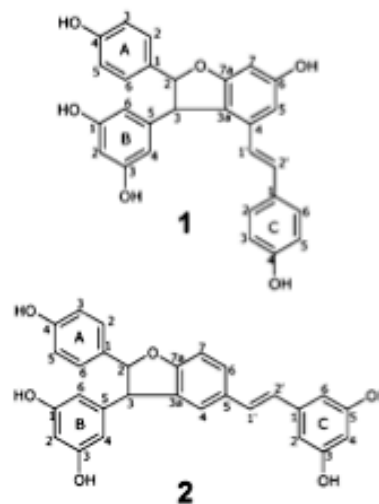


Figure 1. Structures of 1 and 2

Changins (Switzerland). Cuttings from *V. vinifera* var. Chasselas were propagated in a climate-controlled chamber with 16 h of light at 25 °C and 8 h of dark at 18 °C. Some of them were artificially inoculated with *P. viticola* sporangia according to Gindro (11). Leaves were harvested for analysis 7 days after inoculation when sporangioophores of *P. viticola* were visible at their lower face. Leaves were also collected from healthy cuttings, and their undersides were exposed for 10 min to UV-C radiations (Philips TUV 30 W, 92 μ W cm⁻² at 253 and 7 nm, at 13 cm from leaves) and then maintained for 72 h in the dark in a wet chamber and removed for analysis.

Standards. Pure *trans*-resveratrol was obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). *Trans*-piceid (*trans*-resveratrol 3-O- β -D-

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +41 22 363 43 53. Fax: +41 22 363 43 94. E-mail: roger.pezet@rac.admin.ch.

[†] RAC-Changins.

[‡] University of Neuchâtel.

glucoside) was extracted from *Polygonum cuspidatum* and purified according to Waterhouse and Lamuela-Raventos (12). *trans-e*-Viniferin was extracted from lignified canes of Gamaret (100 g FW), sliced into small pieces, and then homogenized in 1 L of MeOH-H₂O (7:3, v/v) for 10 min (Omni-mixer homogenizer, Omni International, U.S.A.). After it was filtered and evaporated with MeOH under vacuum, the aqueous residue was adjusted to 100 mL with distilled water and extracted three times with 100 mL of EtOAc. Further purifications on a preparative low-pressure C18 column (Lichroprep, Merck) and a preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) column (Lichrospher, Merck) using mixtures of MeOH and water yielded 30 mg of partially pure *trans-e*-viniferin. Final purification was made on 20 cm \times 20 cm, 2 mm thick silica thin-layer chromatography (TLC) preparative plates (KH Merck), developed with CHCl₃-MeOH (8:1, v/v). The UV (366 nm) fluorescent band at *R*_f 0.25 was harvested, and pure *trans-e*-viniferin (Figure 1, 1) (23 mg) eluted with MeOH. The structure, confirmed by ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) and ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD), was in accordance with Lin et al. (13) and by MS (ESI) (*m/z* 453.1 [M - H]⁻; 435 (MS²) [M - H - H₂O]⁻).

trans- δ -Viniferin (synonym to *trans*-resveratrol dehydrodimer) was enzymatically synthesized from resveratrol, and the stilbene oxidase of *B. cinerea* was purified as described by Pezet (14). Ten milliliters of an acetone solution of resveratrol (5 mg/mL) and 2.5 mL of an enzyme solution (79.5 μ g of proteins) were added to 1 L of distilled water and stirred at 30 °C for 30 min. The enzymatic reaction mixture

was then extracted with EtOAc. This extract was purified by semi-preparative HPLC on C18 and by preparative TLC as for *e*-viniferin. The UV (366 nm) fluorescent band at *R*_f 0.25 was harvested, and pure *trans- δ* -viniferin (Figure 1, 2) (16.6 mg) eluted with MeOH. The structure was confirmed by ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): 8.54 (brs, OH); 7.37 (dd, *J* = 8.2 et 1.6 Hz, H-6); 7.17 (s, H-4); 7.16 (d, *J* = 8.5 Hz, H-2,6A); 6.96 (d, *J* = 16.2 Hz, H-2'); 6.84 (d, *J* = 8.3 Hz, H-7); 6.78 (d, *J* = 16.2 Hz, H-1'); 6.77 (d, *J* = 8.6 Hz, H-3,5A); 6.42 (d, *J* = 2.2 Hz, H-2,6C); 6.18 (t, *J* = 2.2 Hz, H-2B); 6.13 (t, *J* = 2.2 Hz, H-4C); 6.12 (d, *J* = 2.2, H-4,6B); 5.38 (d, *J* = 8.4 Hz, H-2); 4.39 (d, *J* = 8.3 Hz, H-3) and ¹³C NMR (CD₃OD, 100 MHz): 161.05 (C-7a); 159.98 (C-1,3B); 159.67 (C-3,5C); 158.77 (C-4A); 145.39 (C-5B); 141.19 (C-1C); 132.87, 132.43 et 132.37 (C-3a, C-1A, C-5); 129.39 (C-2'); 128.68 (C-2,6A, C-6); 127.48 (C-1'); 124.18 (C-4); 116.34 (C-3,5A); 110.38 (C-7); 107.75 (C-4,6B); 105.82 (C-2,6C); 102.74 (C-4C); 102.50 (C-2B); 94.94 (C-2); 58.0 (C-3) was in accordance to Breuil et al. (9) and by SM (ESI) (*m/z* 453 [M - H]⁻; 435 (MS²) [M - H - H₂O]⁻).

trans-Pterostilbene was synthesized according to Pezet and Pont (5) and Perret (15). ¹H NMR, *J trans*: 16.4 Hz. *cis* Isomers of each stilbene were obtained by sunlight exposition, for 10 min, of a methanolic standard solution (500 ng/mL for each stilbene except for *trans- δ* -viniferin at 300 ng/mL).

HPLC and LC-MS Analysis. Quantitative analysis of stilbenes by HPLC was carried out, using a Ginkotek system consisting of a

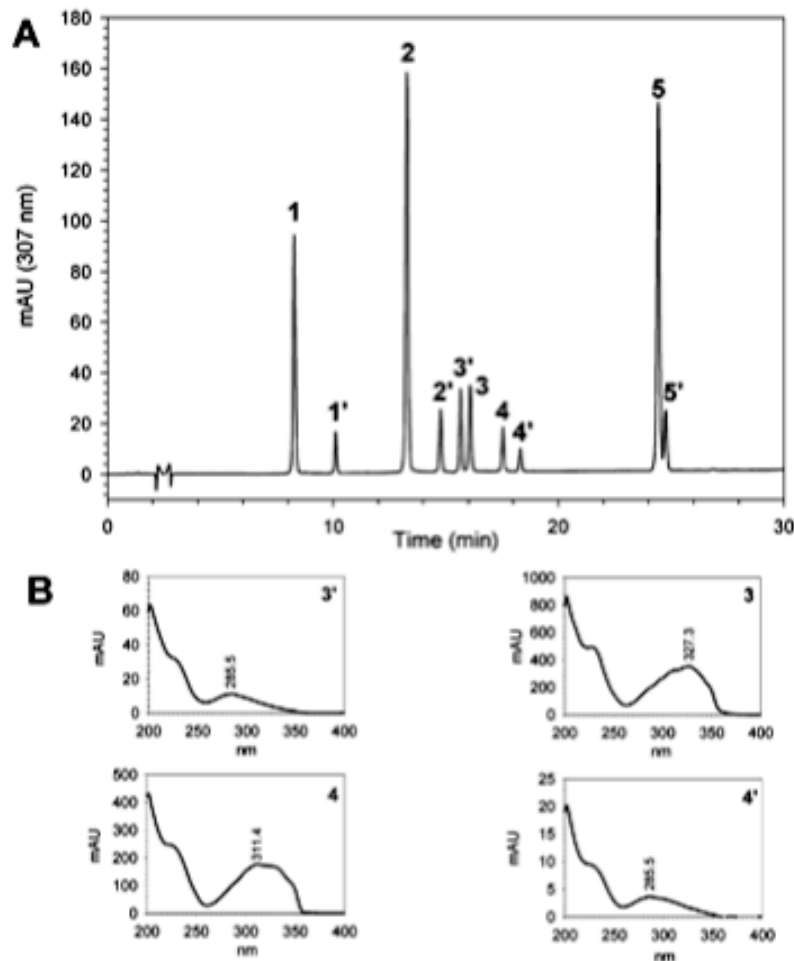


Figure 2. (A) HPLC chromatogram of pure *trans*- and *cis*-stilbenes. (B) UV spectra of *cis*-viniferin (3'), *trans*-viniferin (3), *trans- δ* -viniferin (4), and *cis- δ* -viniferin (4').

quaternary pump (Ginkotek model 480), an automatic solvent degasser (Supelco Mobile Phase Degassing System 55020), an autosampler (Ginkotek Gina 50), a diode array detector (Ginkotek UVD 340S), and the software Chromleon (Dionex), and qualitative analysis was performed by HPLC-MS using an Agilent 1100 series LC/MSD trap in ESI mode. These two LC systems were equipped with a 250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm, C18 Lichrospher column (Merck). The solvent system consisted of 1 min isocratic 20% acetonitrile in water, 30 min linear gradient from 20 to 75% acetonitrile in water, 2 min linear gradient from 75 to 100% acetonitrile, 3 min isocratic 100% acetonitrile, 1 min linear gradient from 100 to 20% acetonitrile in water, and 4 min isocratic 20% acetonitrile in water delivered at a flow rate of 1 mL/min. The column temperature was 25 °C for HPLC-MS system and room temperature for HPLC.

HPLC detection of stilbenes was at 307 nm, and calibration curves were calculated for each *cis*- and *trans*-stilbene on the basis of seven different concentrations from 0.5 to 1000 ng (injection volume 10 μL). UV spectra were made from 200 to 400 nm using the diode array on line detection. Molar extinction coefficients (ε) at 307 nm in MeOH are for ε-viniferin, 17,857, and for δ-viniferin, 13,181.

Sample Preparation. Three pieces of Chasselas leaves were cut in three different *P. viticola* sporulating zones (20.4 mg/73.96 mm²; 18.38 mg/66.63 mm²; 11.22 mg/40.68 mm²) and separately crushed into 300 μL of MeOH placed into a glass tube and then centrifuged (ALC Microcentrifugette 4214, Kontron, 14 000 rpm). Aliquots (10–30 μL) of the supernatant were directly injected into the HPLC or HPLC-MS systems. Three pieces were cut in three distinct parts of one UV-C Chasselas irradiated leaves (15.16 mg/54.96 mm²; 20.10 mg/72.87 mm²; 17.16 mg/62.21 mm²), and samples were prepared for analysis as described above. The surfaces of leaf pieces were measured using a stereoscopic lens equipped with a digital camera (Leica DC 100) and the software Leica IM 1000.

RESULTS AND DISCUSSION

If the *trans*-resveratrol is considered as a nonantifungal stilbene (6), the viniferins are toxic for the fungal parasites (16) and could be considered as true grapevine phytoalexins. Woody parts of grapevines contained stilbenes (17) and particularly large amounts of ε-viniferin (1) as constitutive compounds. However, its isomer δ-viniferin (2) is absent from lignified grapevine canes (result not shown). This woody material is suitable for extraction and purification of ε-viniferin. Once pure, this dimer of resveratrol was characterized by NMR and MS. Its retention time on a C18 chromatographic column and its UV spectrum obtained by diode array detection were shown in Figure 2A,B.

δ-Viniferin was easily synthesized by horseradish peroxidase (6) or by fungal laccases (8, 9) from synthetic resveratrol. Pure δ-viniferin was also obtained by enzymatic biosynthesis and chemically characterized as it was done for its isomer (Figure 2A,B). These two dimers of *trans*-resveratrol, *trans*-resveratrol itself and its glycoside, and *trans*-pterostilbene constitute a pool of stilbene standards useful for the elaboration of an efficient HPLC separation method and further qualitative and quantitative analysis in plants. The analytical method proposed here was adapted from Pezet et al. (18) and is similar to that described by Jeandet et al. (19). Light exposition of a *trans*-stilbene standard solution has been shown to partially photoisomerize stilbenes into *cis* forms (19). Both *cis* and *trans* standard stilbenes were well-separated by HPLC (Figure 2A). UV spectra of *trans* and *cis* isomers of ε- and δ-viniferin were obtained by diode array detection, and with their retention times, these compounds were easily characterized in a chromatographic separation (Figure 2B). In contrast to the other stilbenes analyzed, *cis*-ε-viniferin has a shorter retention time than its *trans* form. According to the high sensitivity of modern diode array detectors, stilbenes in both *trans* and *cis* isomers can be detected at 307 nm even at concentrations as low as 0.5 ng per

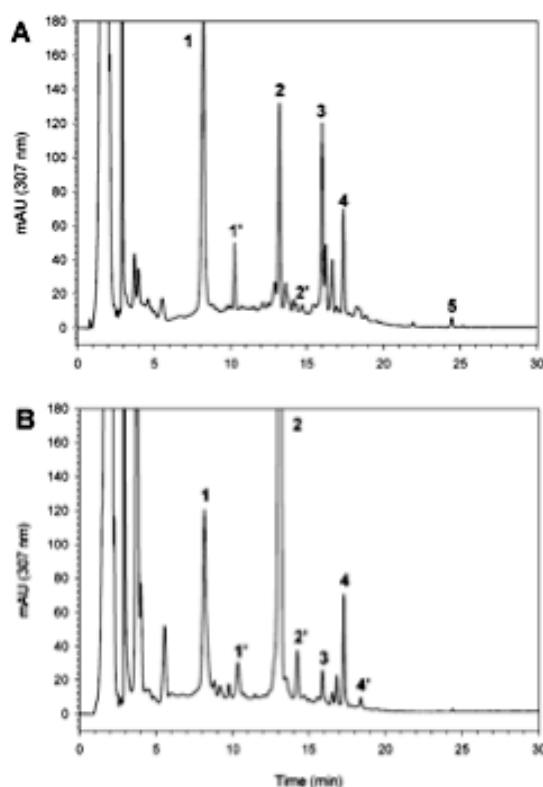


Figure 3. HPLC chromatograms of extracts of (A) *P. viticola*-infected grapevine leaf (var. Chasselas) and of (B) UV-irradiated grapevine leaf (var. Chasselas).

Table 1. Concentrations of Stilbenes Measured in *P. viticola*-Infected Leaves, UV-C-Irradiated Leaves, and Healthy Leaves of Grapevine var. Chasselas

stilbenes peak no.	mg/g fresh weight ^a		
	+ <i>P. viticola</i> ^b	+ UV irradiation ^c	control
1, <i>trans</i> -ploid	64.93 ± 0.95	18.74 ± 3.69	<i>d</i>
1', <i>cis</i> -ploid	12.85 ± 1.34	1.69 ± 0.11	<i>d</i>
2, <i>trans</i> -resveratrol	49.97 ± 8.48	337.53 ± 27.47	0.28 ± 0.02
2', <i>cis</i> -resveratrol	6.45 ± 2.09	0.32 ± 0.09	<i>d</i>
3, <i>trans</i> -ε-viniferin	86.81 ± 18.12	8.63 ± 1.45	<i>d</i>
3', <i>cis</i> -ε-viniferin	7.31 ± 1.08	<i>d</i>	<i>d</i>
4, <i>trans</i> -δ-viniferin	155.68 ± 20.38	165.71 ± 18.42	2.04 ± 0.43
4', <i>cis</i> -δ-viniferin	<i>d</i>	3.42 ± 0.17	<i>d</i>
5, <i>trans</i> -pterostilbene	5.14 ± 0.46	<i>d</i>	<i>d</i>
5', <i>cis</i> -pterostilbene	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>

^aMean of three replicates ± standard deviation. ^bAnalysis made 7 days after inoculation. ^cAnalysis made 72 h after UV irradiation. ^dNo peak detected for this stilbene.

injection volume. If a higher sensitivity is required, a fluorimetric detector at 330 nm for the excitation and 374 nm for the emission wavelength can be coupled to the diode array detector (1, 18).

In grapevine leaves and berries, *trans*-resveratrol and its derivatives are induced by biotic elicitation as fungal parasites (16, 20), fungal exoenzymes (21), or abiotic elicitation as UV irradiation (2), aluminum chloride (22), or fungicide-containing fosetyl-Al (23).

Our analysis was performed on grapevine leaves infected by

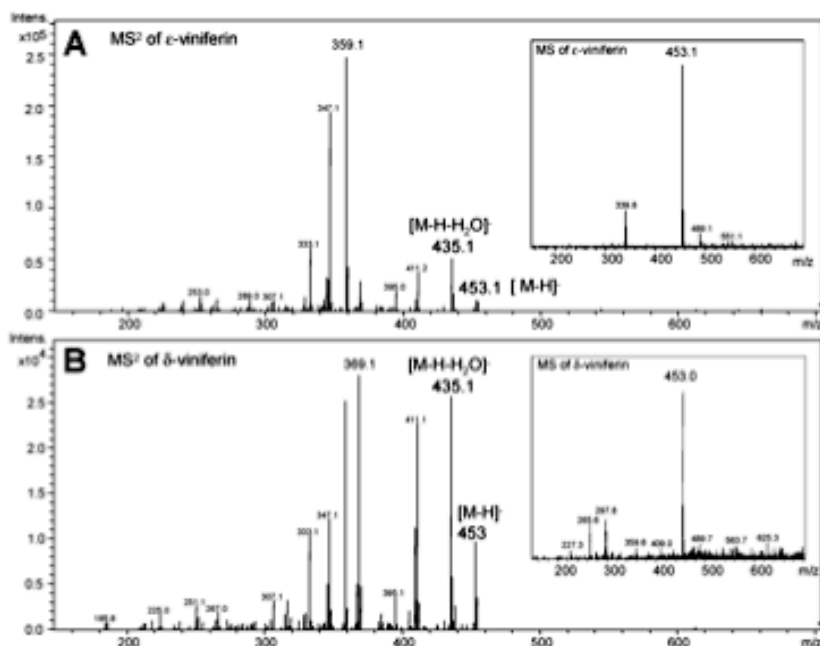


Figure 4. Mass spectra of (A) peaks of 3 (*trans*- ϵ -viniferin) and (B) peaks of 4 (*trans*- δ -viniferin) obtained by HPLC-MS of *P. viticola* and UV-irradiated grapevine leaves extracts (var. Chasselas).

downy mildew (*P. viticola*) or submitted to UV irradiation. Many authors described sophisticated and time-consuming stilbene extraction methods requiring large quantities of plant material (20, 24). However, stilbenes can be efficiently extracted from small leaf pieces with a low volume of MeOH (1–100 mg fresh weight in 100–500 μ L). Methanolic extracts were directly injected after clarification by centrifugation. In several experiments, stilbenes were detected in less than 1 μ g (fresh weight) of stressed grapevine leaves (results not shown). Such extracts were separated by HPLC to detect by UV (DAD, 307 nm) the stilbenes synthesized by *P. viticola* infected grapevine leaves and by HPLC-MS to confirm their identity. *trans*- and *cis*-Piceid, *trans*-resveratrol, *trans*- ϵ - and *trans*- δ -viniferins, and pterostilbene were detected (Figure 3A). MS has confirmed that peaks 3 (ϵ -viniferin, 1) and 4 (δ -viniferin, 2) were *trans*-resveratrol dimers ($m/z = 453$ [M - H]⁻) (Figure 4A,B). UV spectra obtained by diode array detection and retention times are in a complete accordance with those of viniferin standards (Figure 2A,B).

After 72 h of incubation, UV-irradiated leaves synthesized the same stilbenes. However, some differences were observed as follows: *cis*- δ -viniferin was detected, and pterostilbene was absent in these extracts (Figure 3B).

Seven days after inoculation with *P. viticola*, δ -viniferin was the most abundant stilbene detected. In UV-irradiated leaves, resveratrol exhibited the highest concentration. However, the δ -viniferin concentration was almost the same in both samples (Table 1). The resveratrol trimer, α -viniferin, described by Pryce and Langcake (25), was never detected in our grapevine leaf samples.

trans-Resveratrol is the primary phytoalexin produced by a stilbene synthase induced by a stress as described in a recent review (26). Viniferins resulted from an oxidative dimerization of resveratrol carried out by supposed grapevine cell peroxidases (27). These authors identified a *trans*-resveratrol oxidizing basic peroxidase and proposed a mechanism for the synthesis of ϵ -

and δ -viniferins to explain the presence of these two isomers in stressed grapevine leaves.

ACKNOWLEDGMENT

We thank I. De Groote for helpful technical assistance and Anthony Ceasar and TheCan Ceasar (-TonThat), USDA-ARS-NPARRL, Sidney (MT), for reviewing the manuscript.

LITERATURE CITED

- (1) Langcake, P.; Pryce, R. J. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* **1976**, *9*, 77–86.
- (2) Langcake, P.; Pryce, R. J. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1193–1196.
- (3) Langcake, P.; Pryce, R. J. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* **1977**, *32*, 151–152.
- (4) Langcake, P.; Cornford, C. A.; Pryce, R. J. Identification of pterostilbene as a phytoalexin from *Vitis vinifera* leaves. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1025–1027.
- (5) Pezet, R.; Pont, P. Mise en évidence de pterostilbene dans les grappes de *Vitis vinifera*. *Plant Physiol. Biochem.* **1988**, *26*, 603–607.
- (6) Langcake, P.; Pryce, R. J. Oxidative dimerization of 4-hydroxystilbenes *in vitro*: Production of a grapevine phytoalexin mimic. *J. Chem. Soc., Commun.* **1977**, 208–210.
- (7) Pezet, R.; Pont, V.; Hoang-Van, K. Evidence for oxidative detoxication of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1991**, *39*, 441–450.
- (8) Breuil, A. C.; Adrian, M.; Pirio, N.; Meunier, P.; Bessis, R.; Jeandet, P. Metabolism of stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea*: I. Characterization of a resveratrol dehydromer. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 537–540.
- (9) Adrian, M.; Jeandet, P.; Breuil, A. C.; Levite, D.; Debord, S.; Bessis, R. Assay of resveratrol and derivative stilbenes in wines by direct injection high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, *51*, 37–41.

- (10) Waffo-Teguo, P.; Lee, D.; Cuendet, M.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. Two new stilbene dimmer glucosides from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 136–138.
- (11) Gindro, K.; Pezet, R.; Viret, O. Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiol. Biochem.* **2003**, *41* (9), in press.
- (12) Waterhouse, A. L.; Lamuela-Raventos, R. M. The occurrence of piceid, a stilbene glucoside in grape berries. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 571–573.
- (13) Lin, M.; Li, J. B.; Li, S. Z.; Yu, D. Q.; Liang, X. T. A dimeric stilbene from *Gnetum parvifolium*. *Phytochemistry* **1992**, *32*, 633–638.
- (14) Pezet, R. Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *167*, 203–208.
- (15) Perret, C. Analyse de tannins inhibiteurs de la stilbene oxidase produite par *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. Ph.D. Thesis, Institute of Chemistry, University of Neuchâtel, 2001. Web address: <http://www.unige.ch/cyberdocuments/unine/these2001/PerretC/these.html>.
- (16) Langcake, P. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, *ε*-viniferin, *α*-viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.* **1981**, *18*, 213–226.
- (17) Hart, J. H. Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1981**, *19*, 437–458.
- (18) Pezet, R.; Pont, V.; Cuenat, P. Method to determine resveratrol and pterostilbene in grape berries and wines using high-performance liquid chromatography and highly sensitive fluorimetric detection. *J. Chromatogr.* **1994**, *663*, 191–197.
- (19) Jeandet, P.; Breuil, A. C.; Adrian, M.; Weston, L. A.; Debord, S.; Meunier, P.; Maume, G.; Bessis, R. HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorometry. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 5172–5177.
- (20) Bavaresco, L.; Petegolli, D.; Canta, E.; Fregoni, M.; Chiusa, G.; Trevisan, M. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis* **1997**, *36*, 77–83.
- (21) Calderon, A. A.; Zapata, J. M.; Ros Barcelo, A. Peroxidase-mediated formation of resveratrol oxidation products during the hypersensitive-like reaction of grapevine cells to an elicitor from *Trichoderma viride*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1994**, *44*, 289–299.
- (22) Adrian, M.; Jeandet, P.; Bessis, R.; Joubert, J. M. Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl₃). *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1979–1981.
- (23) Dercks, W.; Creasy, L. L. Influence of foseetyl-Al on phytoalexin accumulation in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **1989**, *34*, 203–213.
- (24) Romero-Perez, A. I.; Lamuela-Raventos, R. M.; Andrés-Lacueva, C.; Carmen de la Torre-Boronat, M. Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 210–215.
- (25) Pryce, R. J.; Langcake, P. *α*-Viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1452–1454.
- (26) Jeandet, P.; Douillet-Breuil, A. C.; Bessis, R.; Debord, S.; Sbaghi, M.; Adrian, M. Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2731–2741.
- (27) Pedreno, M. A.; Morales, M.; Calderon, A. A.; Zapata, J. M.; Ros Barcelo, A. A *trans*-resveratrol oxidizing basic peroxidase isoenzyme from *Vitis vinifera*. In *Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology*; Obinger, C., Burner, U., Eberman, R., Penel, C., Greppin, H., Eds.; University of Geneva: Geneva, 1996; pp 338–344.

Received for review March 27, 2003. Revised manuscript received June 12, 2003. Accepted June 13, 2003. We also gratefully acknowledge financial support from the National Center of Competence in Research (NCCR): Plant Survival in Natural and Agricultural Ecosystems.

JF030227O

Articles et abstracts publiés :

- **Jean-Denis J.B.**, Pezet R. and Tabacchi R., 2005. Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew infected grapevine leaves by LC-APPI-MSn. *J. Chromatogr. A*, accepted.
- Pezet R., Perret C., **Jean-Denis J.B.** et al., 2003. δ -viniferin, a resveratrol dehydrodimer: One of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves, *J. Agr. Food Chem.*, 51 (18), 5488-5492.
- **Jean-Denis J.B.**, E. Abou-Mansour and R. Tabacchi, 2003. LC-ESI, APCI, APPI-MS-MS Analysis of phytotoxins and phytoalexins involved in vine resistance and diseases, *Chimia*, 57 (7/8), 388.
- Pezet R., **Jean-Denis J.B.** et al., 2003. Identification of δ -viniferin, a resveratrol dehydrodimer biosynthesised by grapevine plants, *Chimia*, 57 (7/8), 388.

Communications orales :

- Jean-Denis J.B., 2005. *Trans*-resveptero, a new dimeric stilbene characterised in infected grapevine leaves, NCCR Plant Survival International Conference 2005, Leysin, March 31-April 3, Switzerland
- Jean-Denis J.B., 2003. The Usefulness of Natural stilbenes in plants and human health, Conférence Universitaire de Suisse Occidentale, Chemical Biology symposium, September 14th, Champéry, Switzerland.

Posters :

- **Jean-Denis J.B.**, Pezet R. and Tabacchi R., 2005. *Trans*-resveptero, a new dimeric stilbene characterised grapevine leaves by downy mildew, 2nd COST 858 meeting, Università Cattolica del Sacro Cuore, 6-7 may, Piacenza, Italy.
- **Jean-Denis J.B.**, Tabacchi R. and Pezet R., 2004. Polyphenols involved in Grapevine resistance against *Plasmopara viticola*, XXII International Conference on Polyphenols, Senaatintori, 25-28 august 2004, Helsinki, Finland.
- **Jean-Denis J.B.**, 2004. Stilbenic profile of grapevine resistance against *Plasmopara viticola*, Future trends in phytochemistry, Palazzo Feltrinelli, 5-8 may 2004, Gargnano, Italy.

X- Annexes.

- **Jean-Denis J.B., 2004.** Stilbenic profile of grapevine resistance against *Plasmopara viticola*, First COST 858 meeting, Monte-Verita, 29 april-1st may 2004, Ascona, Switzerland.

- Pezet R., **Jean-Denis J.B. et al., 2003.** δ -viniferin, a reveratrol dehydrodimer biosynthesised by grapevine plants, NCCR Graduate school meeting, 8-9 may 2003, Neuchatel, Switzerland.

- Pezet R., **Jean-Denis J.B. et al., 2003.** δ -viniferin, a reveratrol dehydrodimer biosynthesised by grapevine plants, Fall meeting SCS, EPFL, 9 oct 2003, Lausanne, Switzerland.

- **Jean-Denis J.B.,** Abou-Mansour E. and Tabacchi R., **2002.** Analysis by LC-ESI-MS and LC APPI-MS of phytoalexins and phytotoxins involved in vine resistance and diseases. International Mass Spectrometry Society Conference, Edinburgh, Scotland.

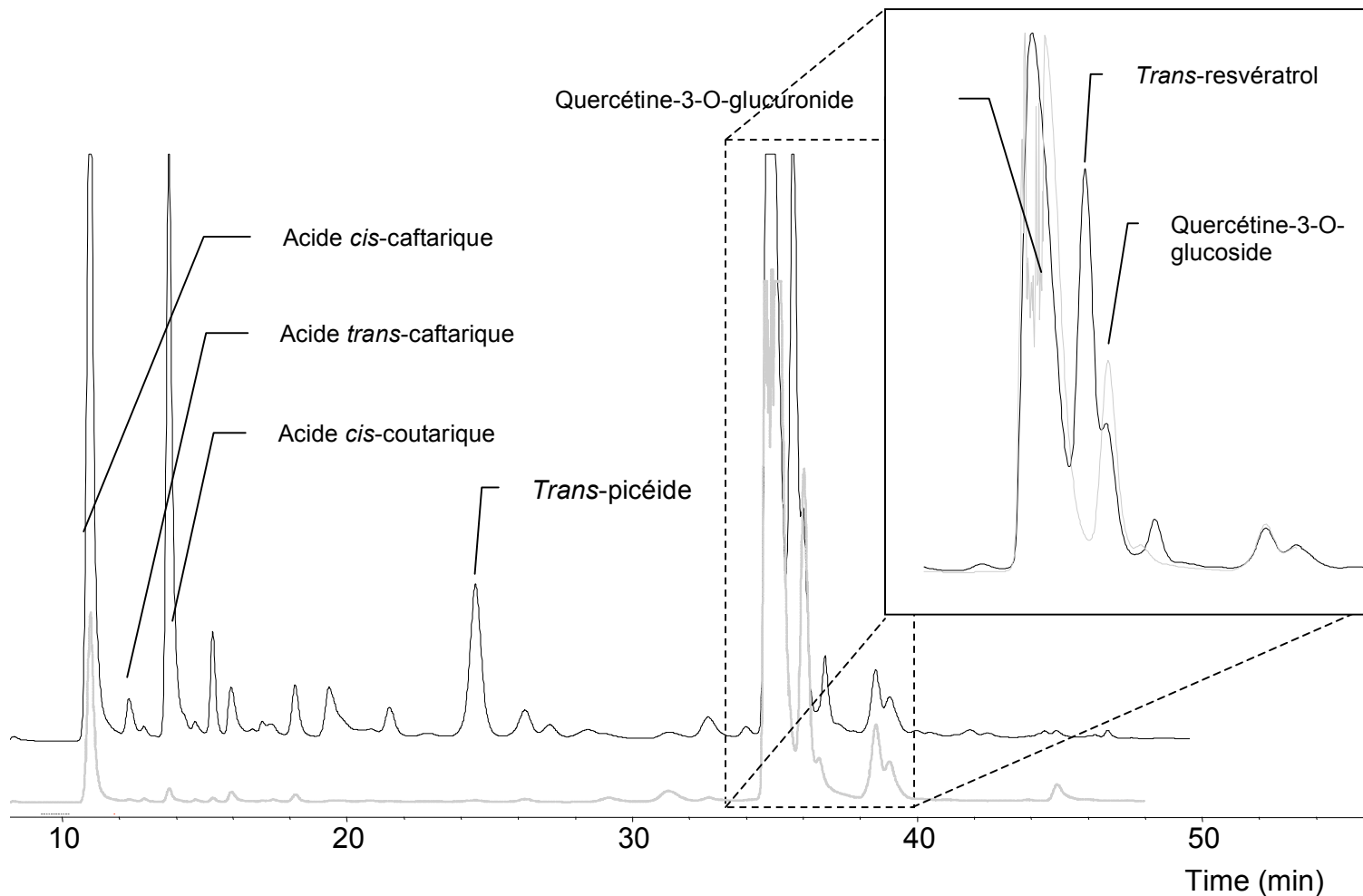
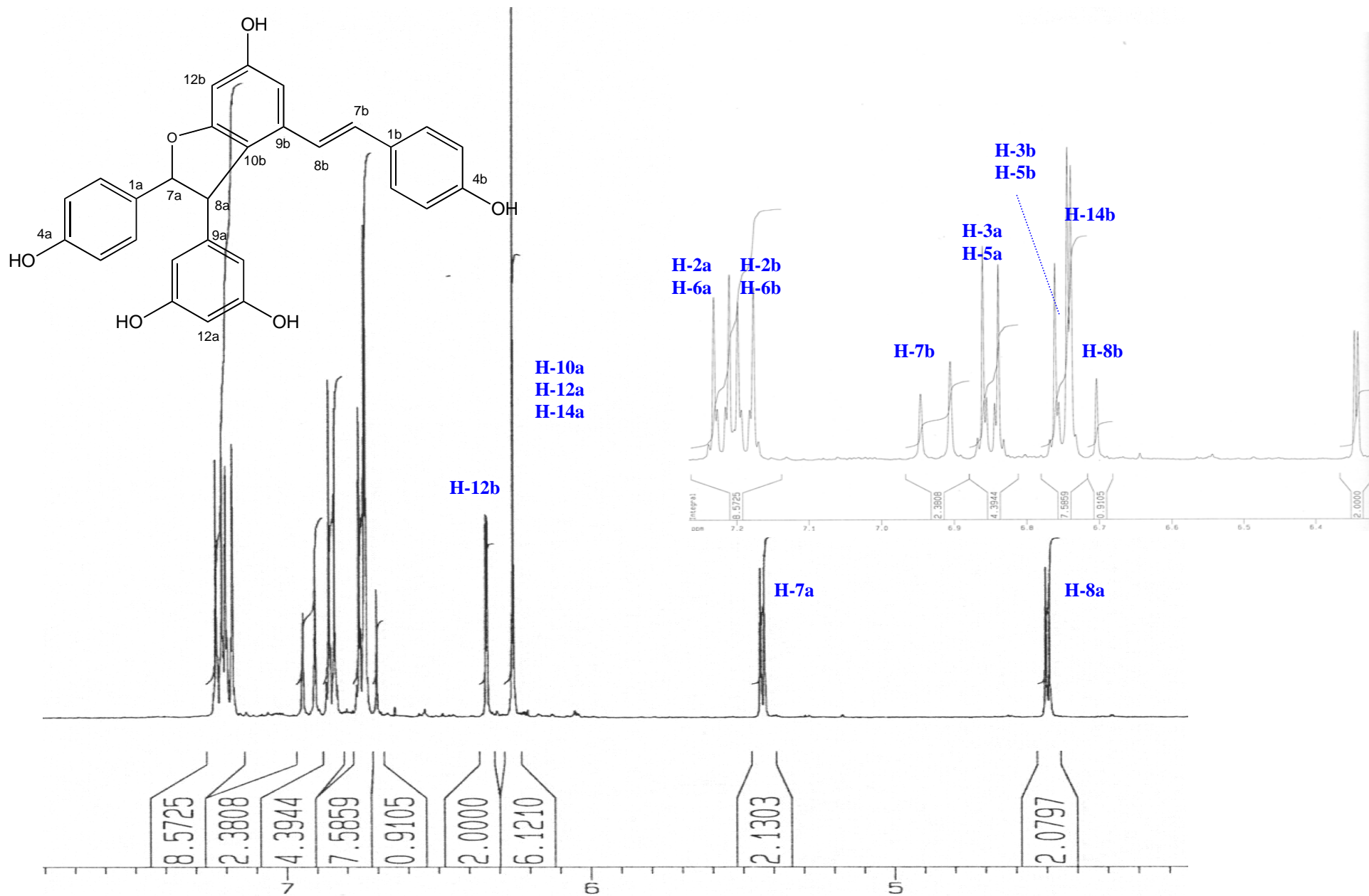
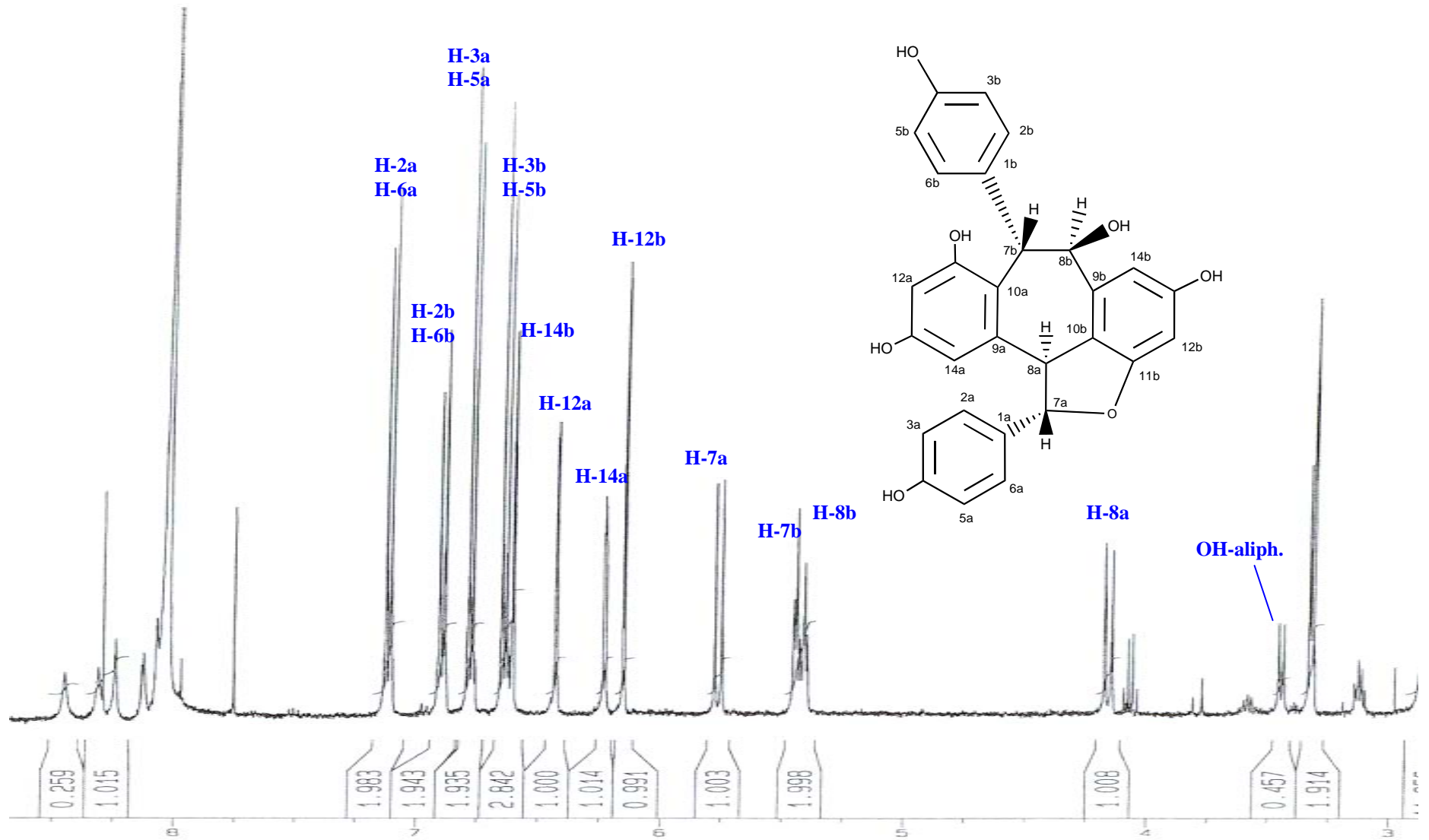


Figure 127 : Chromatogrammes UV d'extrait méthanolique de jeunes feuilles de Solaris infectées par *P. viticola*. 307 nm (noir) et 360 nm (gris)

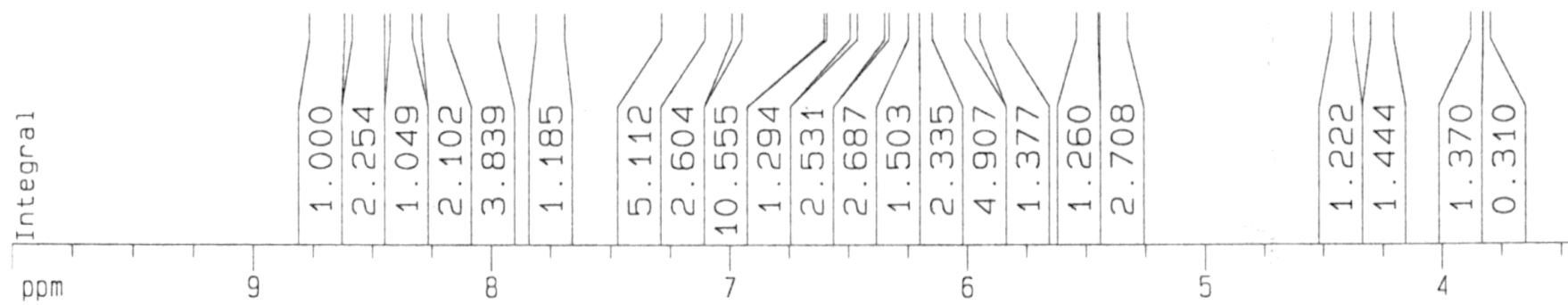
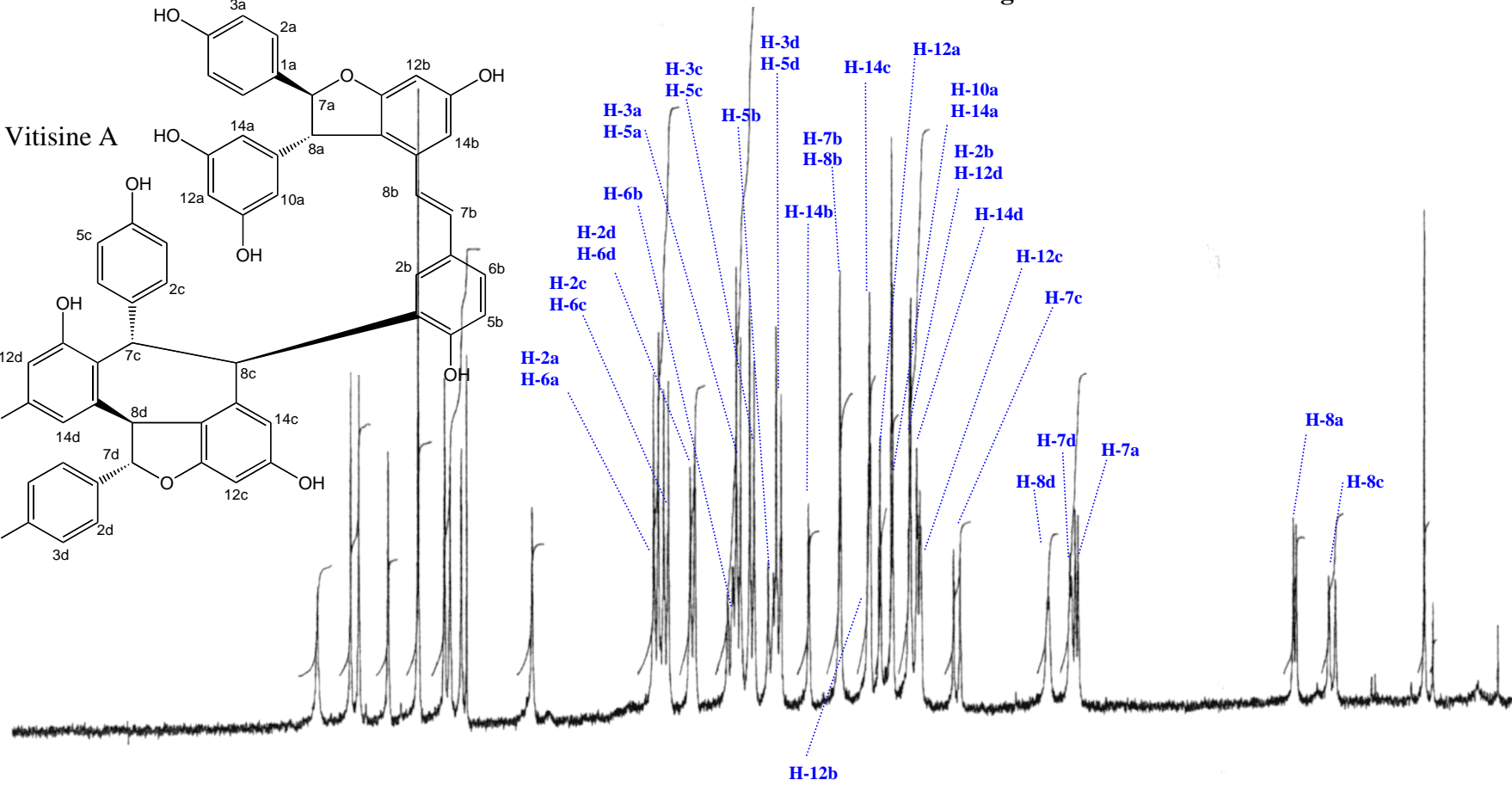
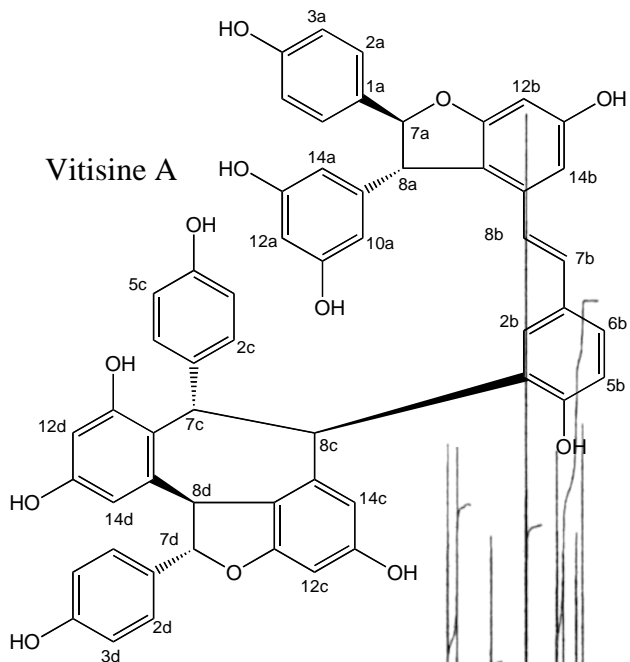
Trans-ε-viniférine



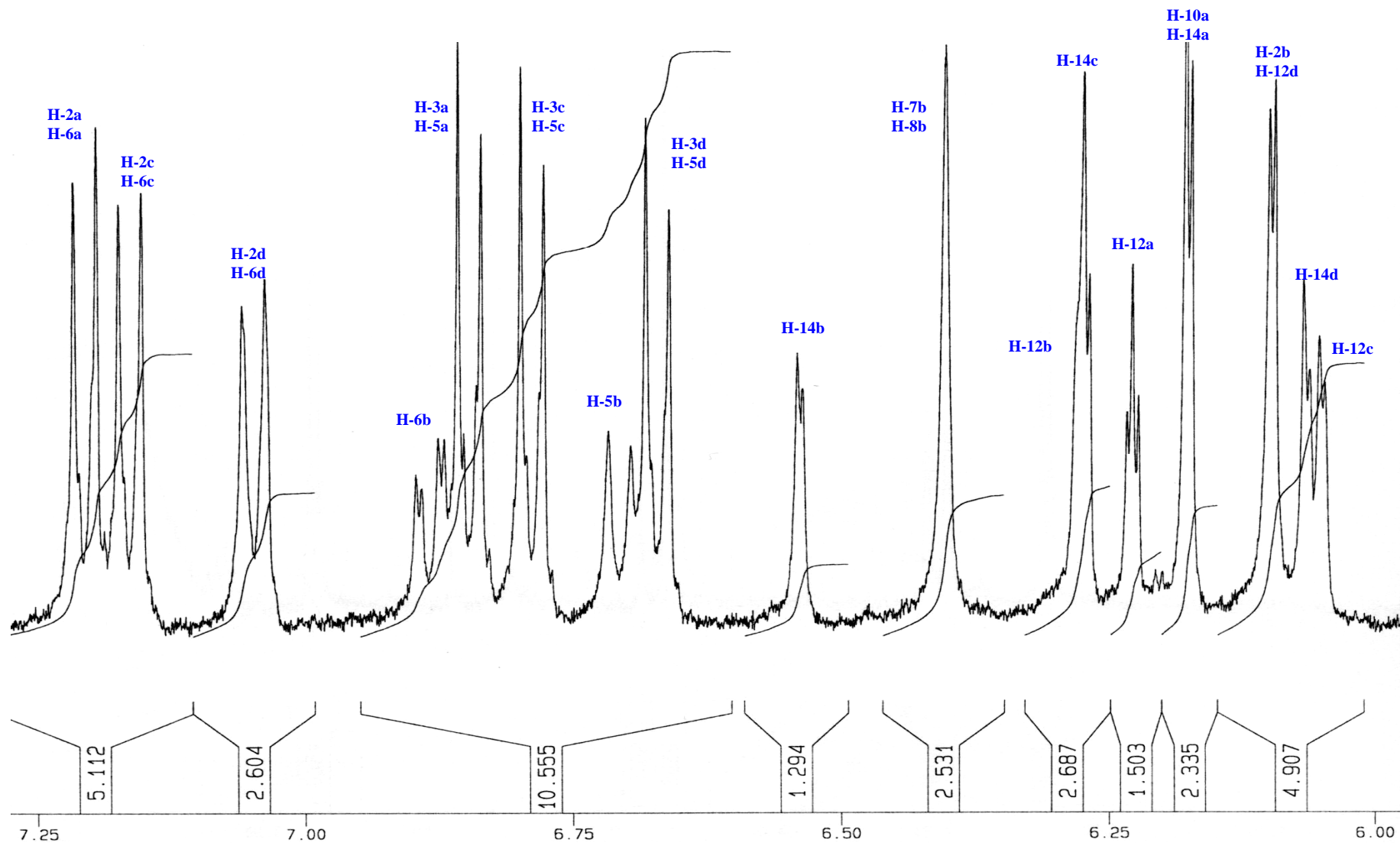
Ampélopsine A



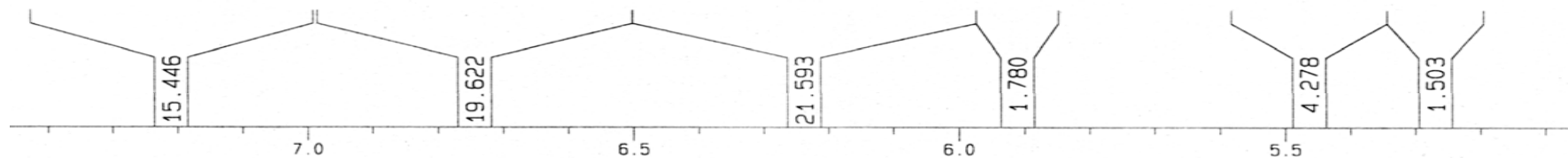
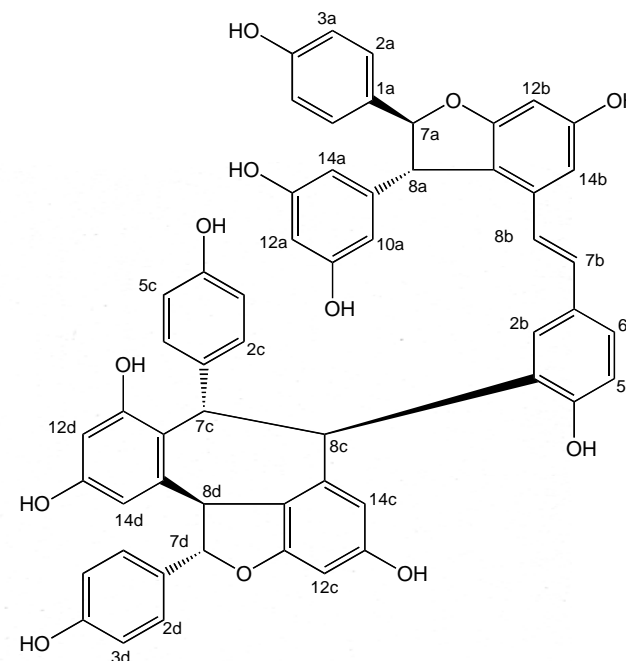
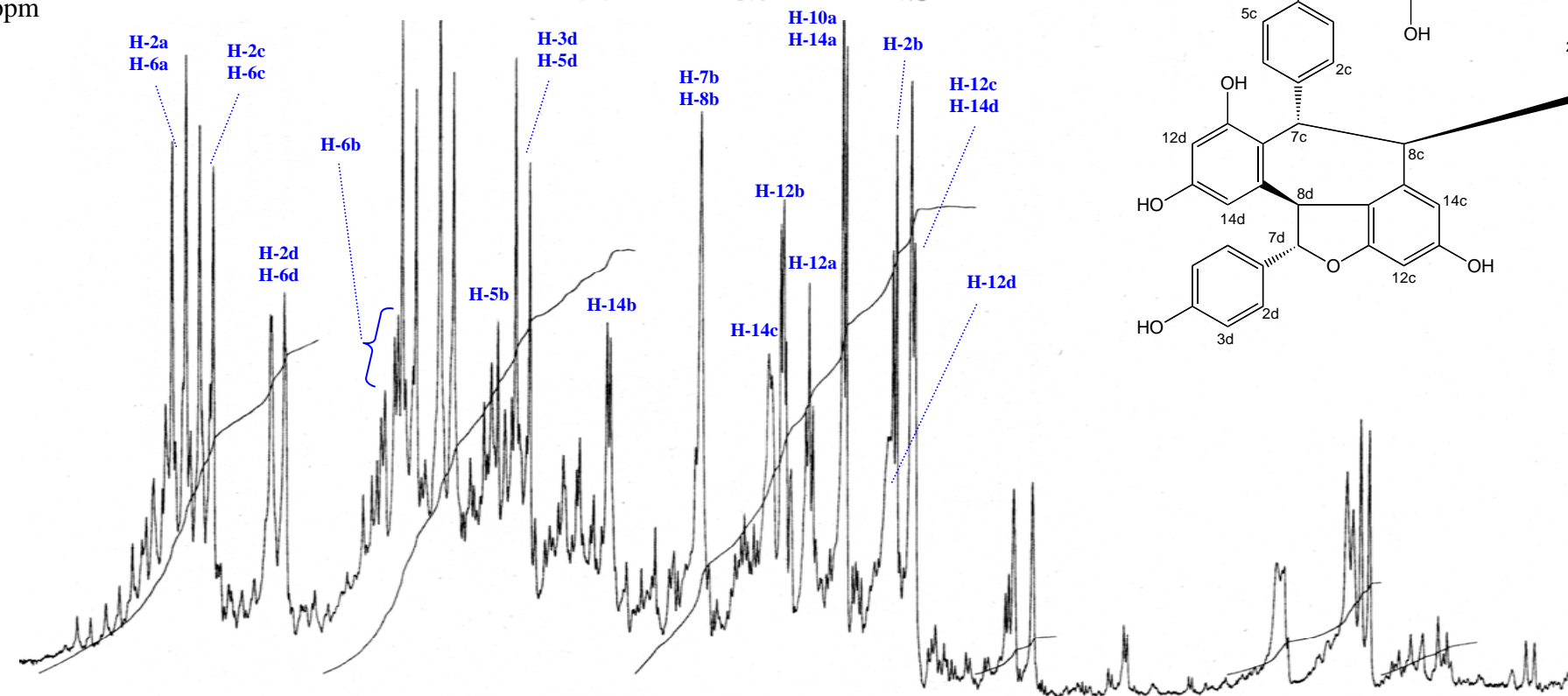
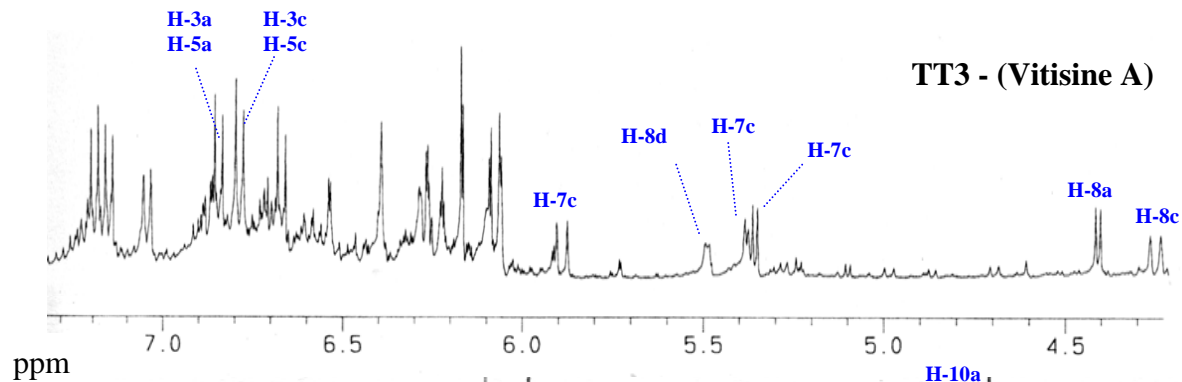
TT1 – analogue de la vitisine A



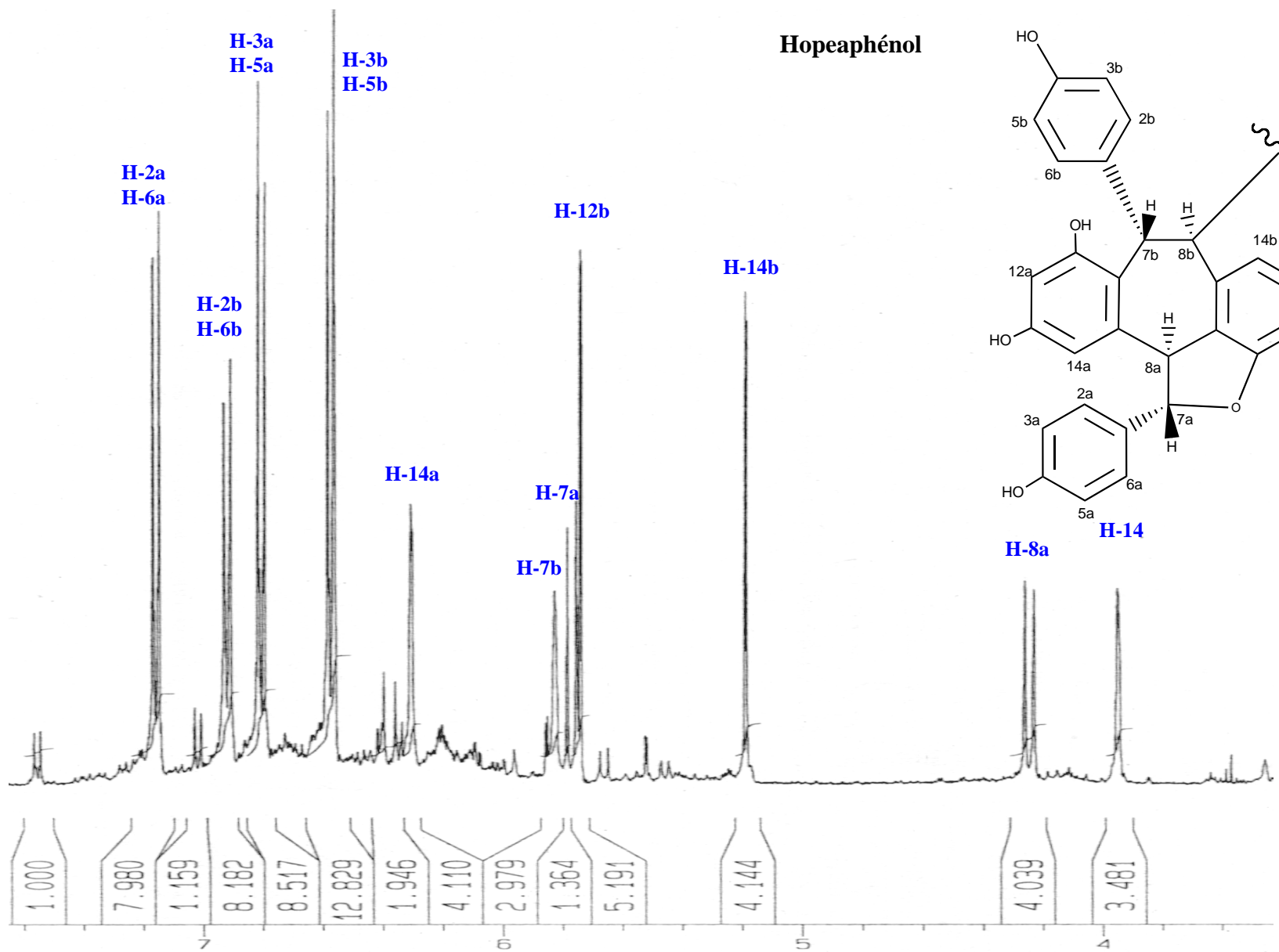
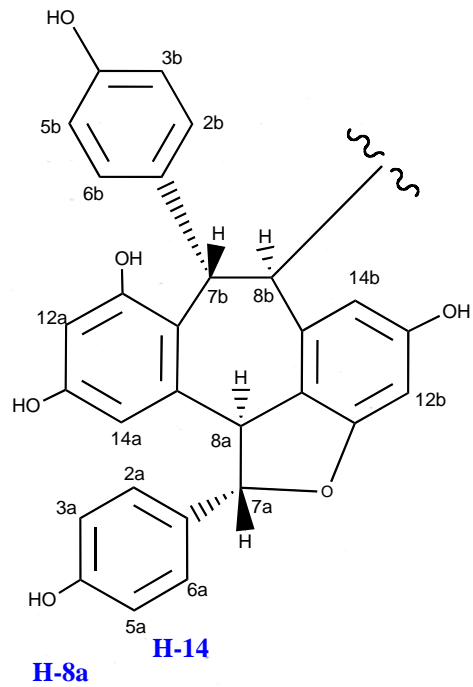
Agrandissement de la région aromatique
TT1 - (analogue de la vitisine A)



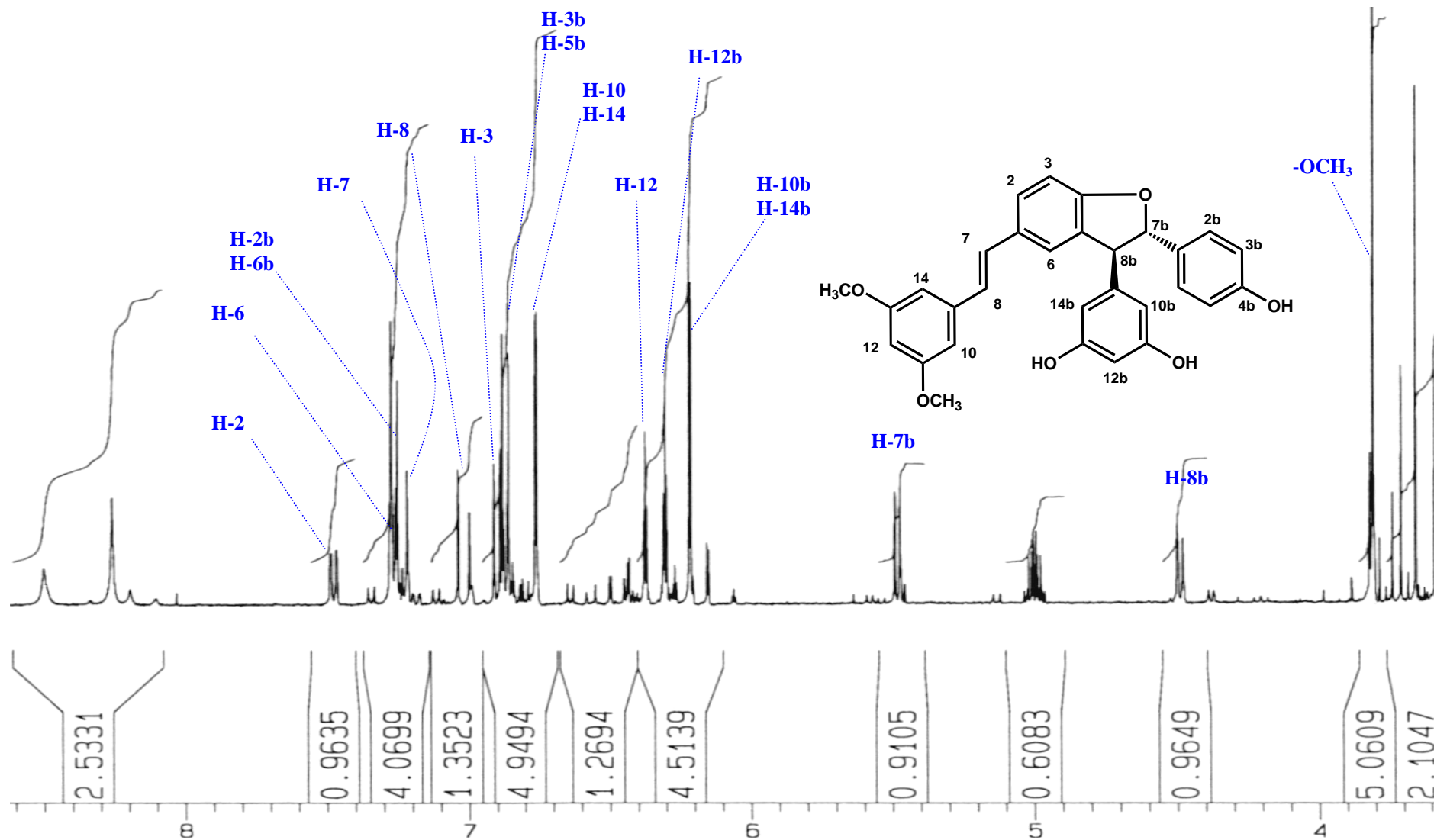
TT3 - (Vitisine A)



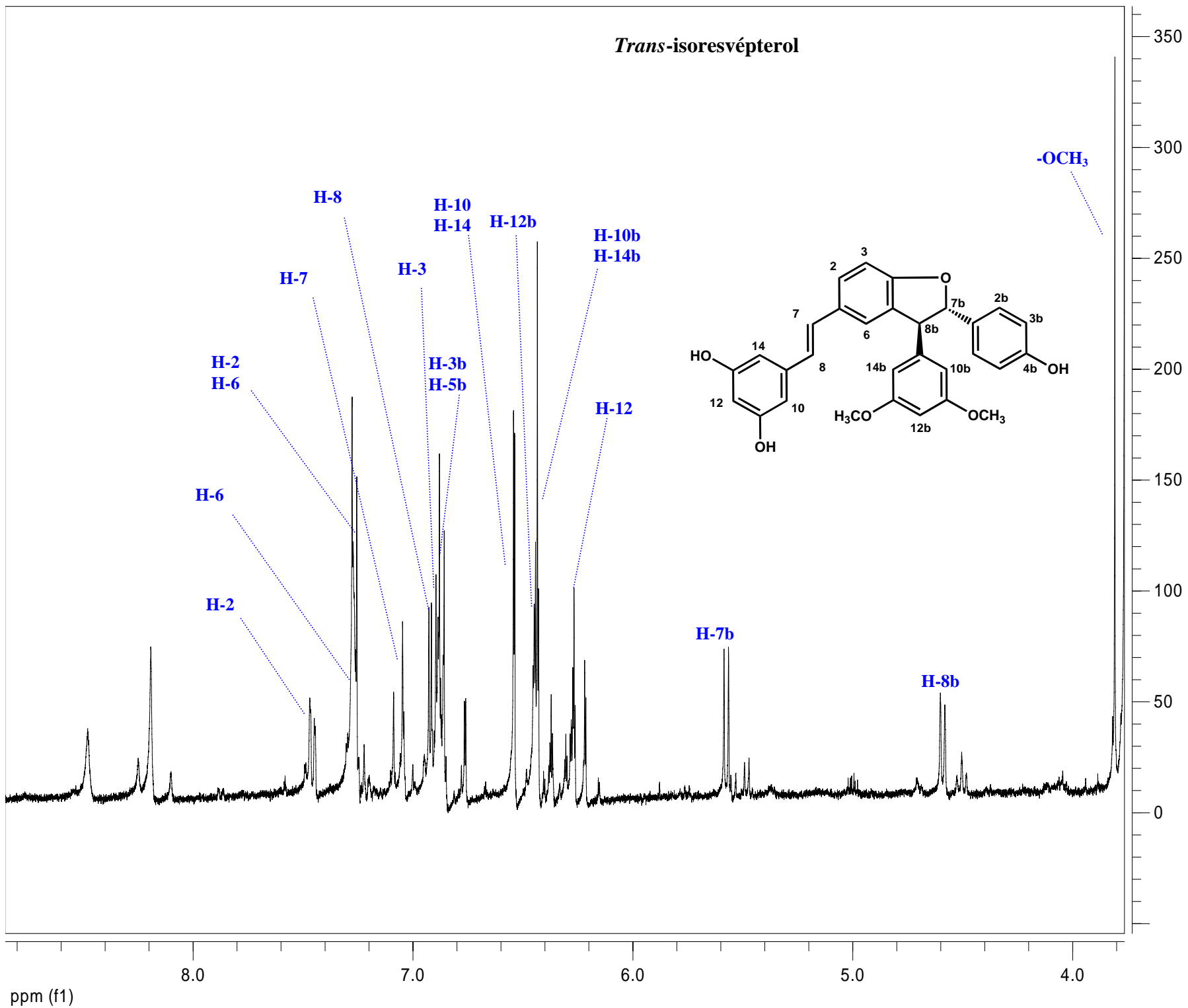
Hopeaphénol



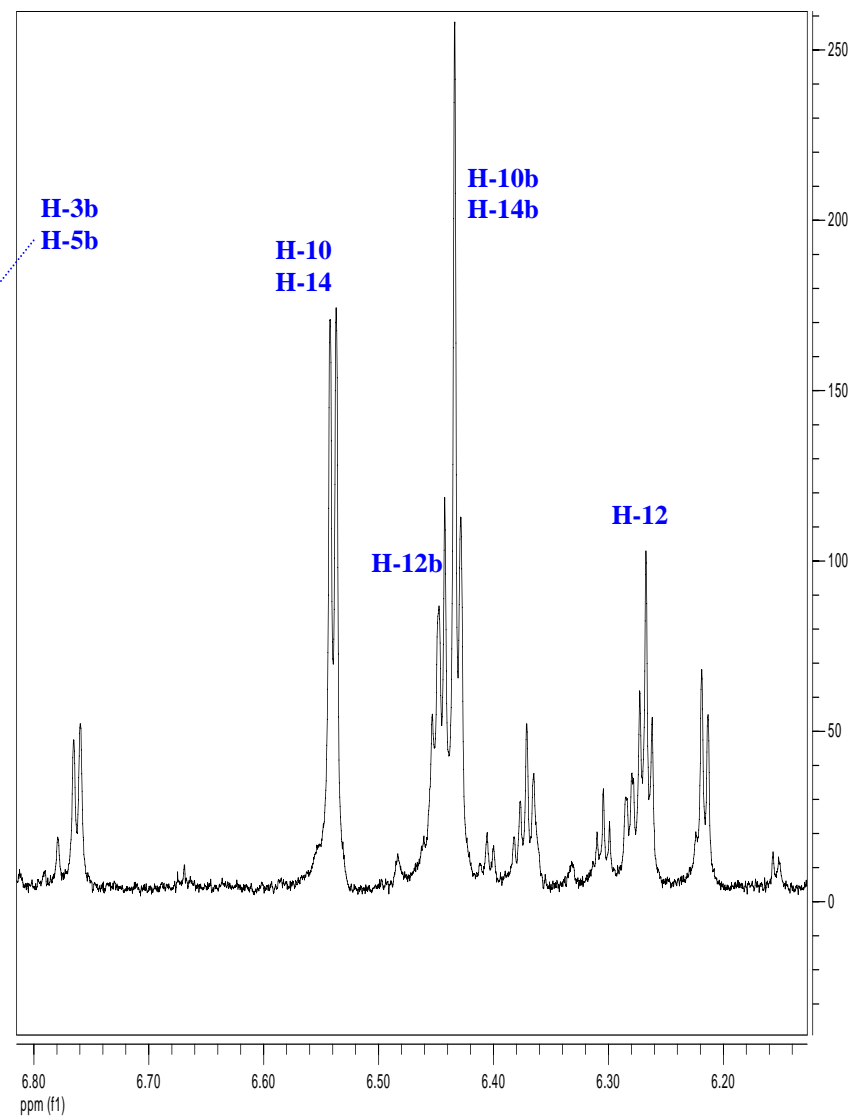
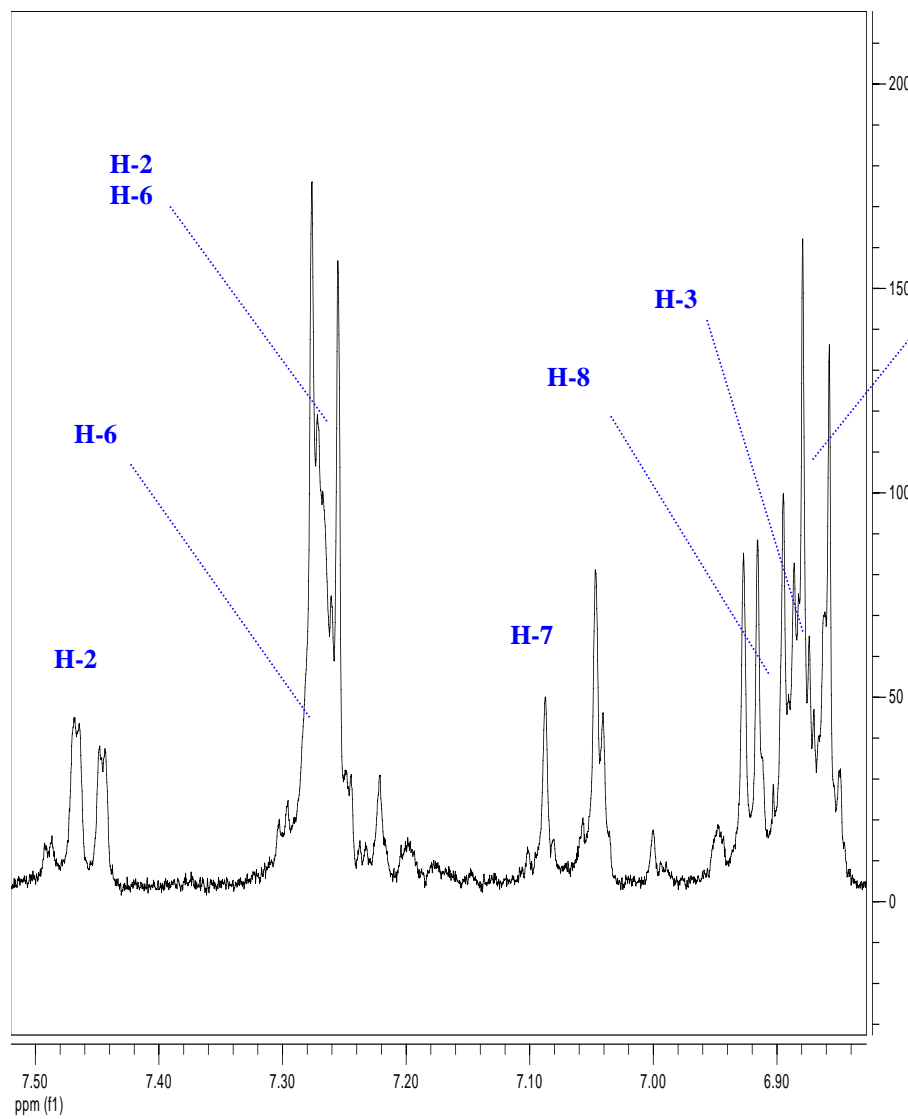
Trans-resvéptérol



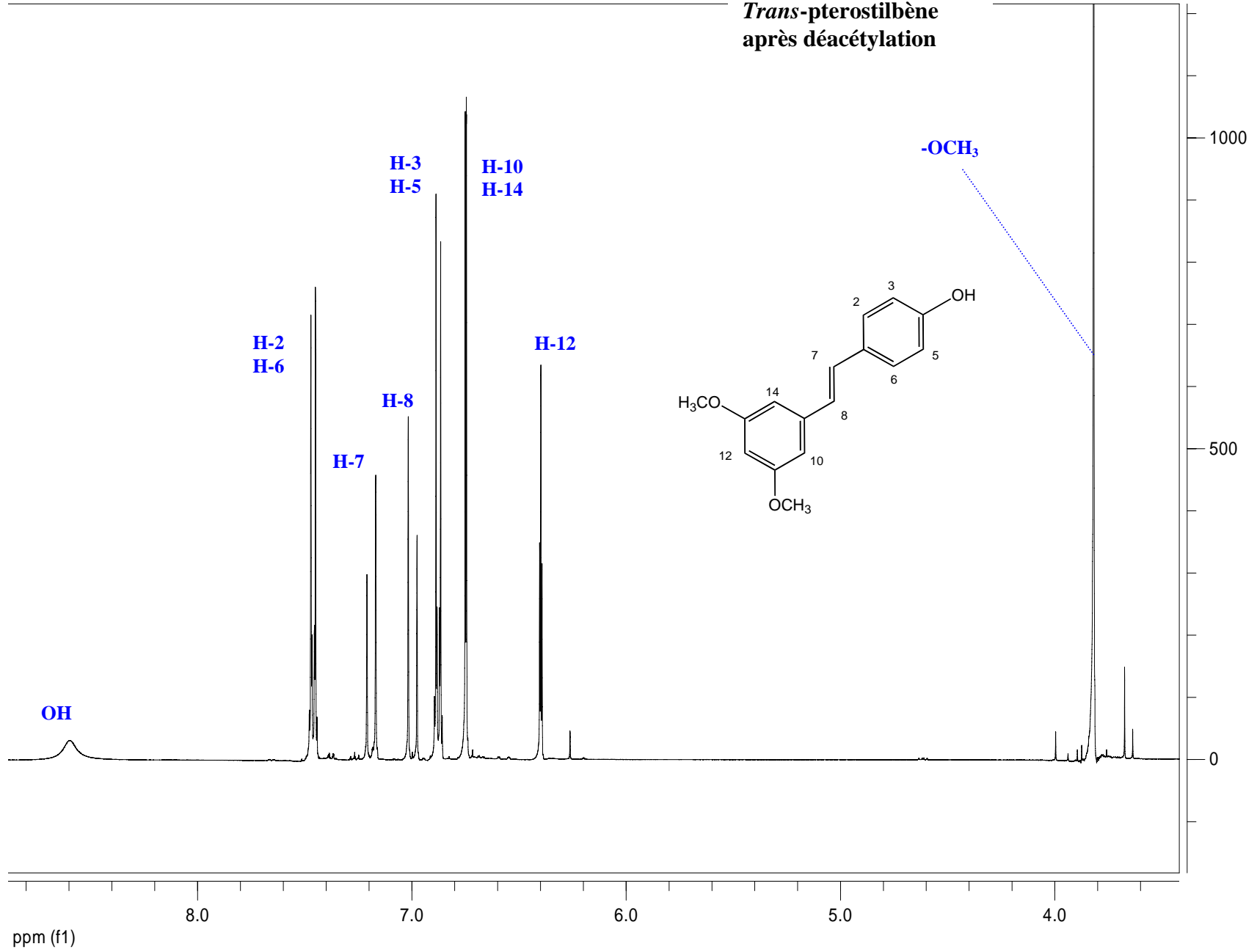
Trans-isoresvépterol

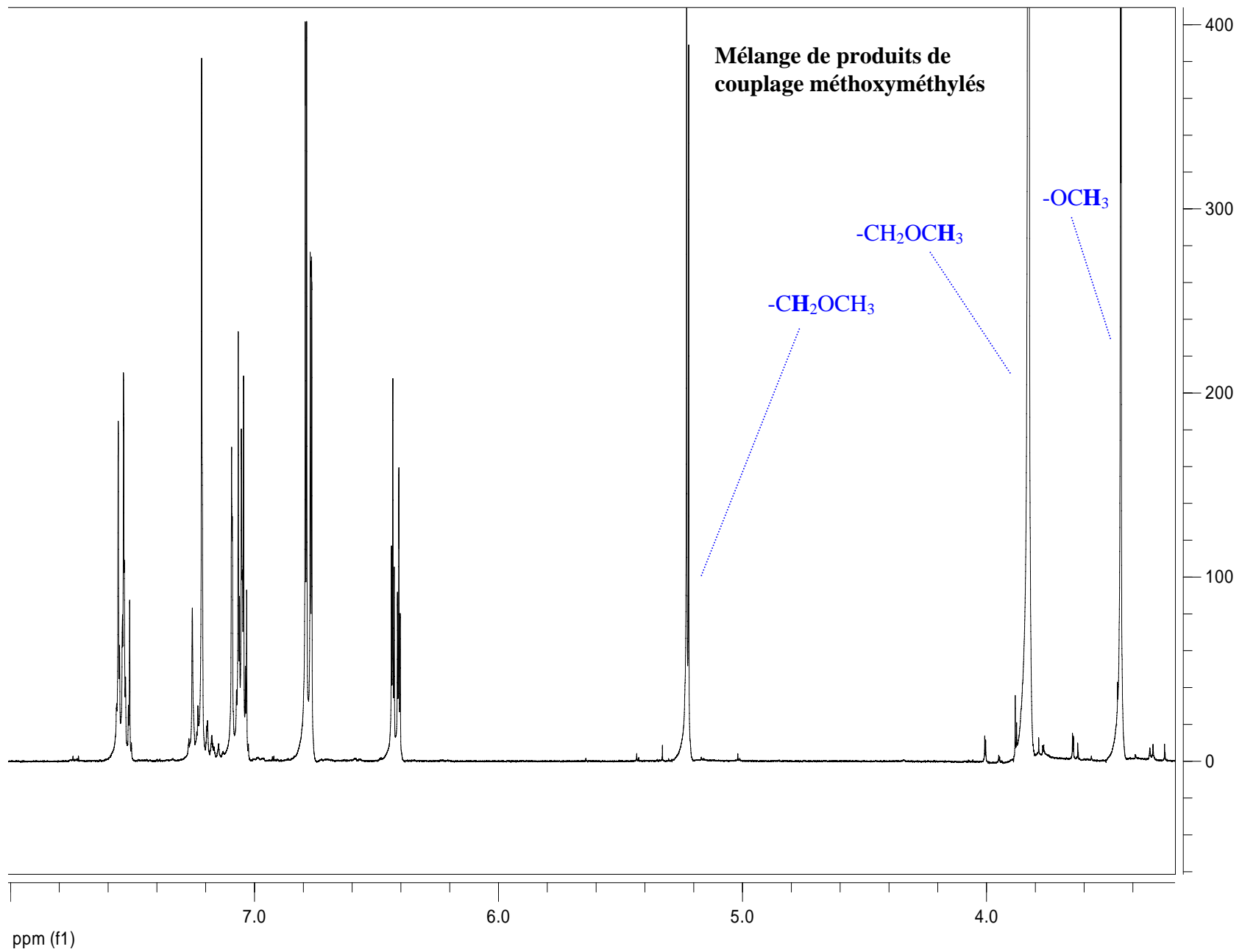


**Agrandissements des zones aromatiques
(*Trans*-isoresvéptérol)**

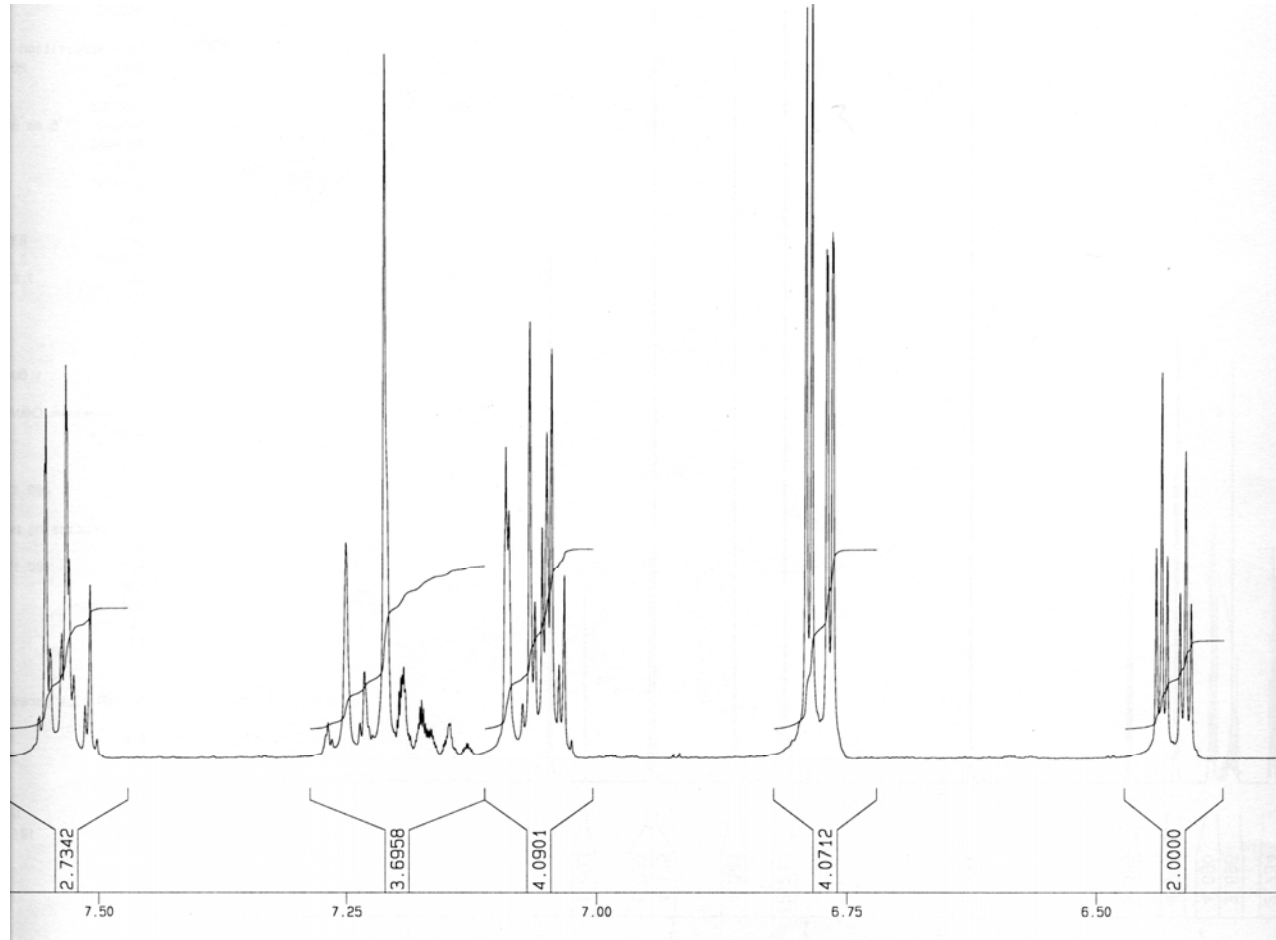


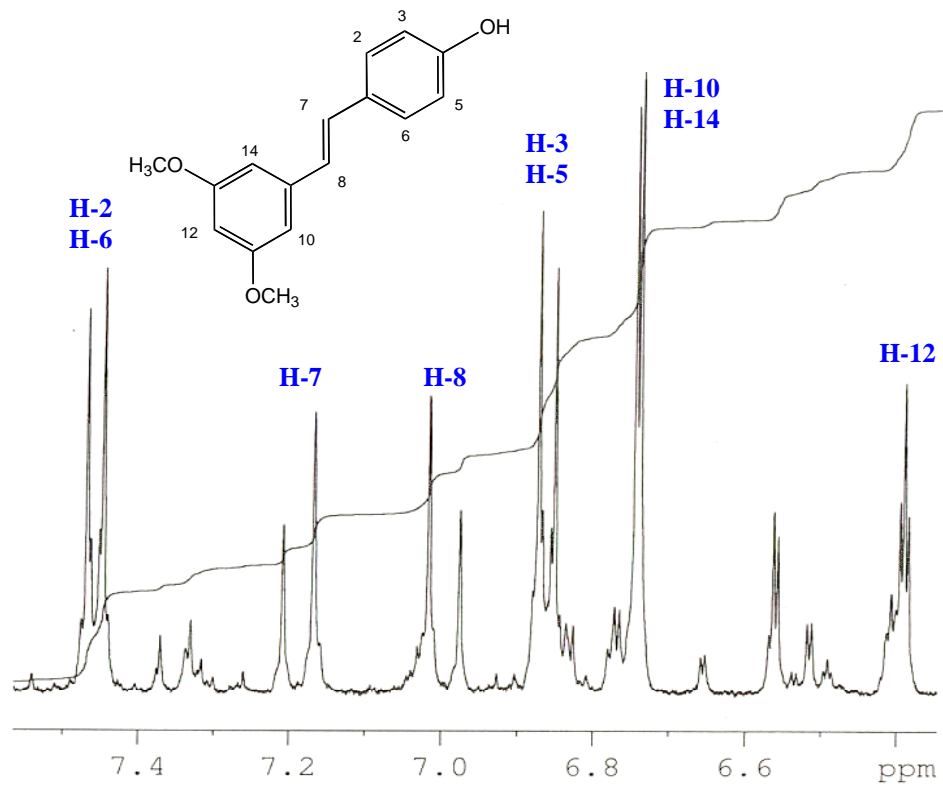
Trans-pterostilbène
après déacétylation





Agrandissement de la zone aromatique (mélange de produits de couplage méthoxyméthylés)





**Trans-pterostilbene après
déméthoxyméthylation**

