

**Les composés phénoliques des entre-nœuds de *Vitis vinifera*
L. var. Ugni blanc au cours du cycle végétatif:
Étude de l'évolution de leur structure**

par

G. DARNÉ

**The phenolic compounds of the internodes of *Vitis vinifera* L. cv. Ugni blanc during
growing season:
Study of the evolution of their structure**

Summary. — The total soluble phenolic compounds extracted from internodes of *Vitis vinifera* L. cv. Ugni blanc were fractionated according to their degree of polymerisation. A comparison of the concentrations at flowering, veraison and leaf fall, during two consecutive growing seasons shows that the tannins containing highly condensed proanthocyanidins are the most important compounds. The extraction technique requires use of a defatting solvent; it is confirmed that chloroform, more practical in use than pentane, does not cause precipitation of the polyphenols.

Introduction

L'évolution globale, au cours de l'année, des teneurs en composés phénoliques totaux et en proanthocyanes dans les rameaux principaux de vigne a été étudiée (DARNÉ, 1975) et l'on sait qu'elle se fait suivant un rythme propre à chaque variété.

A la suite de ces recherches, il était intéressant de préciser comment les diverses molécules phénoliques se répartissaient en fonction de leur degré de polymérisation et s'il existait des variations entre les différents stades du cycle végétatif.

Matériel et méthodes

Les analyses portent sur des lots de 12 entre-nœuds ou mérithalles de rangs 5 et 6, prélevés sur des rameaux principaux de *Vitis vinifera* L. var. Ugni blanc. Les prélèvements ont été effectués pendant deux années consécutives, à trois stades du cycle végétatif: floraison, véraison et chute des feuilles.

L'extraction des composés phénoliques solubles a été effectuée dans le mélange éthanol — eau distillée, en présence de chloroforme utilisé comme solvant de délipidation, sur les poudres obtenues après lyophilisation et broyage des mérithalles. La technique suivie est celle de DARNÉ et MADERO-TAMARGO (1979), légèrement modifiée par l'adjonction d'un anti-oxydant, le métabisulfite de potassium, utilisé à la concentration de 0,5 g/l de solvant (ALIBERT 1975). Les phases hydroalcooliques récupérées après centrifugation ont été concentrées sous vide par évaporation de l'alcool, et les extraits aqueux de «composés phénoliques solubles totaux» (CPST) ont été ajustés à volume connu: 100 ml, correspondant à 1 g de matière sèche.

Une première fraction aliquote (20 ml) de l'extrait CPST a été soumise à un fractionnement sur colonne de polyvinylpyrrolidone (PVPP ou «Polyclar AT») selon la technique décrite pour les vins par GLORIES (1976, 1978) qui permet d'éluier les molé-

les phénoliques selon leur degré de polymérisation croissant. Nous avons utilisé successivement 100 ml du mélange éthanol-eau-HCl en proportions 70 : 30 : 1 en volumes (éluat Ha), 100 ml de méthanol à 1 % de HCl (éluat MeOH), 200 ml d'acide acétique à 50 % (éluat AAc) et enfin 200 ml d'acide formique concentré (éluat AFo). Les molécules de composés phénoliques extrêmement polymérisées restent irréversiblement fixées sur la colonne de PVPP.

Une seconde fraction aliquote de l'extrait CPST, préalablement portée à pH 2, a été épuisée de ses acides phénols libres par traitement à l'éther éthylique, puis divisée en deux volumes égaux pour extraire, à l'aide d'éther éthylique, d'une part les acides phénols combinés libérés par saponification en milieu NaOH 2N, et d'autre part les flavonols libérés par hydrolyse acide en milieu HCl 2N.

Tous les extraits obtenus ont été concentrés sous vide et ramenés à la même dilution (100 ml/g m.s.).

Tableau 1

Evolution de la concentration et de la structure des composés phénoliques dans les mérithalles 5 et 6 d'Ugni blanc au cours de deux cycles végétatifs. (Les résultats sont exprimés par l'indice de Folin-Ciocalteu correspondant à $10 \times$ la densité optique mesurée à la longueur d'onde de 725 nm. Les chiffres entre parenthèses indiquent les valeurs en pour cent)

Evolution of concentration and structure of phenolic compounds in internodes 5 and 6 of Ugni blanc during two growing seasons. (The results are expressed using the Folin-Ciocalteu index which corresponds to $10 \times$ the optical density at a wavelength of 725 nm. The figures in parentheses show the percentage values)

	1er cycle végétatif			2ème cycle végétatif			
	Floraison	Véraison	Chute des feuilles	Floraison	Véraison	Chute des feuilles	
Composés phénoliques solubles totaux ¹⁾	3,71	4,18	3,94	2,78	5,15	3,78	
Fractionnement des composés phénoliques solubles totaux	Ha + MeOH	0,24 (6,5)	0,21 (5,0)	0,15 (3,8)	0,21 (7,5)	0,15 (2,9)	0,18 (4,8)
	AAc	0,33 (8,9)	0,45 (10,8)	0,32 (8,1)	0,32 (11,5)	0,42 (8,2)	0,35 (9,3)
	AFo	1,01 (27,2)	0,76 (18,2)	1,04 (26,4)	0,60 (21,6)	1,52 (29,5)	0,95 (25,1)
	Résidu	2,13 (57,4)	2,76 (66,0)	2,43 (61,7)	1,65 (59,4)	3,06 (59,4)	2,30 (60,8)
	PVPP						
Composés phénoliques résiduels ²⁾	0,55	0,68	0,33	0,60	0,47	0,46	
Acides phénols	Libres	0,23	0,18	0,27	0,17	0,43	0,43
	Combinés	0,63	0,70	0,77	0,15	0,53	0,27
Flavonols	1,69	1,36	0,86	0,28	0,56	0,36	

¹⁾ Composés phénoliques extraits du matériel végétal par la méthode décrite.

²⁾ Composés phénoliques retenus par le matériel végétal après extraction hydroalcoolique à 25 °C.

Tableau 2

Evolution de la concentration et de la structure des tanins à base de proanthocyanidines dans les mérithalles 5 et 6 d'Ugni blanc au cours de deux cycles végétatifs · (Les teneurs en tanins sont exprimées en mg/g de matière végétale sèche · Les chiffres entre parenthèses indiquent les valeurs en pour cent)

Evolution of concentration and structure of tannins containing proanthocyanidins in internodes 5 and 6 of Ugni blanc during two growing seasons · (The concentrations of tannins are expressed in mg/g of dry plant material · The figures in parentheses show the percentage values)

		1er cycle végétatif			2ème cycle végétatif		
		Floraison	Véraison	Chute des feuilles	Floraison	Véraison	Chute des feuilles
Composés phénoliques solubles totaux ¹⁾		24,00	28,25	26,75	17,20	34,50	23,70
Fractionnement des composés phénoliques solubles totaux	Ha + MeOH	0	0	0	0	0	0
	AAc	0	0	0	0	0	0
	AFo	3,50 (14,6)	4,00 (14,2)	4,00 (14,9)	3,25 (18,9)	11,00 (31,9)	4,50 (19,0)
	Résidu	20,50	24,25	22,75	13,95	23,50	19,20
	PVPP	(85,4)	(85,8)	(85,1)	(81,1)	(68,1)	(81,0)
Composés phénoliques résiduels ²⁾		3,50	4,50	4,50	7,70	5,50	6,50

¹⁾ Composés phénoliques extraits du matériel végétal par la méthode décrite.

²⁾ Composés phénoliques retenus par le matériel végétal après extraction hydroalcoolique à 25 °C.

Les poudres épuisées de leurs composés phénoliques solubles ont été soumises à une hydrolyse par chauffage d'une heure, au bain-marie à 100 °C, dans 100 ml d'un mélange éthanol-eau-HCl en proportions 50 : 50 : 1 en volumes, contenant 0,5 ‰ de métabisulfite de potassium. Les extraits de «composés phénoliques résiduels» libérés par cette hydrolyse acide ont été concentrés sous vide puis ramenés à 100 ml avant d'être dosés.

Les teneurs en composés phénoliques et en tanins dans chacun des extraits obtenus ont été estimées respectivement par le réactif de FOLIN-CIICALTEU et par la transformation des proanthocyanidines par chauffage en milieu acide («réaction de BATE-SMITH») selon les méthodes décrites pour les vins par RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET (1966).

Résultats

A — Structures des composés phénoliques extraits des mérithalles

Les composés phénoliques solubles totaux (CPST) extraits des mérithalles 5–6 du rameau principal d'Ugni blanc sont constitués par tout un groupe de molécules possédant des structures et des propriétés différentes (Tableau 1):

— Les petites molécules phénoliques désorbées de la PVPP par les mélanges Ha et MeOH, et celles qui, fixées un petit peu plus fortement sur la résine sont désorbées par l'acide acétique (AAc), ne sont pas de nature proanthocyanidique, la réaction de BATE-SMITH étant négative (Tableau 2). Elles correspondent certainement à d'autres types de molécules phénoliques dont la nature reste à préciser (acides phénols, flavonols, ...). Le pourcentage représenté par ces molécules «non-flavanes» paraît relativement faible puisqu'il ne constitue que 20 % à peine de l'extrait phénolique total (Tableau 1).

— Par contre, les 80 % restants, qui regroupent les molécules désorbées par l'acide formique et celles qui, irréversiblement fixées à la PVPP, correspondent à des molécules très condensées, sont des proanthocyanidines ou des groupes moléculaires à base de proanthocyanidines, la réaction de BATE-SMITH étant positive.

Il en résulte que la majeure partie de l'extrait CPST est constituée de tanins condensés.

En outre, puisque les mérithalles d'Ugni blanc ne possèdent pas de molécules élémentaires ou peu polymérisées de flavanes au cours des stades étudiés, il paraît probable que la synthèse de ces composés ne doit pas intervenir dans le rameau.

Remarque. — Le protocole utilisé ne permet pas d'extraire la totalité du pool phénolique. Il reste donc une fraction «résiduelle» qui renferme une faible quantité de molécules de flavanes retenues par la poudre végétale et ne pouvant être libérées qu'en utilisant des conditions particulières (chauffage, acidité) qui risquent d'entraîner des modifications des structures moléculaires.

B — Comparaison entre les deux cycles végétatifs

Entre la floraison et la véraison, on observe une augmentation de la teneur en CPST et en proanthocyanidines, ce qui avait déjà été décrit (DARNÉ 1975 et 1977). Les résultats obtenus ici permettent de préciser que cette augmentation est due à une accumulation des tanins irréversiblement fixés à la PVPP, c'est à dire des tanins très condensés. Le phénomène inverse est observé entre la véraison et la chute des feuilles, mais dans des proportions beaucoup plus faibles, les valeurs notées à la chute des feuilles étant supérieures à celles de la floraison.

Le pourcentage représenté par les molécules «non flavanes» varient peu entre les stades étudiés; leur rôle semble être moins important que celui des tanins.

Par contre, l'évolution des teneurs en proanthocyanidines entre les différents stades correspond à l'évolution globale des CPST: il paraît se produire une accumulation

Tableau 3

Teneurs en composés phénoliques extraits des mérithalles 5 et 6 d'Ugni blanc en utilisant le pentane comme solvant de délipidation. (Les résultats sont exprimés par l'indice de Folin-Ciocalteu)

Concentrations of phenolic compounds extracted from internodes 5 and 6 of Ugni blanc using pentane as a defatting solvent. (The results are expressed using the Folin-Ciocalteu index)

	2ème cycle végétatif		
	Floraison	Véraison	Chute des feuilles
Composés phénoliques solubles totaux	2,48	4,78	3,54
Acides phénols libres	0,16	0,42	0,43
Acides phénols combinés	0,12	0,31	0,24
Flavonols	0,28	0,53	0,36
Composés phénoliques résiduels	0,62	0,76	0,48

de proanthocyanidines condensées entre la floraison et la véraison, donc pendant la période de croissance du rameau, puis une utilisation entre la véraison et la chute des feuilles, ce qui pourrait être en relation avec les processus de lignification qui interviennent au cours de l'aouïtement.

La comparaison des résultats obtenus pour les CPST et pour les proanthocyanidines à la véraison, lors du 2ème cycle végétatif, conduit à l'hypothèse selon laquelle les phénomènes d'accumulation et de condensation qui se produisent de la floraison à la véraison intéressent d'autres composés phénoliques que les proanthocyanidines. Les différences notées au stade véraison entre les deux cycles végétatifs confirment bien qu'il n'existe pas de relation entre cette étape particulière du développement du raisin et les phénomènes métaboliques qui concernent les composés phénoliques au niveau du rameau principal (DARNÉ 1975 et 1977).

Discussion

A — Influence du solvant de délipidation

Etant donné que le chloroforme, dans certains cas au moins (GLORIES 1978) est susceptible de précipiter les polyphénols les plus polymérisés, nous avons vérifié si ce solvant — que nous utilisons pour délipider le matériel végétal — avait une influence sur les teneurs en composés phénoliques solubilisés.

Une série d'analyses supplémentaire a donc été réalisée sur des extraits obtenus à partir des mérithalles prélevés au cours du 2ème cycle végétatif, en remplaçant, dans le protocole utilisé, le chloroforme par du pentane.

Les chiffres présentés dans les Tableaux 3 et 4 montrent que les différences entre les deux méthodes d'extraction sont faibles, mais toujours en faveur de celle qui utilise le chloroforme comme solvant de délipidation. Les CPST, les tanins et les acides phénols combinés semblent être moins bien récupérés lorsqu'on utilise le pentane; par contre, les teneurs en acides phénols libres et en flavonols sont parfaitement identiques quel que soit le solvant des lipides utilisé. En outre, les teneurs en composés phénoliques résiduels retenus par la poudre végétale restent légèrement plus élevées lorsque les extractions hydroalcooliques préalables ont été effectuées en présence de pentane.

Ces résultats semblent dus au fait que le pentane, plus léger et plus volatil que l'eau, s'est toujours révélé moins facile à récupérer, la séparation des phases hydroal-

Tableau 4

Teneurs en tanins à base de proanthocyanidines extraits des mérithalles 5 et 6 d'Ugni blanc en utilisant le pentane comme solvant de délipidation. (Les teneurs en tanins sont exprimées en mg/g de matière végétale sèche)

Concentrations of tannins containing proanthocyanidins extracted from internodes 5 and 6 of Ugni blanc using pentane as a defatting solvent. (The concentrations of tannins are expressed in mg/g of dry plant material)

	2ème cycle végétatif		
	Floraison	Véraison	Chute des feuilles
Composés phénoliques solubles totaux	13,2	33,0	22,5
Composés phénoliques résiduels	9,5	9,5	7,5

cooliques et lipidiques obtenues par l'intermédiaire d'une centrifugation n'étant pas aussi bonne qu'avec le chloroforme. En effet, alors qu'une fraction de la poudre forme normalement un culot au fond du tube à centrifugation, une autre fraction reste en suspension entre le pentane et le mélange hydroalcoolique, ce qui nuit à la récupération complète de chaque phase.

Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer le fait que le chloroforme n'entraîne pas de précipitations de polyphénols condensés dans les conditions où nous l'utilisons pour effectuer la délipidation des poudres végétales:

a) Les proportions volumiques de chloroforme utilisé sont plus faibles que celles qu'il faut employer pour entraîner la précipitation des tanins les plus condensés d'une solution alcoolique de composés phénoliques (1 volume de CHCl_3 /1 volume de solvant alcoolique au lieu de 2 volumes de CHCl_3 /1 volume de solvant alcoolique).

b) La précipitation des polyphénols par le chloroforme est plus difficile à obtenir à partir d'un mélange eau — éthanol qu'à partir d'une solution de méthanol pur.

c) La précipitation des polyphénols par le chloroforme nécessite plusieurs heures. Or, dans nos conditions opératoires, la durée de contact entre les différents solvants du mélange reste trop brève (1,5 min) pour que cette précipitation puisse se produire.

B — Lieu de synthèse et rôle des composés étudiés

Bien que la synthèse des molécules élémentaires ou peu polymérisées de flavanes ne paraisse pas s'effectuer au niveau des méristhales d'Ugni blanc, ce sont des tanins à base de proanthocyanidines très polymérisées qui constituent l'essentiel du contenu phénolique de ces organes.

Les flavanes sont donc vraisemblablement élaborées au niveau des feuilles, et le rameau principal semble n'être qu'un site d'accumulation de tanins condensés. Leurs variations quantitatives paraissent en relation avec les processus de lignification qui interviennent au cours de l'aoûtment, et montrent qu'il existe une certaine indépendance entre le métabolisme phénolique du rameau et le développement du raisin pendant cette période.

L'évolution des acides phénols et des flavonols et d'une façon plus générale des molécules «non flavanes» qui représentent un pourcentage relativement faible des extraits ne peut être interprétée; ce sont probablement des métabolites intermédiaires dont la nature et le rôle restent à préciser.

Résumé

Les composés phénoliques solubles totaux extraits des entre-noeuds de *Vitis vinifera* L. var. Ugni blanc ont été fractionnés selon leur degré de polymérisation. La comparaison des teneurs aux stades floraison, véraison et chute des feuilles au cours de deux cycles végétatifs consécutifs montre que ce sont les tanins à base de proanthocyanidines extrêmement condensées qui sont les composés les plus importants. La technique d'extraction nécessitant l'utilisation d'un solvant de délipidation, il est vérifié que le chloroforme, d'emploi plus pratique que le pentane, n'entraîne pas de précipitation de polyphénols.

Remerciements

L'auteur remercie vivement Mlle M. AUGUSTIN et M. Y. GLORIES, de l'Institut d'Oenologie de Bordeaux, pour l'aide apportée au cours de ce travail.

Références bibliographiques

- ALIBERT, G., 1975: Les acides phénoliques et leur métabolisme chez *Quercus pedunculata* EHRH. Thèse Doctorat d'État, Toulouse.
- DARNÉ, G., 1975: Recherches sur l'évolution des composés phénoliques totaux et des leucoanthocyanes des sarments de Vigne au cours du cycle végétatif et des boutures au cours de la rhizogénèse. Thèse 3ème Cycle, Bordeaux.
- —, 1977: Caractérisation et interprétation des différentes phases de l'évolution des composés phénoliques totaux et des leucoanthocyanes des rameaux principaux de *Vitis vinifera* L. C. R. Acad. Sci. Paris **284, D**, 441—444.
- — et MADERO-TAMARGO, J., 1979: Mise au point d'une méthode d'extraction des lipides solubles totaux, des glucides solubles totaux et des composés phénoliques solubles totaux des organes de la vigne. *Vitis* **18**, 221—228.
- GLORIES, Y., 1976: Recherches sur la structure et les propriétés des composés phénoliques polymérisés des vins rouges: III — Fractionnement des composés phénoliques avec la polyvinylpyrrolidone (p.v.p.). *Connaiss. Vigne Vin* **10**, 51—71.
- —, 1978: Recherches sur la matière colorante des vins rouges. Thèse Doctorat d'État, Bordeaux.
- RIBÉREAU-GAYON, P., et STONESTREET, E., 1966: Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chim. Analyt.* **48**, 188—196.

Eingegangen am 14. 7. 1981

G. DARNÉ
Laboratoire de Physiologie Végétale
et Ampélogie
Université de Bordeaux I
Avenue des Facultés
33405 Talence cedex
France