

# Introduction

*Pour une chimiste de vocation, épicurienne convaincue et amoureuse des pays du Sud, peut-on imaginer plus belle science que celle des polyphénols ?*

De structures monomériques simples comme l'acide gallique ou plus complexes comme les flavonoïdes, les polyphénols n'ont pas fini d'émerveiller *le chimiste* de par leur aptitude à (co)-polymériser, menant à une multitude de molécules aux couleurs enivrantes, aux arômes et saveurs inégalées, voire même aux propriétés « troublantes ».

Le nutritionniste ne peut aussi qu'être émerveillé par cette classe de molécules, tant les allégations santé qu'on leur attribue sont aujourd'hui nombreuses. La biodisponibilité de nombreux polyphénols reste toutefois posée et les propriétés *in vivo* des métabolites doivent être déterminées.

Que dire du biochimiste, pour lequel tant de questions restent ouvertes concernant les voies métaboliques, en particulier celles qui mènent aux oligomères et tannins, ou de l'agronome qui dispose de nombreuses possibilités pour influencer la production naturelle de la plante, la culture biologique ressortant notamment comme une alternative menant à un enrichissement en polyphénols.

Le coopérant pourra également être confronté au monde des polyphénols lorsqu'il recherchera des matières premières susceptibles d'être valorisées dans les pays du Sud.

Les bioingénieurs alimentaires sont aussi confrontés à ce monde passionnant, la composition polyphénolique des aliments étant étroitement liée aux procédés technologiques. Ainsi, l'étude des polyphénols dans un chocolat, un vin, une bière, un cidre ou un jus de fruits est bien plus complexe que celle menée sur le cacao, le raisin, le malt, le houblon, la pomme ou les fruits tropicaux, car

elle doit aussi intégrer tous les mécanismes de synthèses non enzymatiques qui prennent place lors de la production ou le vieillissement de la denrée alimentaire.

L'allongement de la durée de vie de l'aliment est plus que jamais une priorité du monde industriel. Les polyphénols possèdent des atouts indéniables pour inhiber les réactions radicalaires destructrices dans la denrée. Ils renforcent également la perception... soyeuse dans un grand vin rouge, en générant au cours de son vieillissement des interactions complexes avec d'autres composantes du nectar. Ils peuvent aussi toutefois être source de nouveaux problèmes, en créant par exemple au fil du vieillissement un trouble colloïdal par interaction avec les protéines de la bière.

C'est sous cet angle novateur que nous avons voulu aborder dans cet ouvrage la chimie des polyphénols, tant de fois revisitée. Le réseau de chercheurs GP3A (Génie des Procédés Appliqué à l'Agro-Alimentaire) de l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) s'intéresse depuis une décennie à cette problématique à laquelle il a consacré ses premières journées scientifiques tenues en septembre 2008 à l'Université catholique de Louvain (Louvain-la-Neuve, Belgique). De là est née l'idée de ce livre qui, outre son rôle comme ouvrage de référence pour les étudiants de Master, vise aussi à initier de nouvelles ?? les chercheurs du monde francophone, qu'ils soient des pays du Nord ou d'horizons plus lointains. ??germer de nouvelles idées dans l'esprit des doctorants et chercheurs émerveillés par ??

En espérant que cet ouvrage puisse créer de nombreuses vocations aux saveurs et aux couleurs du Sud ....

*Partie 1*

Structures, analyse et propriétés  
des polyphénols



# *Nomenclature et voies de synthèse des principaux polyphénols*

*Sonia Collin, Christine Counet, Delphine Callemien  
et Vesna Jerkovic*

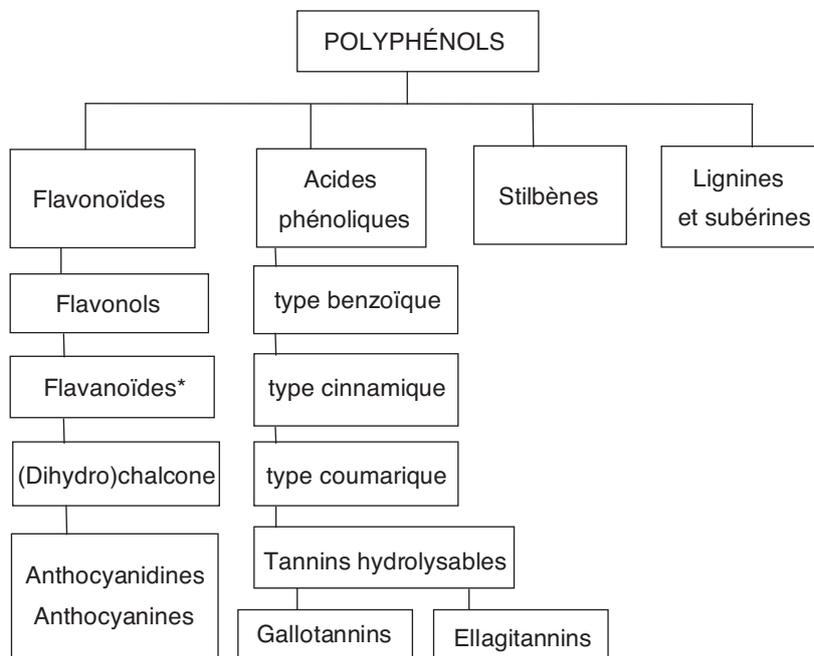
Les polyphénols (8 000 composés connus) représentent un groupe de métabolites secondaires complexes, exclusivement synthétisés dans le règne végétal (figure 1.1). On y retrouve :

- les flavonoïdes (flavanols, flavanoïdes, chalcones et dihydrochalcones, anthocyanidines et tannins condensés) ;
- les acides phénoliques de type benzoïque ou cinnamique et les tannins hydrolysables (gallo- et ellagitannins) ;
- les stilbènes ;
- les lignines et subérines.

## **1. Flavonoïdes**

Les flavonoïdes (figure 1.2) sont formés d'un squelette à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), correspondant à la structure du diphenylpropane (Santos-Buelga et Scalbert, 2000).

Au sein des flavonoïdes, on retrouve les flavanols, les flavones, les flavanoïdes et les tannins condensés, les (prényl)chalcones et les dihydrochalcones ainsi que les anthocyanines/anthocyanidines.



**Figure 1.1.** Différentes familles de polyphénols \*Polymères de flavanoïdes = proanthocyanidines, anthocyanogènes ou procyanidols.

### a) Flavonols

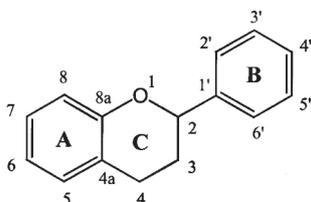
Les flavonols se caractérisent par un hétérocycle oxygéné relativement oxydé (figure 1.3).

Ils existent principalement sous des formes glycosylées (glucose, xylose, arabinose, galactose, rhamnose).

### b) Flavones et flavanoïdes

Les flavones et les flavanoïdes (figure 1.4) possèdent également la structure de base C6-C3-C6.

Au sein des flavan-3-ols (figure 1.5), la structure des catéchines fait apparaître deux carbones asymétriques. La stéréochimie du carbone C2 est généralement R, mais il existe quelques exceptions. On retrouvera ainsi de la (+)-catéchine (2R, 3S) et de la (-)-épicatéchine (2R, 3R).



**Figure 1.2.** Structures de base des flavanoïdes.

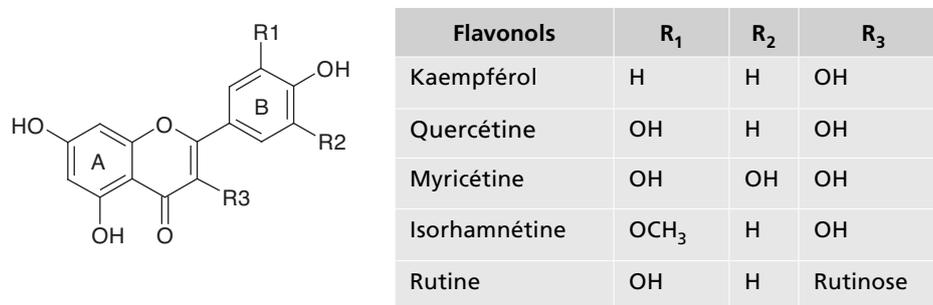


Figure 1.3. Structures chimiques de quelques flavonols.

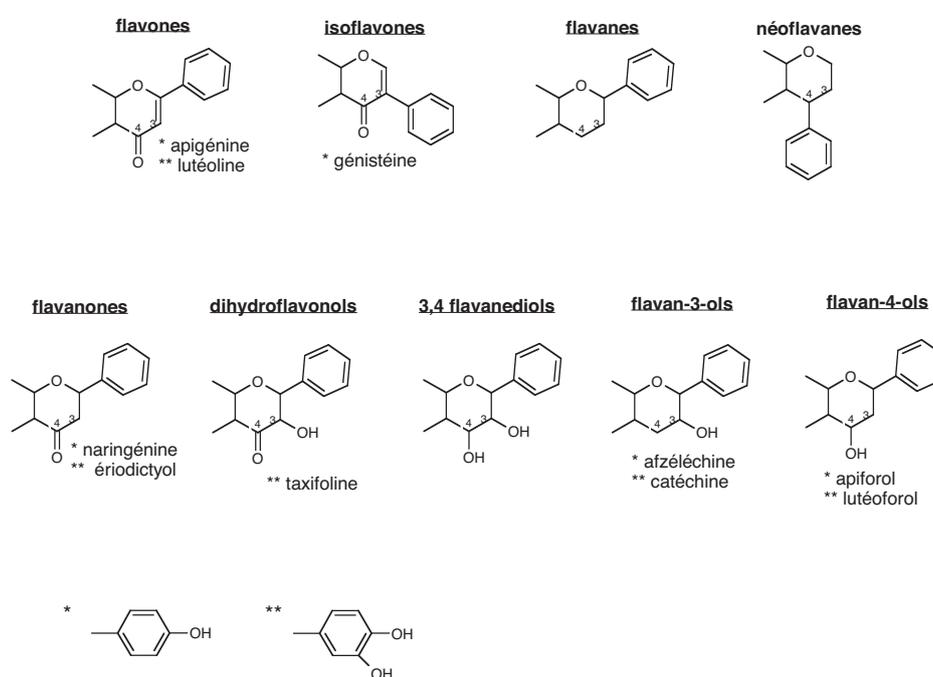
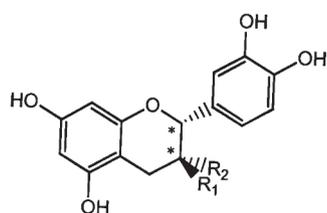


Figure 1.4. Structures chimiques de différents flavones et flavanoïdes.



Flavan-3-ols	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
(+)-catéchine	OH	H
(-)-épicatéchine	H	OH

Figure 1.5. Structures chimiques des catéchines.

Les flavanoïdes se polymérisent au départ de 3,4-flavanediols (ou flavan-4-ols) et de flavan-3-ols (tableau 1.1). L'appellation de flavanoïdes simples sera conservée jusque 7 à 8 unités. Les termes proanthocyanidine, anthocyanogène ou procyanidol (B3, C2,...) seront fréquemment utilisés pour les oligomères de petite taille (respectivement 2, 3,... unités). Pour un plus grand nombre d'unités monomériques, la terminologie tannin sera retenue (Santos-Buelga et Scalbert, 2000).

**Tableau 1.1.** Types et noms de proanthocyanidines pour une configuration 2R, 3S du monomère (Buffnoir, 2000).

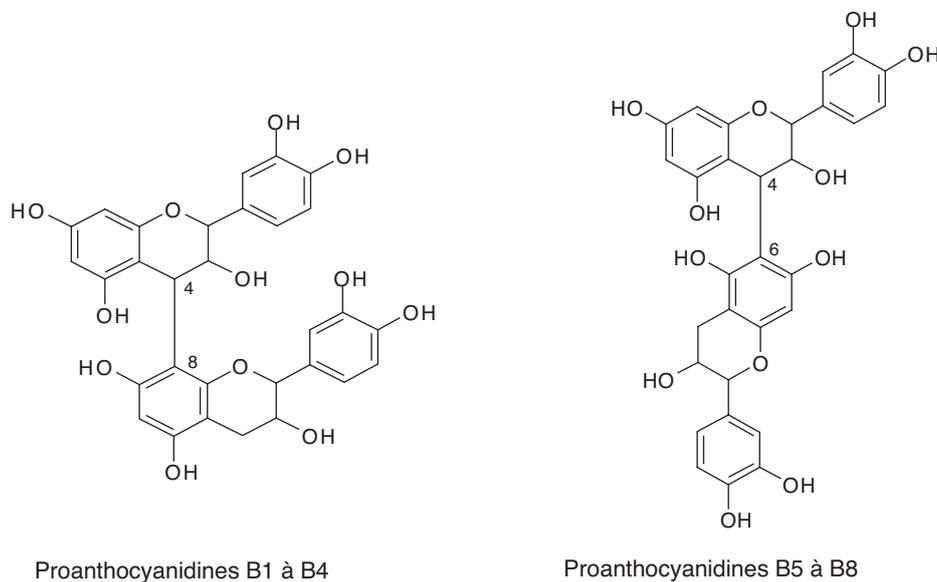
Proanthocyanidines	Classes	Position de substitution						
		Monomère	3	5	7	8	3'	4'
Proapigénidine	Apigénidinflavane	H	OH	OH	H	H	OH	H
Prolutéolinidine	Lutéoliflavane	H	OH	OH	H	OH	OH	H
Protricitinidine	Tricitiflavane	H	OH	OH	H	OH	OH	OH
Propélargonidine	Afzéléchine	OH	OH	OH	H	H	OH	H
Procyanidine	Catéchine	OH	OH	OH	H	OH	OH	H
Prodelphinidine	Gallocatéchine	OH	OH	OH	H	OH	OH	OH
Proguibourtinidine	Guibourtinidol	OH	H	OH	H	H	OH	H
Profisétinidine	Fisétinitol	OH	H	OH	H	OH	OH	H
Prorobinétinidine	Robinétinidol	OH	H	OH	H	OH	OH	OH
Protéracine	Oritine	OH	H	OH	OH	H	OH	H
Promélacine	Prosopine	OH	H	OH	OH	OH	OH	H

Les proanthocyanidines de type B (figure 1.6) se caractérisent par une seule liaison interflavanique reliant les atomes C4-C8 ou C4-C6. Celle-ci est placée du côté opposé par rapport à l'hydroxyle en position C3 du monomère supérieur (lien  $\alpha$  si (+)-catéchine et lien  $\beta$  si (-)-épicatéchine). Les structures chimiques des principaux dimères de type B sont détaillées dans le tableau 1.2 (Perret, 2001; Santos-Buelga et Scalbert, 2000).

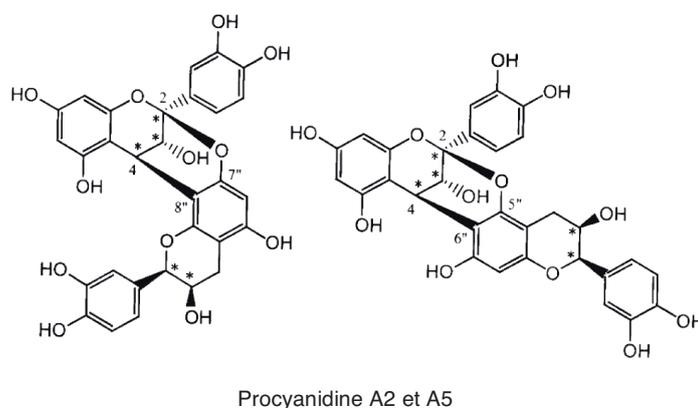
Les proanthocyanidines de type A (figure 1.7) contiennent une liaison éther supplémentaire entre le carbone C2 et les hydroxyles 5 ou 7 du noyau A (Santos-Buelga et Scalbert, 2000 ; Vivas de Gaulejac, 2001).

**Tableau 1.2.** Proanthocyanidines dimériques de type B.

Unités structurales	Liaison en C4-C8	Liaison en C4-C6
(-)-épicatéchine / (+)-catéchine	B1	B7
(-)-épicatéchine / (-)-épicatéchine	B2	B5
(+)-catéchine / (+)-catéchine	B3	B6
(+)-catéchine / (-)-épicatéchine	B4	B8



**Figure 1.6.** Exemples de proanthocyanidines de type B.



**Figure 1.7.** Proanthocyanidines de type A2 et A5.

### c) (Prényl)chalcones et dihydrochalcones

Quelques exemples de prénylchalcones (structures ouvertes de flavonoïdes ne possédant pas d'hétérocycle central) sont présentés à la figure 1.8 (Stevens *et al.*, 1999).

Les molécules ouvertes ne possédant pas la double liaison conjuguée au carbonyle sont appelées dihydrochalcones (figure 1.9).

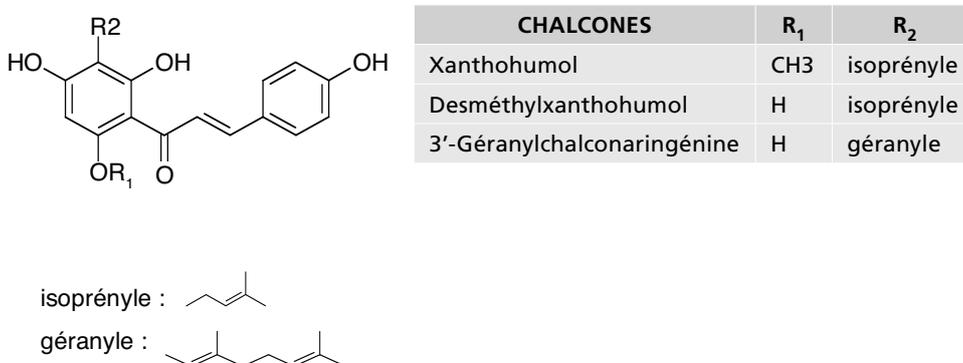


Figure 1.8. Structures chimiques de quelques prénylchalcones.

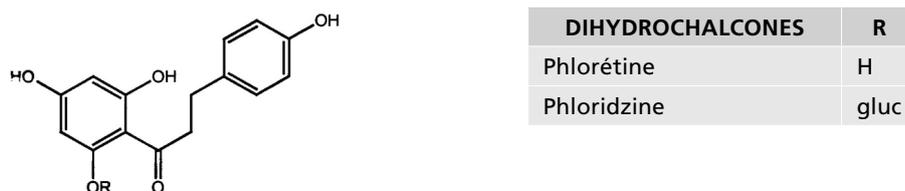


Figure 1.9. Structures chimiques de quelques dihydrochalcones.

#### d) Anthocyanidines-anthocyanines

Les anthocyanidines-anthocyanines jouent un rôle prépondérant dans la coloration des nombreux aliments (cerises, myrtilles, raisins rouges, cacao). Leur structure de base est caractérisée par un noyau « flavonoïde » chargé positivement (C6-C3-C6). Ce dernier portera le nom d'anthocyanine ou d'anthocyanidine suivant qu'il soit glycosylé ou non (Vivas de Gaulejac, 2001). Les anthocyanines se différencient par leur degré d'hydroxylation et de méthylation ainsi que par la nature, le nombre et la position des sucres liés à la molécule. L'aglycone ou anthocyanidine constitue le groupement chromophore du pigment. Cinq anthocyanidines sont reprises à la figure 1.10.

Le pH est un facteur important dans le changement de couleur des anthocyanines (figure 1.11). La forme flavylium, de couleur rouge, est relativement stable en milieu acide mais se transforme, en milieu basique, en base carbinol (incolore), en chalcone (jaune) ou en base quinonique (bleue) (Clifford, 2000).

Les 3-déoxyanthocyanidines telles que la lutéolinidine et l'apigénidine du sorgho sont des analogues colorés plus stables. Ils seraient issus de l'apiforol (leucoapigénidine) et du lutéoforol, deux flavan-4-ols retrouvés dans le sorgho.

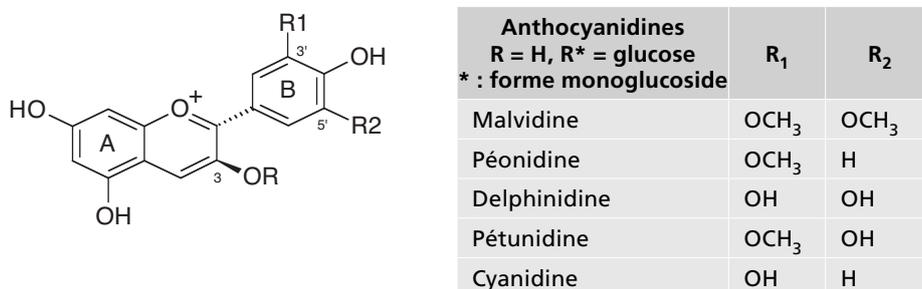


Figure 1.10. Structures chimiques de quelques anthocyanidines.

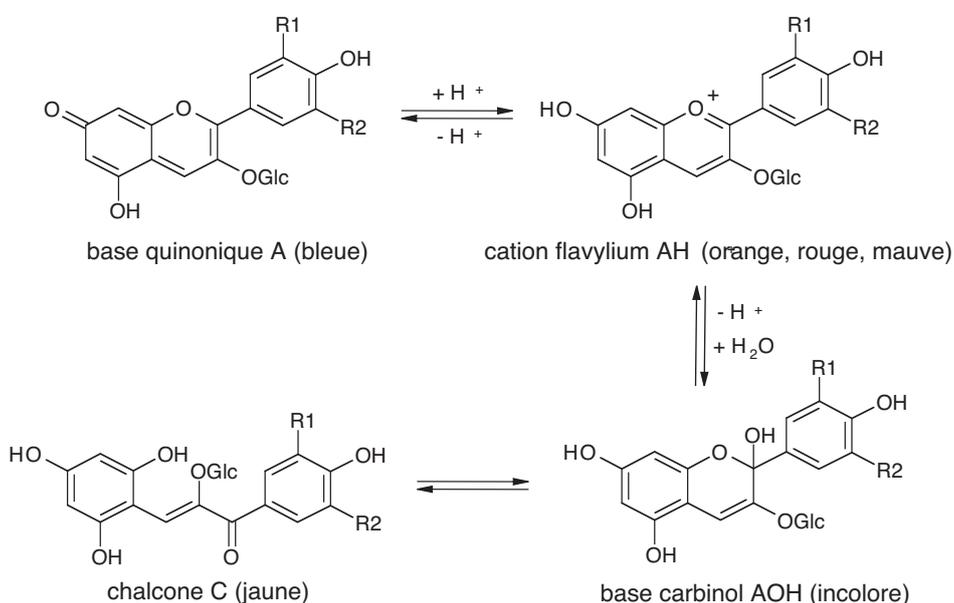


Figure 1.11. Transformation de la structure des anthocyanines en milieu aqueux (Clifford, 2000). R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H (cation flavylium orange) ; R<sub>1</sub> = OH, OCH<sub>3</sub> et R<sub>2</sub> = H (cation flavylium rouge) ; R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OH, OCH<sub>3</sub> (cation flavylium mauve).

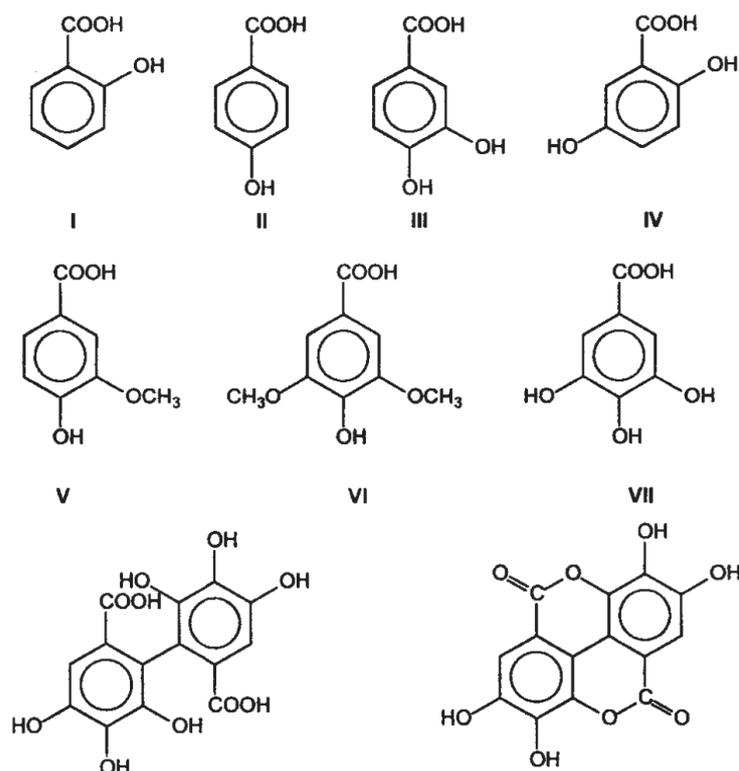
© Lavoisier – La photocopie non autorisée est un délit

## 2. Acides phénoliques et tannins hydrolysables

Parmi les acides phénoliques, on distingue les dérivés de l'acide benzoïque (C6-C1,2) des acides cinnamiques (+ leurs dérivés estérifiés) et des coumarines, possédant une structure du type (C6-C3) (Hollman, 2001).

### a) Acides hydroxybenzoïques

Les structures des acides hydroxybenzoïques varient, comme l'illustre la figure 1.12, suivant les hydroxylations et les méthoxylations sur le cycle phénolique aromatique (Thomás-Barberán et Clifford, 2000).



**Figure 1.12.** Exemples d'acides hydroxybenzoïques : I : acide salicylique ; II : acide 4-hydroxybenzoïque ; III : acide protocatéchique ; IV : acide gentisique ; V : acide vanillique ; VI : acide syringique ; VII : acide gallique ; VIII : acide hexahydroxydiphénique ; IX : acide ellagique (dilactone de l'acide gallique) (Thomás-Barberán et Clifford, 2000).

### b) Acides hydroxycinnamiques

La figure 1.13 illustre la structure des principaux acides hydroxycinnamiques (C6-C3) présents dans les plantes.

Alors que les acides hydroxybenzoïques se présentent majoritairement sous forme libre, les acides hydroxycinnamiques peuvent exister sous une forme estérifiée par l'acide quinique (figure 1.14) (Borchers *et al.*, 2000 ; Jalal et Collin, 1977).

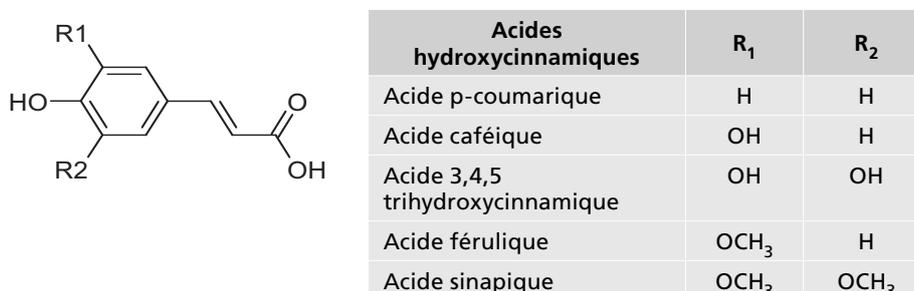


Figure 1.13. Structures chimiques de quelques acides hydroxycinnamiques (C6-C3).

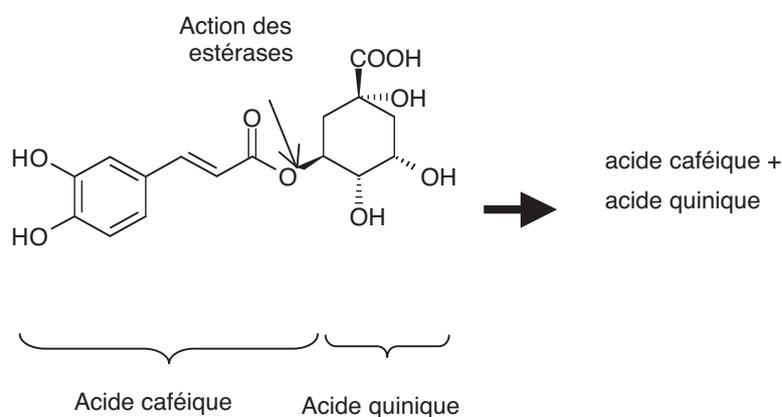


Figure 1.14. Exemple d'un acide chlorogénique (acide 5'-caféoylquinique).

### c) Coumarines

Présentes dans de nombreux végétaux, les coumarines ont une structure de base (C6-C3) dérivant des acides ortho-hydrocinnamiques. Elles sont produites en grande quantité en réponse à une attaque biotique ou abiotique et semblent constituer un moyen de défense de type phytoalexique (Vivas de Gaulejac, 2001). La figure 1.15 présente la structure de quelques coumarines (ex. : aesculétine, scopolétine, umbelliférone,...) et glycosides de coumarines (ex. : aesculine, scopoline,...). Ces composés sont connus pour leurs propriétés anti-coagulantes (Vivas de Gaulejac, 2001).

### d) Tannins hydrolysables

Les tannins hydrolysables (T<sub>H</sub>) sont des esters d'acides phénoliques (acide gallique ou ellagique) associés à un polyol (habituellement le glucose) (Clifford, 2000). Ils sont divisés en ellagitannins et gallotannins (Vivas de Gaulejac, 2001).

Les gallotannins libèrent par hydrolyse acide, hydrolyse basique, à l'eau chaude ou par action enzymatique de l'acide gallique (Wollgast et Anklam, 2000) (figure 1.16).

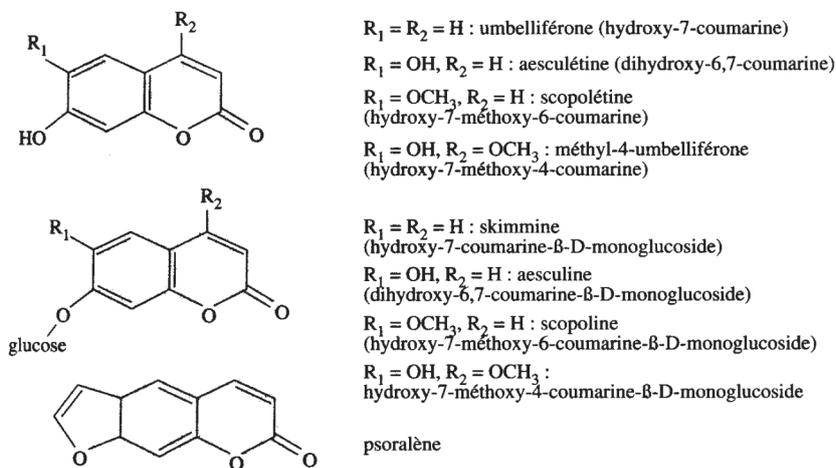


Figure 1.15. Structure de quelques coumarines (Vivas de Gaulejac, 2002).

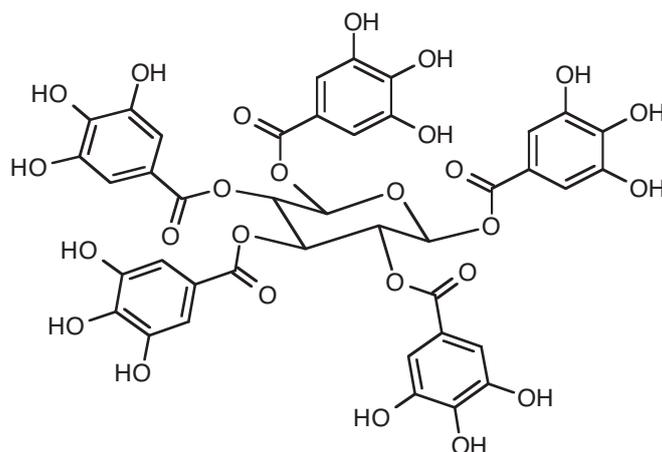


Figure 1.16. Exemple d'un gallotannin : le penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose (Buffnoir, 2000).

La figure 1.17 montre, quant à elle, la structure de quelques ellagitannins retrouvés dans le bois de chêne et les tannins œnologiques. Les monomères sont la vescalagine et la castalagine qui, par hydrolyse acide, libèrent de l'acide ellagique, dilactone de l'acide gallique (Clifford, 2000 ; Vivas de Gaulejac, 2001).

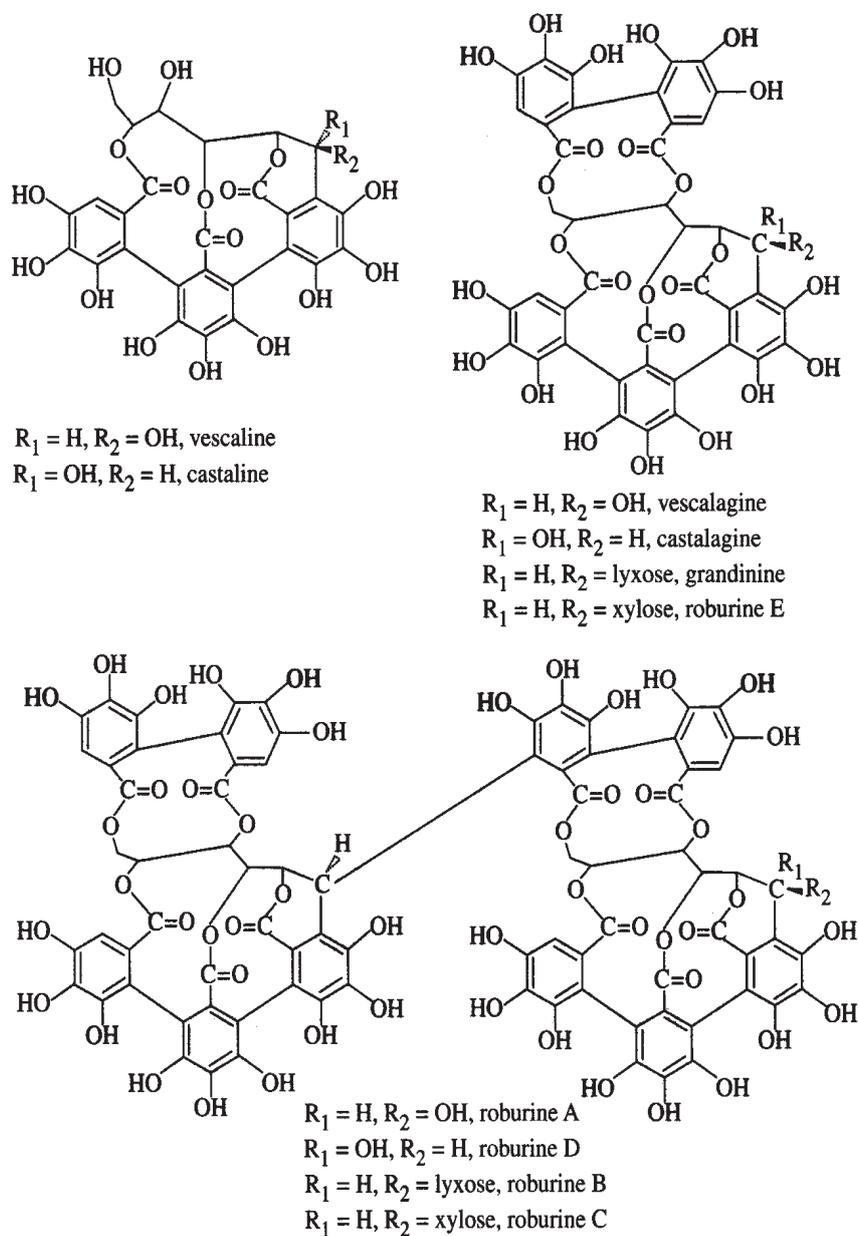


Figure 1.17. Exemple de structures d'ellagitannins (Vivas de Gaulejac, 2001).

### 3. ■ Stilbènes

Plus de 30 stilbènes et glycosides de stilbènes sont présents naturellement dans le règne végétal. Comme l'illustre la figure 1.18, la structure chimique de base des stilbènes est composée de deux cycles aromatiques joints par un pont méthylène. Les deux formes isomères des stilbènes (*cis* et *trans*) ont des propriétés chimiques et biologiques différentes. Des inter-conversions *trans/cis* sont observées en présence de chaleur ou de rayonnements UV (Hart, 1981).

Composés	R1	R2	R3	R4
<b>Aglycones</b>				
Pinosylvine ( <i>trans</i> -3,5-dihydroxystilbène)	-OH	-OH	-H	-H
Resvératrol ( <i>trans</i> -3,4',5-trihydroxystilbène)	-OH	-OH	-H	-OH
Picéatannol ou astringinine ( <i>trans</i> -3,3',4',5-tétrahydroxystilbène)	-OH	-OH	-OH	-OH
Ptérostilbène ( <i>trans</i> -3,5-diméthoxy-4'-hydroxystilbène)	-OCH <sub>3</sub>	-OCH <sub>3</sub>	-H	-OH
Rhapontigénine (3,3',5-trihydroxy-4'-méthoxystilbène)	-OH	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>
<b>Glycosides</b>				
Picéide ou polydatine ( <i>trans</i> -3,4',5-trihydroxystilbène-3-O-β-D-glucopyranoside)	-O-Glc	-OH	-H	-OH
Resvératroloside ( <i>trans</i> -3,4',5-trihydroxystilbène-4'-O-β-D-glucopyranoside)	-OH	-OH	-H	-O-Glc
Astringine ( <i>trans</i> -3,3',4',5-tétrahydroxystilbène-3-O-β-D-glucopyranoside)	-O-Glc	-OH	-OH	-OH
Rhaponticine ( <i>trans</i> -3,3',5-trihydroxy-4'-méthoxystilbène-3-O-β-D-glucopyranoside)	-O-Glc	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>

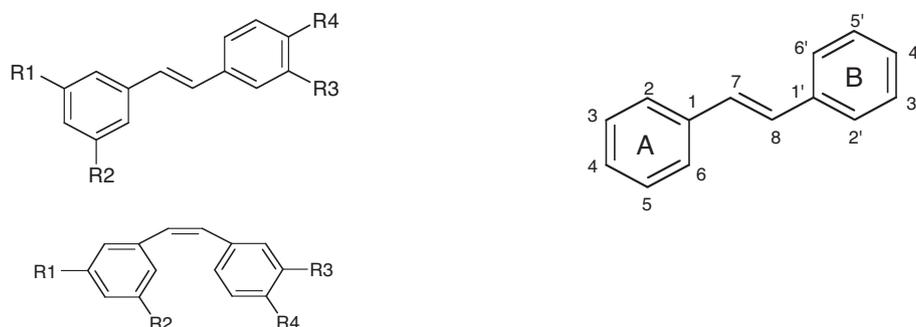
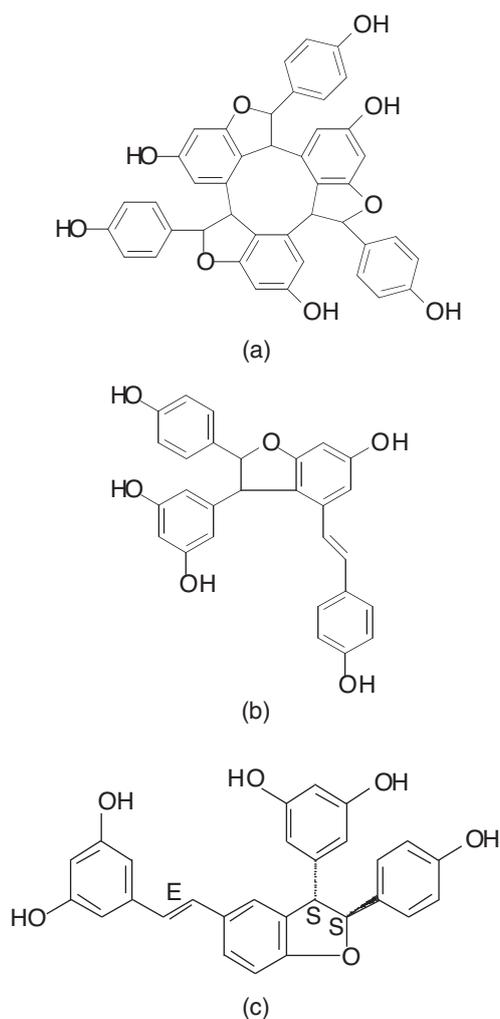


Figure 1.18. Structure de base des stilbènes (*trans* ou *cis*).

© Lavoisier – La photocopie non autorisée est un délit

Des dimères et trimères de resvératrol ont également été identifiés (essentiellement dans le raisin après élicitation UV ou à l'ozone). Les plus connus sont, sans aucun doute, les viniférines. Les structures de ces différents composés sont reprises dans la figure 1.19.



**Figure 1.19.** Structure d'oligomères de resvératrol. (a) *trans*- $\alpha$ -viniférine (b) *trans*- $\epsilon$ -viniférine (c) *trans*- $\delta$ -viniférine.

#### 4. Lignines et subérines

Les lignines et subérines sont des précurseurs de polymères pariétaux des plantes constituant des facteurs de défense contre les agents pathogènes. Chimiquement, les lignines sont des polymères d'alcools coniféryfrique, sinapylique

et p-coumarylique (dérivant respectivement des acides férulique, sinapylique et p-coumarique). Par contre, les subérines sont des polyesters des acides férulique et p-coumarique avec des acides aliphatiques (Regnault-Roger *et al.*, 2002).

## 5. Voies de biosynthèse des polyphénols

La majorité d'entre eux dérivent directement de la voie des shikimates (figure 1.20).

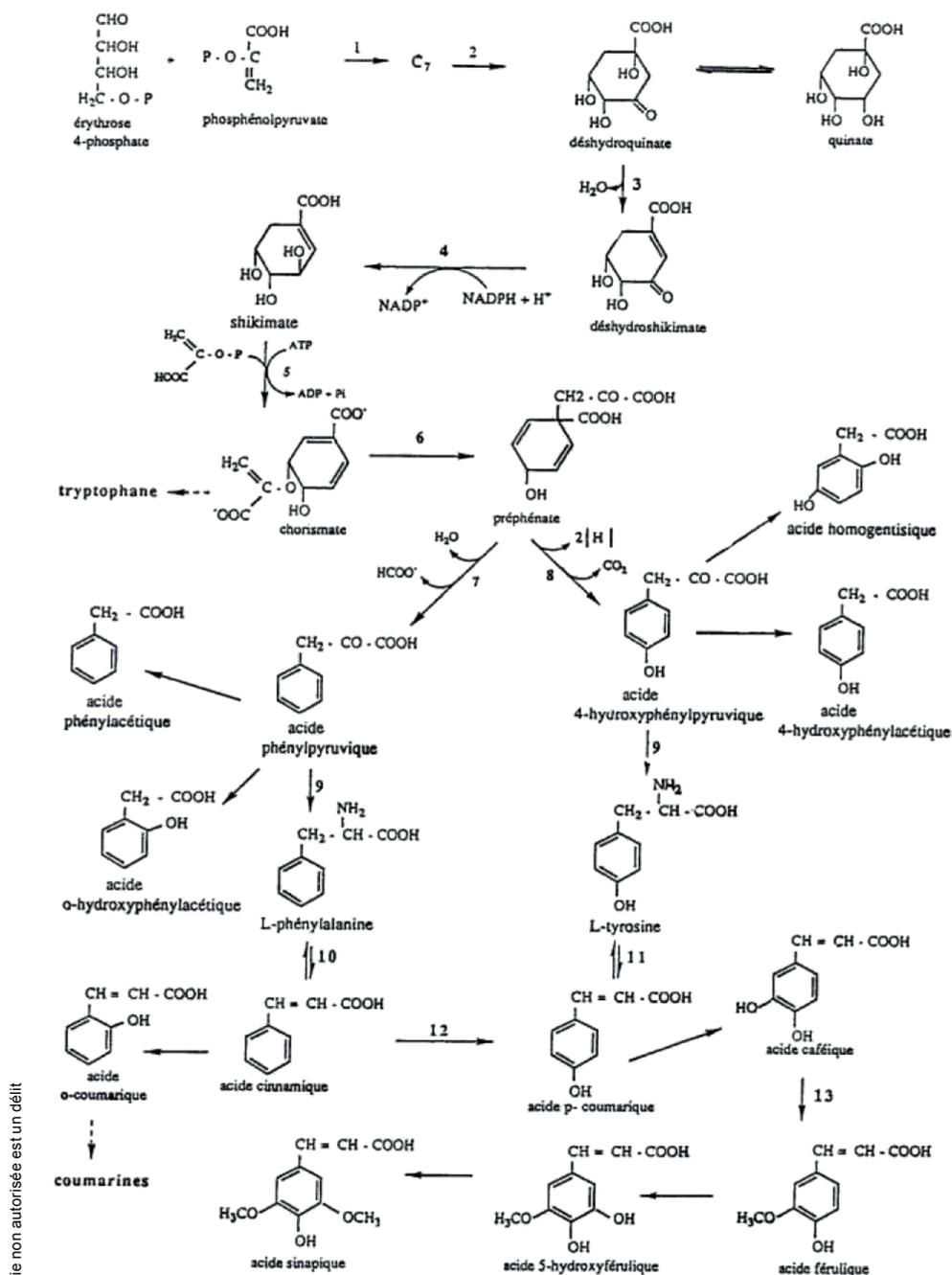
Dans les flavonoïdes et les stilbènes, c'est le cas d'un des deux cycles aromatiques tandis que l'autre provient de la condensation de trois acétyl-CoA (voie des polycétides) (figure 1.21). La voie de l'acide acétique seule ne conduit qu'à peu de polyphénols (ex : 6-méthoxymélléine, une phytoalexine de la carotte).

Les stilbènes, comme les flavonoïdes, sont donc synthétisés par la voie de la phénylalanine/polymalonate. Néanmoins, comme l'illustre la figure 1.21, la dernière étape est catalysée par la stilbène synthase (STS) (EC 2.3.1.95) pour les stilbènes et par la chalcone synthase (CHS) (EC 2.3.1.74) pour les flavonoïdes (Jeandet *et al.*, 2002 ; Soleas *et al.*, 1997).

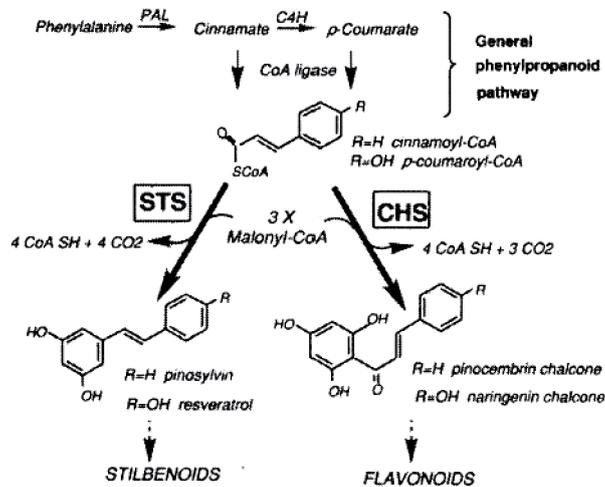
La réaction de cyclisation catalysée par la CHS est une cyclisation de Claisen entre les atomes C1 et C6 de la chaîne tétracétonique linéaire provenant des trois molécules de malonyl-CoA (figure 1.22). Durant la cyclisation, le groupement nucléophile méthylène (C6) le plus proche de l'unité coumaroyl attaque l'atome du carbone du groupe carbonyl C1 liant le thioester à Cys 164. La fermeture du cycle s'accomplit par un transfert de proton interne du carbone nucléophile vers l'oxygène du carbonyle, ce qui provoque la rupture du lien C1-Cys 164 et l'expulsion d'un cycle tricétonique devenant rapidement aromatique par transfert interne de protons, pour former la chalcone, isomérisée en flavanone (naringénine) par une chalcone isomérase.

La spécificité des stilbène synthases par rapport aux chalcone synthases provient de leur cyclisation dite « aldol » reliant les carbones C2 et C7 de l'intermédiaire tétracétonique (figure 1.22). Les stilbènes possèdent en outre un atome de moins que les chalcones. La décarboxylation du carbone C1 après cyclisation nécessite une activité supplémentaire de type thio-estérase afin de détacher le stilbène du résidu Cys 164. Chez les CHS, ce lien est intrinsèquement rompu par formation du cycle entre C1 et C6.

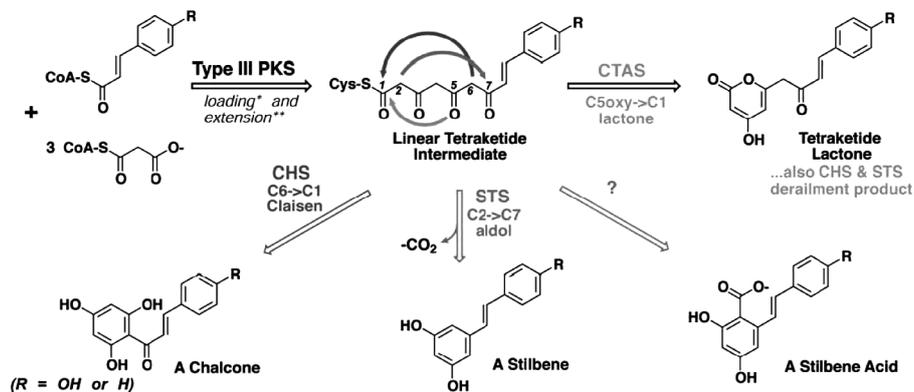
Yamaguchi *et al.* (1999) confirment l'étroite relation entre la STS et la CHS, en décrivant des réactions de croisements entre les deux enzymes sur-exprimées dans *Escherichia coli*. Ils observent la formation du resvératrol par la CHS et réciproquement la formation de chalcone par la STS à hauteur, dans les deux cas, de 2 à 4 % du produit principal.



**Figure 1.20.** Voie des shikimates menant aux acides phénoliques. 1 : aldolase ; 2 : déshydroquinate synthase ; 3 : déshydroquinate hydratase ; 4 : shikimate déshydrogénase ; 5 : complexe shikimate kinase ; 6 : chromisate mutase ; 7 : préphénate déshydratase ; 9 : aminotransférases ; 10 : phénylalanine ammonia-lyase ; 11 : tyrosine ammonia-lyase ; 12 : cinnamate 4-hydroxylase ; 13 : catéchométhyltransférèse.



**Figure 1.21.** Voie de synthèse des stilbènes et des flavonoides à partir de la phénylalanine (Kodan *et al.*, 2002). PAL : Phénylalanine ammonia lyase. C4H : Cinnamate-4-hydroxylase.



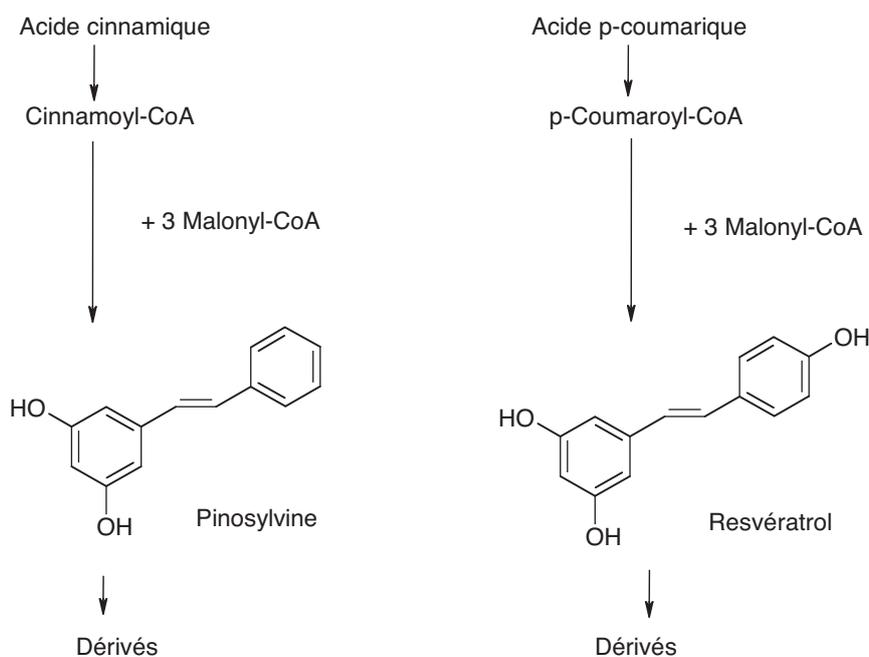
**Figure 1.22.** Mécanisme de cyclisation des chalcones et des stilbènes (Austin *et al.*, 2004).

La similitude de séquence d'acides aminés est grande entre les enzymes STS et CHS, ainsi qu'avec d'autres acyltransférases présentes chez les végétaux et les bactéries. Ces enzymes sont regroupées sous le terme de polycétone synthase de type III (PKS III). Elles utilisent le même mécanisme réactionnel mais diffèrent entre elles par leur spécificité de substrat et/ou par la stéréochimie de la réaction de cyclisation de l'intermédiaire polycétonique.

La STS présente une homologie très élevée avec la chalcone synthase (CHS) au niveau de la composition en acides aminés (70 à 90 % sur environ 400 résidus) ainsi qu'au niveau de l'ADNc (Austin *et al.*, 2004 ; Jeandet *et al.*, 2002). Les

stilbènes synthases seraient apparues à partir des chalcones synthases plusieurs fois au cours de l'évolution (Tropf *et al.*, 1994). Les séquences codantes des stilbènes synthases sont, en effet, parfois plus proches des séquences codantes pour les chalcones synthases de plantes apparentées qu'elles ne le sont à d'autres stilbènes synthases.

Comme l'indique la figure 1.23, les stilbènes synthases sont regroupées suivant deux types. Les enzymes du premier type, présentes dans la vigne, l'arachide, la rhubarbe tartare (*Rheum tataricum*), la canneberge, ... utilisent le p-coumaroyl-CoA et le 3 malonyl-CoA pour former le resvératrol (Schwekendiek *et al.*, 1992). Lors de cette synthèse, 4 molécules de CO<sub>2</sub> sont libérées pour chaque molécule de resvératrol synthétisée (Soleas *et al.*, 2001). Les enzymes du deuxième type, retrouvées principalement dans le pin, utilisent pour substrat le p-cinnamoyl-CoA et le 3 malonyl-CoA pour former la pinosylvine (Schwekendiek *et al.*, 1992).



**Figure 1.23.** Voie de synthèse du resvératrol et de la pinosylvine catalysée par deux types de stilbènes synthases différentes (Schwekendiek *et al.*, 1992).

La STS et la CHS contiennent dans leur séquence d'acides aminés, à la même position, un résidu unique de cystéine (Cys 164) qui constitue le site actif de ces deux enzymes. Néanmoins, en positions 2 et 3 proches du site actif, des différences significatives dans la séquence de deux acides aminés sont responsables de la spécificité pour le substrat et permettent de distinguer la CHS (glutamine-glutamine) des STS. Dans le cas des STS produisant la pinosylvine, les positions 2 et 3

sont occupées par la séquence glutamine-histidine contre histidine-glutamine dans le cas de celles menant au resvératrol (Schroder et Schroder, 1992). La STS a été purifiée pour la première fois en 1984 à partir de cultures cellulaires en suspension d'*Arachis hypogea* (Schöppner et Kindl, 1984). La STS est encodée par une famille multigénique. Sept gènes menant au resvératrol (pSV21, pSV25, pSV696, pSV368, Vst 1, Vst 2 et Vst 3) dans la vigne ainsi que cinq gènes menant à la pinosylvine (PST-1, PST-2, PST-3, PST-4 et PST-5) chez le pin ont déjà été caractérisés (Jeandet *et al.*, 2002). Plus récemment, trois nouveaux gènes codant la STS (pdsts 1, pdsts 2 et pdsts 3) ont également été isolés à partir de racines de *Pinus densiflora*, de même qu'un nouveau gène codant la STS chez *Vitis vinifera* cv *Gloire de Montpellier* (Jeandet *et al.*, 2002). Les gènes codant pour la STS ont été regroupés selon leur sensibilité envers des signaux externes incluant les stress abiotiques ou les signaux biotiques originaires des cellules fongiques. L'ADNc de la STS et les clones génomiques ont été décrits à partir du pin écossais, de l'arachide et de la vigne. La STS originale est un homodimère d'environ 90 kDa (avec deux sous-unités de 43 kDa) (Jeandet *et al.*, 2002).

Bien qu'une expression constitutive de la STS ait été relatée par Sparvoli *et al.* (1994), l'expression des gènes STS est souvent induite en réponse à un stress biotique ou abiotique. À un niveau transcriptionnel, il a été montré que les ARNm de la STS s'accumulent en deux vagues (exemple : 6 et 20 h après traitement de cellules en suspension de *V. vinifera* cv *Optima* avec les parois cellulaires de *Phytophthora cambivora* (Wiese *et al.*, 1994)). Des résultats similaires ont précédemment été obtenus avec des cellules en suspension de vigne élicitées par les parois cellulaires de *Botrytis cinerea* (Liswidowati *et al.*, 1991). Zinser *et al.* (2000) ont également observé dans le *Pinus sylvestris* que les niveaux d'ARNms induits par une exposition à l'ozone atteignent leurs valeurs maximales en deux vagues successives (premier et cinquième jour). Adrian *et al.* (1997) décrivent, *in vitro*, la présence de deux pics dans le profil des ARNm de la STS de *V. vinifera* en réponse à une induction avec de la lumière UV. Le premier pic a été atteint après 8 à 12 heures d'induction alors que le deuxième pic n'apparaît qu'après 22 à 24 heures. De manière similaire, Douillet-Breuil *et al.* (1999) notent la présence de 2 maxima d'accumulation de resvératrol dans les feuilles de vigne traitées à la lumière UV (20 et 40 heures après l'induction). Ces deux vagues d'accumulation d'ARNms correspondent à l'expression d'au moins deux groupes de gènes de la STS. Ceux exprimés plus tôt mènent à des ARNm rapidement dégradés alors que ceux exprimés plus tard fournissent un ARNm plus stable (Wiese *et al.*, 1994).

La présence d'une stilbène synthase (STS) n'a été rapportée que dans un nombre limité d'espèces végétales et son mécanisme d'action est loin d'être complètement élucidé. La base de données Genbank en reprend actuellement 37 (tableau 1.3).

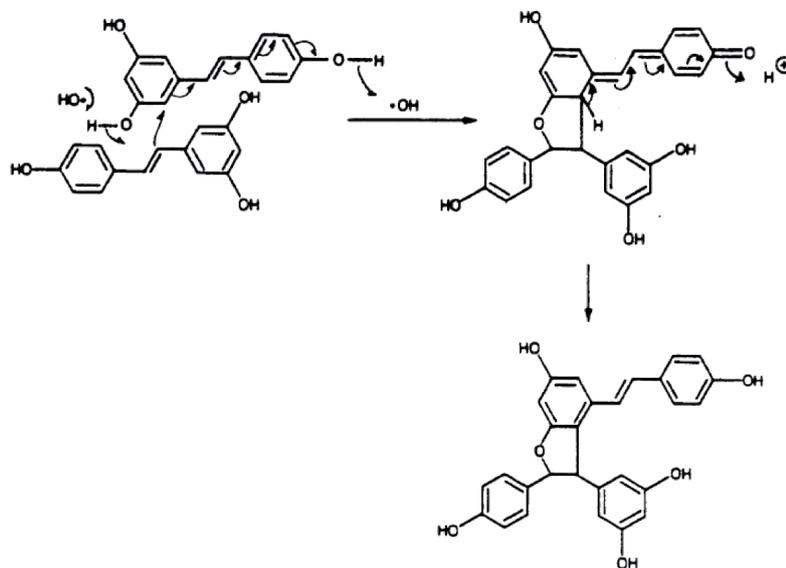
**Tableau 1.3.** Espèces taxonomiques possédant au moins une séquence codante pour une stilbène synthase. <sup>a</sup>Il s'agit de gène et non de ARNm.

Espèces	ARNm	Identifiant Genbank
<i>Arachis hypogea</i>	3	GI60651748
<i>Bauhinia variegata</i>	1	GI98962499
<i>Cissus rhombifolia</i>	1	GI20501852
<i>Partenocissus henryana</i>	1	GI20501850
<i>Pinus densiflora</i>	3	GI7576359
<i>Pinus strobus</i>	2	GI762993
<i>Pinus sylvestris</i>	2	GI20655
<i>Polygonum cuspidatum</i>	2	GI6518677
<i>Rheum tataricum</i>	1	GI30025589
<i>Sorghum bicolor</i>	1	GI17978543
<i>Vitis pseudoreticulata</i>	6	GI93352785
<i>Vitis riparia</i>	6	GI6006726
<i>Vitis vinifera</i>	1	GI499023
<i>Vitis aestivalis</i>	3	GI15811655
<i>Vitis cv. Optima</i>	3 <sup>a</sup>	GI235945

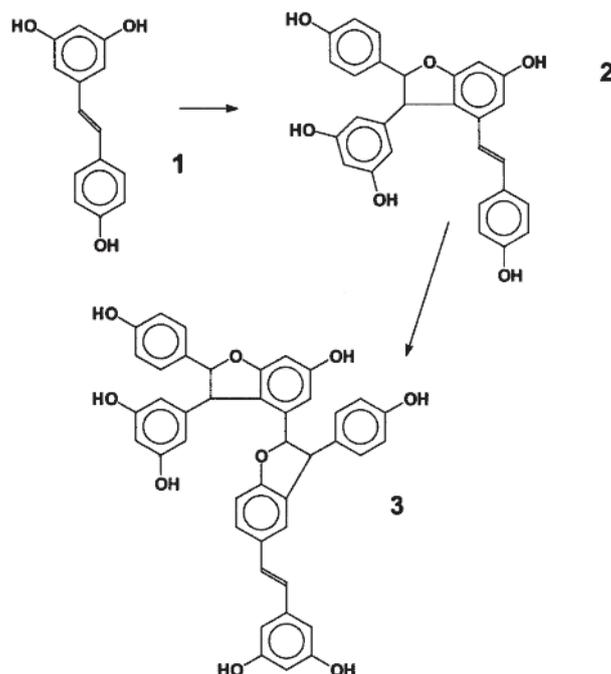
Par ailleurs, des stilbènes ont été détectés chez plusieurs espèces pour lesquelles aucun gène STS n'est actuellement répertorié. La présence de resvératrol est notamment mentionnée dans diverses espèces de myrtilles (Lyons *et al.*, 2003 ; Rimando *et al.*, 2004), chez *Veratrum grandiflorum* (Aggarwal *et al.*, 2004), dans le cacao (Counet *et al.*, 2006) et dans le houblon (Callemien *et al.*, 2005).

La dimérisation oxydative d'unités de resvératrol mène à des oligomères appelés viniférines. Les plus connues sont l' $\epsilon$ - et la  $\delta$ -viniférine. Bien que certains auteurs (Langcake et Pryce, 1977a ; Langcake et Pryce, 1977b) suspectent la présence d'autres viniférines, elles n'ont jamais été isolées. Comme l'illustre la figure 1.24, les enzymes de type peroxydase interviennent dans l'oxydation du resvératrol en viniférine (Gonzalez-Barrio *et al.*, 2006 ; Jeandet *et al.*, 2002). L'oxydation dans la vigne serait contrôlée par trois isoenzymes de type peroxydase : l'A1, la B3 (localisée dans la paroi cellulaire et dans les espaces libres de cette même paroi) et la B5 (localisée au niveau vacuolaire). Ces enzymes semblent liées aux défenses constitutives et induites de la vigne contre les champignons (Jeandet *et al.*, 2002). Utilisant une peroxydase de raifort-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Langcake et Pryce (1977a) ont démontré la possibilité de formation d'un analogue de l' $\epsilon$ -viniférine, mais via une oxydation différente impliquant l'addition d'un groupe hydroxyphényl en position 4' sur le noyau stilbénique. Des études concernant les changements de concentration en stilbènes dans les feuilles de vigne, en réponse à l'éliciteur UV, indiquent que les cinétiques de production de resvératrol

et d' $\epsilon$ -viniférine sont similaires, avec toutefois une différence observée dans les maxima (Douillet-Breuil *et al.*, 1999). Chez *Vitis vinifera* cv. *Xarello*, le premier pic de synthèse du resvératrol apparaît 20 h après l'induction UV alors que le second, plus petit, est observé à la 40<sup>e</sup> heure. Pour l' $\epsilon$ -viniférine, le contraire est observé. Des observations similaires ont été faites dans la peau de raisin après élicitation à l'ozone (Gonzalez-Barrio *et al.*, 2006). Les dimères de resvératrol ( $\delta$ - et  $\epsilon$ -viniférine) commencent à s'accumuler dans la peau après 1 jour de stockage et atteignent leur maximum après 2 jours. Les trimères, quant à eux, ne sont pas quantifiables durant les deux premiers jours, apparaissent au troisième jour et sont à leur maximum après 4 jours. Cette séquence dans la biosynthèse des dérivés du resvératrol confirme que, lors d'un stress, le resvératrol (monomère) est synthétisé en premier, l'accumulation des dimères et des trimères ne venant que plus tard (figure 1.25) (Gonzalez-Barrio *et al.*, 2006). Plusieurs équipes (Breuil *et al.*, 1998 ; Breuil *et al.*, 1999 ; Cichewicz *et al.*, 2000 ; Pezet, 1998) ont mis en évidence la synthèse de viniférines et de dimères de ptérostilbène par les laccases de *Botrytis cinerea*. Cette bio-transformation aurait pour but de réduire l'effet fongitoxique du resvératrol, facilitant l'invasion du champignon (Cichewicz *et al.*, 2000). D'autre part, des formes oxydées de dimères de resvératrol comme les restrytols (A, B et C), le leachinol F et le pallidol ont également été identifiées (Jeandet *et al.*, 2002).



**Figure 1.24.** Mécanisme de dimérisation du resvératrol en  $\epsilon$ -viniférine (Jeandet *et al.*, 2002).



**Figure 1.25.** Séquence observée dans la biosynthèse des dérivés stilbéniques chez le raisin (Gonzalez-Barrio *et al.*, 2006). (1) *trans*-resvératrol ; (2) resvératrol dimère ; (3) resvératrol trimère.

## Références bibliographiques

- Adrian M., Daire X., Jeandet P., Breuil A. C., Weston J., Bessis R. et Boudon E.** Comparisons of stilbene synthase activity (resveratrol amounts and stilbene synthase mRNAs levels) in grapesvines treated with biotic and abiotic phytoalexin inducers. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1997**, *48*, 394-395.
- Aggarwal B., Bhardwaj A., Aggarwal R., Seermam N., Shishodia S. et Takada Y.** Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer : preclinical and clinical studies. *Anticancer Research*, **2004**, *24*, 2783-2840.
- Austin M., Bowman M., Ferrer J., Schroder J. et Noel J.** An aldol switch discovered in stilbene synthases mediates cyclization specificity of type III polyketide synthases. *Chemistry & Biology*, **2004**, *11*, 1179-1194.
- Borchers A., Keen C., Hannum S. et Gershwin M.** Cocoa and chocolate : composition, bio-availability and health implications. *J. Med. Food* **2000**, *3*, 77-105.
- Breuil A.C., Adrian M., Pirio N., Meunier P., Bessis R. et Jeandet P.** Metabolism of stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea* : 1. Characterization of a resveratrol dehydrodimer. *Tetrahedron Letters*, **1998**, *39*, 537-540.
- Breuil A.C., Jeandet P., Adrian M., Chopin F., Pirio N., Meunier P. et Bessis R.** Characterization of a pterostilbene dehydrodimer produced by laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytopatho.*, **1999**, *89*, 298-302.

- Buffnoir** : <http://buffnoir.multimania.com>, **2000**.
- Callemien D., Jerkovic V., Rozenberg R. et Collin S.** Hop as an interesting source of resveratrol for brewers : optimization of the extraction and quantitative study by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 424-429.
- Cichewicz R., Kouzi S. et Hamann M.** Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *J. Natural Products*, **2000**, *63*, 29-33.
- Clifford M.N.** Anthocyanins - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, *80*, 1063-1072.
- Counet C., Callemien D. et Collin S.** Chocolate and cocoa : new sources of *trans*-resveratrol and *trans*-piceid. *Food Chem.*, **2006**, *98*, 649-657.
- Douillet-Breuil A-C., Jeandet P., Adrian M. et Bessis R.** Changes in the phytoalexin content of various *Vitis Spp.* in response to ultraviolet C elicitation. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, *47*, 4456-4461.
- Hart J.H.** Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **1981**, *19*, 437-458.
- Hollman P.C.H.** Evidence for health benefits of plant phenols : local or systemic effects ? *J. Sci. Food Agric.*, **2001**, *81*, 842-852.
- Gonzalez-Barrio R., Beltran D., Cantos E., Gil M., Espin J. et Tomas-Barberan F.** Comparison of ozone and UV-C treatments on the postharvest stilbenoid monomer, dimer, and trimer induction in var. 'Superior' white table grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 4222-4228.
- Jalal M. et Collin H.** Polyphenols of mature plant, seedling and tissue cultures of *Theobroma Cacao*. *Phytochem.*, **1977**, *16*, 1377-1380.
- Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M. et 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.
- Kodan A., Kuroda H. et Sakai F.** A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*) : implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2002**, *99*, 3335-3339.
- Langcake P. et Pryce R.** A new class of phytoalexins from grapes. *Experientia*, **1977a**, *33*, 151-152.
- Langcake P. et Pryce R.** The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochem.*, **1977b**, *16*, 1193-1196.
- Liswidowati F., Mann F., Wer B. et Di H.** Induction of stilbene synthase by *Botrytis Cinerea* in cultured grapevine cells. *Planta*, **1991**, *183*, 307-314.
- Lyons M., Yu C., Toma R., Cho S., Reiboldt W., Lee J. et Van Breemen R.** Resveratrol in raw and baked blueberries and bilberries. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 5867-5870.
- Perret C.** Analyse de tanins inhibiteurs de la stilbène oxydase produite par *Botrytis cinerea*. Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel, Suisse, **2001**.
- Pezet R.** Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers. : *Fr. FEMS Microbio.Letters*, **1998**, *167*, 203-208.
- Regnault-Roger C., Philogène B.J.R. et Vincent C.** Biopesticides d'origine végétale. Éditions Tec & Doc, 337 p., **2002**.
- Rimando A., Kalt W., Magee J., Dewey J. et Ballington J.** Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 4713-4719.

- Santos-Buelga C. et Scalbert A.** Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, *80*, 1094-1117.
- Schroder G. et Schroder J.** A single change of histidine to glutamine alters the substrate preference of a stilbene synthase. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*, 20558-20560.
- Schöppner A. et Kindl H.** Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanuts. *J. Biol. Chem.*, **1984**, *259*, 6806-6811.
- Schwekendiek A., Pfeffer G. et Kindl H.** Pine stilbene synthase cDna, a tool for probing environmental-stress. *FEBS Letters*, **1992**, *301*, 41-44.
- Soleas G., Diamandis E. et Goldberg D.** Resveratrol : a molecule whose time has come ? And gone ? *Clinical Biochem.*, **1997**, *30*, 91-113.
- Soleas G., Diamandis E. et Goldberg D.** The world of resveratrol. *Nutrition and cancer prevention – Advances in experimental medicine and biology*, **2001**, 159-182.
- Sparvoli F., Martin C., Scienza A., Gavazzi G. et Tonelli C.** Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol.*, **1994**, *24*, 743-755.
- Stevens J.F., Taylor A.W. et Deinzer M.L.** Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *J Chrom. A*, **1999**, *832*, 97-107.
- Thomás-Barberán F.A. et Clifford M.N.** Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, *80*, 1024-1032.
- Tropf S., Lanz T., Rensing S. A., Schröder J. et Schröder G.** Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. *J. Mol. Evol.*, **1994**, *38*, 610-618.
- Vivas de Gaulejac N.** Vin et santé. Les bases scientifiques du French Paradox. Éditions Féret., 198 p., **2001**.
- Vivas de Gaulejac N.** Manuel de Tonnellerie. Éditions Féret. 200 p., **2002**.
- Wiese W., Vornam B., Krause E. et Kindl H.** Structural organization and differential expression of 3 stilbene synthase genes located on A 13-Kb grapevine Dna fragment. *Plant Mol. Biol.*, **1994**, *26*, 667-677.
- Wollgast J. et Anklam E.** Review on polyphenols in *Theobroma cacao* : changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res. Int.*, **2000**, *33*, 423-477.
- Yamaguchi T., Kurosaki F., Suh D., Sankawa U., Nishioka M., Akiyama T., Shibuya M. et Ebizuka Y.** Cross-reaction of chalcone synthase and stilbene synthase overexpressed in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, **1999**, *460*, 457-461.
- Zinser C., Jungblut T., Heller W., Seidlitz H., Schnitzler J., Ernst D. et Sandermann H.** The effect of ozone in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) : gene expression, biochemical changes and interactions with UV-B radiation. *Plant Cell Environ.*, **2000**, *23*, 975-982.



## *Extraction et analyse des polyphénols*

*Sonia Collin, Delphine Callemien et Sabrina Nizet*

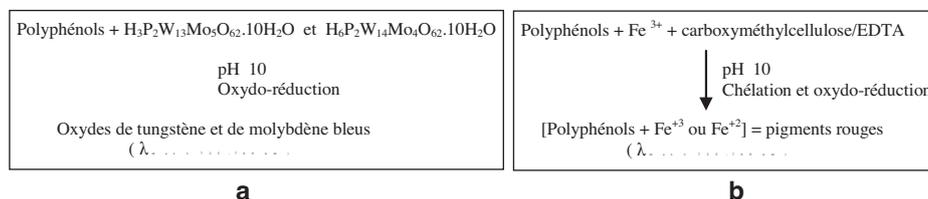
### 1. ■ Analyses globales

#### a) Polyphénols totaux par le test de Folin-Ciocalteu

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acide phosphotungstique et phosphomolybdique (état de valence +6 du métal) qui peut être réduit par les phénols en oxyde de tungstène et de molybdène de coloration bleue ( $\lambda_{\max} = 725-760$  nm, différents états de valence des métaux) (figure 2.1).

Les structures électroniques des produits de réduction ne sont pas bien connues. La réaction d'oxydation est accélérée en milieu alcalin (dans notre cas, par un ajout de carbonate de sodium). Pour éviter la précipitation de complexe de sodium, du sulfate de lithium est ajouté à la réaction (Singleton et Rossi, 1965). Pour réaliser les courbes de calibration, l'acide gallique et la (+)-catéchine sont souvent pris comme références.

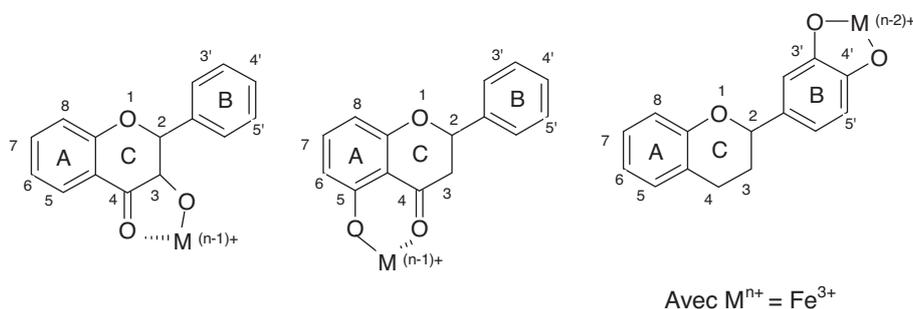
Ce test est utilisé pour quantifier les polyphénols et les protéines (avec des résidus tyrosine), mais il peut hélas répondre à la présence d'autres composés facilement oxydables (Singleton et Rossi, 1965 ; Singleton *et al.*, 1999). La contribution de l'acide ascorbique peut être déduite assez facilement (George *et al.*, 2005).



**Figure 2.1.** Mesure des polyphénols totaux : a. Folin-Ciocalteu et b. Bishop.

### b) Polyphénols totaux par le test de Bishop

Le test de Bishop, principalement utilisé par les brasseurs, est basé sur la chélation des phénols et du fer en milieu alcalin (pH 10 ajusté avec de l'ammoniaque). Le complexe possède une coloration rouge ( $\lambda_{max} = 600 \text{ nm}$ ) (figure 2.1b) (Bishop, 1972). Étant donné que la plupart des flavonoïdes sont en mesure de réduire le  $Fe^{+3}$  en  $Fe^{+2}$ , la chélation avec le  $Fe^{+2}$  est également observée. Trois sites de complexation des métaux sont possibles pour les flavanones : entre leurs groupements 3- ou 5- hydroxyle et le 4-oxo, ou entre le groupement ortho hydroxyle (3' et 4') sur le cycle B. En ce qui concerne la catéchine, seul ce dernier site permet la chélation (Fernandez *et al.*, 2002 ; Mira *et al.*, 2002). Étonnamment, aucune influence du degré de polymérisation n'a été observée (Jerumanis, 1969). Comme on pouvait s'y attendre, Jerumanis (1968) a observé peu ou pas de changement de couleur avec les acides vanilliques, syringiques et féruliques qui ne possèdent pas un tel site d'interaction. Des réactions d'interférences avec les colorants, les mélanoidines, les réductones, la cystéine et l'acide ascorbique ont été mentionnées (Jerumanis, 1968 ; Jerumanis, 1969 ; Jerumanis, 1973). La carboxyméthylcellulose est toujours ajoutée au mélange réactionnel pour améliorer la transparence de la solution, tout comme l'EDTA qui lui, est recommandé comme un antiseptique (De Clerck et Jerumanis, 1967). Des polyphénols isolés à partir de malt ou de houblon sont utilisés comme références pour la courbe d'étalonnage.

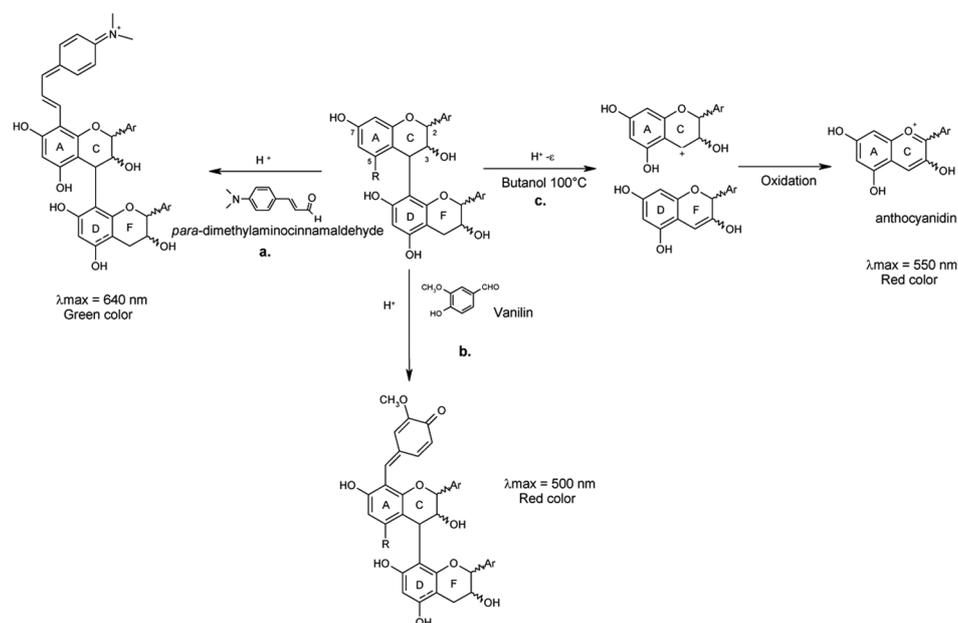


**Figure 2.2.** Chélation des flavanoïdes.

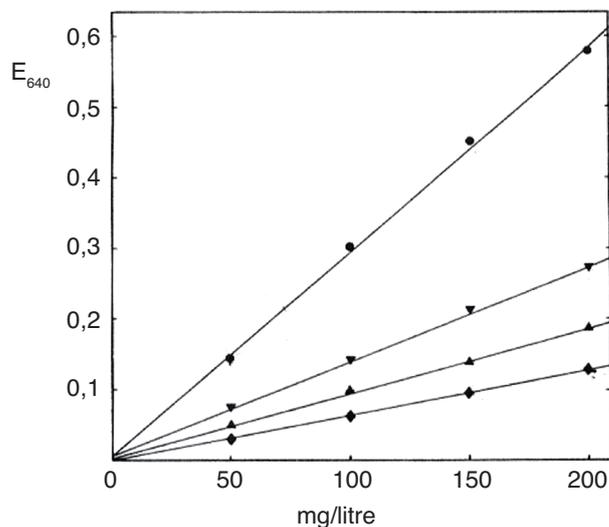
### c) Flavan-3-ols et proanthocyanidines par le test au *para*-diméthylaminocinnamaldéhyde

Une coloration verte ( $\lambda_{\max} = 640 \text{ nm}$ ) apparaît quand le *para*-diméthylaminocinnamaldéhyde réagit avec le cycle A des flavan-3-ols ou des proanthocyanidines (figure 2.3a). Seuls les flavonoïdes avec deux ou trois groupements hydroxyles sur le cycle A (par exemple, en positions 5 et 7) et une simple liaison entre la position 2 et 3 du cycle C (plus haute nucléophilie du noyau A) sont impliqués dans une telle réaction (McMurrough et McDowell, 1978).

Dans les proanthocyanidines, à l'instar du test à la vanilline, ce sont les catéchines de la première unité qui réagissent. Dès lors, le nombre de catéchines-équivalents devra être multiplié par le degré de polymérisation moyen si l'on souhaite connaître le poids de polyphénols dans l'extrait. Cette valeur ne sera toutefois qu'approximative car la (-)-épicatechine donne une intensité de couleur plus élevée que la (+)-catéchine et la réponse dépend aussi fortement du degré de polymérisation. La figure 2.4 précise la sensibilité relative pour quelques flavanoïdes. La (+)-catéchine est choisie comme référence pour la quantification.



**Figure 2.3.** a. Test au *para*-diméthylaminocinnamaldéhyde, b. test à la vanilline (condensations Friedel-Craft dans les deux cas), c. test au butanol acide.



**Figure 2.4.** Production de coloration en présence de para-diméthylaminocinnamal-déhyde ( $E_{640nm}$  vs mg/L) de différents composés phénoliques dans 5 % d'éthanol : • (+)-Catéchine ; ▼ Procyanidine B4 ; ▲ Procyanidine B3 ; ◆ un mélange de procyanidines trimériques et tétramériques contenant principalement de la procyanidine C2 (Delcour et Janssens de Varebeke, 1985).

#### d) Flavan-3-ols et proanthocyanidines par le test à la vanilline

En présence d'acide, la vanilline réagit avec les tannins pour produire des structures rouges détectées à 500 nm (figure 2.3b). Comme dans l'analyse précédente, un lien simple entre les positions 2 et 3 du cycle C et des groupes hydroxyles libres en position *mé*ta sur A sont nécessaires (Sarkar et Howarth, 1976). La (+)-catéchine est utilisée comme standard. Cette analyse est faussée par la présence de traces d'eau ( $H_2SO_4$  est préféré à l'HCl car il contient moins d'eau). Les paramètres critiques sont le temps de réaction (15 minutes sont optimales pour les monomères) et la température (25-35 °C pour des monomères ; pas de température optimale pour les oligomères) (Sun *et al.*, 1998).

#### e) Proanthocyanidines par le test au butanol acidifié

La rupture des liaisons interflavaniques en milieu acide (HCl) suivie d'une oxydation en présence de  $Fe^{+3}$  transforme les proanthocyanidines en anthocyanidines (550 nm) (figure 2.3c). Le taux de conversion en cyanidines dépend du DP et de la teneur en eau (Porter *et al.*, 1986).

#### f) Proanthocyanidines par le test aux anthocyanogènes

Ce traitement thermique en présence d'HCl a souvent été utilisé pour transformer les flavanoïdes oligomériques de la bière en anthocyanidines. L'adsorption des polyphénols par le PVPP est suivie d'une désorption par la N-méthyl-2-pyrrolidone contenant de l'HCl et du fer (ce dernier intensifie la couleur mesurée à 550 nm). Le rendement de cyanidine libérée est faible quand le DP est élevé.

De plus, les cyanidines ne généreront pas la même réponse que les delphinidines ( $\lambda_{\text{max}} = 545$  ou  $557$  nm) (Harris et Ricketts, 1959 ; Jerumanis, 1973 ; McFarlane, 1961 ; McFarlane et Vader, 1962). La leucocyanidine est utilisée comme standard. Étant donné que le test de Bishop fournit la teneur totale en anthocyanogènes quel que soit le DP, Jerumanis a établi un index de polymérisation en calculant le rapport des résultats des deux tests.

### g) Teneurs en tannoïdes

Les tannoïdes impliqués dans l'instabilité colloïdale de la bière peuvent être déterminés par titration par du PVP soluble (mesure de turbidité avec un tannomètre) (Chapon *et al.*, 1975 ; McMurrough *et al.*, 1997). Les structures quantifiées par cette méthode sont principalement les proanthocyanidines oxydées (Chapon, 1994).

## 2. ■ Extractions sélectives

Quatre propriétés peuvent être exploitées pour extraire les polyphénols d'une matrice complexe : leur polarité, leur acidité, leur volatilité ou leur taille.

### a) Extraction des polyphénols sur base de leur polarité

La catéchine ou la quercétine sont de classe de solubilité « S2 » (soluble à 3,3 % dans l'eau mais pas dans le diéthyléther ; Schriener *et al.*, 1998), tandis que les stilbènes et les prénylchalcones appartiennent plutôt à la classe « S1 » (soluble dans les deux milieux). Par conséquent, le diéthyléther peut être utilisé pour délipider une matrice contenant des flavanoïdes ou des flavonols, alors que des solvants tels que le cyclohexane ou le toluène seront nécessaires lorsque l'on étudie le xanthohumol ou le resvératrol. Le CO<sub>2</sub> supercritique est une alternative intéressante pour éliminer les composés hydrophobes sans perdre de polyphénols.

Counet et Collin (2003) ont montré qu'un mélange acétone/eau/acide acétique (70/28/2, v/v) était optimal pour l'extraction des flavanoïdes, surtout s'il s'agissait d'oligomères. Quand le méthanol est utilisé, il est déconseillé d'y ajouter de l'eau. Jerumanis (1969) suspecte une dépolymérisation des proanthocyanidines en présence de méthanol. Des solvants de polarité analogue sont généralement employés pour récupérer les flavonols et les prénylflavonoïdes.

Étonnamment, malgré sa polarité plus faible, le resvératrol est mieux extrait par un mélange éthanol/eau (80/20, v/v, 60 °C) que par un mélange acétone/eau (Callemien *et al.*, 2005).

Pour les anthocyanidines, le méthanol acidifié (1 % HCl) et l'acétone aqueux (70/30) sont les solvants les plus fréquemment utilisés. Le second semble toutefois préférable pour éviter la formation de pyrano-anthocyanidines (Lu et Foo, 2001).

Les solvants non miscibles à l'eau n'extraient pas très bien les flavonoïdes (Zhao *et al.*, 2006). L'acétate d'éthyl et la butan-2-one ont été testés par quelques auteurs (Jerumanis, 1968 ; Jerumanis, 1985 ; Noël *et al.*, 1999b ; Owades *et al.*, 1958a ; Owades *et al.*, 1958b). De manière générale, pour l'étude d'une phase aqueuse, il est préférable d'utiliser des cartouches d'extraction en phase solide (SEP PACK C18, Sephadex LH20, Sephadex G25, polyamide ou nylon 66). Un lavage à l'eau est généralement effectué avant l'élution des polyphénols par l'éthanol (pour les flavonols), le méthanol (pour les monomères de flavan-3-ols), ou l'acétone (pour les oligomères de proanthocyanidines), éventuellement mélangés avec un faible pourcentage d'eau et d'acide.

Les solvants apolaires sont par contre recommandés pour récupérer sélectivement les acides tanniques de haut poids moléculaire. C'est ainsi qu'en utilisant l'acétate d'éthyl, il est possible de concentrer un extrait de gallotannins à raison de plus de 50 % avec les fractions contenant plus de sept unités galloyles (Tian *et al.*, 2009).

Les arômes dérivés des acides hydroxycinnamiques sont quant à eux habituellement extraits par des solvants apolaires tels que le chloroforme, le diéthyléther ou le Fréon 11. Des résines apolaires de type XAD-2 (élution avec du diéthyléther) peuvent également être employées.

#### **b) Extraction des polyphénols sur base de leur acidité**

Avec leur pKa proche de 10, il est possible de faire passer les phénols de la phase aqueuse vers le solvant organique, ou l'inverse, selon le pH (Callemien et Collin, 2009 ; Milligan *et al.*, 2002 ; Stevens et Page, 2004). Ceci peut être très intéressant lorsque l'on veut séparer les phénols d'intérêt d'autres molécules de même polarité.

Une acidification à température plus élevée est parfois utilisée pour libérer certaines formes phénoliques liées (acides hydroxybenzoïques ou hydroxycinnamiques, flavonols) (Garcia *et al.*, 2004 ; Hayes *et al.*, 1987 ; Kenyhercz et Kissinger, 1977 ; McMurrough, 1981 ; McMurrough *et al.*, 1982 ; Nardini et Ghiselli, 2004 ; Vanbeneden *et al.*, 2006b ; Vancaenenbroeck *et al.*, 1983).

Pour les proanthocyanidines, l'acidification du mélange acétone/eau augmente l'extractibilité (Kantz et Singleton, 1990 ; Prior et Gu, 2005 ; Whittle *et al.*, 1999).

Beaucoup de polyphénols sont hélas instables à des pH extrêmes. Une dégradation est souvent observée à des valeurs proches de 6 (autooxydation) ; les produits de dégradation sont des dimères de type A (flavan-3-ols doublement liés par un lien C4-C8 et un lien éther entre C2 et C7) (Zhu *et al.*, 2002). Un pH trop bas est à déconseiller pour l'étude des glycosides (flavanols, flavanoïdes ou stilbènes). De plus, les oligomères de procyanidines sont connus pour se dépolymériser à pH inférieur à 4 (la procyanidine B2 libère de l'épicatéchine et un isomère de type B5) (Zhu *et al.*, 2002). À des valeurs de pH en dessous de 4, des oxydations enzymatiques peuvent également prendre place, donnant des dimères liés par liaisons interflavoniques C-O (Guyot *et al.*, 1996).

Le *trans*-resvératrol est stable en absence de lumière sur une gamme de pH allant de 1 à 7. À pH 10, des pertes importantes peuvent être observées. Pour le *cis*-resvératrol, il est préférable de travailler à pH 7 (Trela et Waterhouse, 1996).

### c) Extraction des polyphénols sur base de leur volatilité

Les arômes appartenant à la famille des phénols volatils peuvent être extraits d'une matrice complexe par distillation sous vide, par « headspace » (statique, dynamique, « purge and trap », SPME...) ou par un appareillage de type Likens-Nickerson (Fickert et Schieberle, 1998 ; Fritsch et Schieberle, 2003 ; Schieberle, 1991 ; Steinhaus et Schieberle, 2000).

Les flavanoïdes, les stilbènes et les chalcones ne sont par contre pas assez volatils pour être extraits de cette manière. Toutefois, ils peuvent le devenir après dérivatisation. Ainsi, le resvératrol a été analysé par SPME après dérivatisation au BSTFA (bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide) (Jerkovic *et al.*, 2008 ; Luan *et al.*, 2000).

### d) Extraction des polyphénols sur base de leur taille

Diverses méthodes ont été développées pour étudier les polyphénols de plus grandes tailles. La dialyse (avec différents cut-offs) peut être exploitée pour séparer les gros oligomères de proanthocyanidines de plus petits analogues. La chromatographie d'exclusion (SEC) ou perméation sur gel (GPC, par exemples Sephadex LH20 ou colonnes HW40) permet un fractionnement selon le poids moléculaire (Yanagida *et al.*, 1999, 2002, 2003).

### e) Autres méthodes

Des enzymes attaquant les polysaccharides permettent parfois d'améliorer le taux de récupération des polyphénols (Pinelo *et al.*, 2006). La température d'extraction est également un paramètre à optimiser (25-60 °C ; Andres-Lacueva *et al.*, 2000 ; Callemien *et al.*, 2005 ; Pinelo *et al.*, 2005). Une température de 60 °C permet ainsi d'accroître le rendement de récupération des stilbènes (Callemien *et al.*, 2005).

Pour certains phénols, on recommande de travailler à l'abri de la lumière (en particulier pour les stilbènes et les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques).

## 3. ■ Analyses chromatographiques

### a) Chromatographie gazeuse (GC)

La chromatographie en phase gazeuse est habituellement utilisée pour séparer les composés volatils tels que les dérivés d'acides hydroxycinnamiques. Les indices de rétention (calculés par comparaison aux temps de rétention des n-alcane) sur colonnes polaires et apolaires permettent de confirmer l'identification.

Les phénols moins volatils tels que les flavonols, les flavanoïdes, les prénylflavanones, ou les stilbènes doivent être dérivatisés avant injection en chromatogra-

phie gazeuse. La dérivation est également parfois employée pour augmenter la sensibilité de la détection en sortie de colonne (ex. : détecteur à capture d'électrons).

### b) Chromatographie liquide haute pression (HPLC)

L'HPLC est habituellement utilisée pour la séparation des polyphénols.

Les colonnes en phase inverse peuvent séparer presque tous les composés phénoliques. Des systèmes binaires d'élution sont préconisés : le solvant A est un milieu aqueux acidifié (acide acétique, acide phosphorique ou acide formique) et l'éluant B est un milieu organique moins polaire (méthanol, acétonitrile), éventuellement acidifié. Occasionnellement, certains auteurs ont utilisé des tampons. Pour les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques, des systèmes isocratiques peuvent être suffisants. En phase inverse, les composés les plus polaires éluent en premier lieu. Les dérivés de l'acide benzoïque éluent avant ceux de l'acide cinnamique. L'addition d'un sucre sur la structure diminue logiquement le temps de rétention (par exemple, l'acide chlorogénique élue avant l'acide caféique, la rutine avant la quercétine, le *trans*-picéide avant le *trans*-resvératrol), tandis qu'un groupement méthoxy retarde l'élution (par exemple, l'acide vanillique sort avant l'acide syringique). La catéchine élue avant l'épicatéchine. La catéchine est précédée par les trimères et les dimères de prodelphinidines et de procyanidines, mais suivie des dimères et des trimères contenant de l'épicatéchine (procyanidines B4, B2 et C1). Le recouvrement d'isomères lourds de même DP peut produire de larges pics (Guyot *et al.*, 1997).

Une phase normale est préférable si l'on souhaite regrouper les oligomères de même taille, jusqu'aux décimères (Counet et Collin, 2003 ; Gu *et al.*, 2003). Dans ce cas, l'ordre d'élution suit le degré de polymérisation. Un gradient tertiaire constitué de dichlorométhane, de méthanol, et d'acide acétique permet d'atteindre une bonne résolution (Gu *et al.*, 2003).

L'hydrolyse en milieu acide ou par une  $\beta$ -glucosidase permet l'identification des aglycones et des sucres isolés (McMurrough *et al.*, 1982 ; Vancaenenbroeck *et al.*, 1983).

Pour une meilleure identification des proanthocyanidines, de nombreux auteurs ont réalisé un clivage des liaisons interflavoniques en présence d'un réactif nucléophile tel que le toluène- $\alpha$ -thiol (Gu *et al.*, 2002 ; Gu *et al.*, 2003 ; Guyot *et al.*, 2001 ; Kennedy et Jones, 2001 ; Matthews *et al.*, 1997a) ou le phloroglucinol (McMurrough *et al.*, 1982 ; Vancaenenbroeck *et al.*, 1983), en milieu acide. Les unités d'extension combinées avec le nucléophile sont ainsi libérées. Seule l'unité terminale est détectée comme un flavan-3-ol libre. Les produits du phloroglucinol sont plus polaires que les structures originales, tandis que les additifs benzylmercaptopan éluent plus tard en phase inverse. La thiolysse est souvent recommandée en raison d'un meilleur rendement de dépolymérisation (Matthews *et al.*, 1997). Toutefois, la présence d'impuretés ou le stockage du réactif peuvent affecter le rendement de réaction (Guyot *et al.*, 2001). Le degré moyen de polymérisation

(mDP) peut être aisément calculé en rapportant le nombre d'unités terminales au nombre total.

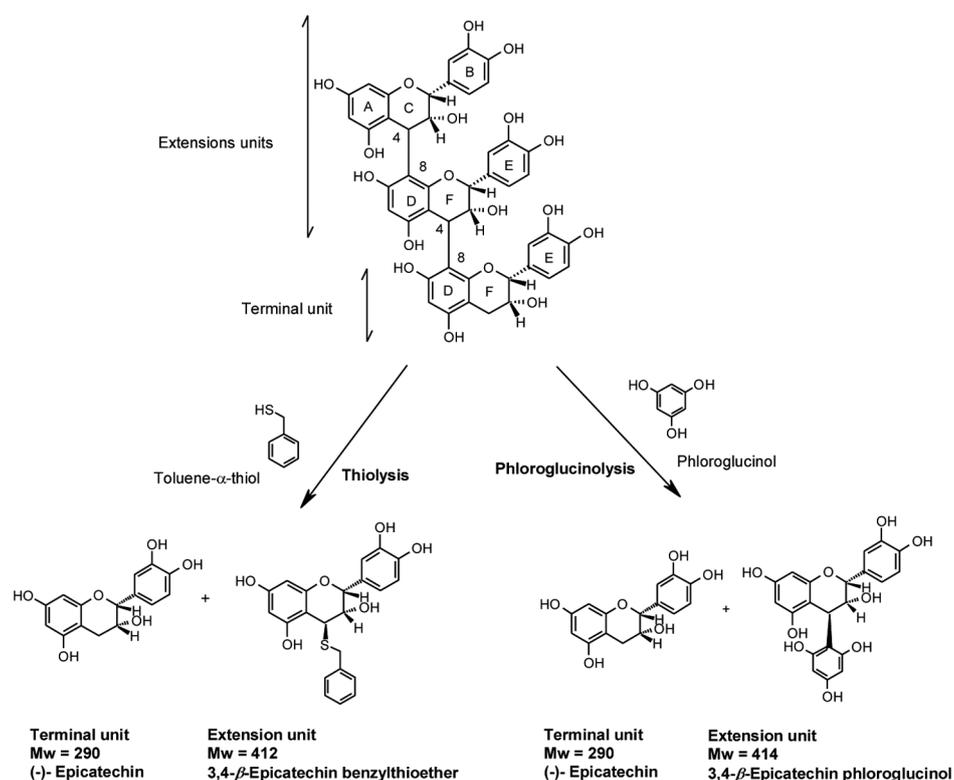


Figure 2.5. Dégradation des procyanidines par le phloroglucinol ou par thiolysé.

## 4. Détections sélectives

### a) Absorption UV et fluorimétrie (HPLC)

En sortie d'HPLC, les phénols peuvent être détectés par absorption UV ou par fluorimétrie.

Le spectre UV des proanthocyanidines présente deux maxima, le premier entre 200 et 240 nm, le second à 278-280 nm. Une troisième bande s'intercale entre les deux premières si un acide gallique est par exemple conjugué à la structure. Des substituants en position *ortho* ou *meta* génèrent un effet bathochrome (plus grand  $\lambda$ ). Quelle que soit la taille, on peut considérer en première approximation que le même poids de proanthocyanidines génère la même intensité d'absorption à 280 nm. Ceci se traduit par des coefficients d'extinction molaire croissants avec le degré de polymérisation (tableau 2.1). Un spectre asymétrique de part et d'autre des 280 nm indique généralement qu'il s'agit de polymères mixtes

procyanidines-prodelphinidines. La fluorescence peut également être utilisée pour quantifier les flavanoïdes ( $\lambda_{exc} = 276$  nm,  $\lambda_{em} = 316$  nm). La dérivation des flavanoïdes avec le *para*-diméthylaminocinnamaldéhyde permet une détection très sensible à 640 nm (McMurrough et McDowell, 1978).

Au sein des flavonoïdes, les flavonols sont habituellement quantifiés par absorption UV à 350 nm. Par ailleurs, les maxima d'absorption UV permettent aisément de distinguer les prénylchalcones ( $\lambda = 370$  nm) des flavanones ( $\lambda = 270$ - $295$  nm).

Les anthocyanidines, étant colorées, seront analysées dans le visible (tableau 2.2) (Awika *et al.*, 2004).

Les stilbènes sont quantifiables à 306 nm.

Les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques sont connus pour absorber à 254, à 280, à 306, et à 320-330 nm. Un analogue décarboxylé, le 4-vinylguaïacol, a été analysé par fluorescence ( $\lambda_{exc} = 259$  nm,  $\lambda_{em} = 341$  nm).

**Tableau 2.1.** Coefficients d'extinction molaire de procyanidines à 280 nm.

Composés	$\epsilon$ (l/mol.cm)	Solvant	Référence
(+)-Catéchine	3 300	méthanol	Oszmianski et Bourzeix, 1996
(-)-Epicatéchine	3 780	méthanol	Rohr <i>et al.</i> , 2000
Procyanidine B2	7 100	méthanol	Oszmianski et Bourzeix, 1996
Procyanidine B3	6 700	méthanol	Oszmianski et Bourzeix, 1996
Procyanidine B4	8 170	méthanol	Rohr <i>et al.</i> , 2000
Procyanidine B5	7 810	méthanol	Rohr <i>et al.</i> , 2000
Procyanidine C1	11 800 10 600	méthanol	Oszmianski et Bourzeix, 1996
Procyanidine C2	9 800	MeOH	Oszmianski et Bourzeix, 1996
Procyanidine A2	5 200	MeOH	Treutter, 1989

**Tableau 2.2.** Propriétés molaires et activités antioxydantes de standards d'anthocyanidines.

Standard	$\lambda$ max (pH 1)	$\epsilon$ (pH 1)
Lutéolinidine	482	31 700
Apigéninidine	468	30 400
Péonidine	516	27 200
Pélargonidine	506	28 100
Pélargonidine-3,5-diglycosine	498	28 800
Cyanidine	516	24 800
Cyanidine-3-glucoside	512	28 600
Cyanidine-3-rutinoside	514	26 100

### **b) Détection électrochimique (ECD-HPLC)**

L'ECD a été employé intensivement pour l'étude des acides hydroxybenzoïques, des acides hydroxycinnamiques, des flavonols et des flavanoïdes. Il s'agit d'un outil extrêmement sensible pour la caractérisation de ces antioxydants (bonne sensibilité et sélectivité beaucoup plus grande) (Madigan *et al.*, 1994).

### **c) Spectrométrie de masse (GC et HPLC)**

Les analyseurs de masse peuvent être des quadrapôles, des « ion trap », ou des systèmes à temps-de-vol. Diverses méthodes d'analyse existent comme le Full-MS, le SIM, le MS/MS ou le MRM. Pour des analyses quantitatives très sélectives, les modes SIM ou MRM sont recommandés tandis que le MS/MS apporte plus d'informations quant à la structure.

Les composés plus volatils tels que le 4-vinylguaiacol peuvent être ionisés en sortie de colonne GC par impact électronique (EI) ou par ionisation chimique (CI). Analysés par HPLC, les flavonoïdes et les stilbènes sont généralement soumis à une ionisation à pression atmosphérique. L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) est recommandée pour les composés apolaires de faible poids moléculaire tandis que l'ionisation de type électrospray (ESI) est préconisée pour les structures polaires de plus hauts poids moléculaires.

Autant l'ESI que l'APCI sont utilisés en mode positif pour l'étude des flavonols.

Pour les flavan-3-ols et les procyanidines, l'ESI est préférable. Des exemples de spectres MS/MS de monomères, dimères, trimères et tétramères, obtenus en mode négatif, seront discutés dans les chapitres 1 et 3. Récemment, la technique MALDI (+) a également été appliquée avec succès pour l'analyse des proanthocyanidines (Ramirez-Coronel *et al.*, 2004).

Les prénylchalcones et les flavanones ne peuvent pas facilement être distingués par EI, CI ou par APCI (+ ou -), en raison d'une isomérisation thermique dans la source des 2'-hydroxychalcones en leurs flavanones correspondants (Stevens *et al.*, 1997). L'information structurale est obtenue par fragmentation spécifique en mode MS/MS.

L'APCI en mode positif s'est avéré très performant pour l'analyse des stilbènes (Callemien *et al.*, 2005). Le lecteur trouvera le spectre MS/MS du resvératrol et du picéide dans le chapitre 1 dédié au cacao et au chocolat.

### **d) Olfactométrie (GC)**

Dans le cas des phénols volatils, la GC-olfactométrie est souvent utilisée comme premier détecteur. Juste en appliquant le nez humain à la sortie de la colonne GC, des traces de ces composés peuvent en effet être repérées au sein d'une multitude de composés inactifs. Pour obtenir des données quantitatives, des dilutions successives de l'extrait sont habituellement analysées (méthodes AEDA-Aroma Extract Dilution Analysis, Charm, ...).

## Références bibliographiques

- Andres-Lacueva C., Lamuela-Raventos R.M., Jauregui O., Casals I., Izquierdo-Pulido M. et Permanyer J.** An LC method for the analysis of cocoa phenolics. *LC-GC Europe*, **2000**, *13*, 902-904.
- Bishop L.R.** Analysis committee of the European brewery convention. Measurement of total polyphenols in worts and beers. *J Inst. Brew*, **1972**, *78*, 37-38.
- Callemien D., Jerkovic V., Rozenberg R. et Collin S.** Hop as an interesting source of resveratrol for brewers: Optimization of the extraction and quantitative study by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 424-429.
- Callemien D. et Collin S.** Structure, organoleptic properties, quantification methods and stability of phenolic compounds in beer – a review. *Food Reviews International*, **2009**, soumis.
- Chapon L., Chapon S., Seyer R. et Louis C.** Model experiments illustrating some aspect of the mechanism of formation of chill haze. *Proceedings of the X<sup>th</sup> European Brewery Convention*, **1975**, *5*, 423-438.
- Chapon L.** The mechanics of beer stabilisation. *Brewers' Guardian*, **1994**, *123*, 46-50.
- Counet C. et Collin S.** Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyanidin fractions isolated from chocolate. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 6816-6822.
- De Clerck J. et Jerumanis J.** Determination of polyphenols in brewery products. *Bulletin de l'Association Royale des Anciens Étudiants en Brasserie de l'Université de Louvain*, **1967**, *63*, 137-161.
- Delcour J.A. et Janssens de Varebeke D.** A new colorimetric assay for flavanoids in pilsner beers. *J Inst. Brew*, **1985**, *91*, 37-40.
- Fernandez M.T., Mira M.L., Florencio M.H. et Jennings K.R.** Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. *J. Inorg. Bioch.*, **2002**, *92*, 105-111.
- Fickert B. et Schieberle P.** Identification of the key odorants in barley malt (caramalt) using GC/MS techniques and odour dilution analyses. *Nahrung-Food*, **1998**, *42*, 371-375.
- Fritsch H. et Schieberle P.** Changes in key aroma compounds during boiling of unhopped and hopped wort. *Proceedings of the X<sup>th</sup> European Brewery Convention*, **2003**, 22-1-22/9.
- Garcia A.A., Grande B.C. et Gandara J.S.** Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. *J. Chromatogr. A*, **2004**, *1054*, 175-180.
- George S., Brat P., Alter P. et Amiot M.J.** Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 1370-1373.
- Gu L.W., Kelm M., Hammerstone J.F., Beecher G., Cunningham D., Vannozzi S. et Prior R.L.** Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 4852-4860.
- Gu L.W., Kelm M.A., Hammerstone J.F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D. et Prior R.L.** Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 7513-7521.
- Guyot S., Vercauteren J. et Cheynier V.** Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochem.*, **1996**, *42*, 1279-1288.
- Guyot S., Doco T., Souquet J.M., Moutounet M. et Drilleau J.F.** Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var kermerrien) skin and pulp. *Phytochem.*, **1997**, *44*, 351-357.

- Guyot S., Marnet N., Sanoner P. et Drilleau J.F.** Direct thiolysis on crude apple materials for high-performance liquid chromatography characterization and quantification of polyphenols in cider apple tissues and juices. *Flavanoids and other polyphenols. Methods in enzymology*, **2001**, 335, 57-70.
- Harris G. et Ricketts R.W.** Nonbiological hazes of beers. VIII. Rapid estimation of anthocyanogens in beer. *J. Inst. Brew.*, **1959**, 65, 331-333.
- Hayes P.J., Smyth M.R. et McMurrrough I.** Comparison of electrochemical and ultraviolet detection methods in high-performance liquid-chromatography for the determination of phenolic-compounds commonly found in beers. 2. Analysis of beers. *Analyst*, **1987**, 112, 1205-1207.
- Jerkovic V., Nguyen F., Timmermans A. et Collin S.** Stilbene extraction procedures for beer analysis. *Journal of the Institute of Brewing*, **2008**, 114 (2), 143-149.
- Jerumanis J.** Simplification and improvement of the method of total polyphenol determination in brewing. *Bulletin de l'Association Royale des Anciens Étudiants en Brasserie de l'Université de Louvain*, **1968**, 64, 223-240.
- Jerumanis J.** Polymerization of polyhydric phenols. *Bulletin de l'Association Royale des Anciens Étudiants en Brasserie de l'Université de Louvain*, **1969**, 65, 169-190.
- Jerumanis J.** Methods of determination of polyphenols in the brewery. *Bulletin de l'Association Royale des Anciens Étudiants en Brasserie de l'Université de Louvain*, **1973**, 69, 1-14.
- Jerumanis J.** Quantitative analysis of flavanoids in barley, hops and beer by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Inst. Brew.*, **1985**, 91, 250-252.
- Kantz K. et Singleton V.L.** Isolation and determination of polymeric polyphenols using Sephadex Lh-20 and analysis of grape tissue-extracts. *Am. J. Enology Viticulture*, **1990**, 41, 223-228.
- Kennedy J.A. et Jones G.P.** Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49, 1740-1746.
- Kenyhercz T.M. et Kissinger P.T.** A new approach to the phenolic components in beer. Application to the determination of sinapic, ferulic, and *p*-coumaric acids. *J. Agric. Food Chem.*, **1977**, 25, 959-961.
- Luan T.G., Li G.K. et Zhang Z.X.** Gas-phase postderivatization following solid-phase micro-extraction for rapid determination of *trans*-resveratrol in wine by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 424, 19-25.
- Madigan D., McMurrrough I. et Smyth M.R.** Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by high-performance liquid chromatography with dual-electrode electrochemical detection. *Analyst (Cambridge, United Kingdom)*, **1994**, 119, 863-868.
- McFarlane W.D.** Determination of anthocyanogens. *J. Inst. Brew.*, **1961**, 67, 502-506.
- McFarlane W.D. et Vader M.J.** Determination of anthocyanogens. II. Further studies on the analysis of beer. *J. Inst. Brew.*, **1962**, 68, 254-257.
- McMurrrough I. et McDowell J.** Chromatographic separation and automated analysis of flavanols. *Anal. Biochem.*, **1978**, 91, 92-100.
- McMurrrough I.** High-performance liquid chromatography of flavonoids in barley and hops. *J. Chromatogr. A*, **1981**, 218, 683-693.
- McMurrrough I., Henningan G.P. et Loughrey M.L.** Quantitative analysis of hop flavonols using high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **1982**, 30, 1102-1106.
- McMurrrough I., Madigan D. et Kelly R.J.** Evaluation of rapid colloidal stabilization with polyvinylpyrrolidone (PVPP). *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1997**, 55, 38-43.

- Milligan S., Kalita J., Pocock V., Heyerick A., De Cooman L., Rong H. et De Keukeleire D. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. *Reproduction*, **2002**, *123*, 235-242.
- Nardini M. et Ghiselli A. Determination of free and bound phenolic acids in beer. *Food Chem.*, **2004**, *84*, 137-143.
- Noël S., Metais N., Bonte S., Bodart E., Peladan F., Dupire S. et Collin S. (1999b) The use of Oxygen 18 in appraising the impact of oxidation process during beer storage. *J. Inst. Brew.*, **1999b**, *105*, 269-274.
- Oszmianski J. et Bourzeix M. Comparison of methods for determining the content and polymerization of procyanidines. *J. Food Nutr. Sciences*, **1996**, *5*, 43-50.
- Owades J.L., Rubin G. et Brenner M.W. Determination of food tannins by ultraviolet spectrophotometry. *J. Agric. Food Chem.*, **1958a**, *6*, 44-46.
- Owades J.L., Rubin G. et Brenner M.W. Determination of tannins in beer and brewing materials by ultraviolet spectrophotometry. *Proceedings of Am. Soc. Brew. Chem.*, **1958b**, 66-73.
- Porter L.J., Hrstich L.N. et Chan B.G. (1986) The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochem.*, **1986**, *25*, 223-230.
- Prior R.L. et Gu L.W. Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochem.*, **2005**, *66*, 2264-2280.
- Pinelo M., Arnous A. et Meyer A.S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, **2006**, *17*, 579-590.
- Pinelo M., Rubilar M., Jerez M., Sineiro J. et Nunez M.J. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 2111-2117.
- Sarkar S.K. et Howarth R.E. Specificity of the vanillin test for flavanols. *J. Agric. Food Chem.*, **1976**, *24*, 317-320.
- Schieberle P. Primary odorants of pale lager beer - differences to other beers and changes during storage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, **1991**, *193*, 558-565.
- Schriner R.L., Hermann C.K.F., Morrill, T.C., Curtin D.Y. et Fuson R.C. The systematic identification of organic compounds. Seventh edition John Wiley & Sons.
- Singleton V.L. et Rossi J.A., Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enology and Viticulture*, **1965**, *16*, 144-158.
- Singleton V.L., Orthofer R. et Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **1999**, *299*, 152-178.
- Steinhaus M. et Schieberle P. Comparison of the most odor-active compounds in fresh and dried hop cones (*Humulus lupulus* L. variety spalter select) based on GC-olfactometry and odor dilution techniques. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 1776-1783.
- Stevens J.F., Ivancic M., Hsu V.L. et Deinzer M.L. Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. *Phytochem.*, **1997**, *44*, 1575-1585.
- Stevens J.F. et Page J.E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! *Phytochem.*, **2004**, *65*, 1317-1330.
- Sun B.S., Ricardo-da-Silva J.M. et Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.*, **1998**, *46*, 4267-4274.
- Ramirez-Coronel M.A., Marnet N., Kuam Kolli V.S., Roussos S., Guyot S. et Augur C. Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 1344-1349.

- Rohr G.E., Meier B. et Sticher O.** *Studies in Natural Products Chemistry*, **2000**, *21*, 497-570.
- Tian F., Li B., Zhang G. et Luo Y.** Identification and structure-activity relationship of gallo-tannins separated from *Galla chinensis*. *Food Sci.Tech.*, **2009**, *42*, 1289-1295.
- Trela B.C. et Waterhouse A.L.** Resveratrol: Isomeric molar absorptivities and stability. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *44*, 1253-1257.
- Treutter D.** Chemical reaction detection of catechins and proanthocyanidins with 4-dimethylaminocinnamaldehyde. *J. Chromatogr. A*, **1989**, *467*, 185-193.
- Vanbeneden N., Delvaux F. et Delvaux FR.** Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, **2006b**, *1136*, 237-242.
- Vanraenenbroeck R., De Brackeleire C., Willems Y. et Devreux A.** Quantitative determination of flavonols in beer. *Cerevisia*, **1983**, *8*, 13-19.
- Whittle N., Eldridge H., Bartley J. et Organ G.** Identification of the polyphenols in barley and beer by HPLC/MS and HPLC/electrochemical detection. *J. Inst. Brew.*, **1999**, *105*, 89-99.
- Yanagida A., Kanda T., Shoji T., Ohnishi-Kameyama M. et Nagata T.** Fractionation of apple procyanidins by size-exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1999**, *855*, 181-190.
- Yanagida A., Shoji T. et Kanda T.** Characterization of polymerized polyphenols by size-exclusion HPLC. *Biosc. Biotech. Biochem.*, **2002**, *66*, 1972-1975.
- Yanagida A., Shoji T. et Shibusawa Y.** Separation of proanthocyanidins by degree of polymerization by means of size-exclusion chromatography and related techniques. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2003**, *56*, 311-322.
- Zhao H.F., Dong J.J., Lu J., Chen J., Li Y., Shan L.J., Lin Y., Fan W. et Gu G.X.** Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 7277-7286.
- Zhu Q.Y., Holt R.R., Lazarus S.A., Ensunsa J.L., Hammerstone J.F., Schmitz H.H. et Keen C.L.** Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 1700-1705.



## Propriétés des polyphénols

*Sonia Collin, Delphine Callemien et Vesna Jerkovic*

### 1. Arôme, goût et astringence

Les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques se caractérisent par des seuils de perception d'amertume ou d'astringence relativement élevés (supérieurs au ppm pour l'amertume et l'astringence - voir tableau 3.1) (Meilgaard, 1975). Leurs dérivés décarboxylés génèrent par contre des arômes phénolique/clou de girofle/fumé, avec un seuil de perception beaucoup plus faible (de l'ordre du ppb, tableau 3.2). Le 4-vinylguaiacol contribue, par exemple, à la spécificité des bières blanches belges (brassées avec du blé non malté) ainsi qu'à celle de la bière allemande Rauch et Weizen (brassée avec du blé malté) (Kieninger *et al.*, 1984 ; Narziss *et al.*, 1990 ; Schieberle, 1991 ; Wackerbauer et Kramer, 1982). Selon sa concentration, le 4-vinylguaiacol peut être à l'origine de notes pharmaceutiques désagréables (Wackerbauer *et al.*, 1978) ou au contraire d'agréables odeurs de clou de girofle (Tressl et Renner, 1975). Le 4-vinylphénol est par contre toujours associé à une déviance aromatique (Tressl et Renner, 1975).

L'amertume est perçue au niveau de la langue, alors que la perception d'astringence résulte du dessèchement de la muqueuse buccale (Siebert et Chassy, 2003 ; Gawel *et al.*, 2001 ; Guinard *et al.*, 1986 ; Thomas et Lawless, 1995). Elle n'est pas toujours perçue immédiatement (Guinard *et al.*, 1986) et augmente lors d'ingestions répétées (Courregelongue *et al.*, 1999). La salive contient des protéines

riches en proline qui lubrifient la bouche. Une large gamme de composés peuvent se lier à ces protéines tels que les sels de cations métalliques polyvalents, les agents de déshydratation, différents acides, et la majorité des polyphénols (Siebert et Chassy, 2003). Les acides phénoliques, les flavonoïdes, et probablement les stilbènes, peuvent être responsables de l'astringence. À notre connaissance, il n'y a pas de données disponibles dans la littérature concernant les capacités astringentes des prénylchalcones. Les seuils de perception des polyphénols se situent entre 1 et 50 ppm (Counet, 2004 ; Dadic et Belleau, 1973) (tableau 3.1).

Les sucres réduisent l'astringence des polyphénols (Siebert et Chassy, 2003 ; Valentová *et al.*, 2002), tandis que l'oxydation l'augmenterait en élevant le degré de polymérisation (DP) (Noble, 2002 ; Peleg *et al.*, 1999). Toutefois, si le DP devient trop élevé, des précipitations peuvent les rendre moins astringents. L'astringence est renforcée à faible pH (4,0-4,2 (Siebert, 2004)). François *et al.* (2006) mesurent pourtant une plus grande astringence dans une bière avec un pH proche de 5. Dans ce cas, le pH des échantillons tomberait dans la bouche à une valeur de 4,4 avant que les interactions polyphénol/protéine ne se produisent. En ce qui concerne l'effet de la température, l'astringence serait plus élevée à 21 °C qu'à 7 °C (Pangborn *et al.*, 1977). Une étude plus récente ne mentionne par contre pas de différences significatives (Valentová *et al.*, 2002).

Comme l'illustre le tableau 3.3, les descripteurs utilisés pour la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine sont tantôt liés à l'amertume, tantôt à l'astringence (Dadic et Belleau, 1973 ; Delcour *et al.*, 1984 ; Kielhorn et Thorngate, 1999 ; Robichaud et Noble, 1990 ; Thorngate et Noble, 1995).

**Tableau 3.1.** Propriétés organoleptiques et seuils de perception d'acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques, de flavonoïdes, de stilbènes et de gallotannins dans la bière \*, à 5 % d'éthanol aqueux \*\* (adapté de Dadic et Belleau, 1973) et dans l'eau \*\*\* (Counet, 2004) ou \*\*\*\* (Hofmann *et al.*, 2006).

Composés phénoliques	Caractéristiques organoleptiques	Seuil de perception (mg/L)
<b>Acides hydroxybenzoïques</b>		
Acide 4-hydroxybenzoïque	Amer	20 * et 2**
Acide protocatéchuique	Amer, astringent	> 50* et 5**
Acide gallique	Astringent	50* et 5**
Acide vanilique	Astringent	20* et 10**
Acide syringique	Amer	10* et 5**
Acide gentisique	Amer, astringent	20* et 2**
<b>Acides Hydroxycinnamiques</b>		
Acide <i>p</i> -coumarique	Astringent	50* et 5**
Acide cafféique	Astringent, amer	20* et 2**
Acide férulique	Astringent	20* et 10**
Acide sinapique	Amer, douce-amère	20* et 5**

© Lavoisier – La photocopie non autorisée est un délit

Composés phénoliques	Caractéristiques organoleptiques	Seuil de perception (mg/L)
<b>Flavonols</b>		
Quercétine	Amer	20* et 10**
Kaempférol	–	50* et 5**
Myricétine	–	10* et 10**
<b>Flavanoïdes</b>		
(+)-Catéchine	Amer, astringent	20*, 5**, 1***
(-)-Epicatéchine	Amer, astringent	1***
<b>Stilbènes</b>		
<i>trans</i> -Resvératrol	Amer, astringent	1***
<b>Gallotannins</b>		
Pentagalloyl glucose	Astringent	1,7 ****

**Tableau 3.2.** Propriétés organoleptiques et seuils de perception de divers composés phénoliques.

Composés phénoliques	Caractéristiques organoleptiques	Seuil de perception dans la bière (mg/l)
4-Vinylguaiacol	Clou de girofle, phénol, amer	0,25* ; 0,30** et ***
4-Ethylguaiacol	Clou de girofle, phénol, doux	0,13* et **
4-Méthylguaiacol	Médicament, brûlé	0,20*
Guaiacol	Phénol, brûlé	0,70*
Eugénol ou 4-Allylguaiacol	Clou de girofle, dentiste, désinfectant	0,20*
Isoeugénol ou 4-Propénylguaiacol	Clou de girofle, dentiste, désinfectant	0,10*
Vanilline	Vanille	0,50*
Acétovanillone	Vanille	0,50*
4-Vinylphénol	Phénol, amer, astringent	0,20*
4-Ethylphénol	Crésol	0,10*
4-Méthylphénol	Médicament, phénol	0,20*
Phénol	Phénol, crésol	0,30*
4-Vinylsyringol	Fumé, brûlé	0,50*
4-Ethylsyringol	Fumé, brûlé	0,50*
4-Méthylsyringol	Fumé, brûlé	0,50*
4-Propylsyringol	Fumé, brûlé	0,50*
4-Allylsyringol	Fumé, brûlé	0,50*
4-Propénylsyringol	Fumé, brûlé	0,25*

Non déterminé,\* Wackerbauer *et al.*, (1982) ; \*\* Meilgaard (1975) ; \*\*\* Moll (1991).

Tableau 3.3. Descripteurs utilisés pour les flavan-3-ols.

	Matrice	Concentrations (ppm)	Perception	
			Amertume	Astringence
(+) -Catéchine	Vin	1200 <sup>a</sup>	+	-
		1500 <sup>b</sup>	-	+
	Eau	46 <sup>c</sup>	+	-
		100 <sup>d</sup>	+	-
Eau gazeuse	100 <sup>d</sup>	+	+	
(-) -Épicatéchine	Vin	900 <sup>f</sup>	+	+

+ : sensation perçue ; - : sensation non perçue ; a. Robichaud et Noble (1990), b. Kielhorn et Thorngate (1999), c. Delcour *et al.*, (1984), d. résultats de notre groupe non publiés, e. Dadic et Belleau (1973), f. Thorngate et Noble (1995).

## 2. Propriétés tannantes et instabilité colloïdale

À l'instar de l'astringence, l'instabilité colloïdale est due à des interactions entre les polyphénols et les protéines. La figure 3.1 présente quelques échelles établies pour la mesure du trouble.

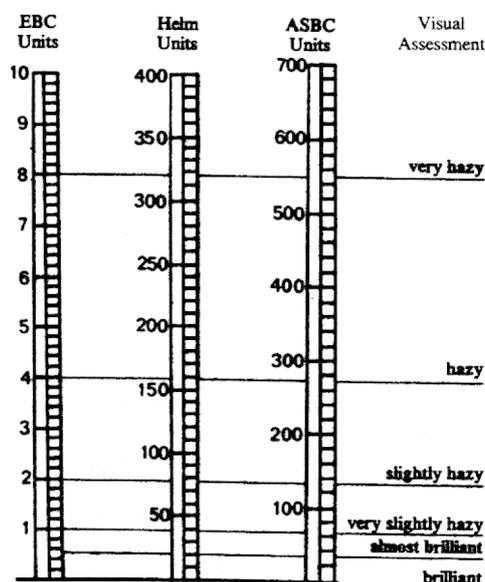


Figure 3.1. Équivalence des mesures du trouble dans une bière (1EBC = 4 NTU = 40 Helm = 69 ASBC).

Les monomères de flavan-3-ol n'induisent pas un trouble aussi intense que leurs polymères (tableau 3.4). Parmi les dimères, la procyanidine B3 et, surtout, la prodelphinidine B3 sont particulièrement tannantes (McMurrough *et al.*, 1992 ;

McMurrough *et al.*, 1996a ; McMurrough *et al.*, 1996b ; Mulkay et Jerumanis, 1983). La procyanidine C2 (trimère) est encore plus active. Pour la génération du trouble, le degré de polymérisation semble être le facteur prédominant, bien plus que le nombre de groupements hydroxyls (Mulkay et Jerumanis, 1983).

Les acides phénoliques et les flavonols ne participent pas à la formation de trouble (Asano *et al.*, 1984 ; Eastmond et Gardner, 1974).

À notre connaissance, aucune donnée n'est actuellement disponible dans la littérature quant à la capacité des stilbènes, des prénylchalcones ou des dérivés flavanones à générer un trouble colloïdal.

L'affinité des gallotannins pour les protéines dépend principalement du nombre de groupements galloyls et du nombre de fonctions alcools du sucre non-estérifiées (He *et al.*, 2006a). Ainsi, le pentagalloyl glucose possède une plus grande capacité à générer un trouble que le tétragalloyl glucose (He *et al.*, 2006a). La précipitation des protéines par le pentagalloyl glucose est supérieure à 40 °C qu'à 20 °C (Hofmann *et al.*, 2006).

**Tableau 3.4.** Capacité de divers composés phénoliques à générer un trouble (Calle-  
mien *et al.*, 2009).

Composés phénoliques	Capacité à générer un trouble (EBC f.u.)
<b>Acides hydroxybenzoïques</b>	
Acide 4-hydroxybenzoïque	0
Acide protocatéchique	0
Acide gallique	0
Acide vanillique	0
Acide syringique	0
Acide gentsique	0
<b>Acides hydroxycinnamiques</b>	
Acide cafféique	0
Acide férulique	0
Acide chlorogénique	0
<b>Flavonols</b>	
Rutine ou Quercétine-3-O-rutinoside	0
<b>Flavanoïdes</b>	
(+)-Catéchine	0,02
(-)-Épicatéchine	0,42
Procyanidine B3	5,50
Prodelphinidine B3	18,20
Procyanidine C2	79,30
Proanthocyanidine tétramère	26,50
Proanthocyanidine pentamère	38,20

Lorsque les protéines et les polyphénols sont mis en présence dans un milieu tampon (Siebert *et al.*, 1996a ; Siebert *et al.*, 1996b), le trouble augmente, atteint un maximum puis décline au fur et à mesure que la concentration en composés actifs augmente. Le pH a également un impact énorme. Comme signalé pour l'astringence, le trouble est plus marqué à un pH de 4,0 qu'à un pH de 3,0 ou au-dessus de 4,2. À un pH de 4, l'éthanol, à faible concentration, provoque une légère réduction du trouble, l'inverse étant observé à des concentrations plus élevées (Siebert *et al.*, 1996a).

### 3. ■ Propriétés antioxydantes

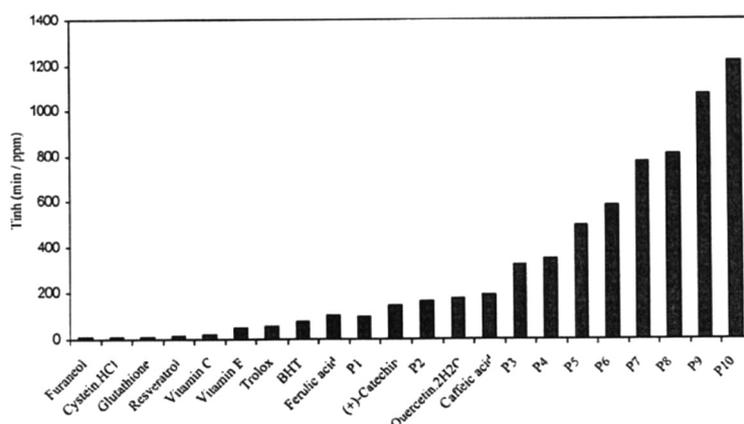
Les polyphénols peuvent réagir avec les espèces réactives de l'oxygène (anion superoxyde  $O_2^-$ ; radical hydroxyle  $OH\cdot$ ) pour produire des radicaux phénoxy stables. Ils peuvent aussi agir comme des antioxydants grâce à leur capacité à complexer les ions métalliques. Malheureusement, certains polyphénols ont également une action pro-oxydante par transfert d'électrons à des ions métalliques (Buggey, 2001).

Les flavan-3-ols sont des antioxydants très puissants. La capacité antioxydante des dimères de type B liés en 4-6 semble supérieure à celle de ceux liés en 4-8 (Wang *et al.*, 2000) ; les dimères de type A sont par ailleurs moins antioxydants que les dimères de type B (Plumb *et al.*, 1998). Les gallates et glycosides de proanthocyanidines montrent une activité antioxydante moindre en milieu lipidique qu'en milieu aqueux (Plumb *et al.*, 1998 ; Santos-Buelga et Scalbert, 2000).

Des données conflictuelles existent concernant l'effet du degré de polymérisation des flavan-3-ols. Pour certains auteurs, l'activité antioxydante par gramme de composé augmente avec le degré de polymérisation (mesures réalisées en dispersion aqueuse (Counet et Collin, 2003) et en système lipidique (Lotito *et al.*, 2000)). Ainsi, dans la figure 3.2, 1 g de trimère affiche une activité antioxydante 3 fois supérieure à 1 g de catéchine (Counet et Collin, 2003). Plumb *et al.* (1998) rapportent, par contre, une augmentation du pouvoir antioxydant lors du passage du monomère au trimère, mais une chute pour le tétramère. En milieu lipidique, ces auteurs observent une diminution régulière du pouvoir antioxydant avec l'augmentation du degré de polymérisation. Récemment, Lu et Foo (2000) rapportaient une activité antioxydante moindre pour les oligomères supérieurs à 4 unités en milieu méthanolique.

Comme l'indique la figure 3.2, les flavonols (par exemple, la quercétine) et les acides hydroxycinnamiques (par exemple, l'acide caféique et l'acide férulique) sont également nettement plus puissants que l'acide ascorbique (vitamine C) comme inhibiteurs de l'oxydation forcée de l'acide linoléique en présence d'AAPH (dihydrochlorure de 2,2'-azobis (2-amidinopropane)) (Counet et Collin, 2003 ; Liégeois *et al.*, 2000).

Le resvératrol affiche dans ce même test une activité antioxydante moindre. Dans d'autres expériences, il s'est par contre révélé plus efficace à piéger les radicaux peroxy et hydroxyls que le BHT et les vitamines C et E, voire même que la catéchine (Soares *et al.*, 2003 ; Yilmaz et Toledo, 2004). Le *trans*-picéide présente une activité antioxydante plus faible que son aglycone (Baderschneider et Winterhalter, 2000 ; Kerem *et al.*, 2006).



**Figure 3.2.** Efficacité de dix fractions purifiées de procyanidines de chocolat et de douze antioxydants commerciaux (Counet et Collin, 2003). P1 à P10 = monomère à décimère.

Au sein des prénylchalcones, le xanthohumol, le desméthylxanthohumol et la 3'-géranylchalconaringénine protègent efficacement les LDLs d'une oxydation *in vitro*. Les prénylflavanones présentent par contre une activité antioxydante faible. Les chalcones non-isoprénylées et les flavanones agirait même en tant que pro-oxydants (Miranda *et al.*, 2000).

Au sein des gallotannins, une étude récente montre que l'activité antioxydante augmente avec le nombre de groupement galloyls (Tian *et al.*, 2009). Les données sont toutefois exprimées en  $\mu\text{mol/L}$ . Transformées en ppm, les efficacités sont relativement constantes.

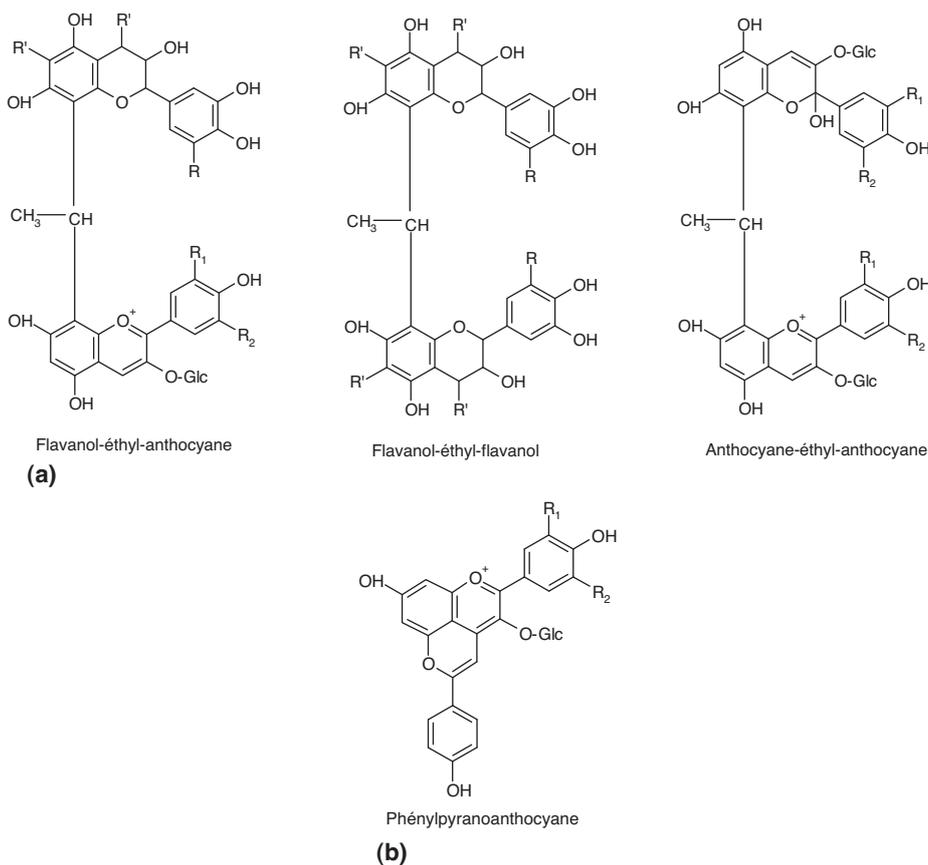
## 4. Couleur

Dans le vin, les polyphénols responsables de la couleur ont été beaucoup étudiés. En présence d'acétaldéhyde, la condensation entre les anthocyanes, déjà colorées à la base, et les flavanols génère des adduits liés par leur position 6 ou 8, par l'intermédiaire d'un pont méthylméthine, communément désigné par le terme de pont éthyle (figure 3.3a). Des réactions analogues ont été observées avec d'autres aldéhydes tels que l'acide glyoxylique, produit de l'oxydation de l'acide tartrique. Les pigments formés présentent des notes violettes ou bleutées. Ils sont

beaucoup plus résistants à l'hydratation ou à la décoloration par les sulfites que les anthocyanes natives. Des pigments orangés possédant une structure de type pyranoanthocyanane (figure 3.3b) peuvent également être formés au départ d'anthocyanes, en présence de vinylphénol. L'autooxydation des flavanols en présence d'acide glyoxylique génère par ailleurs des pigments jaunes identifiés comme des sels de xanthylum (figure 3.3c).

Dans le sorgho, des analogues de procyanidines ne possédant pas de fonction OH en position 3 (3-déoxyanthocyanidines) ont été exploitées comme colorants en raison de leur stabilité plus grande (tableau 3.5 et 2.2).

À pH 5-6, les déhydrodicatéchines de coloration jaune peuvent être formées au départ de catéchines (figure 3.4) (Guyot *et al.*, 1996 ; Young *et al.*, 1987). La formation de pigments jaunes est favorisée en présence de fer, mais leur structure dans ce cas diffère ( $Abs_{\text{en présence de fer}} = 440-460 \text{ nm}$  vs  $Abs_{\text{sans fer}} = 385-412 \text{ nm}$ ) (Oszmianski *et al.*, 1996).



**Figure 3.3.** Structure des (a) produits de réactions de flavanols et des anthocyanes avec l'acétaldéhyde ( $R = H, OH$  ;  $R' = H, \text{flavanyl}$  ;  $R_1 = OH, OCH_3$  ;  $R_2 = H, OH, OCH_3$ ), (b) pyranoanthocyanes ( $R_1 = OH, OCH_3$  ;  $R_2 = H, OH, OCH_3$ ) et (c) sels de xanthylum (ici sel issu de la réaction de la catéchine avec l'acide glyoxylique).

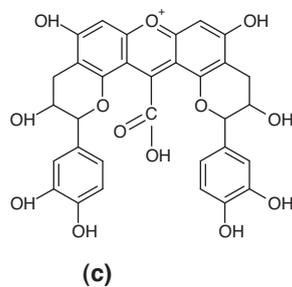


Figure 3.3. (Suite).

Tableau 3.5. Couleur des 3-déoxyanthocyanidines (adapté de Malien-Aubert *et al.*, 2006).

Noms	Couleur à pH < 1
Apigéninidine	Orange
Lutéolinidine	Orange
Tricétinidine	Rouge

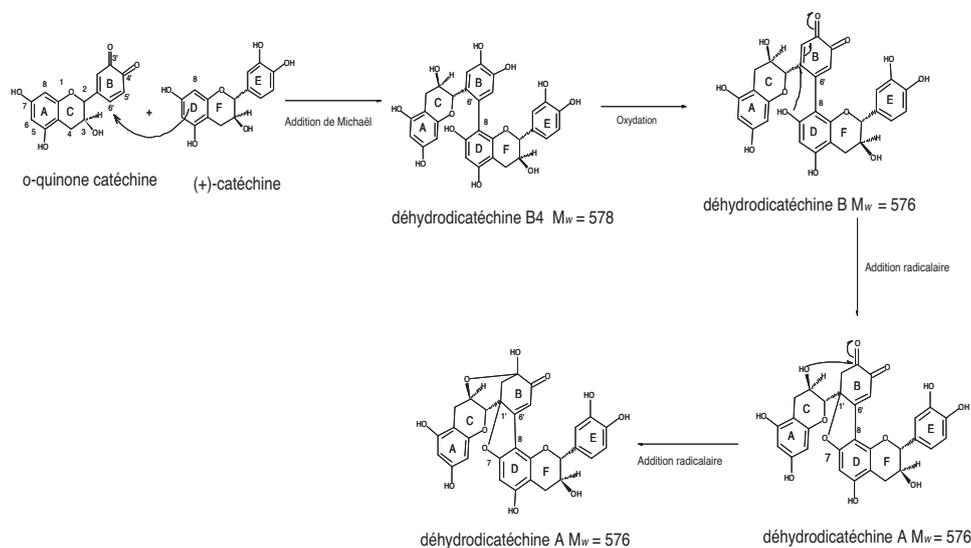


Figure 3.4. Proposition de schéma de dégradation de la (+)-catéchine pour former des composés incolores de masse 578 et des composés jaunes de masse 576 (Guyot *et al.*, 1996).

## 5. ■ Propriétés anti-fongiques et anti-bactériennes

Les stilbènes sont connus depuis longtemps pour leurs propriétés anti-fongiques. Le *trans*-resvératrol, par exemple, inhibe la germination de solutions de conidies de *Botrytis cinerea* à des concentrations entre 60 (25 % d'inhibition) et 160 mg/L (100 % d'inhibition) (Jeandet *et al.*, 2002).

Malgré leur structure semblable, les capacités anti-fongiques du resvératrol et de la pinosylvine sont très différentes. Si à une concentration de 50 mg/L, la pinosylvine inhibe bien le développement fongique, à la même teneur, le resvératrol favorise la croissance du champignon (Roupe *et al.*, 2006). Le ptérostilbène est également très fongi-toxique. La présence de chaînes isoprényles (comme chez les stilbénoides de l'arachide) augmente encore la toxicité de la molécule envers les champignons (Sobolev *et al.*, 2006).

L'activité anti-bactérienne intense (Salmonelles, *Bacillus cereus*) de gallotanins a récemment été mise en évidence par Tian *et al.* (2009).

Rauha *et al.* (2000) rapportent également une activité anti-bactérienne envers *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* pour la quercétine et la naringénine. Aucune activité anti-fongique n'est détectée pour ces composés (*Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*). La catéchine et l'épicatéchine ne montrent aucune activité anti-bactérienne excepté pour *Pseudomonas aeruginosa* (Mayer *et al.*, 2008). À l'inverse, les oligomères P2, P3, P4 ainsi que leurs dérivés gallates sont actifs contre l'ensemble des microorganismes testés (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus casilliflavus*, *Pneumococcus*) (Mayer *et al.*, 2008).

Parmi les acides phénoliques, l'acide cafféique, l'acide gallique et l'acide protocatéchique ne présentent qu'une légère activité anti-bactérienne envers *Pseudomonas aeruginosa* (Rauha *et al.*, 2000).

## 6. ■ Impact sur la santé

Bien que l'éthanol soit un des principaux responsables de cancers, la consommation modérée de vin rouge est connue pour avoir certains effets bénéfiques sur la santé. La diminution du nombre de maladies coronariennes observée chez les buveurs de vin, et ce malgré une alimentation très riche en graisses saturées, est communément appelée le « French paradox » (Renaud et Debord, 1992). Les polyphénols contribuent très probablement à cet effet protecteur (Frémont, 2000 ; Rimm *et al.*, 1996).

### a) Protection cardio-vasculaire

Les flavonols et les flavanoïdes sont à l'origine d'un effet cardioprotecteur via leurs effets antioxydants (protection contre l'oxydation des LDLs), l'inhibition de l'activité plaquettaire et leurs propriétés vasodilatatrices (Prior *et al.*, 2001 ; Santos-Buelga et Scalbert, 2000).

L'action protectrice de l'acide gallique serait également due à son activité antioxydante (piégeage des radicaux libres) (Priscilla et Prince, 2009). Le *trans*-resvératrol agit sur l'agrégation plaquettaire et la vasodilatation. En jouant sur le statut antioxydant, il régule par ailleurs l'expression génique et mène à une diminution de la concentration totale en lipides (cholestérol et triglycérides) (Delmas *et al.*, 2005). Bien que moins puissants, le *cis*-resvératrol et les *trans* et *cis*-picéide améliorent aussi la capacité antioxydante (Fauconneau *et al.*, 1997 ; Orallo, 2006). L'absorption du picéide est renforcée par la présence du sucre (Hollman, 1997).

### b) Activité anti-cancérigène

Le xanthohumol agit sur les trois stades de la cancérogenèse. L'isoxanthohumol, la 8-prénylnaringénine, et le xanthogalénol peuvent également exercer des effets chemopréventifs (De Keukeleire *et al.*, 2001 ; Gerhäuser *et al.*, 2002a ; Gerhäuser *et al.*, 2002b ; Gerhäuser, 2005 ; Stevens et Page, 2004). Le xanthohumol et l'isoxanthohumol sont tous les deux des piègeurs de ROS, alors que seul le premier est actif dans les essais de piégeage de superoxyde.

Le *trans*-resvératrol inhibe l'initiation et la croissance des tumeurs. Il inhibe la cyclo-oxygénase, l'ornithine décarboxylase, et l'angiogenèse (Aggarwal *et al.*, 2004 ; Baur et Sinclair, 2006). Le *trans*-picéide est un faible inhibiteur de la production de ROS (Jang *et al.*, 1999).

Très peu d'informations sont disponibles quant à la capacité des flavonols et des flavanoïdes à agir comme agent anticancérigène. Les flavanoïdes pourraient réduire le risque de cancer, bien que certaines activités procarcinogènes aient également été signalées (Prior et Gu, 2005 ; Santos-Buelga et Scalbert, 2000).

### c) Activité anti-inflammatoire

Les flavanoïdes altèrent la synthèse des éicosanoïdes (médiateurs de l'inflammation). Ils diminuent le rapport leucotriène/prostacycline en modifiant l'activité lipoxygénasique (Schewe *et al.*, 2002 ; Schramm *et al.*, 2001). Le *trans*-resvératrol montre des effets similaires (Baur et Sinclair, 2006 ; de la Lastra et Villegas, 2005).

### d) Activité œstrogénique

Les prénylflavanones ont surtout été étudiés pour leur activité œstrogénique. L'hopéine (8-prénylnaringénine) est un phyto-œstrogène très puissant. Les auteurs recommandent son application dans la prévention ou le traitement des symptômes de la (post)ménopause et de l'ostéoporose (De Keukeleire *et al.*, 2001 ; Milligan *et al.*, 1999 ; Stevens et Page, 2004). Une faible activité œstrogénique a

été observée pour de proches analogues : 6-prénylnaringénine, 8-géranylnaringénine, 6,8-diprénylnaringénine, et isoxanthohumol.

Les prénylchalcones comme le xanthohumol et le xanthogalénol montrent une faible activité (Milligan *et al.*, 2000).

Une activité œstrogénique a récemment été signalée pour certains stilbènes, tel que l'isomère *trans* du resvératrol (Baur et Sinclair, 2006).

## 7. Voies d'absorption, métabolisme et bio disponibilité

Certains polyphénols sont déjà susceptibles de se dégrader dans l'estomac (Spencer *et al.*, 2000 ; Zhu *et al.*, 2002). Les aglycones seront absorbés au niveau de l'intestin grêle. Les polyphénols présents dans les aliments sous forme d'esters, de glycosides ou de polymères ne peuvent être absorbés tels quels ; ils doivent être hydrolysés au préalable par des enzymes intestinales ou par la microflore du côlon (Manach *et al.*, 2006).

Dans les entérocytes et ensuite au niveau du foie, les polyphénols sont conjugués et forment des dérivés méthylés, sulfatés, glucuronides ou glucuronides-sulfatés (Manach *et al.*, 2006). Selon Santos-Buelga et Scalbert (2000), cette transformation des polyphénols en différents métabolites permet d'éviter la formation de quinones toxiques et facilite l'excrétion par augmentation de leur hydrophilicité (Manach *et al.*, 2006).

Ces dérivés sont soit transportés vers les tissus ou les reins, soit excrétés dans l'intestin (au niveau du duodénum) via la bile. Les polyphénols provenant de la bile du foie ainsi que ceux n'ayant pas été absorbés durant le transit gastro-intestinal peuvent encore être dégradés par la flore intestinale. Les métabolites microbiens sont alors absorbés et à nouveau transportés vers le foie créant un cycle entéro-hépatique. Finalement, les polyphénols seront excrétés par les urines ou les fèces. Selon Schramm *et al.* (2003), de 1 à 50 % des polyphénols ingérés peuvent être absorbés.

### a) Absorption

Chez l'homme, une ingestion de catéchine monomérique mène à un pic maximum de concentration dans le plasma après 1 à 2 heures (Aron et Kennedy, 2008 ; Wollgast et Anklam, 2000). Indépendamment de la dose ingérée, on retrouve 0,5 % des catéchines sous forme libre dans le plasma, 0,5 % dans les urines ; 25 % de la dose administrée est retrouvée sous forme de différents métabolites (cycle A intact). Pour les acides cafféique et férulique libres, les valeurs d'excrétion urinaire varient entre 5,9 et 27 % (Manach *et al.*, 2006). Dans le cas du resvératrol, le pic plasmatique est atteint après 30 à 60 minutes, quelle que soit la matrice (Goldberg *et al.*, 2003 ; Meng *et al.*, 2004 ; Walle *et al.*, 2004). Le resvératrol n'est pas plus biodisponible dans le vin que dans une boisson non

alcoolisée (Goldberg *et al.*, 2003 ; Soleas *et al.*, 2001a). La même conclusion peut être tirée concernant la co-administration de catéchine ou de quercétine (Soleas *et al.*, 2001b). Les taux plasmatiques observés sont en accord avec ceux déterminés pour la plupart des flavonoïdes et n'excèdent pas 1  $\mu\text{M}$  après consommation de 10-100 mg de composé (Juan *et al.*, 2002). Selon certains auteurs (Soleas *et al.*, 2001a), l'absorption intestinale du *trans*-resvératrol chez le rat serait saturable. Une augmentation de la dose au-delà d'un certain seuil stabiliserait les teneurs en métabolites alors que, dans le même temps, la concentration en resvératrol libre dans les urines augmenterait.

Les acides phénoliques sont souvent estérifiés. Ceci réduit de manière importante leur absorption puisque la muqueuse intestinale, le foie ou les fluides biologiques ne possèdent pas d'estérases. Seule la microflore colique peut réaliser cette hydrolyse (Manach *et al.*, 2006). Un transport actif dépendant du sodium a été décrit chez le rat pour les acides cinnamique et férulique (Manach *et al.*, 2006).

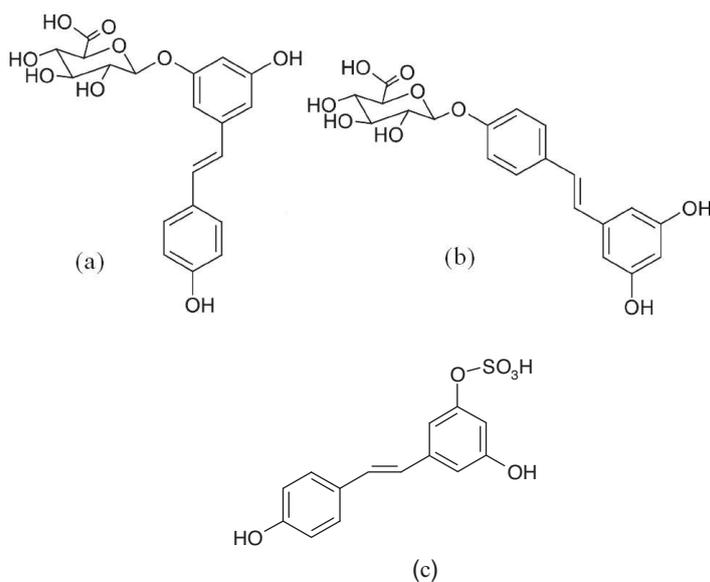
Selon Holleman (1997), le *trans*-picéide serait mieux absorbé au niveau de l'intestin que son aglycone. Henry *et al.* (2005) montrent pourtant que le transport du resvératrol se fait rapidement mais de manière passive alors que celui du picéide, plus lent, est de nature active (SLGT1, transporteur responsable de l'absorption du glucose). Les viniférines (oligomères de resvératrol) auraient une biodisponibilité très faible par manque de solubilité (Gonzalez-Barrio *et al.*, 2006). Henry-Vitrac *et al.* (2006) ont montré que l'étape clé du métabolisme du *trans*-picéide était l'hydrolyse du sucre par les  $\beta$ -glycosidases des micro-organismes du côlon.

Le resvératrol subit majoritairement la glucuronoconjugaison sur le groupement hydroxyl en position 4', cette glycosylation aboutissant à la formation d'un  $\beta$ -D-glucoside (Kaldas *et al.*, 2003 ; Kuhnle *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2003). Le resvératrol peut aussi se faire sulfoconjuguer (Kaldas *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2003) (figure 3.5). De la même manière, les groupements hydroxyles de la (+)-catéchine sont conjugués avec l'acide glucuronique ou un sulfate dans le foie. Une méthylation peut également s'y dérouler (Manach et Donovan, 2004). L'identification des métabolites n'a été réalisée que pour un nombre limité de polyphénols. Par exemple, dans l'urine humaine de même que chez le rat, le resvératrol monosulfate, les deux isomères de resvératrol glucuronide, le dihydroresvératrol monosulfate et le dihydroresvératrol monoglucuronide ont été identifiés (Urpí-Sarda *et al.*, 2005 ; Walle *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2005). Des études récentes montrent également que le picéatannol et le 3,4,5,4'-tétrahydroxystilbènes pourraient être des métabolites du resvératrol (Roupe *et al.*, 2006 ; Piver *et al.*, 2003 ; Potter *et al.*, 2002).

Les flavonoïdes présents dans les aliments sous forme de glucosides résistent habituellement au pH acide de l'estomac. Quelques rares glucosides tels que ceux de la quercétine peuvent être absorbés au niveau de l'intestin grêle. Tous les autres ne pourront être absorbés qu'au niveau du côlon, après hydrolyse en aglycones par les bactéries de la microflore. Dans le cas particulier des anthocyanes,

l'absorption pourrait se faire au niveau de l'estomac, grâce à la bilitranslocase (Manach *et al.*, 2006).

La nature polymérique des procyanidines limite fortement leur absorption intestinale. Les procyanidines B2 et B3 (dimères) ne sont pas ou peu absorbées chez le rat (Manach *et al.*, 2006). Des études sur des cellules Caco-2, modélisant l'absorption dans l'intestin grêle, ont révélé que les oligomères au-delà des dimères et des trimères ne pouvaient pas passer la barrière intestinale. Les procyanidines de 4 à 7 unités adhèrent à la surface des cellules (tests sur des cellules Caco-2), et ne seraient donc pas absorbées (Aron et Kennedy, 2008 ; Wollgast et Anklam, 2000). Elles pourraient toutefois être dégradées par la flore anaérobie du côlon en molécules de petite taille (dépolymérisation en unités catéchines) avant absorption (Aron et Kennedy, 2008). Dans le foie, elles seraient métabolisées (déhydroxylées, méthoxylées, conjuguées à des sulfates ou des glucuronides) à l'instar des autres flavonoïdes (Heilmann et Merfort, 1998 ; Santos-Buelga et Scalbert, 2000 ; Wollgast et Anklam, 2000).



**Figure 3.5.** (a) *trans*-resvératrol-3-glucuronide, (b) *trans*-resvératrol-4'-glucuronide et (c) *trans*-resvératrol-3-sulfate.

### b) Distribution

Les flavan-3-ols et les procyanidines non métabolisés sont retrouvés dans le tractus gastro-intestinal. Les dérivés sulfatés ainsi que les dimères (B1, B2, B3 et B4) et trimères (C2) de procyanidines sont, quant à eux, détectés dans les urines alors que seuls les métabolites glucuronides ou méthyl-glucuronides attei-

gnent le plasma, le foie et les reins. Aucune donnée ne montre que ces composés atteignent le cerveau (Aron et Kennedy, 2008).

Les stilbènes, tels que le resvératrol, sont détectés, en forte concentration, dans les organes d'absorption et d'élimination : tractus digestif, foie et reins (Bertelli, 1998 ; Roupe *et al.*, 2006 ; Soleas *et al.*, 2001a ; Vitrac *et al.*, 2003). L'administration intra-gastrique de resvératrol tritié à des rats mâles conduit également à la détection de radioactivité dans le cœur et la rate (Bertelli *et al.*, 1996 ; Soleas *et al.*, 2001a). Par contre, les concentrations pulmonaires ne sont pas significatives, les poumons n'étant ni un organe de détoxication, ni un tissu potentiellement cible pour le resvératrol (Asensi *et al.*, 2002 ; Bertelli *et al.*, 1996).

### c) Métabolisation

La méthylation des polyphénols est catalysée par la catéchol-O-méthyl transférase, présente dans de nombreux tissus. Sa plus forte activité est mesurée dans le foie et les reins. La méthylation a lieu essentiellement en position 3' sur le groupement catéchol du polyphénol bien qu'une faible proportion de dérivés 4'-O-méthylés puisse être produite (Manach *et al.*, 2006).

Les phénol-sulfotransférases catalysent le transfert d'un sulfate provenant de 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate sur un groupement hydroxyl du polyphénol. Le foie constitue le site principal de sulfatation des polyphénols (Manach *et al.*, 2006).

La glucuronidation des polyphénols est assurée par les UDP-glucosyltransférases retrouvées dans de nombreux tissus (Kaldas *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2003 ; Manach *et al.*, 2006).

### d) Élimination

Les métabolites conjugués de plus haute masse moléculaire sont principalement excrétés dans la bile, alors que ceux de plus faible masse moléculaire sont plutôt excrétés par voie urinaire (Manach *et al.*, 2006). Les bactéries intestinales possèdent des  $\beta$ -glucuronidases capables de libérer les aglycones des métabolites conjugués sécrétés dans la bile. Les aglycones peuvent donc être réabsorbés, entraînant un cycle entérohépatique (Manach *et al.*, 2006).

## Références bibliographiques

- Aggarwal B.B., Bhardwaj A., Aggarwal R.S., Seeram N.P., Shishodia S. et Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer : preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.*, **2004**, *24*, 2783-2840.
- Aron P. et Kennedy A. Flavan-3-ols : nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutri. Food Res.*, **2008**, *52*, 79-104.
- Asano K., Ohtsu K., Shinagawa K. et Hashimoto N. Turbidity formed in beer at low temperatures. Affinity of proanthocyanidins and their oxidation products for haze-forming proteins of beer and the formation of chill haze. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, **1984**, *48*, 1139-1146.

- Asensi M., Medina I., Ortega A., Carretero J., Bano M-C., Obrador E. et Estrela J-M.** Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. *Free Radical Bio. Med.*, **2002**, *33*, 387-398.
- Baderschneider B. et Winterhalter P.** Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from Riesling wine. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 2681-2686.
- Baur J.A. et Sinclair D.A.** Therapeutic potential of resveratrol : the *in vivo* evidence. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2006**, *5*, 493-506.
- Bertelli A.** Modulatory effect of resveratrol, a natural phytoalexin, on endothelial adhesion molecules and intracellular signal transduction. *Pharm. Biol.*, **1998**, *36*, 44-52.
- Bertelli A.A., Giovannini L., Stradi R., Urien S., Tillement J. et Bertelli A.** Kinetics of *trans*- and *cis*-resveratrol (3, 4', 5-trihydroxystilbene) after red wine oral administration in rats. *Int. J. Clin. Pharm. Res.*, **1996**, *16*, 77-81.
- Buggey L.A.** A review of polyphenolic antioxidants in hops, brewing and beer. *The Brewer International*, **2001**, *4*, 21-25.
- Callemien D. et Collin S.** Structure, organoleptic properties, quantification methods and stability of phenolic compounds in beer. A review. *Food Rev. Int.*, **2009**, sous presse.
- Counet C. et Collin S.** Effect of the number of flavanol units on the antioxidant activity of procyandin fractions isolated from chocolate. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 6816-6822.
- Counet C.** Détermination des structures chimiques des polyphénols du chocolat et étude de leurs principales propriétés fonctionnelles. *Thèse de l'Université catholique de Louvain (INBR, UCL, Belgium)*, **2004**.
- Courregelongue S., Schlich P. et Noble A.C.** Using repeated ingestion to determine the effect of sweetness, viscosity and oiliness in temporal perception of soymilk astringency. *Food Qual. Prefer.*, **1999**, *10*, 273-279.
- Dadic M. et Belleau G.** Polyphenols and beer flavors. *Proceedings of the American Society of Brewing Chemists*, **1973**, *4*, 107-114.
- De Keukeleire D., Milligan S.R., Kalita J., Pocock V., De Cooman L., Heyerick A., Rong H. et Roelens F.** Prenylated hop flavonoids are key agents in relation to health-beneficial properties of beer. *Proceedings of the 28<sup>th</sup> European Brewery Convention (Budapest), Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, Germany*, **2001**.
- De la Lastra C.A. et Villegas I.** Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent : mechanisms and clinical implications. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2005**, *49*, 405-430.
- Delcour J.A., Vanderberghe M.M., Corten P.F. et Dondeyne P.** Flavor thresholds of polyphenolics in water. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1984**, *35*, 134-136.
- Delmas D., Jannin B. et Latruffe N.** Resveratrol : preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2005**, *49*, 377-395.
- Eastmond R. et Gardner R.J.** Effect of various polyphenols on the rate of haze formation in beer. *J. I. Brewing*, **1974**, *80*, 192-200.
- Fauconneau B., Waffo-Teguo P., Huguet F., Barrier L., Decendit A. et Mérillon J.-M.** Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci.*, **1997**, *61*, 2103-2110.
- François N., Guyot-Declerck C., Hug B., Callemien D., Govaerts B. et Collin S.** Beer astringency assessed by time-intensity and quantitative descriptive analysis : influence of pH and accelerated aging. *Food Qual. Prefer.*, **2006**, *17*, 445-452.
- Frémont L.** Biological effects of resveratrol. *Life Sci.*, **2000**, *66*, 663-673.
- Gawel R., Iland P.G. et Francis I.L.** Characterizing the astringency of red wine : a case study. *Food Qual. Prefer.*, **2001**, *12*, 83-94.

- Gerhäuser C., Alt A., Heiss E., Gamal-Eldeen A., Klimo K., Knauff J., Neumann I., Scherf H.R., Frank N., Bartsch H. et Becker H. Cancer chemopreventive activity of xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol. Cancer Ther.*, **2002a**, *1*, 959-969.
- Gerhäuser C., Alt A., Klimo K., Knauff J., Frank N. et Becker H. Isolation and potential cancer chemopreventive activities of phenolic compounds of beer. *Phytochem. Rev.*, **2002b**, *1*, 369-377.
- Gerhäuser C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *Eur. J. Cancer*, **2005**, *41*, 1941-1954.
- Goldberg D., Yan J. et Soleas G. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin. Biochem.*, **2003**, *36*, 79-87.
- Gonzalez-Barrio R., Beltran D., Cantos E., Gil M., Espin J. et Tomas-Barberan F. Comparison of ozone and UV-C treatments on the postharvest stilbenoid monomer, dimer, and trimer induction in var. 'Superior' white table grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 4222-4228.
- Guinard J.X., Pangborn R.M. et Lewis M.J. Preliminary studies on acidity-astringency interactions in model solutions and solutions. *J. Sci. Food Agr.*, **1986**, *37*, 811-817.
- Guyot S., Vercauteren J. et Cheynier V. Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry*, **1996**, *42*, 1279-1288.
- He J., Santos-Buelga C., Silva A., Mateus N. et De Freitas V. Isolation and structural characterization of new anthocyanin-derived yellow pigments in aged red wines. *J. Agric. Food Chem.*, **2006a**, *54*, 9598-9603.
- He Q., Shi B. et Yao K. Interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars. *Food Chem.*, **2006b**, *95*, 250-254.
- Heilmann J. et Merfort I. Aktueller kenntnisstand zum metabolismus von flavonoiden. II. Resorption and metabolismus von flavonen, flavanonen, flavanen, proanthocyanidinen und isoflavanoiden. *Pharmazie in unserer Zeit*, **1998**, *27*, 173-183.
- Henry C., Vitrac X., Decendit A., Ennamany R., Krisa S. et Mérillon J-M. Cellular uptake and efflux of *trans*-piceid and its aglycone *trans*-resveratrol on the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, *53*, 798-803.
- Henry-Vitrac C., Desmouliere A., Girard D., Mérillon J-M. et Krisa S. Transport, deglycosylation, and metabolism of *trans*-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur. J. Nutr.*, **2006**, *45*, 376-82.
- Hofmann T., Glabasnia A., Schwarz B., Wisman K., Gangwer K. et Hagerman A. Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranose, castalagin and grandinin. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 9503-9509.
- Hollman P. Bioavailability of flavonoids. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **1997**, *51*, S66-S69.
- Jang D.S., Kang B.S., Ryu S.Y., Chang I.M., Min K.R. et Kim Y. Inhibitory effects of resveratrol analogs on unopsonized zymosan-induced oxygen radical production. *Biochem. Pharmacol.*, **1999**, *57*, 705-712.
- Jeandet P., Douillet-Breuil A-C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M. et 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.
- Juan M., Buenafuente J., Casals I. et Planas J. Plasmatic levels of *trans*-resveratrol in rats. *Food Res. Int.*, **2002**, *35*, 195-199.
- Kaldas M., Walle U. et Walle T. Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2003**, *55*, 307-312.

- Kerem Z., Bilkis I., Flaishman M. et Sivan L.** Antioxidant activity and inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by *trans*-resveratrol, piceid, and a novel *trans*-stilbene from roots of Israeli *Rumex bucephalophorus* L. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 1243-1247.
- Kieninger H., Narziss L., Miedaner H. et Hecht S.** Changes of quality-determining compounds in the preparation of Bavarian wheat beers. *Monatsschrift fuer Brauwissenschaft*, **1984**, *37*, 9-18, 55.
- Kielhorn S. et Thorngate J.H.** Oral sensations associated with the flavan-3-ols (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Food Qual. Prefer.*, **1999**, *10*, 109-116.
- Kuhnle G., Spencer J., Chowrimootoo G., Schroeter H., Debnam E., Srai S., Rice-Evans C. et Hahn U.** Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **2000**, *272*, 212-217.
- Li Y., Shin Y.G., Yu C., Kosmeder J., Hirschelman W., Pezzuto J. et van Breemen R.** Increasing the throughput and productivity of Caco-2 cell permeability assays using liquid chromatography-mass spectrometry: application to resveratrol absorption and metabolism. *Com. Chem. High T. Scr.*, **2003**, *6*, 757-67.
- Liégeois C., Lermusieau G. et Collin S.** Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 1129-1134.
- Lotito S.B., Actis-Goretta L., Renart M.L., Caligiuri M., Rein D., Schmitz H.H., Steinberg F.M., Keen C.L. et Fraga C.G.** Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, **2000**, *276*, 945-951.
- Lu Y. et Foo L.Y.** Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.*, **2000**, *68*, 81-85.
- Malien-Aubert C. et Amiot-Carlin M.-J.** Pigments phénoliques – structures, stabilité, marché des colorants naturels et effet sur la santé dans Les polyphénols en agroalimentaire. Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V., *Collection sciences et techniques Agro-alimentaires, TEC&DOC-Lavoisier*, **2006**, 295-333.
- Manach C. et Donovan J.** Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radical Res.*, **2004**, *38*, 771-785.
- Manach C., Scalbert A., Remesy C. et Morand C.** Consommation et biodisponibilité des polyphénols dans Les polyphénols en agroalimentaire. Sarni-Manchado, P. et Cheynier, V., *Collection sciences et techniques Agro-alimentaires, TEC&DOC-Lavoisier*, **2006**, 361-390.
- Mayer R., Stecher G., Wuerzner R., Colonia Silva R., Sultana T., Trojer L., Feuerstein I., Krieg C., Abel G., Popp M., Bobleter O. et Bonn G.K.** Proanthocyanidins : target compounds as antibacterial agent. *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 6959-6966.
- McMurrough I., Kelly R., Byrne J. et O'Brien M.** Effect of the removal of sensitive proteins and proanthocyanidins on the colloidal stability of lager beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1992**, *50*, 67-76.
- McMurrough I., Madigan D., Kelly R.J. et Smyth M.R.** The role of flavanoid polyphenols in beer stability. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1996a**, *54*, 141-148.
- McMurrough I., Madigan D. et Smyth M.R.** Semi-preparative chromatographic procedure for the isolation of dimeric and trimeric proanthocyanidins from barley. *J. Agric. Food Chem.*, **1996b**, *44*, 1731-1735.
- Meilgaard M.C.** Flavor chemistry of beer. II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. *Technical Quarterly - Master Brewers Association of the Americas*, **1975**, *12*, 5-13.
- Meng X., Maliakal P., Lu H., Lee M. et Yang C.** Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 935-942.

- Milligan S.R., Kalita J.C., Pocock V., Van de Kauter V., Stevens J.F., Deinzer M.L., Rong H. et De Keukeleire D.** The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **2000**, *85*, 4912-4915.
- Miranda C.L., Stevens J.F., Ivanov V., McCall M., Frei B., Deinzer M.L. et Buhler D.R.** Antioxidant and pro-oxidant actions of prenylated and non-prenyated chalcones and flavanones in vitro. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, *48*, 3876-3884.
- Moll M.** Beers & Coolers: definition, production, and composition. *Collection sciences et techniques Agro-alimentaires, Apria, TEC&DOC-Lavoisier*, **1991**.
- Mulkay P. et Jerumanis J.** Effect of molecular weight and the hydroxy groups in proanthocyanidins on the colloidal stability of beer. *Cerevisia*, **1983**, *8*, 29-35.
- Narziss L., Miedaner H. et Nitzsche F.** The formation of 4-vinylguaiacol during the manufacture of Bavarian wheat beers (Weizenbier). *Monatsschrift fuer Brauwissenschaft*, **1990**, *43*, 96-100.
- Noble A.C.** Astringency and bitterness of flavonoid phenols. Chemistry of taste : mechanisms. *ACS symposium series*, **2002**, 192-201.
- Orallo F.** Comparative studies of the antioxidant effects of *cis*- and *trans*-resveratrol. *Curr. Med. Chem.*, **2006**, *13*, 87-98.
- Oszmianski J., Cheynier V. et Moutounet M.** Iron-catalyzed oxidation of (+)-catechin in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, **1996**, *44*, 1712-1715.
- Pangborn R.M., Lewis M.J. et Tanno L.S.** Sensory quantification of bitterness and flavor of beer during storage. *J. I. Brewing*, **1977**, *83*, 244-250.
- Peleg H., Gacon K., Schlich P. et Noble A.C.** Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *J. Sci. Food Agr.*, **1999**, *79*, 1123-1128.
- Piver B., Berthou F., Dreano Y. et Lucas D.** Differential inhibition of human cytochrome P450 enzymes by [E]-viniferin, the dimer of resveratrol : comparison with resveratrol and polyphenols from alcoholized beverages. *Life Sci.*, **2003**, *73*, 1199-1213.
- Plumb G.W., Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Cheynier V. et Williamson G.** Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins : effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Res.*, **1998**, *29*, 351-358.
- Potter G., Patterson L., Wanogho E., Perry P., Butler P., Ijaz T., Ruparelia K., Lamb J., Farmer P., Stanley L. et Burke M.** The cancer preventative agent resveratrol is converted to the anticancer agent piceatannol by the cytochrome P450 enzyme CYP1B1. *Brit. J. Cancer*, **2002**, *86*, 774-778.
- Priscilla D.H. et Prince S.M.** Cardioprotective effect of gallic acid on cardiac troponin-T, cardiac marker enzymes, lipid peroxidation products and antioxidants in experimentally induced myocardial infraction in Wistar rats. *Chemico-Biological Intercations*, **2009**, *179*, 118-124.
- Prior R.L. et Gu L.W.** Occurrence and biological significance of proanthocyanidins in the American diet. *Phytochemistry*, **2005**, *66*, 2264-2280.
- Prior R.L., Lazarus S.A., Cao G., Muccitelli H. et Hammerstone J.F.** Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, *49*, 1270-1276.
- Rauha J.-P., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kähkönen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H. et Vuorela P.** Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbio.*, **2000**, *56*, 3-12.
- Renaud S. et Debord S.** Wine, alcohol, platelets and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **1992**, *339*, 1523-1526.

- Rimm E.B., Klatsky A., Grobbee D. et Stampfer M.J.** Review of moderate alcohol consumption and reduced risk of coronary heart disease: is the effect due to beer, wine, or spirits ? *Brit. Med. J.*, **1996**, *312*, 731-736.
- Robichaud J.L. et Noble A.C.** Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *J. Sci. Food Agr.*, **1990**, *53*, 343-353.
- Roupe K., Remsberg C., Yanez J. et Davies N.** Pharmacometrics of stilbenes : segueing towards the clinic. *Curr. Clin. Pharmacol.*, **2006**, *1*, 81-101.
- Santos-Buelga C. et Scalbert A.** Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agr.*, **2000**, *80*, 1094-1117.
- Schewe T., Kuhn H. et Sies H.** Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J. Nutr.*, **2002**, *132*, 1825-1829.
- Schieberle P.** Primary odorants of pale lager beer - differences to other beers and changes during storage. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, **1991**, *193*, 558-565.
- Schramm D.D., Karim M., Schrader H.R., Holt R.R., Kirkpatrick N.J., Polagruto J.A., Ensuna J.L., Schmitz H.H. et Keen C.L.** Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Sci.*, **2003**, *73*, 857-869.
- Schramm D.D., Wang J.F., Holt R.R., Ensuna J.L., Gonsalves J.L., Lazarus S.A., Schmitz H.H., German J.B. et Keen C.L.** Chocolate procyanidins decrease the leukotriene-prostaglandin ratio in humans and human aortic endothelial cells. *Am. J. Clin. Nutr.*, **2001**, *73*, 36-40.
- Siebert K.J.** pH and colloidal stability. *Proceedings of the XIth De Clerck Chair, Louvain-la-Neuve, Belgium*, **2004**.
- Siebert K.J., Carrasco A. et Lynn P.Y.** Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *J. Agric. Food Chem.*, **1996a**, *44*, 1997-2005.
- Siebert K.J. et Chassy A.W.** An alternate mechanism for the astringent sensation of acids. *Food Qual. Prefer.*, **2003**, *15*, 13-18.
- Siebert K.J., Troukhanova N.V. et Lynn P.Y.** Nature of polyphenol-protein interactions. *J. Agric. Food Chem.*, **1996b**, *44*, 80-85.
- Soares D., Andrezza A. et Salvador M.** Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol , and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, *51*, 1077-1080.
- Sobolev V., Deyrup S. et Gloer J.** New peanut (*Arachis hypogaea*) phytoalexin with prenylated benzenoid and but-2-enolide moieties. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 2111-2115.
- Soleas G., Angelini M., Grass L., Diamandis E. et Goldberg D.** Absorption of *trans*-resveratrol in Rats. *Methods Enzymol.*, **2001a**, *335*, 145-154.
- Soleas G., Yan J. et Goldberg D.** Measurement of *trans*-resveratrol, (+)-catechin, and quercetin in rat and human blood and urine by gas chromatography with mass selective detection. *Methods Enzymol.*, **2001b**, *335*, 130-145.
- Spencer J.P.E., Chaudry F., Pannala A.S., Srai S.K., Debnam E. et Rice-Evans C.** Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **2000**, *272*, 236-241.
- Stevens J.F. et Page J.E.** Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health ! *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 1317-1330.
- Thomas C. et Lawless H.** Astringent subqualities in acids. *Chemical Senses*, **1995**, *20*, 593-600.
- Thorngate J.M. et Noble A.C.** Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3 R(-)-epicatechin and 3S(+)-catechin. *J. Sci. Food Agr.*, **1995**, *67*, 531-535.

- Tian F., Li B., Ji B., Zhang G. et Luo Y.** Identification and structure-activity relationship of gallotannins separated from *Galla Chinensis*. *LWT-Food Sci. Technol.*, **2009**, *42*, 1289-1295.
- Tressl R. et Renner R.** Gas chromatographic-mass spectrometric study of some lactones in beer. *Monatsschrift fuer Brauerei*, **1975**, *28*, 195-197.
- Urpí-Sarda M., Jauregui O., Lamuela-Raventos R., Jaeger W., Miksits M., Covas M. et Andres-Lacueva C.** Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 3149-3155.
- Valentová H., Skrovankova S., Panovska Z. et Pokorny J.** Time-intensity studies of astringent taste. *Food Chem.*, **2002**, *78*, 29-37.
- Vitrac X., Desmoulière A., Brouillaud B., Krisa S., Deffieux G., Barthe N., Rosenbaum J. et Mérillon J-M.** Distribution of [<sup>14</sup>C]-*trans*-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. *Life Sci.*, **2003**, *72*, 2219-2233.
- Wackerbauer K., Kossa T. et Tressl R.** Phenol formation by yeasts. *Monatsschrift fuer Brauerei*, **1978**, *31*, 52-55.
- Wackerbauer K. et Kramer P.** Bavarian wheat beer - an alternative. Production and composition. *Brauwelt*, **1982**, *122*, 758-60, 762.
- Walle T., Hsieh F., DeLegge M., Oatis J. et Walle U.** High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab. Dispos.*, **2004**, *32*, 1377-1382.
- Wang J.N., Chen Y.J., Hano Y., Taro N. et Tan R.X.** Antioxidant activity of polyphenols from seeds of *Vitis amurensis* in vitro. *Acta Pharm. Sinic.*, **2000**, *21*, 633-636.
- Wang D., Hang T., Wu C. et Liu W.** Identification of the major metabolites of resveratrol in rat urine by HPLC-MS/MS. *J. Chromatogr. B*, **2005**, *829*, 97-106.
- Wollgast J. et Anklam E.** Polyphenols in chocolate : is there a contribution to human health. *Food Res. Int.*, **2000**, *33*, 449-459.
- Yilmaz Y. et Toledo R.T.** Major flavonoids in grape seeds and skins : antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, *52*, 255-260.
- Young D.A., Young E., Roux D.G., Brandt E.V. et Ferreira D.** Synthesis of condensed tannins. Phenol oxidative coupling of (+)-catechin and (+)-mesquitol - conformation of bis-(+)-catechins. *J. Chem. Soc. Perk. T. 1*, **1987**, 2345-2351.
- Zhu Q.Y., Holt R.R., Lazarus S.A., Ensunsa J.L., Hammerstone J.F., Schmitz H.H. et Keen C.L.** Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 1700-1705.

