



Les ellagitanins de bois de cœur de différentes espèces de chênes (*Quercus* sp.) et de châtaignier (*Castanea sativa* Mill.). Dosage dans les vins rouges élevés en barriques

Nicolas VIVAS^{1*}, Yves GLORIES²,
Guy BOURGEOIS³ et Christiane VITRY³

1 : Tonnellerie DEMPTOS détaché à la Faculté d'Œnologie, Université de Bordeaux II, 351 cours de la Libération, 33405 Talence (France) ;

2 : Laboratoire de chimie appliquée, Faculté d'Œnologie, Université de Bordeaux II ;

3 : Centre d'Étude Structurale et d'Analyse des Molécules Organiques (CESAMO), CNRS URA n°35, Université Bordeaux I, 351 cours de la Libération, 33405 Talence (France).

(Reçu après révision le 20 septembre 1995)

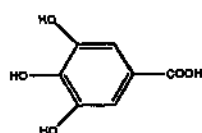
Résumé : Sur les bois de cœur de plusieurs espèces de chênes et d'un châtaignier, extraits par le mélange acétone/eau (7:3), sont estimés la teneur en extrait sec et les phénols totaux. En outre, nous avons dosé les ellagitanins en utilisant des méthodes spécifiques différentes : dosage par réaction avec l'acide nitreux, par dégradation acide et par dosage HPLC en phase inverse. L'étude a porté sur 3 chênes européens (*Q. robur*, *Q. petraea* et *Q. farnetto*), 3 chênes d'Amérique Centrale et du Nord (respectivement, *Q. oocarpa* et *Q. alba*, *Q. stellata*) et un châtaignier européen (*C. sativa*). Les dosages ont montré que l'extractible phénolique des diverses espèces est principalement représenté par les ellagitanins. La vescalagine et la castalagine sont retrouvées dans tous les échantillons et sont majoritaires. Les espèces européennes se caractérisent par la présence, en quantité variable, des 4 ellagitanins monomères (vescalagine, castalagine, grandinine et roburine E) et des 4 dimères (roburines A, D, B et C). Les espèces américaines n'ont pratiquement pas de dimères. Le châtaignier se distingue par l'absence de formes dimères et d'ellagitanins pentosylés. La comparaison des méthodes de dosage montre que le dosage HPLC donne des résultats toujours inférieurs aux deux autres méthodes. Nous interprétons cela par l'existence d'ellagitanins de structures inconnues et par la présence de combinaisons polysaccharides-ellagitanins non dosables par chromatographie en phase inverse. Enfin, l'application de la méthode de dosage, par dégradation acide, à des vins rouges, a permis de démontrer la présence d'ellagitanins dans les vins rouges élevés en barriques neuves. Les ellagitanins se solubilisent facilement au cours des premiers mois d'élevage. Mais ils disparaissent rapidement, en participant aux réactions d'oxydation. En effet, les formes oxydées des ellagitanins ne libèrent pas d'acide ellagique par hydrolyse acide. Ceci explique les faibles concentrations en ellagitanins retrouvées par certains auteurs dans les vins et les eaux-de-vie.

Mots-clefs : *Fagacea*, *Quercus* sp., *Castanea sativa*, ellagitanins, dosage, bois de cœur, barriques, vins rouges

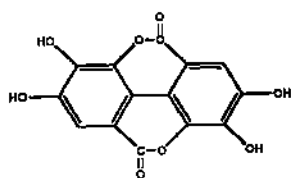
INTRODUCTION

Le chêne et le châtaignier appartiennent au groupe des angiospermes et à la famille des *fagacea*. Ces deux essences ont été largement utilisées en tonnellerie pour fabri-

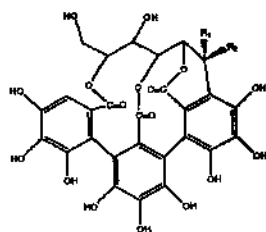
*pour toute correspondance



I - ac. gallique

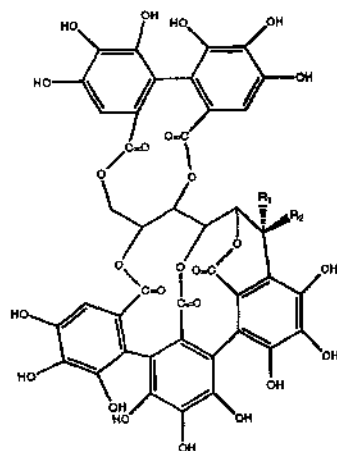


II - ac. ellagique



III - vescaline : R1 = H, R2 = OH

IV - castaline : R1 = OH, R2 = H

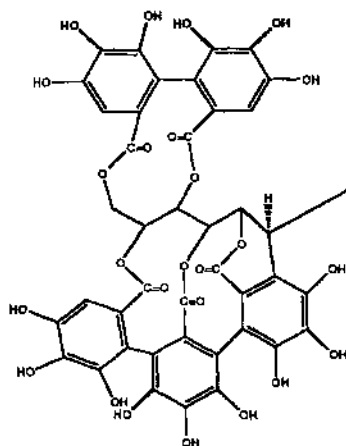


V - vescalagine : R1 = H, R2 = OH

VII - castalagine : R1 = OH, R2 = H

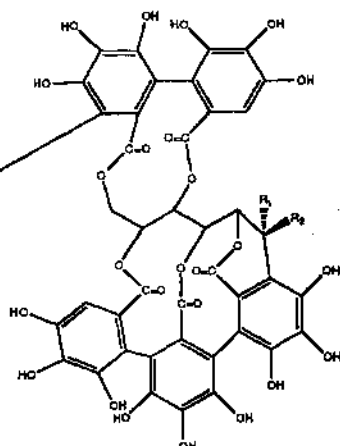
VII - granidine : R1 = H, R2 = Lyxose

VIII - roburine E : R1 = H, R2, Xylose



IX - roburine A : R1 = H, R2 = OH

X - roburine D : R1 = H, R2 = Lyxose



XI - roburine B : R1 = OH, R2 = H

XII - roburine C : R1 = H, R2, Xylose

Figure 1 — Structure des acides phénols (I, II) et des ellagitannins (III, XII) retrouvés dans les extraits de bois de cœur de chênes et de châtaignier

quer de la futaille destinée au transport, à la conservation des vins (TARANSAUD, 1976) et à la préparation de tanins œnologiques (VIVAS et al., 1993a). En Europe, c'est essentiellement les *Quercus robur* et *Q. petraea* de France et des Pays de l'Est, le *Q. farnetto* (*Q. conferta*) de Hongrie, le *Q. alba* des Etats-Unis et le *Castanea sativa* de France qui ont été principalement employés (TARANSAUD, 1976 ; KELLER, 1992 ; VIVAS, 1995). Actuellement, seuls *Q. robur*, *Q. petraea* et *Q. alba* sont encore couramment travaillés en tonnellerie et proviennent, pour les deux premiers, du massif forestier français et pour le second de la côte est des Etats-Unis. Le châtaignier n'est plus guère utilisé, cependant certains tonneliers continuent encore à l'employer soit pour faire des barriques 100 % châtaignier, soit des barriques mixtes châtaignier/chêne. Pour l'avenir, la recherche de nouvelles sources d'approvisionnement de bois de qualité est un élément important à prendre en compte, à la fois pour ménager nos régions d'approvisionnement très sollicitées, et pour fournir sur le marché des barriques de qualité dont le rapport qualité/prix reste raisonnable.

Les tanins du bois de cœur de nombreuses espèces de chênes (*Quercus* sp.) appartiennent principalement au groupe des tanins hydrolysables (HASLAM, 1981). Il comprend les gallotanins et les ellagitannins, libérant respectivement de l'acide gallique et de l'acide ellagique après hydrolyse acide. Dans le bois des chênes (*Q. petraea*, *Q. robur*) et de châtaignier (*Castanea sativa*), on retrouve majoritairement deux ellagitannins, dont deux isomères : la vescalagine et la castalagine (MAYER, 1971 ; SCALBERT et al., 1988 ; VIRIOT et al., 1994 ; VIVAS et al., 1995a). Plus récemment, des ellagitannins dimères et des formes pentosylées ont été décrits (NONAKA et al., 1989 ; HERVÉ du PENHOAT et al., 1991a ; HERVÉ du PENHOAT et al., 1991b) : il s'agit des roburines A, B, C, D, E et de la grandinine. Ces différentes structures sont portées sur la figure 1 et apparaissent constituées d'une chaîne glucosidique linéaire dont les OH sont estérifiés par les fonctions carboxyliques de groupes hexahydroxydiphéniques et nonahydroxytriphéniques. Ces différents ellagitannins sont hydrosolubles et passent rapidement en solution dans les milieux hydro-alcooliques tels que les vins et les eaux-de-vie (MOUTOUNET et al., 1989 ; VIRIOT et al., 1993). Leur oxydabilité (VIVAS et GLORIES, 1993, 1996) et leurs propriétés gustatives (POCOCK et al., 1994) leur confèrent un rôle non négligeable au cours de l'élevage des vins rouges (VIVAS et GLORIES, 1993 ; SINGLETON, 1995) et des eaux-de-vie (PUECH, 1987 ; VIRIOT et al., 1993) en fûts de chêne.

Dans les extraits de bois de chêne et dans les vins blancs conservés au contact du bois, l'identification par HPLC et le dosage global des ellagitannins par oxydation à l'acide nitreux (BATE-SMITH, 1972) ou après hydrolyse acide (PENG et al., 1991) sont relativement aisés (MOUTOUNET et al., 1989 ; SCALBERT et al., 1990 ; PUECH et al., 1992). En revanche dans les vins rouges, riches en composés phénoliques, ces différentes techniques n'ont pas été appliquées. La littérature, à notre connaissance, ne donne pas de données quantitatives sur les ellagitannins totaux présents dans les vins rouges élevés en barriques. La complexité du milieu rend impossible toute analyse HPLC par injection directe. De même, les interférences probables entre les polyphénols du vin et la réaction chimique de BATE-SMITH à l'acide nitreux ne permettent pas l'application de méthodes colorimétriques directes.

L'objet de cet article est de rappeler les différentes méthodes de dosage des ellagitannins et de mettre au point une technique de dosage adaptée aux vins rouges. Enfin, les méthodes sont appliquées à l'étude de la teneur en ellagitannins des bois de chêne de différentes espèces utilisées ou potentiellement utilisables en tonnellerie, ainsi que les quantités d'ellagitannins présents dans les vins rouges.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I - MATÉRIELS

1 - Produits de références

L'acide gallique, l'acide ellagique et la (+)-catéchine sont fournis par FLUKA™. La vescalagine et la castalagine sont isolées et purifiées à partir du duramen de *Q. robur*, dans les conditions décrites par VIVAS *et al.* (1995). Les différents roburines (A-E), la grandininine et le penta-galloylglucose nous ont été offerts gracieusement par SCALBERT (INA/INRA Thiverval-Grignon). La castaline et la pédonculagine nous ont été fournies par NONAKA (Université de Kyushu, Japon). Les extraits de pépins et les anthocyanes libres sont préparés d'après GLORIES (1978).

2 - Échantillons de chênes

Les échantillons de chênes sont constitués par le bois de cœur duraminisé d'arbres âgés de 110 à 150 ans, issus de massifs forestiers homogènes et convenablement entretenus. Le bois de cœur de châtaignier est issu d'arbres isolés. Seul le quart inférieur du tronc, constituant généralement le bois de tonnellerie, est utilisé pour l'étude. Le bois débité par fendage ou sciage est séché naturellement 24 mois. Les différents échantillons pris au hasard sur des piles de bois ($n = 10$) sont rabotés puis réduits en sciure par broyage dans l'azote liquide, avant d'être tamisés pour ne conserver que les particules de dimension inférieure à 60 mesh. Les échantillons sont conservés après lyophilisation pour être analysés dans un délai de 2 mois. Les différentes espèces étudiées sont : *Q. robur* (Limousin, France), *Q. petraea* (Allier, France), *Q. farnetto* (Hongrie), *Q. alba* (Missouri, USA), *Q. stellata* (Missouri, USA), *Q. oocarpa* (Costa Rica), *C. sativa* (Dordogne, France).

3 - Échantillons de vins

Les analyses sont réalisées sur un vin rouge de Cabernet Sauvignon élevé en barriques neuves (Allier, séchage naturel 18 mois, chauffe moyenne) pendant 2 ans. Les dosages sont également réalisés sur une série de vins de diverses provenances (Rioja, Espagne, vins rouges de Tempranillo ; St-Emilion et Médoc, France, vins de Merlot noir et de Cabernet Sauvignon).

II - EXTRACTION ET IDENTIFICATION DES ELLAGITANNINS DE CHÊNE ET DE CHÂTAIGNIER

Différents solvants d'extraction sont comparés : eau, éthanol/eau 5:5, éthanol, méthanol, méthanol/chloroforme 8:2, acétone/eau 7:3. Le solvant ayant le meilleur pouvoir extractif est retenu pour la suite du travail. 1 g de sciure (60 mesh) est extrait par 100 ml de solvant pendant 12 h à température ambiante ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) sur table d'agitation (150 rpm). L'extrait obtenu est ensuite filtré sur membranes 0,45 μm , lyophilisé et pesé.

100 µg d'extrait lyophilisé sont utilisés pour l'identification des ellagitanins majoritaires par LSIMS. Les spectres sont réalisés sur un VG-Autospec EQ, avec un canon au Cesium, en mode négatif, dans les conditions suivantes : calibration : sel d'iodate de césium entre 200 et 1500 Da, matrice : thioglycérol, énergie de bombardement : 35 keV, 2µA, température < 40°C, solubilisation de l'échantillon : méthanol anhydre.

Une deuxième fraction aliquote de l'extrait (1 mg) est reprise par le minimum de méthanol/eau (6:4) pour être analysée par HPLC couplée, par l'intermédiaire d'un diviseur de flux, à un détecteur UV et à un spectromètre de masse « LSIMS », selon le dispositif mis au point par VIVAS *et al.* (1995). La méthode de séparation HPLC est décrite dans le paragraphe suivant. Quelques modifications sont cependant apportées, d'une part, pour assurer une détection en LSIMS on doit rajouter dans les solvants d'élution 2 % de glycérol jouant le rôle de matrice, d'autre part, le volume injecté est augmenté (100 µl) pour améliorer la qualité des spectres enregistrés.

III - SÉPARATION ET DOSAGE DES ELLAGITANINS PAR HPLC

La technique chromatographique de séparation et de dosage des ellagitanins est conforme à la méthode mise au point par SCALBERT *et al.* (1990). Les extraits de bois sont analysés sur phase inverse sur une chaîne HPLC Beckman™ (pompes 126 et détecteur 167). La colonne est une ODS Ultrasphère™ (250 x 4,6 mm, dp : 4 µm). Le volume d'injection est de 20 µl. Le programme d'élution est conduit à débit constant (1 ml/min), il passe de 0 % de B à 10 % en 40 min, puis monte jusqu'à 100 % de B en 25 min (solvant A : H₂O/H₃PO₄ 990:1, solvant B : MeOH /acide phosphorique 990:1). La détection est conduite à λ 280 nm, la pureté chromatographique des pics, et la réalisation de spectres UV (220-300 nm) par un spectrophotomètre à barrette de diodes, sont gérées par le logiciel Gold 6™.

IV - DOSAGE DES ELLAGITANINS TOTAUX

1 - Estimation du taux de composés phénoliques totaux

L'estimation de la richesse des extraits de bois en composés phénoliques totaux est réalisée soit par la méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu, soit par la mesure de l'absorbance à D.O. 280 nm des extraits dilués au 1/100^e (VIVAS *et al.*, 1993). Ces deux méthodes donnent des résultats comparables mais non spécifiques des ellagitanins.

2 - Réaction d'oxydation à l'acide nitreux

Dans cette méthode proposée par BATE-SMITH (1972), les esters de l'acide hexahydroxydiphénique et du glucose sont oxydés par l'acide nitreux sous azote. La réaction conduit à une coloration bleue. On mélange à 1 ml de solution à doser 1ml de méthanol et 160 µl d'acide acétique à 6 %, puis on chasse l'oxygène par barbotage d'azote durant 10 min, on ajoute enfin 160 µl de nitrite de sodium à 6 % suivi d'un bref barbotage (1 min). Le tube est bouché hermétiquement et la réaction se développe en 60 min dans un bain-marie à 30°C. L'intensité de la couleur développée est mesurée à λ 600 nm. Les résultats sont estimés en mg/g ou mg/l d'équivalent castalagine (ε_{600nm} : 983 g⁻¹).

2 - Dégradation acide

La méthode proposée est adaptée de celle mise au point par PENG *et al.* (1991). Elle est basée sur l'hydrolyse acide des ellagitannins, au bain-marie, suivie d'un dosage par HPLC de l'acide ellagique libéré. 10 ml d'extrait de bois ou de vin sont évaporés à sec (évaporateur rotatif, 40°C) dans un tube à hydrolyse muni d'une fermeture téflon, le contenu est repris par 10 ml de méthanol/ac. chlorhydrique 6N (8,4:1,6). On dose l'acide ellagique présent, puis, après 2 heures d'hydrolyse acide (bain d'huile à 100°C), l'acide ellagique formé. La différence entre les deux valeurs correspond aux ellagitannins ayant libéré de l'acide ellagique. Le dosage HPLC est pratiqué avec le matériel décrit ci-dessus (programme d'élution : 0 à 100 % de B en 20 min, λ : 370 nm). Les résultats sont exprimés en mg/g ou mg/l d'équivalent castalagine, en considérant qu'une mole de castalagine donne, dans ces conditions, une mole d'acide ellagique (PENG *et al.*, 1991).

RÉSULTATS

I - EXTRACTION ET IDENTIFICATION DES PRINCIPAUX ELLAGITANNINS

Différents solvants ont été testés pour comparer leur capacité à solubiliser les composés extractibles du bois et en particulier les composés phénoliques. Les résultats sont identiques pour les chênes et le châtaignier étudiés ; seuls sont présentés, à titre d'exemples, les résultats obtenus pour *Q. robur* (figure 2).

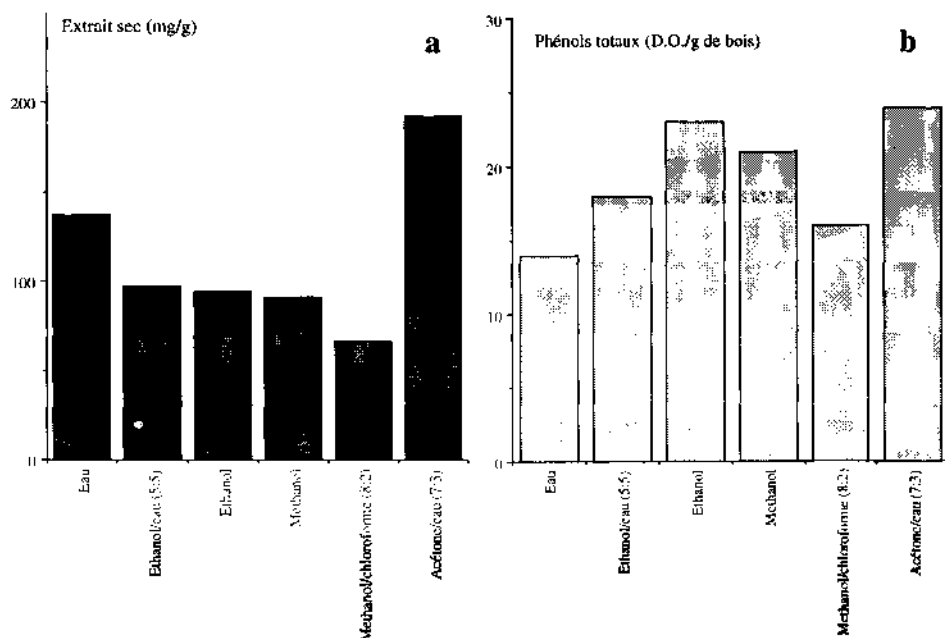


Figure 2 — Extraction des composés fixes (a) et des phénols totaux (b) du bois de cœur de *Q. robur* par différents solvants

Les solvants sont classés, en fonction de l'extrait sec : acétone/eau (7:3) > eau > éthanol/eau (5:5) ≥ éthanol = méthanol ≥ méthanol/chloroforme (8:2) et des phénols totaux: acétone/eau (7:3) ≥ éthanol ≥ méthanol > éthanol/eau (5:5) > méthanol/chloroforme (8:2) ≥ eau. L'eau et le mélange acétone/eau permettent d'isoler le plus de composés extractibles. Cependant, seul le solvant acétone/eau permet d'extraire, dans le même temps, un maximum de composés phénoliques solubles. L'extraction d'échantillons de bois par une solution hydroalcoolique de composition proche du vin (12 % vol. éthanol, 5 g/l d'acide tartrique, NaOH N qsp pH 3,5) donne des valeurs comparables aux extractions à l'eau (résultats non présentés). L'éthanol et le méthanol extraient peu de composés mais contiennent l'essentiel des phénols extractibles. Pour la suite du travail, le mélange acétone/eau est retenu.

L'analyse par LSIMS, pratiquée directement sur les extraits, permet d'identifier les composés majeurs des espèces étudiées (tableau 1). Dans tous les échantillons, nous retrouvons constamment comme acides phénols, l'acide gallique et l'acide ellagique, et comme ellagitannins, la vescalagine et la castalagine. Cependant la plupart des ellagitannins sont présents dans le mélange en trop faible quantité et ne peuvent pas être identifiés dans nos conditions. Il s'agit des monomères pentosylés et des dimères, qui n'ont été repérés avec certitude que chez *Q. petraea*, *Q. robur* et *Q. stellata* (monomères pentosylés) et dans *Q. farnetto* (dimères pentosylés). La figure 3 regroupe les spectres LSIMS de *Q. robur* et de *C. sativa* ; les spectres de *Q. robur* et de *Q. petraea* étant identiques, quel que soit l'échantillon. On note, sur les spectres, la présence des pics quasi moléculaires $[M-H]^-$ des acides phénols et des ellagitannins cités tableau 1, mais également le pic quasi moléculaire caractéristique de la vescaline et de la castaline (m/z : 632, $[M-H]^-$). Ces deux ellagitannins sont considérés comme des produits de l'hydrolyse de la vescalagine et de la castalagine (MOUTONNET *et al.*, 1989 ; VIRIOT *et al.*, 1994). Nous les avons retrouvés en quantité suffisante pour être détectés dans les extraits à l'eau et éthanol/eau.

Le couplage HPLC/LSIMS permet de confirmer l'attribution des pics, réalisée habituellement par comparaison des spectres UV et des temps de rétention (T_r) des molécules à identifier avec des produits purs de référence. A titre d'exemple, le chromatogramme d'un extrait de *Q. robur* et les spectres LSIMS enregistrés au sommet de quelques pics sont regroupés sur la figure 4. La concentration en roburines B et C est insuffisante pour obtenir un spectre clair. Bien que de faible concentration, il apparaît, aux T_r des roburines A et D, un pic qui se distingue du bruit de fond, à m/z : 1849 $[M-H]^-$. La présence de vescaline et de castaline est confirmée dans l'extrait aqueux. L'allure des chromatogrammes des extraits de bois de cœur analysés révèle des différences nettes (figure 5). D'après les profils, on distingue :

- le groupe des espèces présentant les 8 ellagitannins « Et » : *Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. farnetto* ;
- le groupe des espèces ne présentant que des monomères « Em » : *Q. oocarpa* ;
- le groupe des espèces présentant la vescalagine, la castalagine et des dimères de vescalagine « Ev » : *Q. stellata*, *Q. alba* et *C. sativa*.

Les profils chromatographiques sont identiques pour les échantillons d'une même espèce. Les différences qualitatives observées ont donc majoritairement une origine variétale au regard de l'hétérogénéité intraspécifique.

Tableau 1
Identification des principaux acides phénols et des ellagitannins du bois de cœur
des différentes espèces de chênes et de châtaignier par LSIMS en mode négatif

Molécules	M _w ⁺	Structure ⁺⁺	Echantillons				
			<i>Q. robur</i>	<i>Q. petraea</i>	<i>Q. farnetto</i>	<i>Q. alba</i>	<i>Q. stellata</i> <i>Q. oocarpa</i> <i>C. sativa</i>
Acides phénols							
Ac. gallique	170		+	+	+	+	+
Ac. ellagique	302		+	+	+	+	+
Ellagitannins							
<i>Monomères :</i>							
Vescalagine	934	V	+	+	+	+	+
Castalagine	934	C	+	+	+	+	+
Grandifoline	1066	VI	+	+	nd	+	nd
Roburine E	1066	Vx	+	+	nd	+	nd
<i>Dimères :</i>							
Roburine A	1850	VV	+	+	nd	nd	nd
Roburine D	1850	VC	+	+	nd	nd	nd
Roburine B	1932	VVI	nd*	nd	+	nd	nd
Roburine C	1932	VVx	nd	nd	+	nd	nd

*Masse moléculaire déterminée par LSIMS. **V : vescalagine - C : castalagine - I : lyxose - x : xylose - *nd : non détectable

Tableau 2
Comparaison des méthodes d'estimation de la teneur en ellagitannins.
 Les résultats sont donnés en g d'équivalent castalagine.

Solution	Composition	Quantité de produit (g de produit pesé)	Méthodes de dosage		
			IFC#	HPLCE	ac. nitreux ^o dégradation acides [§]
1	V*	1	0,8 (20 %)**	1	1,1 (10 %)
2	C*	1,1	1,0 (10 %)	1,08 (2 %)	1,0 (9 %)
4	V+C (0,6;0,5 ; p;p)	1,2	1,1 (8,3 %)	1,12 (6,7 %)	1,1 (8 %)
5	V+C (0,5;0,5 ; p;p)	0,24	0,33 (37,5 %)	0,240 (0 %)	0,226 (6 %)

*V : Vescalagine, C : Castalagine. **Ecart par rapport à la quantité de produit pesé. #I-C : Indice de Folin-Ciocalteu. § Dosage des ellagitannins par HPLC en phase inverse. ° Dosage des ellagitannins par la méthode à l'acide nitreux de BATE-SMITH (1972). § Dosage des ellagitannins totaux par dosage de l'acide ellagique formé après hydrolyse acide.

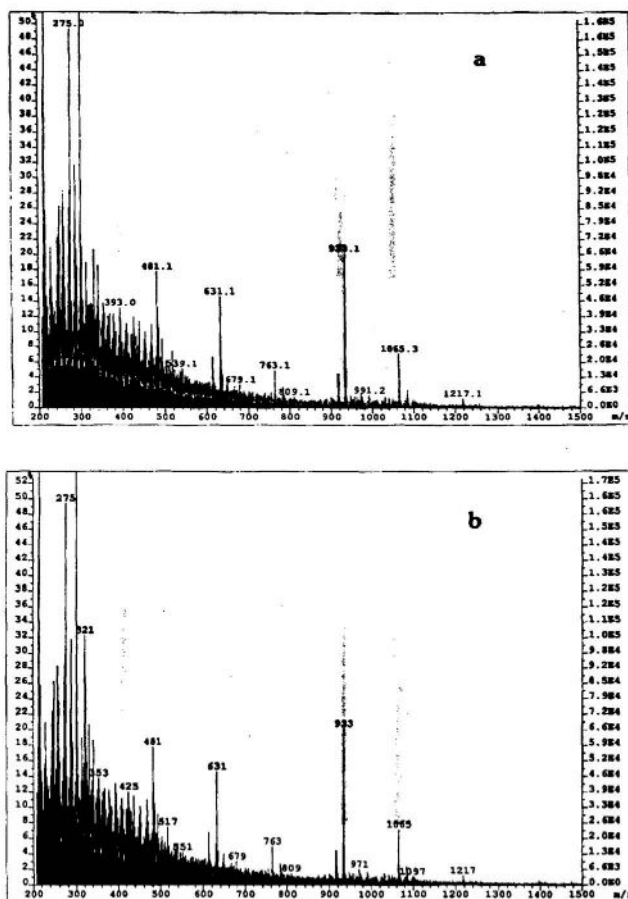


Figure 3 — Spectres LSIMS des extraits acétone/eau de *Q. robur* (a) et *C. sativa* (b).
Spectres enregistrés en mode négatif, entre 200 et 1500 Da, matrice thioglycérol

II - DOSAGE DES ELLAGITANINS DANS LES EXTRAITS DE BOIS DE CŒUR

1 - Comparaison des différentes méthodes de dosage des composés phénoliques et des ellagitannins totaux

Les méthodes de dosages retenues ont été appliquées à des solutions de vescalagine et de castalagine. Dans le tableau 2, on constate que les diverses méthodes conduisent à des résultats comparables en relation avec la quantité d'ellagitannins pesée. Les écarts par rapport à la valeur réelle restent inférieurs à 10 %. La méthode utilisant l'HPLC est la plus précise.

Les différentes méthodes ont servi ensuite à estimer la teneur en polyphénols solubles et en ellagitannins totaux des extraits de bois de cœur de chêne et de châtaignier. Les résultats sont regroupés sur le tableau 3.

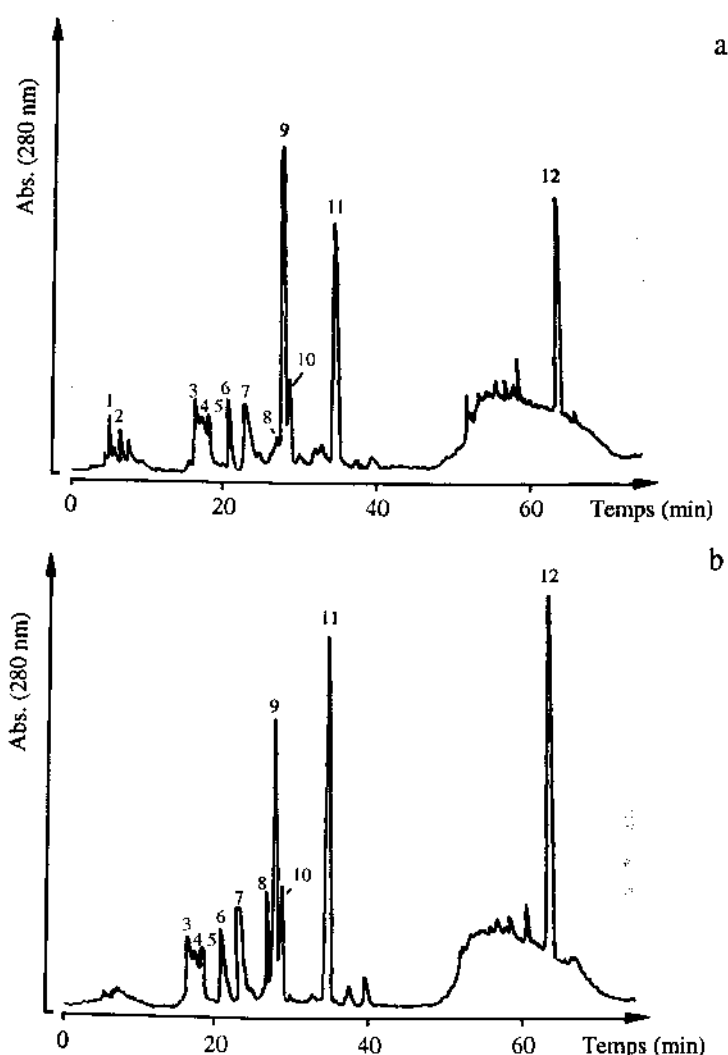
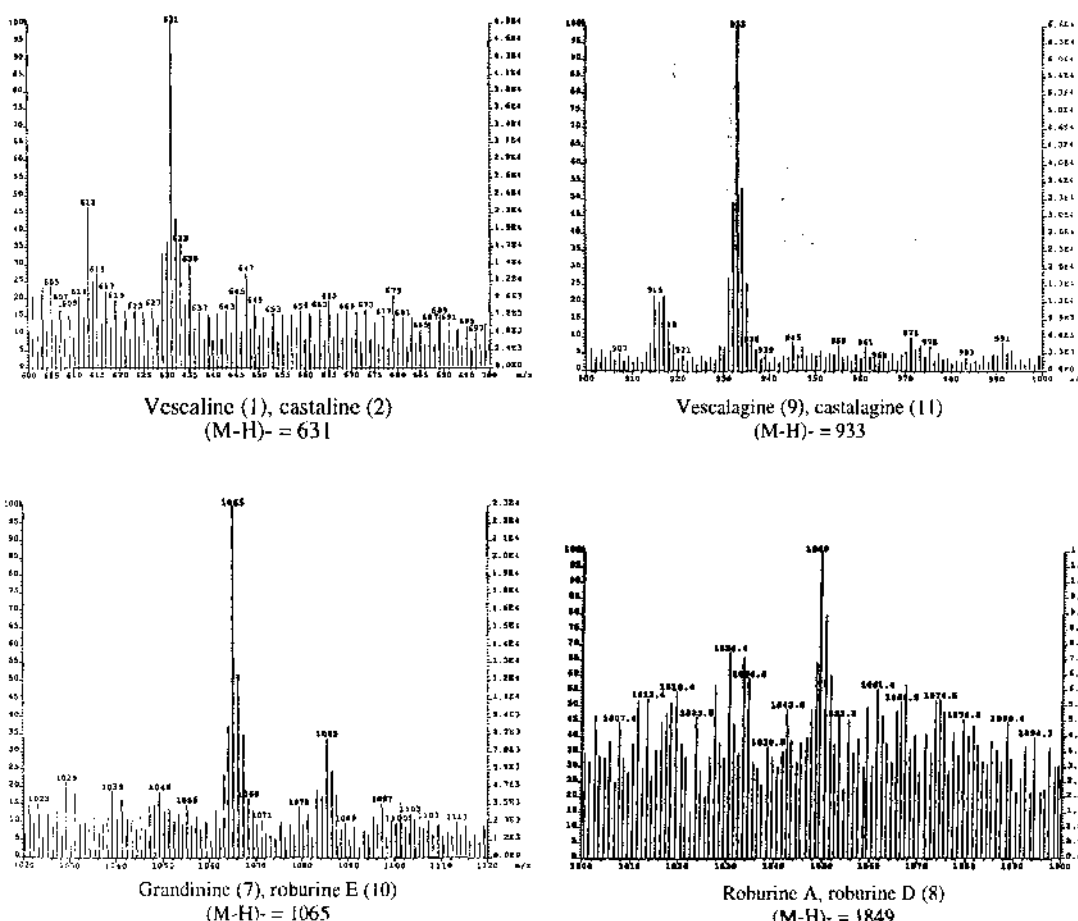


Figure 4a — Couplage HPLC/LSIMS d'un extrait aqueux et acétone/eau de *Q. robur*. Chromatogramme HPLC en phase inverse d'extraits de *Q. Robur* à l'eau (a) et à l'acétone/eau (b)

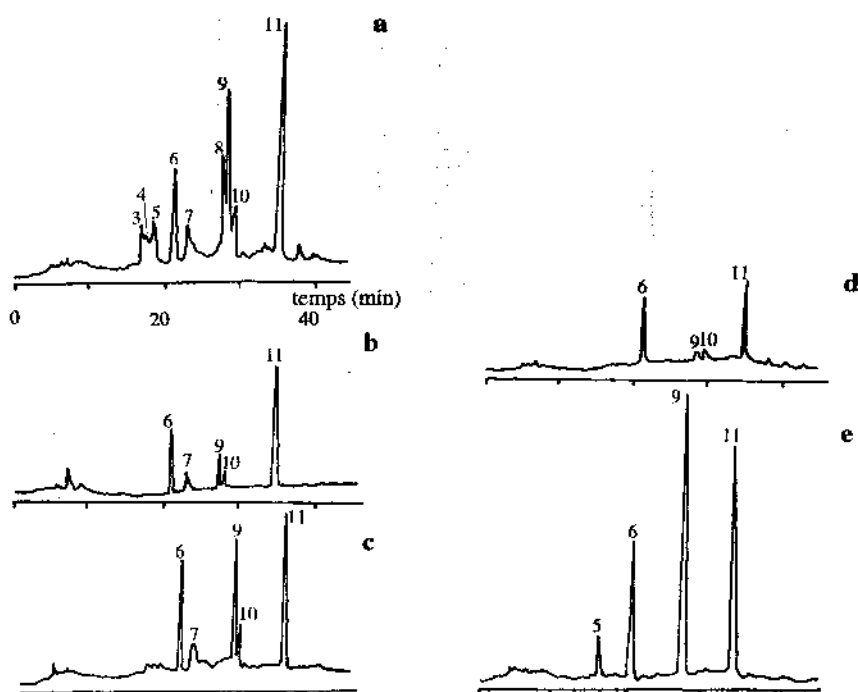
(identification des pics : 1 : vescaline - 2 : castaline - 3 : roburine A - 4 : roburine B - 5 : roburine C - 6 : ac. gallique - 7 : grandinine - 8 : roburine D - 9 : vescalagine - 10 : roburine E - 11 : castalagine - 12 : ac. ellagique)

Pour chaque détermination réalisée sur les 6 chênes et le châtaignier, les écarts à la moyenne sont relativement réduits, permettant une différenciation convenable des espèces entre elles. *Q. robur* et surtout *Q. farnetto* et *C. sativa* sont les plus riches en extrait sec et en phénols totaux, alors que *Q. stellata*, *Q. oocarpa* et surtout *Q. alba* en sont peu pourvus. *Q. petraea* occupe une position intermédiaire. On constate, dans notre échantillonnage, que les espèces européennes ont à la fois un extrait sec et un taux de phénols solubles plus importants que les espèces d'Amérique Centrale et



**Figure 4b — Couplage HPLC/LSIMS d'un extrait aqueux et acétone/eau de *Q. robur*.
Spectres LSIMS des différents pics chromatographiques
(spectres en mode négatif, correspondant au (M-N)⁻, matrice glycérol)**

d'Amérique du Nord. La méthode de dosage des ellagitannins totaux par HPLC donne des résultats inférieurs aux méthodes utilisant la dégradation acide ou la réaction à l'acide nitreux. Pour *Q. farnetto* et *Q. oocarpa*, les différences entre HPLC et dégradation acide représentent 24 mg/g de bois, 16,5 mg/g pour *C. sativa*, 17,5 mg/g pour *Q. robur*, 15 mg/g pour *Q. alba* et *Q. stellata* et 13,5 mg/g pour *Q. petraea*. Ces écarts peuvent être attribués à des structures inconnues. Ces molécules sont probablement des ellagitannins. La méthode à l'acide nitreux conduit à des résultats supérieurs à ceux donnés par dégradation acide, les écarts sont cependant plus faibles (5 à 10 mg/g de bois). Ceci peut s'expliquer par l'existence de substances qui interfèrent dans le dosage et augmentent l'absorbance à 600 nm. Le calcul du rapport ellagitannins totaux/extrait sec (figure 6) permet de constater que les méthodes de dégradation acide et de réaction à l'acide nitreux représentent le mieux la fraction



**Figure 5 — Chromatogrammes HPLC en phase inverse
d'extraits de bois de cœur de chêne à l'acétone/eau.**

Q. petraea (a), *Q. occurpa* (b), *Q. stellata* (c), *Q. alba* (d) et de châtaignier *C. sativa* (e)

(identification des pics : 3 : roburine A - 4 : roburine B - 5 : roburine C - 6 : ac. gallique
7 : grandinine - 8 : roburine D - 9 : vescalagine - 10 : roburine E - 11 : castalagine)

ellagitannins de l'extractible total. On observe dans les extraits secs de *Q. alba* et *Q. stellata* que la fraction ellagitannins est majoritaire. Chez les autres espèces, et en particulier pour *Q. petraea* et *C. sativa*, l'extrait sec renferme en majorité des fractions non ellagitannins, en cours de caractérisation.

Les différentes méthodes, retenues pour le dosage des ellagitannins totaux des extraits de bois de cœur de chênes et de châtaignier, donnent des valeurs comparables (figure 7), significativement corrélées ($r > 0,97$, $\alpha : 0,01$).

2 - Application taxonomique du dosage des acides phénols et des ellagitannins monomères et dimères

Nous avons constaté précédemment (figure 5) que les chromatogrammes des extraits analysés sont suffisamment différents d'une espèce à l'autre pour constituer un profil caractéristique. La quantification de l'acide gallique, de l'acide ellagique et des ellagitannins monomères et dimères connus révèle, de la même façon, des écarts appréciables entre espèces. Seuls *Q. robur* et *Q. petraea* ont une composition proche (tableau 4).

Tableau 3
Estimation de la quantité de composés phénoliques totaux et comparaison de différentes méthodes de dosage
des ellagitannins d'extraits de bois de cœur de chênes et de châtaignier.
 (Les ellagitannins totaux sont exprimés en équivalent castalagine)

Espèces	Extrait sec (mg/g de bois)	Phénols totaux		Ellagitannins totaux (mg/g de bois)		
		D.O. 280 nm	IFC ⁺	HPLC ⁺⁺	ac. nitreux*	dégradation acide §
Quercus :						
<i>Q. robur</i>	118 ±5,7	27 ±2,5	24 ±3,5	87,5 ±11,6	112 ±13,5	105 ±12,5
<i>Q. petraea</i>	85 ±4,3	17,5 ±3,2	15 ±2,7	39 ±9,5	56 ±9,6	52,5 ±10,3
<i>Q. farnetto</i>	136 ±8,5	23,5 ±4,3	21 ±3,6	110 ±12,8	138,5 ±12,7	134 ±14,6
<i>Q. alba</i>	43 ±4,5	6 ±1,2	8,5 ±2,3	33 ±3,5	61 ±8,6	48 ±9,7
<i>Q. siellata</i>	64 ±8,5	11 ±0,8	12,5 ±1,4	67 ±10,7	98,5 ±10,8	91 ±11,4
<i>Q. oocarpa</i>	65,5 ±7,4	11 ±1,5	13,5 ±1,8	39 ±9,6	66 ±5,3	55,5 ±6,8
Castanea :						
<i>C. sativa</i>	137 ±12,7	31 ±5,8	27 ±6,8	44 ±7,4	57,5 ±8,2	51 ±6,5

⁺IFC: Indice de Folin-Ciocalteu. ⁺⁺Dosage des ellagitannins totaux par HPLC. ^{*}Dosage des ellagitannins totaux par réaction de BATE-SMITH (1972) à l'acide nitreux. [§]Dosage des ellagitannins totaux par dosage de l'acide ellagique formé après hydrolyse acide

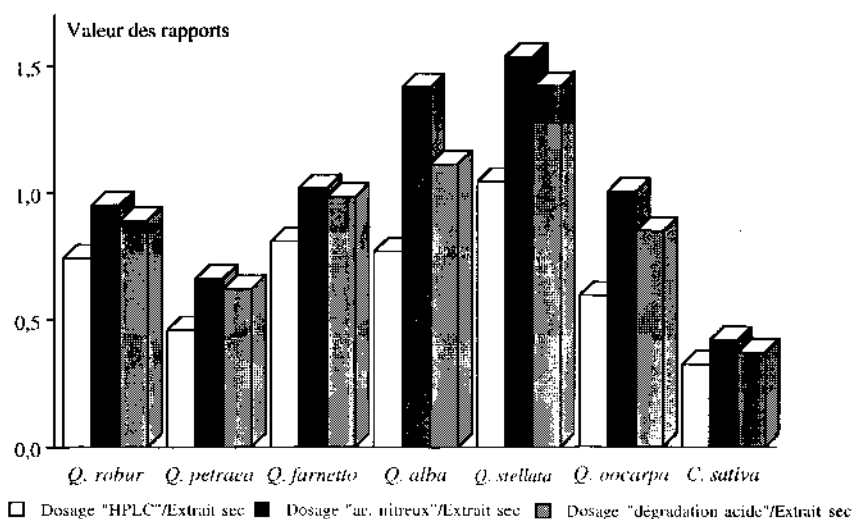


Figure 6 — Valeurs des rapports entre les différentes méthodes de dosage des ellagitanins et l'extrait sec des bois de cœur des espèces de chênes et de châtaignier

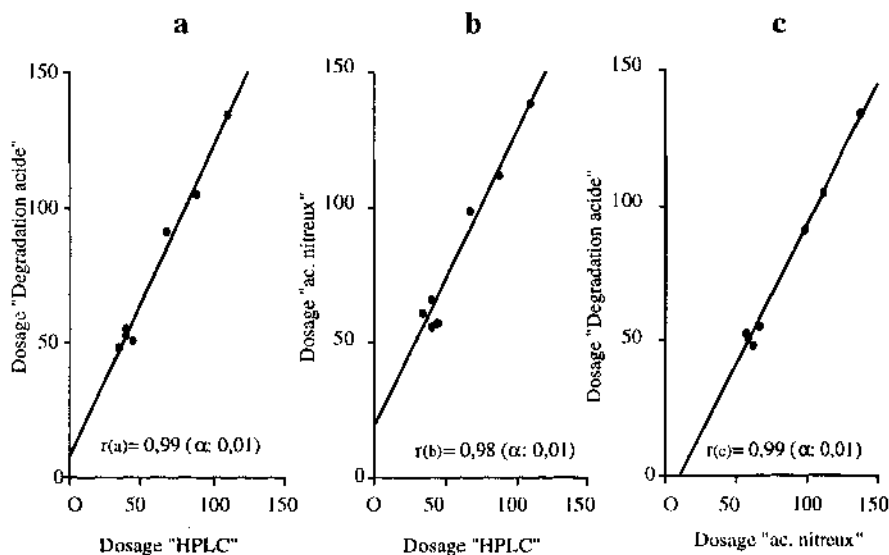


Figure 7 — Corrélation entre le dosage des ellagitanins totaux par HPLC et dégradation acide (a), par HPLC et à la réaction à l'acide nitreux (b) et par la réaction à l'acide nitreux et dégradation acide (c)

(Les résultats sont donnés en mg/le bois équivalent castalagine.

Chaque point représente la moyenne de 10 déterminations.)

Les trois espèces européennes possèdent les 4 ellagitanins monomères et les 4 dimères décrits (tableau 4). *Q. farnetto* se distingue des deux autres espèces par la plus grande quantité d'ellagitanins pentosylés (tableau 4 : 55 %, 22,5 %, 39 % respectivement pour *Q. farnetto*, *Q. robur* et *Q. petraea*), liée à une forte teneur en dimères pentosylés, roburines B et C (figure 8). Le rapport vescalagine totale/castalagine totale est voisin de 2 chez *Q. robur* et *Q. petraea*. Il est de 4,5 chez *Q. farnetto*, pour lequel la vescalagine représente l'ellagitanin prédominant.

Les extraits de bois de cœur des espèces américaines renferment presque exclusivement des ellagitanins monomères (> 90 %). *C. sativa* présente les mêmes caractéristiques avec, en plus, une quasi absence de molécules pentosylées (figure 8).

Tableau 4
Acides phénols et ellagitanins d'extraits de bois de cœur de chênes et de chataîgnier.
(ellagitanins et ac. phénols en mg/g de bois)

	<i>Q. robur</i>	<i>Q. petraea</i>	<i>Q. farnetto</i>	<i>Q. alba</i>	<i>Q. stellata</i>	<i>Q. oocarpa</i>	<i>C. sativa</i>
Acides phénols							
ac. gallique	1,4	1,1	3,2	1,2	1,8	1,3	2,1
ac. ellagique	1,9	3,1	0,6	18,4	11,2	4,2	1,7
Ellagitannins							
<i>Monomères :</i>							
Vescalagine	26,7	8,7	15,7	3,8	16,3	6,5	22,6
Castalagine	30,1	12,4	14	26,4	29,6	23,7	17,4
Grandinine	8,5	5,8	5,2	tr.*	6,4	6,2	tr.
Roburine E	4	4,7	8,7	2,8	8,5	2,9	0
<i>Dimères :</i>							
Roburine A	8,7	2,4	12,2	tr.	1,9	0	3,8
Roburine D	2,3	0,4	5,2	0	0	0	0
Roburine B	3,6	2,6	26	tr.	2,3	0	tr.
Roburine C	3,5	2,1	21	tr.	1,9	0	0
% dimères	21	19	58,5	< 1	9	0	9
% monomères	79	81	41,5	> 99	91	100	91
% ellagitanins pentosylés**	22,5	39	55	9	28	23	< 1
Ac. gallique/ac. ellagique	0,73	0,35	5,3	0,06	0,16	0,3	1,23
Vescalagine libre/ castalagine libre	0,88	0,7	1,1	0,14	0,55	0,27	1,3
Vescalagine totale/ castalagine totale#	1,7	2	4,6	0,26	1,25	0,65	1,5
Ellagitanins totaux/ ac. ellagique	46	12,6	183	1,8	59,8	9,3	25,8

*tr. : traces - **ellagitanins pentosylés : Grandinine + roburine E + roburine B + roburine C - #Vescalagine et castalagine totale = molécules libres + pentosylées + sous forme de dimères



Figure 8 — Proportion centésimale des ellagitannins monomères et dimères dosables par HPLC dans les extraits de cœur des différentes espèces analysées

III - DOSAGE DES ELLAGITANINS DANS LES VINS ROUGES ÉLEVÉS EN BARRIQUES

1 - Dosage des ellagitannins par réaction à l'acide nitreux (BATE-SMITH, 1972)

La méthode de dosage des ellagitannins par oxydation à l'acide nitreux sous azote est très spécifique des esters de l'acide hexahydroxydiphénique. On observe, sur le tableau 5, qu'en milieu hydroalcoolique, des procyanidines de pépins et des anthocyanes monoglucosides de pellicules de raisins (*Vitis vinifera* c.v. Cabernet Sauvignon) répondent faiblement au dosage. En revanche, dans les vins rouges, du fait de la complexité du milieu et de la présence d'une grande quantité de divers composés phénoliques, particulièrement des tanins condensés, le dosage n'est pas applicable. L'élimination des anthocyanes par l'alcool isoamylique (tableau 5) et des procyanidines par l'acétate d'éthyle (résultats non présentés) n'améliore pas le résultat du dosage et le rend plus délicat. Dans les vins blancs beaucoup moins riches en phénols, la méthode peut conduire à des résultats comparatifs satisfaisants.

2 - Dosage des ellagitannins totaux par dégradation acide

Cette méthode de dosage est basée sur la libération d'acide ellagique lors de l'hydrolyse acide des ellagitannins. L'acide ellagique formé peut alors être quantifié par HPLC. Plusieurs problèmes sont à résoudre pour adapter la méthode aux vins rouges : le mélange complexe constitué par le vin nécessite un gradient chromatographique adapté à la séparation de l'acide ellagique des autres phénols, et dans un temps compatible avec l'analyse en séries d'échantillons ; choisir une longueur d'onde spécifique à laquelle peu de molécules absorbent ; optimiser la méthode d'hy-

drolyse acide pour obtenir le maximum d'acide ellagique dans un délai minimum ; enfin, il convient de choisir un solvant dans lequel l'acide ellagique est très soluble. Les conditions retenues donnent des résultats reproductibles et permettent une quantification satisfaisante des ellagitanins totaux en solution dans les vins rouges (cf. Matériels et Méthodes).

Les ellagitanins du bois de chêne se solubilisent rapidement dans le vin logé en barriques (figure 9), puisqu'en 3 mois, la teneur maximale est atteinte, au-delà, elle diminue régulièrement. L'acide ellagique s'accumule plus rapidement durant le premier mois, puis, il augmente très lentement pendant toute la durée de l'élevage (figure 9). Dans le tableau 6, sont regroupés des dosages effectués sur plusieurs vins rouges. Les ellagitanins sont dosés en grande quantité dans les vins jeunes, surtout pendant les premiers mois d'élevage. Après quelques mois en barrique, le taux d'ellagitanins devient faible. Si on ne retrouve plus d'ellagitanins en quantités appréciables dans les vins après quelques années de conservation en bouteilles, en revanche, l'acide ellagique reste un marqueur de la conservation des vins en barriques. En effet, l'acide ellagique est assez stable pour être dosé, même après plusieurs dizaines d'années. Ces résultats suggèrent que les ellagitanins, sous leur forme native, subissent de rapides transformations qui ne leur permettent plus de libérer d'acide ellagique par hydrolyse acide.

Tableau 5
Influence des composés phénoliques du raisin et du vin sur la valeur du dosage des ellagitanins par oxydation à l'acide nitreux.

(NaNO_2 : nitrite de sodium à 6 %, solution 1-7 : solution hydroalcoolique 12 % vol. EtOH, 5 g/l ac. tartrique, NaOH N qsp pH = 3,5)

Solution	Composition	Phénols totaux (DO 280 nm)	D.O. 600 nm (DO 280 nm)			Ellagitanins totaux (mg/l)
			eau	NaNO_2	Δ DO	
1	Extrait de <i>Q. robur</i> (1 g/l)*	14,5	0,07	0,78	0,71	774
2	Procyanidines oligomères (1 g/l)**	42,3	0,09	0,1	0,01	9,5
3	Solutions 1 + 2 (1:1)	19,1	0,07	0,86	0,79	750,5 (11 %)
4	Anthocyanes monoglucosides (1 g/l)**	4,5	0,12	0,14	0,02	19
5	Solutions 1 + 4 (1:1)	19,3	0,15	0,88	0,73	693,5 (3 %)
6	Extrait de pépins de raisin (1 g/l)**	43,8	0,12	0,1	—	—
7	Solutions 6 + 1 (1:1)	19,2	0,11	0,84	0,73	693,5 (3 %)
8	Vin blanc (cuve inox)	6,8	0,05	0,15	0,1	95
9	8 + 1 g/l ellagitanins	22,2	0,1	0,89	0,79	750,5
10	Vin rouge (cuve inox)	28	0,48	0,8	0,32	304
11	10 + 1 g/l ellagitanins	38	0,61	1,67	0,66	627
12	Vin rouge traité à l'alcool isoamylique#	22,4	0,4	0,6	0,2	190
13	12 + 1 g/l ellagitanins	36	0,35	1,51	1,16	1102

* Extrait acétone/eau (7:3) - ** Composés phénoliques isolés du raisin dans les conditions décrites par VIVAS *et al.*, 1994

Vin rouge extrait par 2 fois son volume d'alcool isoamylique RP - \$ Ecart en % par rapport à la solution 1

Tableau 6
Dosage de l'acide ellagique et des ellagitanins totaux dans différents échantillons de vins rouges.
 (Les résultats sont exprimés en mg/l. Les vins 1-5 ; 6 et 7 ; 8 et 9 sont identiques)

Echantillons	Origines	Millésime	Type d'élevage	Ac. ellagique	Ac. ellagique libéré	Ellagitanins totaux
1	Espagne (Rioja)	1993	Cuve inox (4 mois)	0	0	0
2	"	"	Barriques usagées (4 mois)	4,5	1,3	4
3	"	"	Barriques neuves-chênes USA (4 mois)	16,8	1,9	5,8
4	"	"	Barriques neuves-chênes Limousin Fr. (4 mois)	12,2	30,5	94,2
5	"	"	Barriques neuves-chênes Allier Fr. (4 mois)	8,3	21,6	66,7
6	France (Saint-Emilion)	1992	Barriques neuves-chênes Allier Fr. (2 mois)	4,6	38,7	119,8
7	"	"	Barriques neuves-chênes Allier Fr. (6 mois)	10,4	13	40,3
8	France (Médoc)	"	Barriques neuves-chênes Allier Fr. (6 mois)	7,8	15,4	47,5
9	"	"	Barriques neuves-chênes Allier Fr. (18 mois)	12,2	10,1	31,2
10	France (Médoc)	1970	Barriques neuves-chêne Fr.	7,3	0,9#	2,8#
11	France (?)	1880	Barriques	5,6	0	0

#Estimation

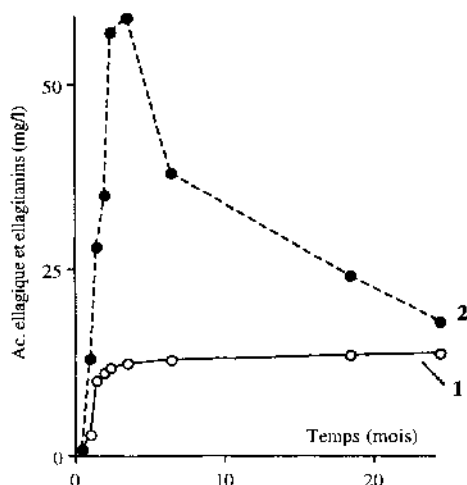


Figure 9 — Evolution de la teneur en acide ellagique (1) et en ellagitannins totaux (2) d'un vin au cours de son élevage en barrique neuve (*Q. petraea*, Allier, France)

DISCUSSION

Le bois de cœur de chênes et de châtaignier renferme 4 à 10 % de son poids sec en extractibles facilement solubilisables par des mélanges d'éthanol/eau, méthanol/eau (PENG *et al.*, 1991) et acétone/eau. La plus grande partie de ces extraits est soluble dans l'eau (SCALBERT *et al.*, 1989). Dans nos conditions expérimentales, le mélange acétone/eau (7:3) a donné à la fois l'extrait sec le plus important et le plus riche en phénols totaux. Parmi les autres solvants employés, l'eau donne un extrait sec élevé, mais peu de phénols totaux ; l'éthanol/eau (5:5), l'éthanol, le méthanol et le méthanol/chloroforme (8:2) donnent peu d'extraits secs mais plus concentrés en phénols. Le mélange d'acétone et d'eau s'avère un bon solvant pour quantifier la fraction soluble totale du bois de cœur. Mais la poudre obtenue ne contient pas seulement des ellagitannins. Une partie est extractible par des solvants organiques, à partir de l'extrait sec solubilisé dans l'eau : 0,5 à 1 % dans le chloroforme, 5 à 7 % dans l'éther diéthylique et 5 à 10 % dans l'acétate d'éthyle. Ces fractions contiennent respectivement des acides gras et stéroïdes, des acides phénols et de la catéchine, des procyanidines (SCALBERT *et al.*, 1989 ; BAUCH *et al.*, 1991 ; VIRIOT *et al.*, 1993). Une étude plus détaillée est actuellement en cours. Une partie importante de l'extrait (17 à 23 %) est précipitable à l'éthanol (eau:éthanol 1:9), ne dialyse pas au travers de membranes de 2000 et 3500 Da et est pratiquement soluble en totalité dans le DMSO. Il s'agit probablement de polysaccharides liés à des composés phénoliques (absorbent à 280 nm et réagissent à la liqueur de Folin-Ciocalteu). Au total, la majorité de l'extrait (60 à 70 %) contient des ellagitannins.

Plusieurs méthodes de dosage des ellagitannins totaux utilisant des principes différents sont testées sur les extraits de bois de cœur de chênes et de châtaignier. L'étude a porté sur 6 espèces de chênes et 1 de châtaignier : *Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. farnetto* (Europe de l'Ouest), *Q. alba*, *Q. stellata*, *Q. oocarpa* (Amérique du Nord et

Amérique Centrale) et *C. sativa* (Europe). Nous comparons le dosage par HPLC, par dégradation acide suivie d'une estimation de l'acide ellagique formé par HPLC, par oxydation des esters hexahydroxydiphéniques par l'acide nitreux sous azote. Afin d'être comparés, les résultats sont tous exprimés en équivalent castalagine. On constate que le dosage HPLC donne des résultats inférieurs aux deux autres méthodes. Le rendement de la dégradation acide n'est pas exactement de 1 mole d'ac. ellagique par mole de monomères et de 2 moles par mole de dimères, il est voisin de 0,9 (résultats non présentés). Malgré cela, la plus grande quantité d'ellagitanins dosés par cette méthode suggère l'existence d'autres molécules capables de libérer de l'acide ellagique par hydrolyse acide. Ce sont probablement des structures proches des ellagitanins car elles réagissent également à l'acide nitreux. Cette dernière méthode s'avère très spécifique de ce type de molécules. L'analyse des ellagitanins et des extraits de bois de cœur, par HPLC en phase inverse, est fréquemment affectée par la présence de composés non-ellagitanins qui se complexent aisément avec ces molécules et interfèrent dans le dosage (SCALBERT *et al.*, 1990). Lors du fractionnement des extraits acétone/eau, nous avons isolé un précipité à l'éthanol, certainement de nature polysaccharidique, qui libère de grandes quantités d'acide ellagique par hydrolyse acide et réagit positivement à l'acide nitreux (résultats non présentés). Les différences du résultat de dosage entre la méthode HPLC et les autres méthodes représentent de 10 à 20 mg d'ellagitanins/g de bois. Elles peuvent être attribuées à des formes combinées polysaccharides-ellagitanins extractibles à l'eau. KLUMPERS *et al.* (1994) ont isolé d'autres fractions solubles au DMSO qui nous semblent également attribuables à des formes d'ellagitanins combinés à des polysaccharides plus fortement retenus à la paroi cellulaire. Leur solubilité dans le DMSO permet de les rapprocher des hémicelluloses (JOSELEAU, 1980).

La technique de LSIMS ainsi que le couplage HPLC/LSIMS ont été appliqués sur les extraits secs des différentes espèces sélectionnées pour notre étude. Ces méthodes complètent les techniques habituellement appliquées pour l'identification de produits par HPLC (co-injection de produits purs de références, comparaison de leurs Tr et de leurs spectres UV). Dans tous les échantillons, on retrouve de l'acide ellagique indiquant que les espèces retenues ont des quantités variables d'ellagitanins dans leurs extraits (SCALBERT *et al.*, 1989). La vescalagine et la castalagine sont systématiquement identifiées au côté d'autres formes monomères et dimères d'ellagitanins. Nous retrouvons également, dans les extraits à l'eau, la vescaline et la castaline (identifiées par LSIMS, m/z : 631 [M-H]⁻ et comparaison du Tr avec la castaline de référence). La présence de ces molécules dans les extraits de bois de cœur de *Q. robur* et *C. sativa* a déjà été rapportée par MAYER *et al.* (1967, 1971). SCALBERT *et al.* (1990) ne retrouvent pas ces molécules. Leur présence peut être liée en partie à des réactions d'hydrolyse de la vescalagine et de la castalagine durant l'extraction. En effet, nous avons trouvé ces molécules uniquement dans les extraits à l'eau et au mélange éthanol/eau (5:5). Récemment, VIRIOT *et al.* (1994) ont suggéré leur présence dans le bois de cœur de ces deux mêmes espèces. D'après ces auteurs, la présence de vescaline et de castaline est attribuable à des réactions d'hydrolyse dans le bois au cours de son vieillissement. Ils notent une augmentation de la concentration de ces deux molécules et de l'acide ellagique en fonction de l'âge du bois : les couches d'aubier et de duramen récent en sont dépourvues, mais les couches plus âgées du duramen en renferment des quantités significatives. Dans nos conditions, les analyses ont été pratiquées sur des échantillons représentant tout le bois de cœur, on peut penser que

la teneur globale en vescaline et castaline de l'échantillon est devenue trop faible pour être dosée par HPLC. Cependant l'origine exacte de ces molécules est toujours incertaine et nécessite des investigations complémentaires. L'acide gallique et l'acide ellagique sont les principaux phénols simples de faible poids moléculaire des extraits de bois de cœur des chênes et du châtaignier. Si la présence d'acide ellagique est aisément expliquée par l'hydrolyse des nombreux ellagitannins du bois, en revanche, l'origine de l'acide gallique est plus discutable. On sait que le précurseur commun des ellagitannins est le β -penta-O-galloyl-D-glucose (OKUDA *et al.*, 1982 ; ADAMCZESKI *et al.*, 1992 ; VIRIOT *et al.*, 1994 ; VIVAS *et al.*, 1995a), mais on ne le retrouve pas dans les extraits de bois de chênes et de châtaignier. SCALBERT *et al.* (1988) ont identifié du penta-galloylglucose dans des cultures de tissus de feuilles et dans des cales ; en revanche, ils ne l'ont pas mis en évidence dans les feuilles, l'écorce et le bois de *Q. robur* adultes. Dans les feuilles de la même espèce, SCALBERT et HASLAM (1987) rapportent la présence de divers esters hexahydroxydiphéniques tels que la vescalagine, la castalagine et la pedunculagine, mais aucun ester de l'acide gallique. L'origine de l'acide gallique est donc encore non résolue. On note pourtant une augmentation de sa teneur durant le vieillissement du bois de l'arbre sur pied (VIRIOT *et al.*, 1994), ce qui tend à supposer, avec ces auteurs, qu'il dérive de l'hydrolyse d'esters galloylés probablement liés à des composants pariétaux des cellules (GARLAND *et al.*, 1985 ; SCALBERT *et al.*, 1988). A la vue des différents travaux, la présence de gallotannins dans le bois de cœur de chêne n'est pas à exclure (SEIKEL *et al.*, 1971 ; VIVAS *et al.*, 1993a). Dans le cas particulier du châtaignier *C. sativa*, en accord avec les résultats de SALAGOITY *et al.* (1986), nous avons dosé de l'acide digallique dans des extraits aqueux de bois de cœur (VIVAS *et al.*, 1993b). La présence de ce depside dans les extraits de châtaignier a été récemment confirmée (VIVAS *et al.*, 1996). On peut alors présumer qu'une partie de l'acide gallique libre provient de l'hydrolyse d'acide digallique. Le mécanisme est facilement réalisé par voie enzymatique (VIVAS *et al.*, 1991).

Le dosage des ellagitannins monomères et dimères des extraits des espèces étudiées donne des profils chromatographiques suffisamment différents pour une application taxonomique. La vescalagine et la castalagine sont les principaux ellagitannins des extraits de tous les échantillons de bois de cœur. Dans les 3 espèces de chênes européens (*Q. robur*, *Q. petraea* et *Q. farnetto*), on retrouve les 4 ellagitannins monomères (vescalagine, castalagine, grandinine et roburine E) et les 4 dimères (roburine A, roburine D, roburine B et roburine C). Les espèces américaines (*Q. alba*, *Q. stellata* et *Q. oocarpa*) sont caractérisées par la quasi absence de dimères. *C. sativa* se distingue par la présence presque exclusive de formes monomères non pentosylées. Les résultats analytiques obtenus pour *Q. robur*, *Q. petraea* et *C. sativa* sont en accord avec ceux de MAYER, 1971 ; SCALBERT *et al.* (1986) ; SCALBERT *et al.* (1990) ; VIRIOT *et al.* (1994). Pour les autres espèces, à notre connaissance, aucune étude détaillée de leur composition en ellagitannins n'a été réalisée. La plus grande réactivité de la vescalagine par rapport à la castalagine (VIVAS *et al.*, 1995 et 1996) favorise les attaques nucléophiles sur le C1-glycosidique de la vescalagine, expliquant que les dimères en sont formés majoritairement. Le ratio vescalagine totale/castalagine totale est supérieur à 1, sauf dans *Q. alba* et *Q. oocarpa* dans lesquels il est probable que d'autres formes dimériques inconnues soient présentes. Par comparaison avec les autres espèces, *Q. farnetto* présente une meilleure aptitude à la dimérisation (dimères : 58 %, contre 20 % pour *Q. robur* et *Q. petraea* et < 10 %

pour les autres espèces) et à la formation d'ellagitanins pentosylés (55 %, contre 0-40 % pour les autres espèces).

Dans la dernière partie du travail, nous avons dosé les ellagitanins totaux dans des vins rouges élevés en barriques. Bien que la réaction de dosage des ellagitanins à l'acide nitreux soit très spécifique des groupes hexahydroxydiphéniques, l'application de la méthode aux vins s'est révélée impossible. L'existence de substances, différentes des procyanidines et des anthocyanes, interfère en réagissant positivement à l'acide nitreux. La dégradation acide appliquée sur une prise d'essai de vins, dans un mélange acide chlorhydrique/méthanol, libère des quantités variables d'acide ellagique. Les dosages indiquent que les ellagitanins se solubilisent pendant les premiers mois d'élevage, par la suite leurs teneurs diminuent rapidement. La capacité de ces molécules à s'oxyder facilement (VIVAS et GLORIES, 1996) leur permet de participer aux réactions d'oxydoréduction au cours de l'élevage en barrique (VIVAS et GLORIES, 1993). La présence d'ellagitanins dans des vins blancs élevés en barriques a déjà été rapportée par QUINN et SINGLETON (1985) après isolement de la fraction ellagitanin sur colonne de LH20TM en basse pression et par MOUTOUNET *et al.* (1989) par dosage HPLC et par hydrolyse acide. Cependant, le fait de ne trouver que de faibles quantités d'ellagitanins totaux dans les vins (MOUTOUNET *et al.*, 1992) tend à montrer que la barrique en cède peu. En fait, le dosage est le résultat du bilan entre les ellagitanins solubilisés et ceux oxydés. Les formes oxydées ne libèrent que peu d'acide ellagique par hydrolyse acide alors que leur absorbance à D.O. 280 nm et leur réactivité au réactif de Folin-Ciocalteu sont en proportion moins affectées (KLUMBERS *et al.*, 1994). Une partie des ellagitanins en solution dans les vins sont sous formes combinées aux polysaccharides (DUBOURDIEU, 1992). Dans ces conditions, ils ne sont plus accessibles aux dosages classiques.

CONCLUSION

Les différentes espèces de chênes analysées dans cette étude montrent que leurs teneurs en extractibles et en phénols totaux sont variables mais comparables aux espèces de chênes habituellement employées en tonnellerie. Parmi les phénols totaux, les échantillons présentent tous une majorité d'ellagitanins. Cette propriété est importante car elle confère au bois une meilleure durabilité (HART et HILLIS, 1972) en comparaison avec d'autres espèces qui en sont dépourvues tel que *Q. cerris* (LAVISCI *et al.*, 1991), et qui ne peuvent pas être utilisées en tonnellerie.

Une méthode de dosage des ellagitanins totaux des vins rouges est également proposée. Elle nous a permis de montrer d'une part que les ellagitanins sont très hydrosolubles et se retrouvent rapidement dans les vins après quelques semaines d'élevage en barriques neuves et, d'autre part, ces molécules disparaissent lors des réactions d'oxydation dont le vin est le siège.

Remerciement : Nous tenons à remercier, bien vivement, Augustin SCALBERT (INRA-INA, Thiverval-Grignon) pour l'intérêt qu'il a sans cesse exprimé à l'égard de nos travaux, ainsi que pour ses très nombreux conseils.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMCZESKI M., HUANG J., KANG R., N.J.X., JABER H. and NAKATSU T., 1992. in « *Plant Polyphenols : Biogenesis, chemical properties and significance* », Hemingway R.W. and Laks P.E. (eds.), Plenum press, New York.
- BATE-SMITH E.C., 1972. Detection and determination of ellagitannins. *Phytochemistry*, **11**, 1153-1156.
- BAUCH J., HUNDT H., WEIBMAN G., LANGE W. and KUBEL H., 1991. On the cause of yellow discoloration of oak heartwood (*Quercus* sect. *robur*) during drying. *Holzforschung*, **45**, 2, 79-85.
- DUBOURDIEU D., 1992. Vinification des vins blancs secs en barriques. in « *Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie* », Guimberteau G. (ed.), Vigne et Vin Publications Internationales, Martillac, 137-143.
- GARLAND C.P., JAMES F.C., NELSON P.J. and WALLIS A.F., 1985. in « *Proceeding of International symposium in wood pulp chemistry* », Vancouver, Canada, **1**, 123-127.
- GLORIES Y., 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. *Thèse doct. ès sciences*, Université de Bordeaux II.
- HART J.H. and HILLIS W.E., 1972. Inhibition of wood-rotting fungi by ellagitannins in the heartwood of *Quercus alba*. *Phytopathology*, **62**, 620-626.
- HASLAM E., 1981. Vegetable tannins. in « *The biochemistry of plants* », Conn E.E. (ed.), Academic press, New York.
- HERVE du PENHOAT C.L.M., MICHON V.M.F., OHASSAN A., PENG S., SCALBERT A. and GAGE D., 1991a. Roburin A, a dimeric ellagitannin from heartwood of *Quercus robur*. *Phytochemistry*, **30**, 1, 329-332.
- HERVE du PENHOAT C.L.M., MICHON V.M.F., PENG S., VIRIOT C., SCALBERT A. and GAGE D., 1991b. Structural elucidation of new dimeric ellagitannins from *Quercus robur* L., Roburins A-E. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **1**, 1653-1660.
- JOSELEAU J.P., 1980. Les hémicellulose, in « *Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés* », Monties B. (ed.), Bordas, Paris, 87-121.
- KELLER R., 1992. Les chênes dans le monde. Les chênes de tonnellerie en France : *Quercus petraea* et *robur*. in « *Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie* », Guimberteau G. (ed.), Vigne et Vin Publications Internationales, Martillac, 7-24.
- KLUMPERS J., SCALBERT A. and JANIN G., 1994. Ellagitannins in european oak wood : Polymerisation during wood ageing. *Phytochemistry*, **36**, 5, 1249-1252.
- LAVISCI P., SCALBERT A., MASSON D. and JANIN G., 1991. Quality of Turkey oak (*Quercus cerris* L.) wood. *Holzforschung*, **45**, 4, 291-296.
- MAYER V.W., GABBER W., RIESTER A., and KORGER H., 1967. Über die Gerbstoffe aus dem Holz der Edelkastanie und der Eich. II- Die Isolierung von Castalagin, Vescalin, Castalin und Vescalin. *Lieb. Ann. Chem.*, **707**, 177-192.
- MAYER V.W., SEITZ H., JOCHIMS J.C., SCHAUERTE K. and SCHILLING G., 1971. Über die Gerbstoffe aus dem Holz der Edelkastanie und der Eich. *Lieb. Ann. Chem.*, **751**, 60-73.
- MAYER V.W., 1971. Über die Gerbstoffe aus dem Holz der Edelkastanie und Eich. *Das Leder*, **12**, 277-283.
- MOUTOUNET M., RABIER PH., PUECH J.-L., VERETTE F. and BARILLERE J.-M., 1989. Analysis by HPLC of extractable substances in oak wood. Application to a chardonnay wine. *Sci. aliments*, **9**, 1, 35-51.
- MOUTOUNET M., RABIER PH., SARNI F. et SCALBERT A., 1992. Les tanins du bois de chêne. Les conditions de leur présence

- dans les vins. in « *Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie* », Guimberteau G. (ed.), Vigne et Vin Publications Internationales, Martillac, 75-79.
- NONAKA G.I., ISHIMARU K., AZUMA R., ISHIMATSU M. and NISHIOKA I., 1989. *Chem. Pharma. Bull.*, **37**, 2071-2077.
- OKUDA T., YOSHIDA T., HANATO T., YAZAKI K. and ASHIDA M., 1982. *Phytochemistry*, **21**, 2871-2875.
- PENG S., SCALBERT A. and MONTIES B., 1991. Insoluble ellagitannins in *Castanea sativa* and *Quercus petraea* woods. *Phytochemistry*, **30**, 3, 775-778.
- POCOCK K.F., SEFTON M.A. and WILLIAMS P.J., 1994. Taste thresholds of phenolic extract of french and american oak wood : The influence of oak phenols on wine flavor. *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 4, 429-434.
- PUECH J.-L., RABIER P. and MOUTOUNET M., 1993. Dosage des tanins ellagiques sur des extraits de bois de chêne et des eaux-de-vie vieillies en fût. in « *Elaboration et connaissance des spiritueux* », Cantagrel R. (ed.), Lavoisier (diffusion), Paris.
- PUECH J.-L., 1987. Extraction of phenolic compounds from oak wood in model solution and evolution of aromatic aldehydes in wines aged in oak barrels. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38**, 3, 236-238.
- QUINN M.K. and SINGLETON V.L., 1985. Isolation and identification of ellagitannins from white oak wood and an estimation of their roles in wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**, 2, 148-155.
- SALAGOITY-AUGUSTE M.-H., TRICARD C., MARSAL F. and SUDRAUD P., 1986. Preliminary investigation for the differentiation of enological tannins according to botanical origin : Determination of gallic acid and its derivatives. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37**, 4, 301-303.
- SCALBERT A. and HASLAM E., 1987. Polyphenols and chemical defence of the leaves of *Quercus robur*. *Phytochemistry*, **26**, 3191-3195.
- SCALBERT A., MONTIES B. and FAYRE J.M., 1988. Polyphenols of *Quercus robur* : Adult tree and *in vitro* grown calli and shoots. *Phytochemistry*, **27**, 11, 3483-3488.
- SCALBERT A., MONTIES B. and JANIN G., 1989. Tannins in wood : Comparison of different estimation methods. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 5, 1324-1329.
- SCALBERT A., DUVAL L., PENG S., MONTIES B. and HERVE DU PENHOAT C.L.M., 1990. Polyphenols of *Quercus robur* L. II- Preparative isolation by low-pressure and high-pressure liquid chromatography of heartwood ellagitannins. *J. Chromatogr.*, **502**, 107-119.
- SEIKEL M.K., HOSTETTLER F.D. and NIEMANN G.J., 1971. *Fagaceae* - Phenolic of *Quercus rubra* wood. *Phytochemistry*, **10**, 2249-2251.
- SINGLETON V.L., 1995. Maturation of wines and spirits : Comparisons, facts, and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 1, 98-115.
- TARANSAUD J., 1976. *Le livre de la tonnellerie*. La roue à livres diffusion (ed.), Paris.
- VIRIOT C., SCALBERT A., LAPPIERRE C. and MOUTOUNET M., 1993. Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1872-1879.
- VIRIOT C., SCALBERT A., HERVÉ DU PENHOAT C.L.M. and MOUTOUNET M., 1994. Ellagitannins in woods of sessile oak and sweet chestnut. Dimerization and hydrolysis during wood ageing. *Phytochemistry*, **36**, 5, 1253-1260.
- VIVAS N., GLORIES Y., DONECHE B., et GUEHO E., 1991. Observation sur la flore fongique du bois de chêne (*Quercus* sp.) au cours de son séchage naturel. *Ann. Sc. Nat. Bot. (Paris)*, **13**, **11**, 4, 149-153.
- VIVAS N. et GLORIES Y., 1993. Les phénomènes d'oxydoreduction liés à l'élevage en barrique des vins rouges : Aspects technologiques. *Rev. Fr. Enol.*, **33**, 142, 33-38.
- VIVAS N., CHAUVET S., SUDRAUD P. et GLORIES Y., 1993a. Techniques de contrôle et d'évaluation de la qualité des

tanins œnologiques. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **86**, 919, 215-222.

VIVAS N., CHAUVET S., GLORIES Y. et SUDRAUD P., 1993b. Caractérisation et définition des préparations commerciales de tanins œnologiques. *Ind. Agric. Alim.*, **110**, 10, 705-713.

VIVAS N., BELLEMERE L., LONVAUD-FUNEL A., GLORIES Y. et AUGUSTIN M., 1994. Etude sur la fermentation malolactique des vins rouges en barriques et en cuves. 1^o partie. *Rev. Fr. Œnol.*, **34**, 149, 37-42.

VIVAS N., 1995. The notion of grain in cooperage. *J. Sci. Tech. Tonnellerie*, **1**, 17-48.

VIVAS N., LAGUERRE M., GLORIES Y., BOURGEOIS G. and VITRY C., 1995. Structure simulation of two ellagitannins

from *Quercus robur* L. *Phytochemistry*, **39**, 5, 1193-1199.

VIVAS N., LAGUERRE M. et GLORIES Y., 1996. Structure et propriétés physico-chimiques des deux principaux ellagitannins du bois de chêne : Vescalagine et castalagine. in « *Actualité Œnologique 95* », Lonvaud-Funel A. et Glories Y. (eds.), Lavoisier, Paris.

VIVAS N. and GLORIES Y., 1996. Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, **47**, 1.

VIVAS N., BOURGEOIS G., VITRY C., DE FREITAS V. and GLORIES Y., 1996. Study on the composition of commercial tannins extracts by liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS). *J. Sci. Food Agric.* (soumis pour publication).