

# Recherche des composés responsables de l'effet antiradicalaire dans les vins. Influence de l'élevage en barriques.

Nathalie SAINT-CRICQ DE GAULEJAC, Yves GLORIES et Nicolas VIVAS





# Recherche des composés responsables de l'effet antiradicalaire dans les vins. Influence de l'élevage en barriques

Nathalie SAINT-CRICQ DE GAULEJAC<sup>1</sup>, Yves GLORIES<sup>2</sup> et Nicolas VIVAS<sup>1\*</sup>

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

(Reçu après révision le 20 février 1998)

**Résumé** : Les radicaux libres sont des substances fortement néfastes pour l'organisme étant donné qu'ils s'attaquent aux divers constituants de la cellule, entraînant ainsi son vieillissement accéléré, parfois même sa destruction ou, si l'ADN a été touché, des dysfonctionnements irréversibles. Ces produits sont dits « piègeurs de radicaux libres » c'est-à-dire qu'ils sont susceptibles de bloquer les actions néfastes de ces radicaux pouvant ainsi protéger les cellules des dommages oxydatifs : ce sont des antiradicalaires. Il est maintenant bien connu que les composés phénoliques du vin ont un fort potentiel antiradicalaire. Après extraction et purification de ces composés dans le vin, nous mesurons leur activité antiradicalaire par une méthode enzymatique. Nous soulignons en particulier le rôle fort intéressant des anthocyanes (issues du raisin) et des ellagitanins (issus du bois de chêne) préservés dans le vin et qui ont un potentiel antiradicalaire particulièrement élevé pour des concentrations relativement faibles.

**Mots-clés** : French Paradox, composés phénoliques, anthocyanes, tanins, antiradicalaire, élevage en barrique

## INTRODUCTION

Les radicaux libres sont des métabolites hautement réactifs qui vont oxyder les constituants de la cellule, en particulier sa membrane, et donc conduire à son vieillissement accéléré et à sa destruction (AMES, 1983 ; PRYOR, 1982 ; PRYOR *et al.*, 1983). Leur présence en excès entraîne un vieillissement accéléré des tissus et des lésions tissulaires perturbant l'équilibre de l'organisme. Ces déséquilibres se manifestent par des maladies cardio-vasculaires, des états inflammatoires, des problèmes de peau induits par les radiations solaires, etc. Cependant, les actions néfastes des radicaux libres peuvent être bloquées par des produits « piègeurs » de radicaux libres qui détoxifient l'organisme. Les recherches actuelles sur les radicaux libres permettent de confirmer que les aliments riches en antioxydants ont une action primordiale sur la prévention des maladies cardio-vasculaires (FUHRMAN *et al.*, 1995 ; RENAUD et de LORGERIL, 1992), des maladies cancéreuses (WOOD *et al.*, 1982 ; DRAGSTED *et al.*, 1993) et neurodégénératives, les plus connues étant les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (OKUDA *et al.*, 1992), de même que sur les états inflammatoires (LIETTY *et al.*, 1976) et les troubles dus au vieillissement cellulaire et cutané (AMES *et al.*, 1993). Un apport adéquat de ces éléments est nécessaire pour permettre une action préventive efficace (KANNER *et al.*, 1994).

\*pour toute correspondance

Nous avons déjà montré que le vin rouge possédait un fort potentiel antioxydant dû aux composés phénoliques (tanins et anthocyanes) présents en quantité adéquate pour assurer une activité optimum de ces composés et même une action synergique entre eux (SAINT-CRICO DE GAULEJAC *et al.*, 1998). L'effet protecteur des vins rouges sur des cellules hépatiques de foie de rats bombardées par des radicaux libres (engendrés par irradiation) a pu également être visualisé lors de tests immunochimiques (SAINT-CRICO DE GAULEJAC *et al.*, 1998). Nous cherchons donc désormais à savoir quels sont, parmi ces composés phénoliques, les plus susceptibles d'intervenir dans cette action antiradicalaire, l'intérêt de ce travail étant de visualiser l'effet protecteur des polyphénols afin de sélectionner les molécules les plus efficaces, dans un but pharmaceutique par exemple. Ce travail nous permettra par la suite de remonter aux mécanismes d'oxydoréduction, les phénomènes antiradicalaires étant généralement l'amorce des réactions d'oxydoréduction, afin de comprendre et de maîtriser les problèmes et/ou les avantages de l'oxydoréduction dans les vins.

Pour atteindre ces objectifs, les polyphénols du vin doivent être extraits et purifiés avant de doser leur activité antiradicalaire (% O<sub>2</sub><sup>o-</sup> piégés). Pour cela, un vin rouge a été fractionné selon la méthode GLORIES (1978) en 5 fractions phénoliques, les tanins et les anthocyanes présents dans ces fractions ont été dosés et enfin leur capacité antiradicalaire, exprimée par la concentration nécessaire à inhiber 50 % des radicaux O<sub>2</sub><sup>o-</sup>, a été mesurée par une méthode enzymatique (système HPX-XOD) (HODGSON et FRIDOVICH, 1976).

Dans un second temps, nous avons étudié l'influence des différents modes d'élevage des vins sur leur activité antiradicalaire. Pour cela, nous avons comparé un vin élevé en cuve par rapport à son homologue élevé en barriques neuves, sachant que la barrique, de par son apport important en composés phénoliques extraits du bois et cédés au vin (VIVAS, 1997), est susceptible d'intervenir au niveau du potentiel antiradicalaire des vins.

En dernier lieu, le rôle des tanins issus du bois dans le potentiel antiradicalaire d'un vin a été confirmé sur une solution d'ellagitanin purifiée, justifiant le fort pouvoir antiradicalaire de ces molécules et expliquant par la même la plus forte activité antiradicalaire des vins élevés en barriques par rapport à ceux élevés en cuves.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### I - PRODUITS CHIMIQUES

La xanthine oxydase (XOD) et l'hypoxanthine (HPX) proviennent de chez Sigma Aldrich Chimie (Saint-Quentin Fallavier, France). La malvidine chlorure et la malvidine-3-mono-glucoside sont achetées chez Extrasynthèse S.A. (Genay, France). Les ellagitanins utilisés pour la solution modèle proviennent de chez J. Laffort & Cie (Bordeaux, France), et le glucose de chez Prolabo (Gradignan, France).

### II - SÉLECTION DES VINS

Les composés phénoliques des vins proviennent des parties solides du raisin ; les anthocyanes étant situées dans les pellicules des baies et les tanins dans les pépins et

pellicules. Ils peuvent également provenir du bois (ellagitanins) lors de l'élevage en barriques. Ils sont extraits au cours de la fermentation et de la macération (ROGGERO et ARCHIER, 1989 ; VIVAS *et al.*, 1992). Ceci explique la forte présence de polyphénols dans les vins rouges alors que les vins blancs, vinifiés sans macération ou avec une légère macération préfermentaire, ne présentent que peu de composés phénoliques issus du raisin et contiennent ceux provenant du bois dans le cas d'un élevage en barriques neuves.

Dans un premier temps, nous avons donc travaillé sur un vin rouge de Merlot (1996) et fermenté en cuves (VRc), afin de limiter l'étude aux seuls composés phénoliques provenant du raisin. Puis, dans un second temps, pour visualiser plus nettement le rôle des ellagitanins dans l'activité antiradicalaire, nous avons comparé un vin blanc fermenté en cuves (VBc) (Chardonnay, 1996) avec le même vin mais élevé en barriques neuves (VBb). Ces deux vins proviennent de la même parcelle et ont subi le même procédé de vinification.

### III - FRACTIONNEMENT ET ISOLEMENT DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES VINS ROUGES

Selon la méthode définie par GLORIES (1978) (figure 1), on peut fractionner les composés phénoliques du vin en 5 groupes de familles phénoliques :

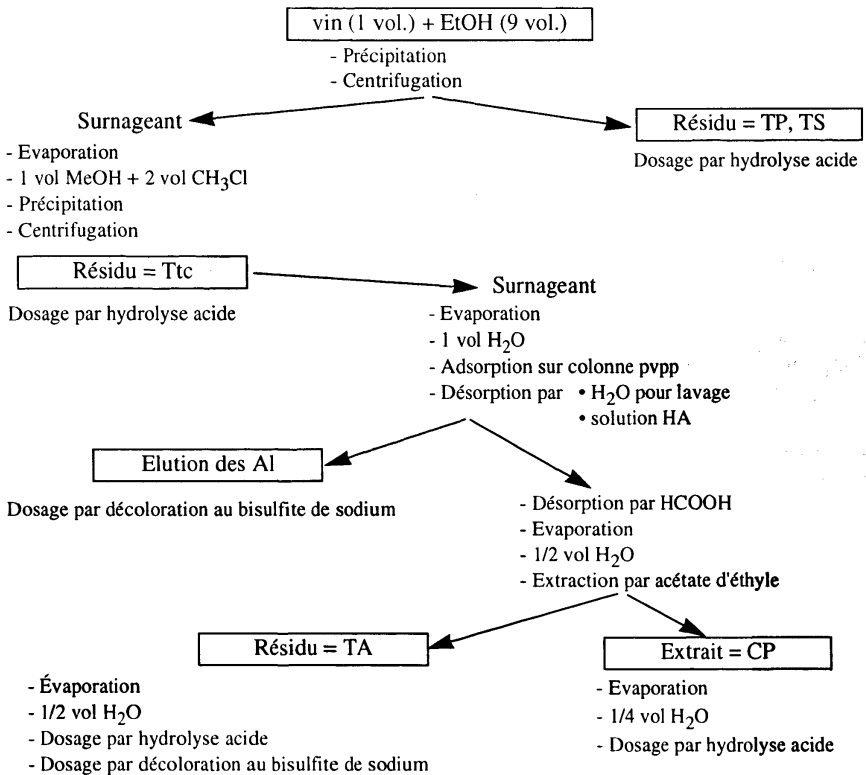


Figure 1 - Fractionnement des composés phénoliques du vin (GLORIES, 1978)

- Tanins-Polysaccharides, Tanins-Sels (TP-TS),
- Tanins très condensés (Ttc),
- Procyanidines et Catéchines (P-C),
- Complexes Tanin-Anthocyane (T-A),
- Anthocyanes Libres (Al).

#### IV - DOSAGE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

##### 1) Dosage des anthocyanes totales

Cette méthode est basée sur la décoloration des anthocyanes par un excès de SO<sub>2</sub> (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1965). Certaines combinaisons T-A n'étant pas décolorées (les TAT), les résultats obtenus sont donc supérieurs aux valeurs réelles.

##### 2) Dosage des tanins totaux (LA) et estimation des tanins corrigés (T)

Ce dosage est basé sur la propriété des proanthocyanidines à se transformer en anthocyanidines en milieu acide à 100°C (RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET, 1966). La totalité des tanins intervient lors de cette réaction, y compris ceux combinés à d'autres composés phénoliques.

Des corrections ont été apportées à ce dosage (GLORIES, 1988) pour tenir compte des erreurs attribuables à certaines de ces combinaisons. Elles sont basées sur la mesure des  $\Delta d$  à 470, 520 et 550 nm des échantillons avant et après hydrolyse acide à 100°C. Les différences entre les longueurs d'onde de l'échantillon (chauffé) et du témoin (non chauffé) sont notées  $\Delta d_m$ . Les corrections sur la valeur du dosage des tanins comprennent :

a) Calcul du  $\Delta d_{570c}$  à partir du  $\Delta d_{470}$  mesuré (m) :  $\Delta d_{570c} = 0,715 \times \Delta d_{470m}$

- Si la valeur de  $\Delta d_{570c}$  obtenue est inférieure à celle mesurée à cette longueur d'onde, on continue en gardant la valeur  $\Delta d_{470}$  mesurée.
- Si, au contraire, la valeur de  $\Delta d_{570}$  obtenue est supérieure à celle mesurée à cette longueur d'onde, on garde la valeur mesurée à 570 nm pour obtenir, d'après la même équation, le  $\Delta d_{470}$  calculé.

b) Avec la valeur de  $\Delta d_{470}$  mesurée, dans le premier cas, ou celle de  $\Delta d_{470}$  calculée dans le second cas, on calcule la valeur du  $\Delta d_{520c}$  d'après cette équation :

$$\Delta d_{520c} = 1,1 \times \Delta d_{470}$$

c) On obtient la valeur des tanins proanthocyanidiques corrigés T :

$$T \text{ (g/l)} = \Delta d_{520c} \times 15,7$$

##### 3) Dosage des ellagitanins

10 ml de vin de vin sont évaporés à sec dans un tube à hydrolyse muni d'une fermeture téflon (évaporateur rotatif, T ° < 30°C) puis repris dans 10 ml de méthanol chlorhydrique 2N. Les ellagitanins sont dosés par « dégradation acide », méthode adaptée de celle de PENG *et al.* (1991). Elle consiste en une hydrolyse acide des ellagitanins,

suivi d'un dosage par HPLC de l'acide ellagique libéré. On dose alors l'acide ellagique présent, puis après deux 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. Pour cela, les extraits de vin sont analysés sur une phase inverse sur une chaîne HPLC Beckmann™ (pompes 126, détecteur 168). La colonne est une ODS ultrasphère™ (250 × 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 % à 100 % de solvant (MeOH / H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 990 : 1) en 20 min. La détection est réalisée à 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).

V - MESURE DE L'ACTIVITÉ ANTIRADICALAIRE : SYSTEME ENZYMATIQUE HYPOXANTHINE - XANTHINE OXYDASE SPÉCIFIQUE DES RADICAUX SUPEROXYDES : O<sub>2</sub><sup>o-</sup> (HODGSON et FRIDOVICH, 1976)

Le système hypoxanthine - xanthine oxydase (HPX-XOD) génère des radicaux superoxydes O<sub>2</sub><sup>o-</sup>. A pH 7.4, ces radicaux O<sub>2</sub><sup>o-</sup> réduisent le nitrobleu de tétrazolium en bleu de formasan (max λ<sub>560</sub>). En présence de piègeurs de radicaux libres (tels que les composés phénoliques) la formation du bleu de formasan est alors limitée (λ<sub>560</sub> diminue). λ<sub>560</sub> est donc proportionnelle à la production de radicaux O<sub>2</sub><sup>o-</sup>.

Mode opératoire :

Le nitrobleu de tétrazolium (NBT, 10<sup>-3</sup> M) est préparé dans un tampon TRIS (HCL 0,05 M pH 7,4). La solution d'hypoxanthine (H, 0.5.10<sup>-2</sup> M) et la solution de xanthine oxydase (XOD, 1,67 u/ml) sont préparées dans le même tampon. Les composés testés sont solubilisés dans H<sub>2</sub>O. Toutes les données spectrophotométriques sont enregistrées sur un spectrophotomètre Kontron Uvikon 810. Des cuves jetables (1 cm × 1 cm × 4.5 cm) provenant de Muller Ratiolab (Dreieich, Allemagne) sont utilisées pour les mesures d'absorption dans le visible.

	T (µl)	N (µl)	H (µl)	XO (µl)	Échantillon (µl)	
cuve 0	2400	100	500	—	—	↳ λ <sub>560</sub> pendant 10 min
cuve 1	2300	100	500	100	—	↳ λ <sub>560</sub> pendant 10 min
cuve 2	2200	100	500	100	100	↳ λ <sub>560</sub> pendant 10 min

La diminution de l'absorbance est déterminée à 560 nm toutes les minutes, pendant 10 minutes. La pente de la cuve 1 (P<sub>1</sub>) représente l'effet maximum d'anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>o-</sup> (≈ 100 %). Alors que la pente de la cuve 2 (P<sub>2</sub>) représente l'effet de ces radicaux libres O<sub>2</sub><sup>o-</sup> piégés par les composés testés.

La quantité d'anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>o-</sup> résiduels peut ainsi être calculée et s'exprime par la relation :

$$\text{O}_2^{\text{o-}} \text{ résiduels} = (P_2 - P_0) / (P_1 - P_0) \times 100$$

L'activité antiradicalaire peut être définie par la quantité d'antioxydant nécessaire à inhiber 50 % des radicaux O<sub>2</sub><sup>o-</sup> générés par le système XOD-HPX (concentration efficace = EC<sub>50</sub> (mol/l de composés phénoliques).

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

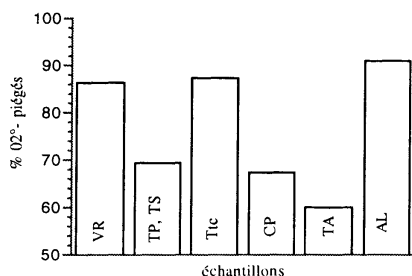
### I - RECHERCHE DES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES RESPONSABLES DE L'ACTIVITÉ ANTIRADICALE LAIRE DANS UN VIN ROUGE ÉLEVÉ EN CUVE

Un vin rouge de Merlot (1996) fermenté en cuve (VRc) a été fractionné selon la méthode GLORIES en 5 fractions :

- Tanins-Polysaccharides, Tanins-Sels (TP-TS),
- Tanins très condensés (Ttc),
- Procyanidines et Catéchines (P-C),
- Complexes Tanin-Anthocyane (T-A),
- Anthocyanes Libres (AL).

Dans un premier temps, la vinification en cuve nous assure de l'absence de composés phénoliques susceptibles d'être cédés au vin par le bois tels que les ellagitanins ou des fractions lignibles et simplifie de ce fait le fractionnement du vin et la recherche des antioxydants.

Ces cinq groupes phénoliques ont été récupérés, les tanins et anthocyanes présents ont été dosés avant de mesurer leur capacité antiradicalaire (% O<sub>2</sub><sup>•-</sup> piégés). Les résultats de ces dosages sont reportés dans le tableau 1 et les activités antiradicalaires, mesurées par le système XOD-HPX sur la figure 2. On s'aperçoit immédiatement



**Figure 2 - Activité antiradicalaire (exprimée en pourcentage de radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> piégés) pour les différentes fractions d'un vin rouge élevé en cuve.**

de la très forte efficacité de la fraction anthocyanique AL ( $\approx 91$  % de radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> piégés par cette fraction), correspondant aux groupes des anthocyanes libres, c'est à dire non combinées aux tanins. On peut donc en conclure que les anthocyanes libres sont les polyphénols les plus antiradicalaires des vins rouges, d'autant plus que les résultats analytiques (tableau 1) indiquent que cette fraction AL est faiblement concentrée (289 mg/l) par rapport aux autres fractions essentiellement tanniques (de l'ordre du g/l).

**Tableau 1**  
**Résultats des dosages des composés phénoliques dans les différentes fractions d'un vin rouge élevé en cuve.**

fractions phénoliques	[tanins corrigés] g/l	[anthocyanes] mg/l	% O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> piégés
1 AL	—	289	90,93
2 Ttc	1036	—	87,38
3 TPTS	527	—	69,51
4 CP	95	—	67,24
5 TA	95	67	60,07
6 Total	1753	356	86,03

Cette forte réactivité vis-à-vis des radicaux superoxydes peut s'expliquer par la fragilité des molécules anthocyaniques de part leur structure (ion oxonium, figure 3), elles seraient donc plus rapidement oxydables par ouverture du cycle C. Cependant, les anthocyanes des raisins et des vins de *Vitis Vinifera* sont exclusivement sous formes d'hétérosides monoglucosides (RIBÉREAU-GAYON, 1973), c'est-à-dire qu'une molécule de glucose est rattachée à la fonction hydroxyle du carbone C<sub>3</sub> de l'hétérocycle oxygéné C. Nous avons donc pris la précaution de vérifier si le glucose n'était pas à l'origine de l'activité fortement antiradicalaire des anthocyanes du vin. Or, la molécule de glucose soumise au système XOD-HPX présente un potentiel antiradicalaire uniquement pour des concentrations supérieures à 100 g/l ce qui n'est jamais le cas des vins secs. De plus, pour des concentrations de l'ordre de celles des anthocyanes (300 mg/l), il devient même prooxydant. L'activité antiradicalaire de la fraction AL des vins est donc bien due aux anthocyanes et non au glucose qui leur est rattaché. Nous avons de même comparé l'activité antiradicalaire de la malvidine chlorure (aglycone) à celle de la malvidine-3-mono-glucoside (3mG) (figure 4). Nous constatons alors que la malvidine-3mG a un effet antiradicalaire toujours supérieur à celui de la malvidine aglycone. Ceci va donc à l'encontre des résultats précédents étant donné que l'aglycone possède une fonction hydroxyle supplémentaire et que le glucose de la 3mG n'est pas actif sur les radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Néanmoins nous pouvons proposer une interprétation conformationnelle de ces résultats : La malvidine-3mG, en raison de la présence du glucose adopte très certainement une conformation différente de celle de la malvidine aglycone, ce qui lui confère une

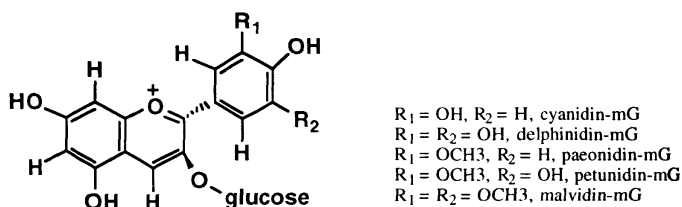


Figure 3 - Structure des anthocyanes du raisin et du vin

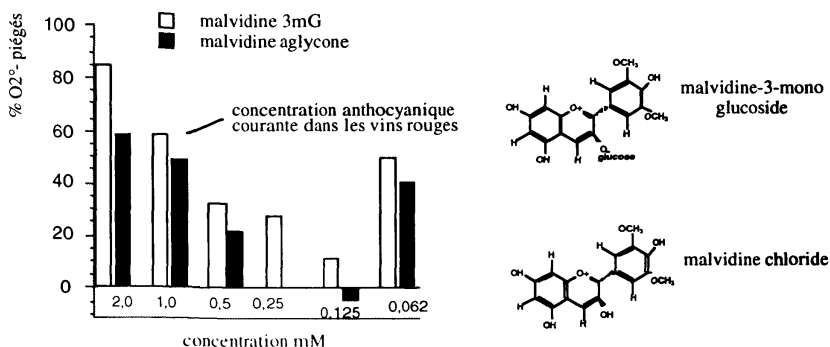
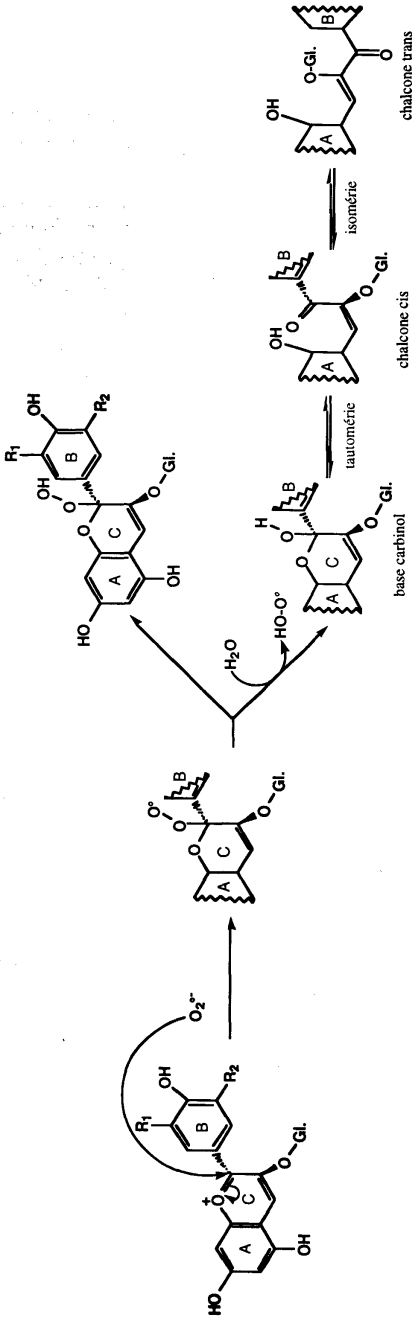


Figure 4 - Comparaison de la malvidine chlorure et de la malvidine-3-mono-glucoside en solution aqueuse (mêmes concentrations millimolaires)



1<sup>er</sup> voie: attaque du cycle C



2<sup>er</sup> voie: attaque du cycle B

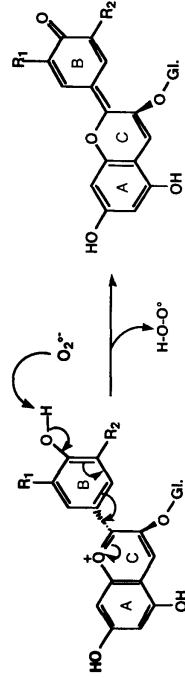
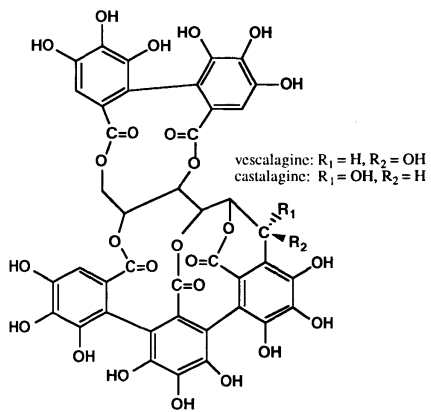


Figure 5 - Schéma des différentes voies hypothétiques de l'oxydation des anthocyanes par le radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.  
Le radical étant chargé négativement, la voie A (attaque du cation flavylum) serait privilégiée.

prédisposition à l'oxydation. On peut en effet supposer que le cycle benzénique B de la malvidine chloride vienne se rabattre sur l'hétérocycle oxygéné C, gênant par la même la fonction oxonium de cet hétérocycle et donc l'attaque radicalaire en ce point. Alors que les réactions d'oxydation de la malvidine-3mG seraient au contraire facilitées par attaque du noyau oxonium, le glucose bloquant stériquement le rapprochement du cycle B sur l'hétérocycle C. Des calculs de modélisation moléculaire, actuellement en cours, sont susceptibles de confirmer ces hypothèses. Un hypothétique schéma réactionnel est proposé figure 5, il nous faut cependant rappeler que ces arguments de mécanismes réactionnels ont été formulés pour l'anion superoxyde  $O_2^{\circ-}$ , c'est-à-dire pour des radicaux libres chargés négativement et donc susceptibles de réagir dans un premier temps et essentiellement avec l'oxonium (chargé positivement) des anthocyanes. Les résultats ne sont donc pas extrapolables aux autres espèces de radicaux libres non chargés comme  $^{\circ}OH$ ,  $^{\circ}OOH$ ... Des expériences sur ces espèces oxygénées actives, engendrées par la réaction de Fenton, et sur le radical stable commercialisé DPPH $^{\circ}$ , sont actuellement en cours dans notre laboratoire.

## II - COMPARAISON DE L'ACTIVITÉ ANTIRADICALAIRE POUR UN VIN BLANC ÉLEVÉ EN CUVE ET EN BARRIQUES

Pour étudier à présent l'intérêt de la présence des ellagitanins (figure 6) dans les vins, nous avons travaillé sur deux vins blancs, sachant qu'ils sont pauvres en composés phénoliques issus des raisins. En effet, ils sont exempts d'anthocyanes et contiennent très peu de procyanidines issus du processus de macération. Cela nous permet donc d'observer plus nettement le rôle des ellagitanins dans l'activité antiradicalaire. Pour cela, nous avons comparé un vin blanc fermenté en cuves (VBc) (Chardonnay, 1996) avec le même vin élevé en barriques neuves (VBb). Il est à noter que seul le conditionnement de la fermentation distingue VBc et VBb, toute chose étant égale par ailleurs. L'activité antiradicalaire, évaluée comme précédemment, a été mesurée directement sur VBc et VBb. Les résultats reportés sur la figure 7 montrent très clairement que VBb est plus antiradicalaire que VBc. Cela était prévisible en raison de la présence d'ellagitanins dans VBb et non dans VBc. En effet, les vins élevés en barriques neuves contiennent des ellagitanins provenant du bois, le dosage de ces polyphénols dans VBb, réalisé selon la méthode de PENG *et al.* (1991) adaptée, indique une présence de 80 mg/l d'ellagitanins pour ce vin. De plus, ces molécules, de par leur structure (figure 6) sont supposées être des antiradicaux très efficaces. En effet, la présence de noyaux gallates (3 fonctions hydroxyles en ortho) facilite les réactions radicalaires par délocalisation des charges comme le laisse supposer le schéma réactionnel de la figure 8.



**Figure 6 - Structure des ellagitanins identifiés dans les extraits de bois (plusieurs degrés de polymérisation peuvent coexister) d'après VIVAS, 1997.**

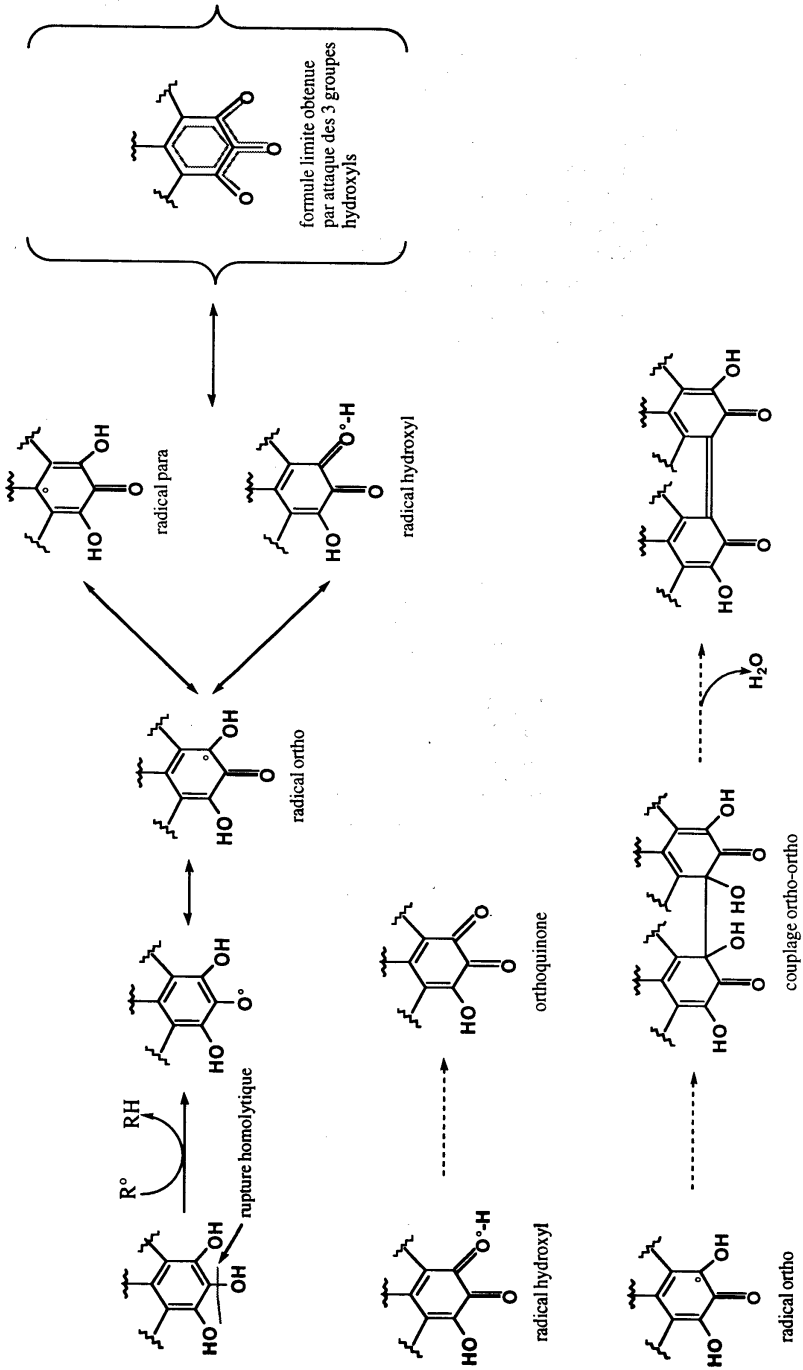
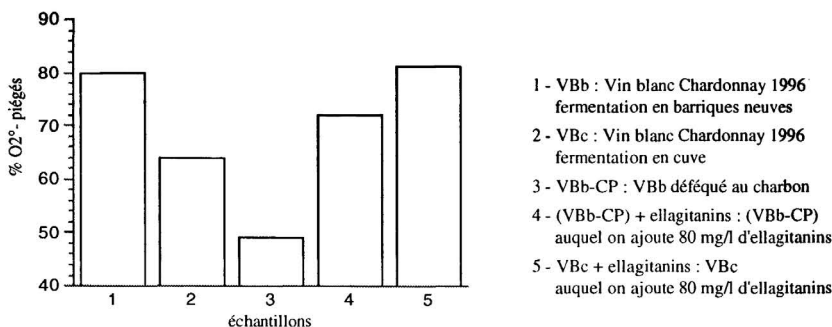


Figure 8 - Schéma des différentes voies hypothétiques de l'oxydation radicalaire des ellagitanins (sur les noyaux gallates).

## Effet radicalaire des vins rouges

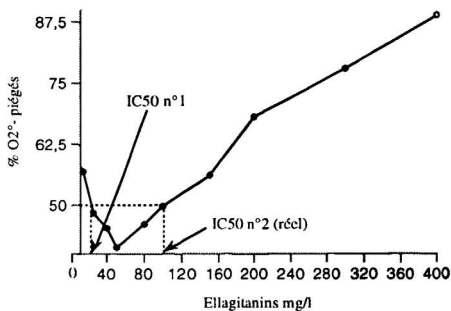


- 1 - VBb : Vin blanc Chardonnay 1996 fermentation en barriques neuves
- 2 - VBc : Vin blanc Chardonnay 1996 fermentation en cuve
- 3 - VBb-CP : VBb déféqué au charbon
- 4 - (VBb-CP) + ellagitanins : (VBb-CP) auquel on ajoute 80 mg/l d'ellagitanins
- 5 - VBc + ellagitanins : VBc auquel on ajoute 80 mg/l d'ellagitanins

**Figure 7 - Activité antiradicalaire (exprimée en pourcentage de radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> piégés) des différents échantillons**

Pour confirmer le rôle des ellagitanins dans cette augmentation du potentiel antiradicalaire de VBb par rapport à VBc, nous avons déféqué VBb au noir animal, nous supprimons ainsi tous les composés phénoliques (CP) susceptibles d'être présents dans VBb dont essentiellement les ellagitanins. Nous obtenons donc VBb-CP sur lequel nous mesurons à nouveau l'activité antiradicalaire. Les résultats (figure 7) nous montrent que l'effet antiradicalaire diminue sensiblement, dû à l'absence des ellagitanins mais certainement aussi à d'autres composés phénoliques car on constate que l'activité antiradicalaire de VBb-CP est inférieure à celle de VBc. Si on rajoute à présent 80 mg/l d'ellagitanins à VBb-CP [(VBb-CP) + ellagitanins], afin de se ramener au taux initial de VBb, l'activité antiradicalaire augmente alors par rapport à VBb-CP mais on ne retrouve pas tout à fait le même niveau que VBb car il manque encore divers composés phénoliques différents des ellagitanins et qui auraient un effet antiradicalaire non négligeable. Ceci confirme les résultats précédents. Par contre, l'adjonction de 80 mg/l d'ellagitanins à VBc (VBc + ellagitanins) provoque une remontée du potentiel antiradicalaire à un niveau identique à celui de VBb. Nous pouvons donc en conclure que la différence du potentiel antiradicalaire entre VBb et VBc est bien due à la présence des ellagitanins dans VBb.

Par ailleurs, la forte activité antiradicalaire des ellagitanins a été mise en évidence sur une solution synthétique d'ellagitanins (pH 3,4 ; 5 g acide tartrique ; 12 % EtOH) se rapprochant des conditions du vin, à différentes concentrations. Les résultats reportés sur la figure 9 indiquent un maximum d'efficacité pour des concentrations de l'ordre de 400 mg/l, à titre de comparaison, la vitamine E (antiradicalaire couramment employé en pharmacologie et cosmétologie) est à cette concentration beaucoup fois moins efficace que les ellagitanins. La concentration des ellagitanins nécessaire à inhiber 50 % des radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup>



**Figure 9 - Activité antiradicalaire (exprimée en pourcentage de radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> piégés) pour des concentrations croissantes en ellagitanins - Détermination du IC<sub>50</sub> (concentration en ellagitanins nécessaire pour piéger 50 % des radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup>).**

**Tableau 2**  
**Comparaison de différents antioxydants**  
**couramment utilisés en agro-alimentaire**  
**et en pharmacologie avec les composés**  
**phénoliques (issus du raisin et du bois)**  
**en fonction de leur IC<sub>50</sub> (concentration**  
**en antioxydant nécessaire**  
**pour piéger 50% des radicaux O<sub>2</sub><sup>•</sup>).**

Antioxydants	IC <sub>50</sub> (mg/l)
D-Cystéine	6760
D-Manitol	3417
SO <sub>2</sub>	3207
Glutathion	2600
THBP	615
Acide ascorbique (vitamine C)	187
Vitamine E	122
Ellagitanins (extraits du chêne)	109
Catéchine	73
Procyanidine dimère B <sub>1</sub>	49
Procyanidines oligomères (extraites des pépins de raisins)	52

formés au cours d'une réaction enzymatique spécifique, (IC<sub>50</sub>) a été déterminée à 109 mg/l ce qui est proche de la concentration dans les vins (figure 9). Les valeurs des IC<sub>50</sub> de différents antioxydants couramment utilisés dans le domaine agro-alimentaire, pharmacologique ou autre sont comparées dans le tableau 2 : On constate que les ellagitanins sont généralement de meilleurs antioxydants (IC<sub>50</sub> parmi les plus faibles), seuls d'autres composés phénoliques (issus du raisin) ont une activité antiradicalaire légèrement supérieure. L'avantage d'une utilisation de ces ellagitanins en tant qu'agent antiradicalaire est essentiellement au niveau de la facilité et du faible coût de leur extraction, ce qui n'est pas le cas de polyphénols du raisin et du vin, tout en ayant une activité en moyenne bien supérieure à celle des antioxydants employés actuellement.

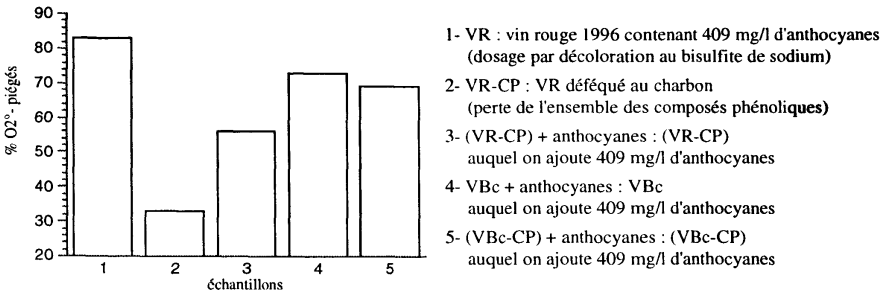
### III - MISE EN ÉVIDENCE DU ROLE DES ELLAGITANINS ET DES ANTHOCYANES DANS LE « FRENCH PARADOX »

Nous connaissons à présent les composés phénoliques du vin susceptibles d'intervenir comme agent protecteur des oxydations radicalaires, le fort potentiel antioxydant des anthocyanes et des ellagitanins étant alors démontré. Il nous reste cependant à déterminer leur capacité antiradicalaire au sein même du milieu vin, c'est-à-dire leur intervention dans le « French Paradox » reposant sur une consommation modérée de vin rouge.

#### 1) Participation des anthocyanes à l'activité antiradicalaire d'un vin rouge

Pour visualiser l'effet des anthocyanes dans l'activité antiradicalaire d'un vin rouge, le vin VRc contenant 409 mg/l d'anthocyanes totales (dosées par décoloration au bisulfite de sodium) a été déféqué au charbon actif afin de lui ôter la totalité de son contenu phénolique (VRc-CP). Les activités antiradicalaires de VRc et de VRc-CP sont reportées sur la figure 10. On peut noter que VRc a un potentiel antiradicalaire de 83 %. En l'absence de ses composés phénoliques, il perd une grande partie de son potentiel antioxydant, ce qui nous montre bien que l'essentiel du pouvoir antioxydant des vins est bien attribuable à leurs composés phénoliques. Dans un second temps, on observe (figure 10) que l'adjonction de  $\approx 400$  mg/l d'anthocyanes (extraites de pellicules de Merlot) à VRc déféqué (VRc-CP) provoque une augmentation de 70 % de cette activité par rapport au vin rouge témoin (VRc). On démontre ainsi l'importance de la participation des anthocyanes à l'activité antiradicalaire des vins rouges. De même, nous avons vérifié que l'adjonction de cette concentration anthocyanique à VBc entraînait un taux de radicaux O<sub>2</sub><sup>•</sup> piégés assez proche de

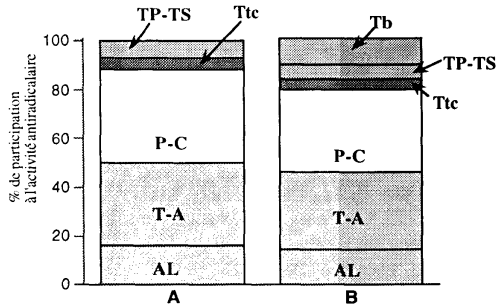
celui de VRc témoin. Nous en concluons donc que les anthocyanes sont en grande partie responsables de l'activité antiradicalaire des vins rouges.



**Figure 10 - Activité antiradicalaire (exprimée en pourcentage de radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> piégés) pour les différents échantillons.**

## 2) Participation des ellagitanins à l'activité antiradicalaire d'un vin rouge

Le pourcentage de radicaux libres O<sub>2</sub><sup>•-</sup> piégés par les différents groupes phénoliques (tableau 1) a été ramené au g/l de ses différentes fractions comme nous le montre l'histogramme A de la figure 11. On constate ainsi que, pour un vin rouge élevé en cuve, l'activité antiradicalaire est due à 16 % à la fraction AL, à 34 % aux T-A, à 38 % aux procyanidines oligomères (P-C), à 5 % aux procyanidines polymérisées (Ttc) et à 7 % aux complexes TP-TS. Par contre, l'expérience réalisée sur les vins élevés en barriques, nous a démontré que les tanins du bois, cédés au vin par la barrique, venaient se rajouter à ce pool de molécules antiradicalaires (histogramme B, figure 11) en prenant une part de 11 %, ce qui est loin d'être négligeable et s'explique en raison de la structure particulièrement oxydable de ces molécules.



**Figure 11 - Participation des différentes fractions phénoliques d'un vin rouge à son activité antiradicalaire (en % de radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> piégés).**

A: vin rouge élevé en cuve

B: vin rouge élevé en barriques neuves

## CONCLUSION

Depuis quelques décennies, des scientifiques, notamment par le biais de nombreuses études épidémiologiques (GEY, 1990 ; DOLL, 1990) ont confirmé certaines observations relatives au phénomène du « French Paradox », à savoir qu'une consommation modérée de vin rouge réduit de 25 % à 60 % les risques de maladies cardio-vasculaires et de mortalité liée à l'ischémie coronaire. Certaines substances phénoliques retrouvées spécifiquement dans la fraction non-alcoolique des vins se comportent comme des antioxydants capables de limiter l'oxydation des lipides et sont donc responsables des effets cardioprotecteurs observés. La propriété essentielle de ces

composés phénoliques expliquant leurs effets bénéfiques sur la santé est leur aptitude à capter les radicaux libres, fortement néfastes pour la santé puisqu'ils s'attaquent aux différents constituants de la cellule entraînant ainsi sa destruction ou des dysfonctionnements irréversibles (AMES, 1983 ; PRYOR, 1982). Les composés phénoliques préservés dans le vin pourraient donc intervenir comme préventifs des maladies dégénératives telles que les maladies cancéreuses ou neurodégénératives comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, dérivant des attaques radicalaires sur les cellules.

Ce travail nous a permis de définir les composés phénoliques les plus susceptibles d'intervenir dans cette protection antiradicalaire. Nous avons ainsi démontré l'importance des anthocyanes et des ellagitanins dans les vins rouges, à l'origine de la notion de « French Paradox ». Il convient à présent d'étudier le comportement de ces antiradicaux directement sur cellules, ce qui est en cours dans notre laboratoire, et, dans un but pharmaceutique, il serait intéressant d'étudier et d'améliorer la pénétration de ces composés à l'intérieur des cellules pour leur assurer un maximum d'efficacité.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMES BN., 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens : oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, **221**, 1256-1264.
- AMES BN., SHIGENA MK. et HAGEN TM., 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 795-7922.
- DOLL R., 1990. An overview of the epidemiological evidence linking diet and cancer. *Proc. Nutr. Soc.*, **49**, 119-131.
- DRAGSTED CO., STRUBE M. et LARSEN JC., 1993. Cancer protective factors in fruits and vegetables : biochemical and biological background. *Pharmacol. Toxicol.*, **72** (suppl. 1), 116-135.
- FUHRMAN B., LAVY A. et AVIRAM M., 1995. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low density lipoprotein to lipid peroxidation. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **61**, 549-554.
- GEY KF., 1990. The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease : epidemiology and mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.*, **18**, 1041-1045.
- GLORIES Y., 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. *Thèse docteur ès sciences*, Université de Bordeaux.
- GLORIES Y., 1988. Correction du dosage des tanins (résultats non publiés).
- HODGSON E.K. et FRIDOVICH I., 1976. The accumulation of superoxide radical during the aerobic action of xanthine oxidase. A requiem for  $H_2O_4^-$ . *Biochim. Biophys. Acta*, **430**, 182-188.
- KANNER J., FRANKEL E., GRANIT R., GERMAN B. et KINSELLA JE., 1994. Natural antioxidants in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 64-69.
- LIETTY A., CRISTONI A. et PICCI M., 1976. Studies on *Vaccinium myrtillus* anthocyanosides. I. Vasoprotective and antiinflammatory activity. *Arzneim-Forsch.*, **26**, n° 5, 829-832.
- OKUDA T., YOSHIDA T. et HATANO T., 1992. *Antioxydant effects of tannins and related polyphenols. Phenolic compounds in food and their effects on health*, II. Huang MT., Ho CT., Lee CY., Ed. American Chemical Society, Washington DC, 87-97.
- PENG S., SCALBERT A. et MONTIES B., 1991. Insoluble ellagitanins in *Castanea*

*sativa* and *Quercus petraea* woods. *Phytochemistry*, **30**, 374-378.

PRYOR WA., 1976 à 1982. *Free radicals in biology*. Ed. Academic Press, New York, 1-5.

PRYOR WA., TAMURA M., DOOLEY MM., PREMOVIC PI. et CHURCH DF., 1983. Oxy-Radicals and Their Scavenger Systems : Cellular and Medical Aspects. Cohen G. et Grennwald R., Ed. Elsevier, Amsterdam, **2**, 185-192.

RENAUD S. et DE LORGERIL M., 1992. Wine, alcohol, platelets and the Fench paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **339**, 1523-1526.

RIBÉREAU-GAYON P. et STONESTREET E., 1965. Le dosage des anthocyanes dans les vins rouges. *Bull. Soc. Chim.*, **9**, 2649-2652.

RIBÉREAU-GAYON P. et STONESTREET E., 1966. Le dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie Anal.*, **48**, 188-192.

RIBÉREAU-GAYON P., 1973. Interprétation chimique de la couleur des vins rouges. *Vitis*, **12**, 119-142.

ROGGERO JP. et ARCHIER P., 1989. Mise au point d'une méthode de dosage des phénols

simples des vins. Application à des vins d'origines et d'âges différents. *Connaissance Vigne Vin*, **23**, 25-37.

SAINT-CRICO DE GAULEJAC N., 1998. Comparative study of polyphenols scavenging activities estimated by different methods. Soumis.

VIVAS N., GALVIN C. et CHABOT PH., 1992. La maîtrise de la macération dans la production de vins rouges de qualité. *Progr. Agric. Vitic.*, **109**, 79-88.

VIVAS N., 1997. Recherches sur la qualité du chêne français de tonnellerie (*Q. petraea* Lieb., *Q. robur* L.) et sur les mécanismes d'oxydoréduction des vins rouges au cours de leur élevage en barriques. *Thèse docteur ès sciences*, Université Victor Segalen, Bordeaux II.

WOOD AW., HUANG MT., CHANG RL., NEWMARK HL., LEHR RE., YAGI H., SAYER JM., JERINA DM. et CONNEY AH., 1982. Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols : exceptional activity of ellagic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 5513-5517.



ISSN : 1274 - 2244

**Copyright 1998 © Vigne et Vin Publications Internationales - Bordeaux (France)**  
Imprimé en France par La Nef-Chastrusse