



## Activité antiradicalaire des vins rouges : synergie des anthocyanes et ellagitanins. Comparaison avec différentes sources de polyphénols

Nathalie SAINT-CRICO DE GAULEJAC<sup>1</sup> et Chantal CHAUGIER<sup>2</sup>,

Dominique BUGANET<sup>2</sup> et Nicolas VIVAS<sup>1</sup>

(1)Demptos cooperage, détaché au Centre d'Etude Structurale et d'Analyse  
des Molécules Organiques (CESAMO),  
Université de Bordeaux I, 351 cours de la Libération, 33405 Talence (France).

(2)Société Française de Recherches et d'Investissement (SFRI), Berganton  
33127 Saint-Jean d'Ilac (France)

Mots clés: French Paradox, composés phénoliques, ellagitanins,  
anthocyanes, antiradicalaire

*Nos études antérieures soulignaient la forte activité antiradicalaire des vins rouges, essentiellement due à ses composés phénoliques et particulièrement à sa fraction anthocyanique et ellagique. Cependant, l'étude de ces composés purifiés ne s'est pas révélée très intéressante étant donné que les extraits purifiés à partir du matériel végétal (raisins et bois de chêne) ou même les molécules pures (commercialisées ou synthétisées) présentent une activité antiradicalaire systématiquement inférieure à celle du vin rouge lui-même. Une activité synergique des polyphénols entre eux, mais également entre polyphénols et autres composés du vin permet en effet d'augmenter leur potentiel antiradicalaire, dès lors que ces derniers sont dans un milieu phénolique complexe, a fortiori le milieu « vin rouge ». Par ailleurs, l'étude de différentes préparations pharmaceutiques à base de flavonoïdes ne s'est pas révélée très concluante. Effectivement, nous avons souligné la participation de l'éthanol, en faible pourcentage, dans l'activité antiradicalaire des polyphénols; ces résultats étant d'autant plus marqués que l'on se rapproche des conditions in vivo.*

Les flavonoïdes et les polyphénols sont des composés largement répandus dans les végétaux et notamment dans certains fruits, légumes et céréales. On les retrouve donc en quantité non négligeable dans notre alimentation, surtout par la consommation de diverses boissons telles que les vins rouges et les thés. Or, ces composés phénoliques ont la particularité de piéger les radicaux libres, substances fortement néfastes pour l'organisme, étant donné qu'ils vont oxyder les divers 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). Ces composés ont donc fait l'objet de nombreuses recherches en raison de leur propriété à capter les radicaux, protégeant ainsi l'organisme des dommages oxydatifs, cause de divers dysfonctionnements du corps humain tels que les maladies cardio-vasculaires (RENAUD et DE LORGERIL, 1992), les états inflammatoires (LIETTY *et al.*, 1976), les maladies neurodégénératives (Parkinson, Alzheimer) (OKUDA *et al.*, 1992)... Ils sont ainsi promus à un avenir thérapeutique envers toutes les pathologie engendrées par les radicaux libres (CHENG *et al.*, 1986 ; HERTONG *et al.*, 1993).

Dans les vins rouges, les composés phénoliques proviennent des parties solides du raisin (pépins et pellicules) et du bois dans la mesure où les vins sont élevés en barriques. Ces composés sont extraits lors de la fermentation et de la macération (ROGGERO et ARCHIER, 1989 ; VIVAS *et al.*, 1992).

Il est désormais reconnu que les vins rouges possèdent un fort potentiel antioxydant dû à ces composés phénoliques (tanins et anthocyanes), présents en quantité adéquate pour assurer une activité optimum et même une action synergique entre eux (SAINT-CRICO DE

GAULEJAC *et al.*, 1999a). Leur mode d'action a été envisagé sur des molécules simples (anthocyanes pures, procyanidines, et ellagitanins monomères) et en présence de radicaux oxygénés ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $^{\cdot}OH...$ ) (SAINT-CRICO DE GAULEJAC *et al.*, 1998a). Par ailleurs, nous avons déjà mis en évidence « l'effet dose » de l'activité antiradicalaire des composés phénoliques des vins rouges (Saint-CRICO DE GAULEJAC *et al.*, 1999b) étant donné que cette activité antiradicalaire est fortement dépendante de la concentration en polyphénols, mais également de leur structure physico-chimique. Néanmoins, il a été constaté, lors de ces études, qu'une quantité adéquate de ces composés était nécessaire pour qu'ils puissent exercer une action antiradicalaire efficace (KANNER *et al.*, 1994). Dans cet article, nous avons donc comparé le potentiel antiradicalaire des extraits phénoliques d'un vin rouge (extrait phénolique total, extrait tannique et extrait anthocyanique) avec ceux des molécules pures correspondantes. L'intérêt ici étant de visualiser l'activité synergique des composés phénoliques entre eux (dès lors qu'ils sont en mélange) leur permettant d'assurer une activité antiradicalaire optimale. Cette étude, réalisée *in vitro* par voie enzymatique, a par la suite été transposée sur des analyses se rapprochant de plus en plus des conditions *in vivo*, dans le but d'observer le comportement de ces extraits phénoliques en milieu cellulaire et de les comparer à ceux des polyphénols purs. En dernier lieu, nous avons comparé différentes préparations pharmaceutiques à base de polyphénols et des produits alimentaires, naturellement riches en composés phénoliques, afin de comparer leur efficacité antiradicalaire en fonction de leur contenu phénolique.

## Résultats et discussion

### Rappels sur les composés phénoliques responsables de l'activité antiradicalaire dans un vin rouge élevé en cuve (SAINT-CRICO DE GAULEJAC et al., 1998a)

Nous savons déjà que le vin rouge possède un fort potentiel antiradicalaire dû à ses composés phénoliques (tanins, ellagitanins et anthocyanes) (SAINT-CRICO DE GAULEJAC et al., 1998a). Nous avons également démontré quels étaient, parmi ces composés phénoliques, les plus susceptibles d'intervenir dans cette action antiradicalaire. Les résultats alors obtenus lors de ces études antérieures ont souligné la forte participation des anthocyanes libres, des ellagitanins dans la mesure où les vins ont pu bénéficier d'un élevage en barriques et des tanins procyanidiques, étant donné que ces derniers constituent la plus grande majorité des polyphénols des vins rouges.

En effet, sur vin rouge fractionné selon la méthode GLORIES (1978) en 5 groupes phénoliques :

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

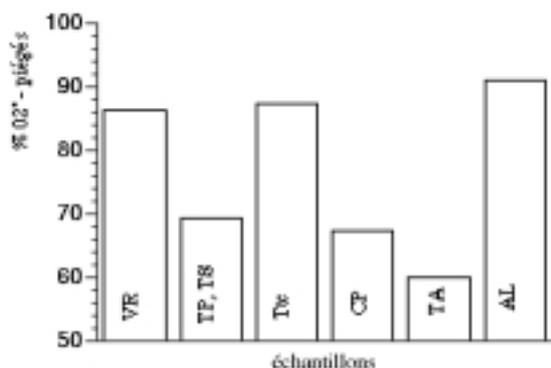


Figure 1 - Activité antiradicalaire (exprimée en pourcentage de radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> piégés) pour les différentes fractions d'un vin rouge élevé en cuve (d'après SAINT-CRICO DE GAULEJAC et al., 1998a).

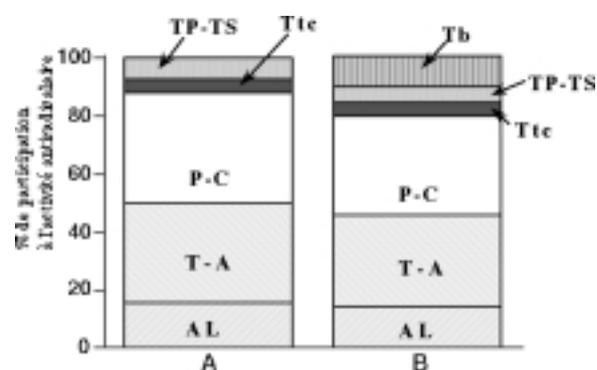


Figure 2 - Participation des différentes fractions phénoliques d'un vin rouge à son activité antiradicalaire (en % de radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> piégés) (d'après SAINT-CRICO DE GAULEJAC et al., 1998a).  
A: vin rouge élevé en cuve  
B: vin rouge élevé en barriques neuves

nous avons immédiatement remarqué la très forte efficacité de la fraction anthocyanique AL (≈ 91 % de radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> piégés par cette fraction), correspondant aux groupes des anthocyanes libres (figure 1). Nous en avons alors conclu que les anthocyanes libres sont les polyphénols les plus antiradicalaires des vins rouges, d'autant plus les résultats analytiques indiquaient que cette fraction AL était faiblement concentrée (289 mg/l dans ce cas) par rapport aux autres fractions essentiellement tanniques (de l'ordre du g/l).

Par ailleurs, nous avons également souligné la forte participation des ellagitanins à l'activité antiradicalaire des vins rouges. Pour cela, le pourcentage de radicaux libres O<sub>2</sub><sup>•-</sup> piégés par les différents groupes phénoliques a été ramené au g/l de ses différentes fractions (histogramme A, figure 2).

Nous avons alors constaté 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. Dans un même temps, l'expérience réalisée sur les vins élevés en barriques nous montrait que les tanins du bois, cédés au vin par la barrique, venaient se rajouter à ce pool de molécules antiradicalaires (histogramme B, figure 2) en prenant une part de 11 % loin d'être négligeable.

Ce travail nous avait ainsi permis de définir les composés phénoliques les plus susceptibles d'intervenir dans le potentiel antiradicalaire des vins rouges. Nous avons démontré l'importance des anthocyanes et des ellagitanins, à l'origine de la notion de « French Paradox » ; les tanins procyaniques étant également fortement impliqués dans cette activité antiradicalaire en raison de leur importante concentration dans les vins rouges au regard des anthocyanes et des ellagitanins. Néanmoins les phénomènes de polymérisation de ces derniers affectent leur réactivité antiradicalaire et seuls les tanins oligomériques ont des activités comparables à celle des anthocyanes ou des ellagitanins (SAINT-CRICO DE GAULEJAC et al., 1999b).

### Mise en évidence de l'activité synergique des polyphénols dans le potentiel antiradicalaire des vins rouges

#### • Extraits phénoliques d'un vin rouge

La figure 3 représente les différents groupes phénoliques extraits d'un vin rouge :

- extrait sec,
- fraction phénolique totale,

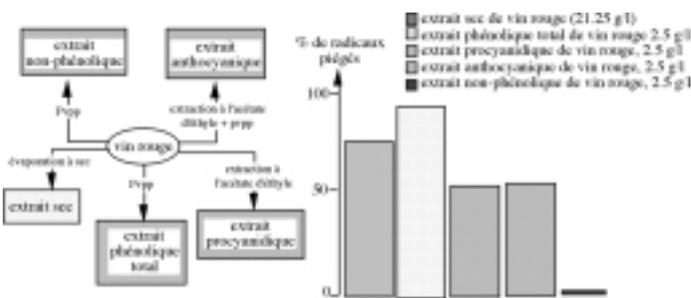


Figure 3 - Activité antiradicalaire (pourcentage de radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> piégés dans le système HPX-XOD) des différentes fractions phénoliques et la fraction non-phénolique d'un vin rouge).

- fraction tannique,
- fraction anthocyanique.

La fraction non phénolique a également été récupérée afin de nous assurer de son caractère non-antiradicalaire et de vérifier par la même la provenance du potentiel antiradicalaire des vins rouges via leur contenu phénolique. Ces cinq fractions sont récupérées et leur activité antiradicalaire est mesurée par le système enzymatique XOD-HPX, permettant de déterminer la capacité des échantillons à piéger les radicaux libres  $O_2^{\bullet-}$  (HODGSON et FRIDOVICH, 1976 ; SAINT-CRICO DE GAULEJAC *et al.*, 1999a) sur une gamme de concentrations allant de 10 g.l<sup>-1</sup> à 19,5 mg.l<sup>-1</sup>. Les résultats obtenus pour des concentrations de 2500 mg.l<sup>-1</sup> (représentant le taux de polyphénols contenus dans le vin rouge initial) sont reportés sur la figure 3.

On distingue immédiatement la forte capacité antiradicalaire de la fraction phénolique totale essentiellement au regard des autres fractions phénoliques (tannique et anthocyanique). Cependant, il nous est ici difficile de conclure quant à la capacité antiradicalaire de l'extrait sec du vin. En effet, même si ce dernier est nettement moins performant à la concentration de 2500 mg.l<sup>-1</sup>, les composés phénoliques constituant cette fraction ne sont pas majoritaires : ils ont été dosés dans cet extrait à seulement 295 mg.l<sup>-1</sup>, c'est-à-dire qu'ils ne représentent que 12 % de cette fraction. Ramenés à la concentration de 2 500 mg.l<sup>-1</sup> (soit l'extrait sec ramené à 21.25 g.l<sup>-1</sup>), ces composés sont alors fortement antiradicalaires puisqu'ils sont susceptibles de piéger 98 % de radicaux  $O_2^{\bullet-}$  (figure 3). Cette fraction constituée par l'extrait sec du vin rouge apparaît donc comme étant la plus antiradicalaire.

Ces résultats soulignent donc le fait que les composés phénoliques du vin rouge expriment davantage leur capacité antiradicalaire en présence des autres composés du vin, sans que pour autant ces derniers ne possèdent par eux-mêmes d'activité antiradicalaire (étant donné que la fraction non phénolique ne retient quasiment pas de radicaux).

On peut donc déjà mettre en avant le rôle des substances non antiradicalaires susceptibles d'exalter l'activité antiradicalaire des composés phénoliques. Plusieurs éléments peuvent alors expliquer ce phénomène :

- La présence de métaux (fer, cuivre) dans les vins, à l'état de traces et à différents degrés d'oxydation, pouvant être chélatés par les polyphénols et catalyser les réactions radicalaires ;
- La formation de combinaisons « polyphénols / non-phénols » qui renforcerait les propriétés antiradicalaires des composés phénoliques ;
- La présence de substances non phénoliques provoquerait des configurations et conformations stéréochimiques des polyphénols plus aptes à piéger les radicaux.

De plus, ces hypothèses semblent se confirmer davantage sur les fractions tannique et anthocyanique de ce vin rouge. Effectivement, les concentrations nécessaires pour inhiber 50 % des radicaux  $O_2^{\bullet-}$  formés lors de la réaction enzymatique spécifique (EC50) ont été déterminées pour chacune des fractions et sont reportées dans le tableau 1.

On constate ainsi que la fraction phénolique totale possède le EC50 le plus faible, soit la plus forte activité antiradicalaire. Les autres fractions phénoliques sont relativement moins performantes bien qu'étant cependant plus actives du point de vue des activités antiradicalaires que divers antioxydants couramment utilisés dans les domaines agro-alimentaire et pharmacologique (SAINT-CRICO DE GAULEJAC *et al.*, 1998a). On met ainsi en évidence « l'activité synergique » des composés phénoliques avec les autres substances des vins rouges, de même que la synergie des composés phénoliques entre eux, puisqu'ils sembleraient, dans cette première expérience, plus actifs vis-à-vis des radicaux dès lors qu'ils sont en mélange.

Pour vérifier ces hypothèses, il nous faut compléter l'étude sur des molécules pures et en mélanges.

#### • Comparaison de l'activité antiradicalaire des anthocyanes pures avec un extrait anthocyanique de pellicules de raisins et un extrait anthocyanique synthétisé

Sur ce même principe, nous avons comparé l'activité antiradicalaire d'anthocyanes pures (commercialisées)

**Tableau 1 - Concentrations des extraits de vin rouge entraînant une inhibition de 50 % des radicaux  $O_2^{\bullet-}$  (valeurs EC50) et activités antiradicalaires réelles de ces extraits (pourcentage de  $O_2^{\bullet-}$  piégés par les concentrations réelles de ces fractions dans le vin rouge, sans dilution) dans le système HPX-XOD.**

extrait de vin rouge <sup>a)</sup>	% $O_2^{\bullet-}$ piégés (concentration réelle) <sup>b)</sup>	EC50 (mg.l <sup>-1</sup> ) <sup>b)</sup>
extrait sec (5)	77 ± 3	48 ± 1
extrait phénolique total (4)	98 ± 2	43 ± 1
extrait procyanidique (4)	50 ± 4	50 ± 1
extrait anthocyanique (4)	51 ± 3	52 ± 2
extrait non-phénolique (4)	4 ± 1	—

a) Le chiffre entre parenthèses représente les nombres de préparations différentes

b) Les nombres représentent les moyennes ± SD des résultats de 4 à 5 (chiffre entre parenthèses) préparations différentes

**Tableau 2 - Valeurs EC50 des anthocyanes pures (système HPX-XOD). Comparaison avec la fraction anthocyanique extraite de pellicules raisins et avec une solution modèle d'anthocyanes.**

Composés	EC50 (mg.l <sup>-1</sup> ) <sup>a)</sup>	% inhibition <sup>b)</sup>
fraction anthocyanique de pellicules (4)	97 ± 4	
solution modèle anthocyanique (4)	216 ± 4	55.1
anthocyanes pures :		
delphinidine (6)	170 ± 4	42.9
cyanidine (6)	250 ± 9	61.2
cyanidine-3mG (6)	325 ± 11	70.1
paéonidine (5)	380 ± 7	74.5
paéonidine-3mG (5)	412 ± 12	76.5
malvidine (5)	404 ± 21	76.0
malvidine-3mG (5)	517 ± 23	81.2

a) Les nombres représentent les moyennes ± SD des résultats de 4 à 6 (chiffre entre parenthèses) préparations différentes

b) Pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire des anthocyanes pures par rapport aux extraits végétaux correspondants (calculé en fonction de la concentration en mg.l<sup>-1</sup>) - Indice d'activité synergique

avec un mélange anthocyanique obtenu par extraction des anthocyanes monoglucosylés des pellicules de raisins noirs. Les résultats obtenus pour les anthocyanes purs sont reportés dans le tableau 2. Les fortes réactivités de ces molécules anthocyaniques vis-à-vis de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> s'explique par la fragilité de leur structure, notamment au niveau de l'ion oxonium susceptible d'agir très rapidement en présence de radicaux chargés par ouverture du cycle C (SAINT-CRICO DE GAULEJAC *et al.*, 1999c).

D'un autre côté, la même expérience est réalisée sur la fraction anthocyanique issue des pellicules de raisins. Les résultats (tableau 2) montrent clairement la plus forte efficacité de cette fraction anthocyanique par rapport aux molécules pures.

Parallèlement, la mesure de l'activité antiradicalaire est réalisée sur une solution modèle d'anthocyanes monoglucosylés commercialisés et rapportées aux mêmes concentrations que celles retrouvées dans la fraction extraite des pellicules. Les résultats (tableau 2) soulignent la plus faible activité de cette solution synthétique par rapport à l'extrait végétal. Cependant l'extrait anthocyanique synthétique reste plus efficace que les anthocyanes purs.

Ainsi la répartition des anthocyanes dans les pellicules (mélange des cinq anthocyanes monoglucosylés, RIBÉREAU-GAYON, 1973) est telle que l'activité antiradicalaire des raisins est plus importante que celle d'une seule anthocyane monoglucosylée à la même concentration. Cette conclusion s'appuie elle aussi sur le fait que la fraction anthocyanique extraite des pellicules présente une valeur EC<sub>50</sub> plus faible que celles des molécules pures en solution (tableau 2). Ces résultats résul-

**Tableau 3 - Concentrations des ellagitanins purs et des fractions ellagiques extraites de bois de chêne entraînant une inhibition de 50% des radicaux O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (valeurs EC<sub>50</sub>) dans le système HPX-XOD.**

Composés	EC <sub>50</sub> (mg.l <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	EC <sub>50</sub> (mM.l <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	% pureté <sup>b</sup>	% inhibition <sup>d</sup>
<b>Fractions ellagiques de bois de chêne (4)<sup>c</sup></b>				
fraction 1 : ellagitanins totaux (4)	109 ± 3	117 ± 3		
fraction 2 : polysaccharides(4)	—	—		
fraction A (4) : ellagitanins monomères	132 ± 4	141 ± 4		
fraction B (4) : ellagitanins oligomères	111 ± 2	119 ± 2		
fraction C (4) : ellagitanins polymères	467 ± 6	500 ± 6		
<b>Ellagitanins purs</b>				
vescalagine (5)	138 ± 4	148 ± 4	89.6	21.0
castalagine (5)	183 ± 2	196 ± 2	94.3	40.4
vescaline (5)	281 ± 7	445 ± 11	88.2	61.2
castaline (5)	247 ± 5	391 ± 8	89.7	55.9

a) Les nombres représentent les moyennes ± SD des résultats de 4 à 6 (chiffre entre parenthèses) préparations différentes

b) Pourcentage de pureté obtenu par RMN 1H (bruker DPX 400)

c) EC<sub>50</sub> (mM.l<sup>-1</sup>) en équivalent castalagine

d) Pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire des ellagitanins purs par rapport à la fraction 1 de l'extrait de bois de chêne (calculé en fonction de la concentration en mg.l<sup>-1</sup>) - Indice d'activité synergique

teraient de l'activité synergique des anthocyanes entre elles.

On met ainsi en évidence l'importance des activités synergiques des polyphénols entre eux qui régissent en partie leur potentiel antiradicalaire, l'effet de concentration ne permettant pas, à lui seul, d'expliquer la forte capacité des polyphénols à piéger les radicaux libres.

#### • Comparaison de l'activité antiradicalaire d'ellagitanins purs avec les extraits ellagiques de bois de chêne

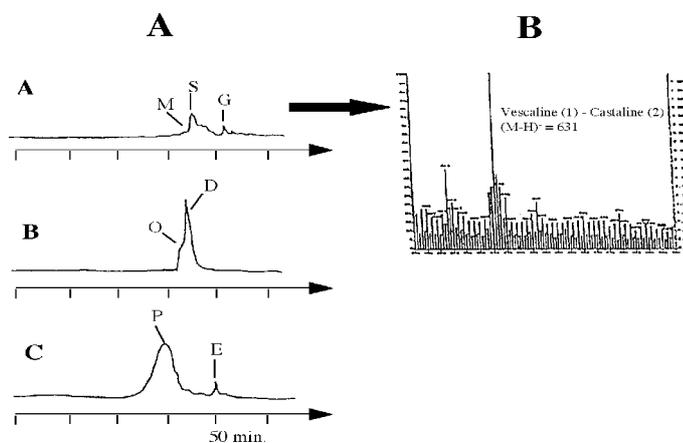
Pour confirmer cette hypothèse, nous avons repris cette expérience sur les ellagitanins, autres molécules phénoliques particulièrement impliquées dans le potentiel antiradicalaire des vins.

Les valeurs des EC<sub>50</sub> obtenues pour les ellagitanins purs sont répertoriées dans le tableau 3 et comparées à celles des extraits ellagiques de bois de chêne. L'injection d'un extrait aqueux de bois de chêne sur colonne basse pression de gel LH20 permet d'obtenir le fractionnement des ellagitanins en fonction de leur degré de polymérisation croissant selon le principe de perméation de gel (Vivas, 1997 ; figure 4). La caractérisation de ces fractions en LSIMS et confirme le contenu ellagique des extraits ainsi que leur degré de polymérisation.

La fraction 1 correspond à l'extrait total ellagique purifié par précipitation des polysaccharides, La fraction 2 contient les polysaccharides récupérés. Ces deux fractions sont analysées afin de comparer leur activité antiradicalaire avec celles des fractions ellagiques purifiées par basse pression (figure 4) :

- fraction A : ellagitanins monomères,
- fraction B : ellagitanins oligomériques,
- et fraction C : ellagitanins polymérisés.

La capacité antiradicalaire de ces cinq fractions est par la suite testée sur l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> par le test enzymatique HPX-XOD comme précédemment. La comparaison des valeurs EC<sub>50</sub> obtenues par l'étude du



**Figure 4 - Détermination des fractions ellagiques en fonction de leur degré de polymérisation.**

4A : Chromatogramme basse pression d'un extrait ellagique de bois de chêne

(E : acide ellagique ; G : acide gallique ; S : castaline, vescaline ; M : ellagitanins monomères ; D : ellagitanins dimères ; O : ellagitanins oligomères ; P : polymères).

4B : Spectre de masse (LSIMS) de la fraction A.

comportement de ces fractions sur une gamme de concentrations de 10 g.l<sup>-1</sup> à 19.5 mg.l<sup>-1</sup> avec celles déterminées pour les ellagitanins purs (tableau 3) soulignent l'activité importante de la fraction 1 par rapport à la fraction polysaccharidique, mais également par rapport aux autres fractions ellagiques purifiées en fonction de leur degré de polymérisation. Ainsi, les plus faibles valeurs obtenues dans le cas des fractions ellagiques et notamment pour la fraction 1, la plus complexe du point de vue de son contenu phénolique, par rapport aux molécules purifiées, soulignent une fois de plus le caractère synergique des activités antiradicalaires de ces composés.

• **Activité antiradicalaire de polyphénols purs sur ADN plasmidique. Comparaison avec les extraits phénoliques de raisins**

La synergie des activités antiradicalaires des polyphénols est à présent bien établie et vérifiée sur plusieurs familles de ces composés. Nous avons étudié le comportement de ces composés en milieu cellulaire pour se rapprocher des conditions *in vivo* et vérifier si cet effet de synergie s'exprime encore dans un milieu physico-chimique et physiologique totalement différent (modification du pH, présence d'enzymes extra et intracellulaire...). Pour simplifier les manipulations et clarifier les résultats, nous avons sélectionné un groupe de molécules : les flavan-3-ols [(+)-catéchine et (-)-épicatéchine] et les procyanidines dimères, en raison de leur forte concentration dans les pépins et de leur relative facilité d'extraction.

La (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine pures (commercialisées), les dimères purs (synthétisés) et des extraits végétaux de procyanidines monomères et dimères (issus de pépins) sont analysés pour évaluer leur capacité à protéger de l'ADN plasmidique bombardée par des radicaux hydroxyls °OH, selon la méthode immuno-

**Tableau 4 - Valeurs EC50 des flavan-3-ols purs (dans le test 3D, sur ADN plasmidique et ADN génomique). Comparaison avec les fractions extraites des pépins de raisins.**

Composés	EC50 (mg.l <sup>-1</sup> )	%	EC50 (mM.l <sup>-1</sup> )	%
	ADN plasmidique <sup>a)</sup>	inhibition <sup>b)</sup>	ADN génomique <sup>a)</sup>	inhibition <sup>b)</sup>
<b>Mélanges procyanidiques</b>				
fraction monomérique (4)	13 ± 0.2		8 ± 2	
fraction dimérique (4)	11 ± 0.4		6 ± 2	
<b>Procyanidines pures</b>				
(+)-catéchine (6)	93 ± 2	86.0	18 ± 6	55.5
(-)-épicatéchine (6)	123 ± 4	89.4	112 ± 7	92.8
B1 (5)	26 ± 1	57.7	25 ± 4	76.0
B2 (5)	29 ± 2	62.1	27 ± 2	77.8
B3 (5)	26 ± 2	57.7	22 ± 4	72.7
B4 (5)	34 ± 2	67.6	31 ± 5	80.6
A2 (4)	79 ± 2	86.1	62 ± 6	90.3

a) Les nombres représentent les moyennes ± SD des résultats de 4 à 6 (chiffre entre parenthèses) préparations différentes

b) Pourcentage d'inhibition de l'activité antiradicalaire des procyanidines pures par rapport aux extraits végétaux correspondants - Indice d'activité synergique

chimique du test 3D (SAINT-CRICO DE GAULEJAC *et al.*, 1999a ; SALLE *et al.*, 1995).

Les résultats obtenus pour les différents échantillons purs et pour les extraits végétaux sont répertoriés dans le tableau 4. Dans tous les cas, un effet dose est visible permettant d'établir la concentration donnant 50 % inhibition spécifique. La comparaison des échantillons entre eux est alors possible et révèle la plus forte activité pour les fractions extraites du matériel végétal par rapport aux molécules pures. On retrouve donc le même effet synergique observé précédemment sur le radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Cependant, on peut noter qu'il s'exprime d'autant plus dans cette expérience puisque l'écart des EC50 entre les molécules pures et les fractions est encore accentué.

On en déduit que l'effet de synergie est d'autant plus significatif que l'on se rapproche des conditions *in vivo*.

• **Activité antiradicalaire de polyphénols purs sur ADN génomique. Comparaison avec les extraits phénoliques de raisins**

Les mêmes échantillons sont étudiés sur cellules entières pour modéliser au mieux leur effet de synergie *in vivo* (test 3D, SAINT-CRICO DE GAULEJAC *et al.*, 1999d). Comme précédemment, on détermine, pour chaque molécule et fraction testées, la concentration donnant 50 % d'inhibition spécifique. Les résultats, reportés dans le tableau 4, nous montrent que la fraction la plus active envers les radicaux libres est encore la fraction polyphénolique la plus complète (la fraction dimérique contenant un mélange complexe de procyanidines dimères). Son efficacité, expliquée par une action synergique de ces molécules entre elles, est donc d'autant plus vraie que l'on se rapproche des conditions *in vivo*.

Il faut souligner que ces résultats sont obtenus pour des molécules dimériques soit très faiblement polymérisées. On peut penser qu'une plus forte polymérisation serait susceptible d'entraîner une perturbation de leur activité antiradicalaire sur des cellules entières essentiellement pour des raisons stériques, mais également en raison du changement des propriétés physico-chimiques des polyphénols durant les phénomènes de polymérisation (variation de leur solubilité, polarité...). Ces considérations sont donc en prendre en compte et font actuellement l'objet de recherches.

En conclusion, nous retiendrons que :

- Les composés phénoliques des vins rouges sont présents en quantité adéquate pour assurer une activité optimum de ces composés et même une action synergique entre eux. Ces observations se vérifient sur des extraits végétaux et leurs homologues constitués de molécules phénoliques pures : Dans tous les cas, les extraits végétaux présentent une plus forte activité antiradicalaire que les polyphénols purs.

- Ce phénomène trouverait son explication dans un effet de synergie des polyphénols entre eux mais aussi entre ces composés et d'autres substances non-phénoliques. Plusieurs éléments physico-chimiques et d'ordre réactionnel sont alors susceptibles de justifier cette activité synergique.

- Il est également important de noter que ces observations sont d'autant plus marquées que l'on se rapproche des conditions *in vivo* (sur ADN plasmidique

puis sur cellules entières). On peut donc douter de l'intérêt de l'extraction de ces composés de leur source (matériel végétal ou produit élaboré) pour l'amélioration de leur effet thérapeutique.

- Dans tous les cas, ces résultats restent à confirmer sur les autres produits sources d'antioxydants (thé, fruits...).

### Comparaison de différentes sources de polyphénols

#### • Activité antiradicalaire de préparations pharmaceutiques

Pour contourner les effets néfastes de l'éthanol, de nombreux auteurs ont élaboré des produits pharmaceutiques ou parapharmaceutiques à base de flavonoïdes pour bénéficier de leur activité antiradicalaire tout en palliant les conséquences antagonistes des produits alcoolisés.

Les préparations pharmaceutiques et parapharmaceutiques étudiées ici sont actuellement commercialisées. Elles se présentent sous la forme de comprimés enrobés ou de gélules, dont la matrice et les extraits phénoliques sont connus.

Ces préparations sont étudiées en milieu hydroalcoolique avec des concentrations croissantes en éthanol. En fonction des posologies décrites, ces différentes préparations sont dissoutes dans 250 ml de solvants pour ramener leur concentration à celle ingérée au cours d'un repas (calculée pour modéliser l'absorption de polyphénols contenus dans deux verres de vin rouge). Selon les préparations, on atteint approximativement 2,5 g.l<sup>-1</sup> de composés phénoliques. On souligne alors les problèmes de dissolution rencontrés pour certaines préparations qui nécessitent une sonification de la solution. Leurs activités antiradicalaires seront donc estimées par excès (étant donné les conditions opératoires) sur ADN plasmidique et génomique par le test 3D (SAINT-CRICO DE GAULEJAC *et al.*, 1999a et d).

Les résultats obtenus dans les conditions précédemment décrites sont reportées sur le tableau 5. On constate alors que les activités antiradicalaires mesurées sur ADN plasmidique sont relativement faibles et sont inexistantes sur ADN génomique. Seule la préparation n°4 présente une activité significative à 10 % d'éthanol, mais elle reste néanmoins très inférieure à celle obtenue avec un vin rouge dans les mêmes conditions (D50 = 1/5970, SAINT-CRICO DE GAULEJAC *et al.*, 1999d). De plus, la présence d'éthanol est nécessaire pour obtenir des activités positives, dans tous les cas les résultats obtenus dans l'eau ne présentent aucune activité antiradicalaire. Ainsi :

- 10 % d'EtOH sont nécessaires pour révéler les caractéristiques antiradicalaires des préparations,
- à partir de 20 % d'EtOH, leur efficacité diminue progressivement,
- dès 50 %, leur activité antiradicalaire est inhibée en totalité.

Il est par ailleurs important de signaler des erreurs dans les modes de fabrication de ces différents produits qui nuisent considérablement à leur potentiel antiradicalaire. En effet, la plupart des matrices des comprimés contiennent des éléments pro-radicalaires ou encore

**Tableau 5 - Dilution donnant 50 % inhibition spécifique pour les 4 préparations phénoliques testées sur ADN plasmidique.**

Préparation	0 % EtOH	5 % EtOH	10 % EtOH	25 % EtOH	50 % EtOH
n°1	—*	—	1/1	1/4	—
n°2	—	—	1/44	1/61	—
n°3	—	—	—	1/9	—
n°4	—	1/9	1/472	1/122	—

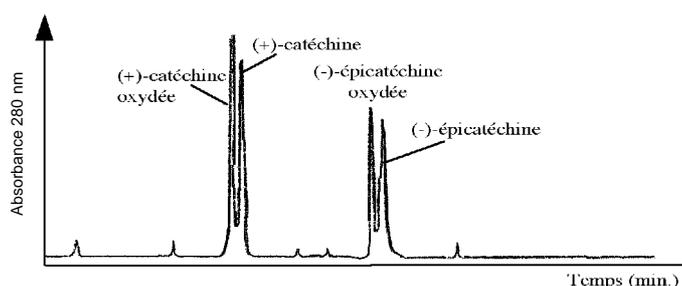
\* non déterminée sur la gamme de dilution étudiée

\* Une activité antiradicalaire n'a pu être déterminée sur ADN génomique, toutes les préparations se sont révélées inefficaces sur la gamme de dilution étudiée.

**Tableau 6 - Dilution donnant 50 % inhibition spécifique pour la préparation n°3 avec et sans enveloppe gélatineuse testées sur ADN plasmidique.**

	0 % EtOH	5 % EtOH	10 % EtOH	25 % EtOH	50 % EtOH
avec gélatine	—*	—	—	1/9	—
préparation 3 sans gélatine	—	—	1/124	1/41	—

\* non déterminée sur la gamme de dilution étudiée



**Figure 5 - Analyse HPLC d'un extrait à l'acétate d'éthyle (après fractionnement en CLBP) de la préparation n°4**

des constituants protéiques (essentiellement la gélatine) qui font chuter les activités antiradicalaires. Cela est encore plus caractéristique pour les gélules dont l'enveloppe est entièrement gélatineuse (préparation n°3). D'un point de vue physico-chimique, la dissolution de la préparation n°3 est nettement plus limpide que les autres solutions. Dans un premier temps, des filaments apparaissent à l'œil nu, formés par des colloïdes de protéines (gélatine) et de tanins (de la préparation n°3). Ces colloïdes précipitent, entraînant une chute brutale du contenu phénolique et une clarification de la solution. La même expérience est réalisée sur la préparation n°3 sans son enveloppe de gélatine (tableau 6).

La suppression de l'enveloppe gélatineuse augmente sensiblement l'activité de la préparation étant donné que son contenu phénolique reste en solution et donc potentiellement actif vis-à-vis des radicaux libres. On démontre ainsi, l'importance du choix de l'enveloppe ou de la matrice dans l'élaboration des préparations phénoliques afin de préserver leur capital antiradicalaire.

Les températures atteintes pour la fabrication de ces préparations sont également un élément déterminant. Le contenu phénolique de ces produits a été analysé en

HPLC et démontre l'état oxydatif des composés lorsque de trop fortes températures ont été pratiquées (figure 5). Par exemple, l'élaboration de la préparation n°4 nécessite des processus d'extraction puis d'évaporation à 85°C ! Or, nous savons que des températures de 50°C entraînent déjà une profonde modification des composés phénoliques (SAINT-CRICO DE GAULEJAC *et al.*, 1999e). Elles favorisent la formation de quinones phénoliques particulièrement instables et rapidement investies dans des processus de polymérisation oxydatifs qui conduisent à la précipitation des quinones et donc à une perte du contenu phénolique. Ainsi, le chromatogramme HPLC de la préparation n°4 montre la forte teneur en quinones monomères par rapport aux formes natives non oxydées. Elles sont donc inefficaces vis-à-vis des radicaux libres, car les processus de fabrication ont déjà provoqué l'oxydation de ces flavanols et donc une inhibition de leur caractéristique antiradicalaire.

#### • Activité antiradicalaire de divers aliments

Suite à ces préparations pharmaceutiques, la généralisation des propriétés antiradicalaires à divers aliments est souvent citée dans la presse et la vulgarisation des polyphénols et de leurs propriétés antiradicalaires ont déjà dépassé le stade de la pharmacologie pour s'étendre aux domaines de l'alimentation classique ou supplémentée en aliments antioxydants. Cependant, ces études sont souvent incomplètes, car peu d'entre elles prennent en compte qu'un apport adéquat de ces aliments antiradicalaires est nécessaire pour permettre une action préventive efficace.

Effectivement, la comparaison de diverses boissons et aliments contenant des polyphénols reflète la grande diversité de leur pouvoir antiradicalaire (figure 6).

On a ainsi constaté que :

- Les vins rouges ont un pouvoir antiradicalaire généralement supérieur aux autres boissons, mais surtout leur activité est relativement constante dans la mesure où les vins ont suivi un processus de vinification « classique » (macération et élevage en barriques neuves) et sont d'un millésime proche.
- Les autres boissons testées ont des valeurs beaucoup plus disparates et leur pouvoir antioxydant est très fortement dépendant du mode d'élaboration des produits. Ainsi, le pouvoir antiradicalaire des jus de fruits est important dans la mesure où ces derniers sont issus de fruits frais (sans stérilisation), cependant cette activité antioxydante chute brutalement dès l'ouverture de la bouteille en raison de la présence

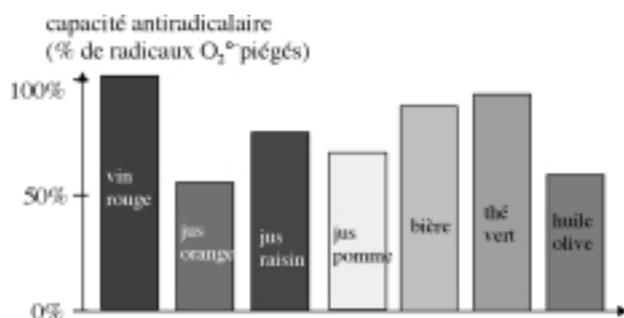


Figure 6 - Comparaison de l'activité antiradicalaire de divers aliments (pour 120 ml de liquide analysé soit environ 1 verre)

d'enzymes réagissant avec l'oxygène de l'air pour oxyder rapidement le produit. La conservation des jus de fruits par pasteurisation diminue leur activité antiradicalaire (suite aux modifications des composés phénoliques lors de ce traitement), mais elle est alors plus constante dans le temps. Par ailleurs, les bières possèdent un pouvoir antiradicalaire conséquent dans la mesure où ces dernières ont pu profiter d'un élevage en barriques. Les huiles possèdent cette caractéristique antiradicalaire si elles sont issues de l'extraction d'olives par une pression à froid et sans filtration. Les thés verts sont également des produits intéressants d'un point de vue nutritif en raison de leur forte concentration en polyphénols radicaux, mais le thé noir, ayant subi un processus oxydatif, est nettement moins antiradicalaire.

On voit donc que l'origine et le processus d'élaboration de ces produits régissent considérablement leur capacité antiradicalaire.

#### Conclusion

Plusieurs faits intéressants ressortent de cette étude. Notamment, nous retiendrons que :

- Dans tous les cas, les mélanges phénoliques complexes et non purifiés présentent une plus forte activité antiradicalaire que les polyphénols purifiés. Ce phénomène trouverait son explication dans une activité antiradicalaire synergique entre les polyphénols entre eux mais aussi entre ces composés et d'autres substances non-phénoliques. Plusieurs phénomènes physico-chimiques et d'ordre réactionnel sont alors susceptibles de justifier cette activité synergique.
- Il est également important de noter que ces observations sont d'autant plus marquées que l'on se rapproche des conditions *in vivo* (sur ADN plasmidique puis sur cellules entières). On peut donc douter de l'intérêt de l'extraction de ces composés de leur source (matériel végétal ou produit élaboré) pour l'amélioration de leur effet thérapeutique.
- De plus, des études menées sur différentes préparations à base de polyphénols soulignent la participation d'un faible pourcentage d'éthanol à l'action antiradicalaire de ces composés.
- De même, le vin rouge, de par son mode d'élaboration, sa complexité du point de vue phénolique d'autant plus important que ce dernier a été élevé en barriques, et un degré éthanolique adéquate (10-15°) présente un potentiel antiradicalaire généralement supérieur aux autres sources de polyphénols (naturelles ou préparées).

Cependant, seule une étude complète du mécanisme réactionnel de ces composés *in vivo* permettrait de maîtriser ces activités antiradicalaires, de cibler et d'améliorer leur efficacité.

#### Références bibliographiques

- AMES B.N., 1983. Endogenous oxidative DNA damage, ageing and cancer. *Free radical Res. Commun.*, 7, 121-127.
- CHENG S.J., HO C.T., LOU H.Z., BAO Y.D., JIAN Y.Z. et LI M.H., 1995. A preliminary study on the antimutagenicity of green tea antioxidants. *Acta Biol. Exp. sin.*, 19, 427-431.
- GLORIES Y., 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. *Thèse doct es sciences*, Université de Bordeaux.

- HERTONG G.L.M., HOLLMAN C.H.P. et PUTTE B., 1993. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1242-1246.
- HODGSON E.K. et FRIDOVICH I., 1976. The accumulation of superoxide radical during the aerobic action of xanthine oxidase. A requiem for H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>·. *Biochim. Biophys. Acta*, **430**, 182-188.
- KANNER J., FRANKEL E., GRANIT R., GERMAN B. et KINSELLA J.E., 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**, 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., Eds. (American Chemical Society, Washington DC), 87-97.
- PRYOR WA., 1976 à 1982. *Free radicals in biology*. ed. Academic Press New York, 1-5.
- Pryor WA., TAMURA M. et DOOLEY MM., Premovic PI., Church DF., 1983. *Oxy-Radicals and their scavenger systems : cellular and medical Aspects*. Cohen G. et Grenwald R., Eds. ( Elsevier, Amsterdam), 1983, 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., 1973. Interprétation chimique de la couleur des vins rouges. *Vitis*, **12**, 119-142.
- Roggero JP., 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., GLORIES Y. et VIVAS N., 1998a. Recherche des composés responsables de l'effet antiradicalaire dans les vins. Influence de l'élevage en barriques. *J.Sci. Tech. Tonnellerie*, **4**, 147-161.
- SAINT-CRICO DE GAULEJAC N., DE FREITAS V., GLORIES Y., BOURGEOIS G. et VIVAS N., 1998b. Fractionnement et dosage des procyanidines oligomères des raisins et des vins : relation avec la qualité des vins. *Sci. Aliments*, **18**, 59-76.
- SAINT-CRICO DE GAULEJAC N., VIVAS N., FREITAS V. et GLORIES Y., 1999a. The influence of various phenolic compounds on scavenging activity assessed by enzymatic method. *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 1081-1090.
- SAINT-CRICO DE GAULEJAC N., PROVOST C. et VIVAS N., 1999b. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2, 425-431.
- SAINT-CRICO DE GAULEJAC N., GLORIES Y. et VIVAS N., 1999c. Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wine. *Food Res. Int.*, **32**, 327-333.
- SAINT-CRICO DE GAULEJAC N., VIVAS N., CHAUGIER C., BUGANET D., BENTZON J. and SKOVENBORG E., 1999d. Influence of ethanol on free radical scavenging activity of phenolic compounds issuing from red wines. *Polyphenols, Wine and Health, Bordeaux, 1999d*, sous presse.
- SAINT-CRICO DE GAULEJAC N., VIVAS N., LARTIGUE L. et Bourgeois G., 1999e. Study and quantification of monomeric flavan-3-ol and dimeric procyanidinquinonic forms by LC/EL-. Application to wine oxidation process. *J. Sci. Food Agric.*, soumis.
- SALLES B., PROVOST C., CALSOU P. et HENNEBELLE I., 1995. A chemiluminescent microplate assay to detect DNA damage induced by genotoxic treatments. *Analytical biochemistry*, **231**, 000-000.
- 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., Recherches sur la qualité du chène français de tonnellerie (*Q. petraea* Liebl., *Q. robur* L.) et sur les mécanismes d'oxydoréduction des vins rouges au cours de leur élevage en barriques. *Thèse doctorat es Sciences*, Université Victor Segalen, Bordeaux II, 1997.