

1996 : LES MOLÉCULES DES FUTURS MILLÉSIMES BORDELAIS ? (*)

C. CASTAGNINO, C. CHÈZE,
J. VERCAUTEREN (**)

Une nouvelle série de polyphénols glycosylés, nommés castavinols, est isolée à partir d'un vin rouge de Bordeaux. La caractérisation structurale de ces quatre nouveaux produits naturels est réalisée par diverses techniques spectroscopiques, en particulier par résonance magnétique nucléaire. La voie de leur biogenèse la plus probable est présentée, ainsi que leurs propriétés chimiques liées aux modifications de la couleur au cours du vieillissement des vins rouges.

INTRODUCTION

Le vin rouge est riche en composés polyphénoliques, dont les nombreuses propriétés physiologiques *in vitro* ne sont plus à démontrer. En effet, les polyphénols sont connus comme étant des antioxydants [1], de puissants piègeurs de radicaux libres [2,3], des protecteurs vasculaires et veinotoniques [4], des hypocholestérolémiants [5], et des antiathérogènes [6].

(*) *Manuscrit reçu le 22 Septembre 1997*

(**) *Laboratoire de Pharmacognosie. Faculté de Pharmacie. Université Victor-Segalen Bordeaux 2. 146, Rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux Cedex.*

Ils peuvent manifester, en outre, des propriétés cardiotoniques [7], antivirales [8], ou antimicrobiennes [9]. Malgré plusieurs études épidémiologiques qui mettent en évidence « *le Paradoxe Français* » [1,10], et qui tentent d'expliquer ce phénomène par la présence des polyphénols, de nombreuses questions se posent sur la capacité de ces substances d'exercer leur activité *in vivo*. Certains paramètres, comme la quantité adsorbée dans l'intestin, la proportion dégradée par la flore intestinale, la fraction réellement biodisponible, ou la structure proprement dite des formes actives polyphénoliques, demeurent incomplètement élucidés.

Afin de fournir quelques arguments à ces questions, il est indispensable d'élargir la connaissance des structures des molécules impliquées. C'est ainsi que l'isolement de polyphénols glycosylés, dont la présence avait été constatée dans le totum polyphénolique des vins rouges bordelais [11], a été entrepris. En effet, ces composés, jusque là insoupçonnés du fait de leurs propriétés physico-chimiques particulières ne permettaient pas leur extraction dans les conditions « habituelles » d'isolement.

Malgré les difficultés de séparation et de purification rencontrées du fait des propriétés d'interaction importante des polyphénols ajoutées à leur hydrosolubilité lorsqu'ils sont liés à des sucres, ce travail a conduit à l'isolement et à la caractérisation de plus de trente substances phénoliques, dont plusieurs structures originales propres au vin [12,13].

RÉSULTATS - DISCUSSION

I - Mise au point d'un protocole d'isolement de polyphénols glycosylés

De nombreux essais préalables ont conduit à la mise en œuvre d'un protocole d'isolement de composés polyphénoliques glycosylés à partir de 21 litres d'un vin rouge bordelais.

Ce protocole, qui allie à la fois la chromatographie liquide basse pression (CLBP) et la chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase inversée, peut se résumer selon les schémas suivants (Fig. 1 à 3).

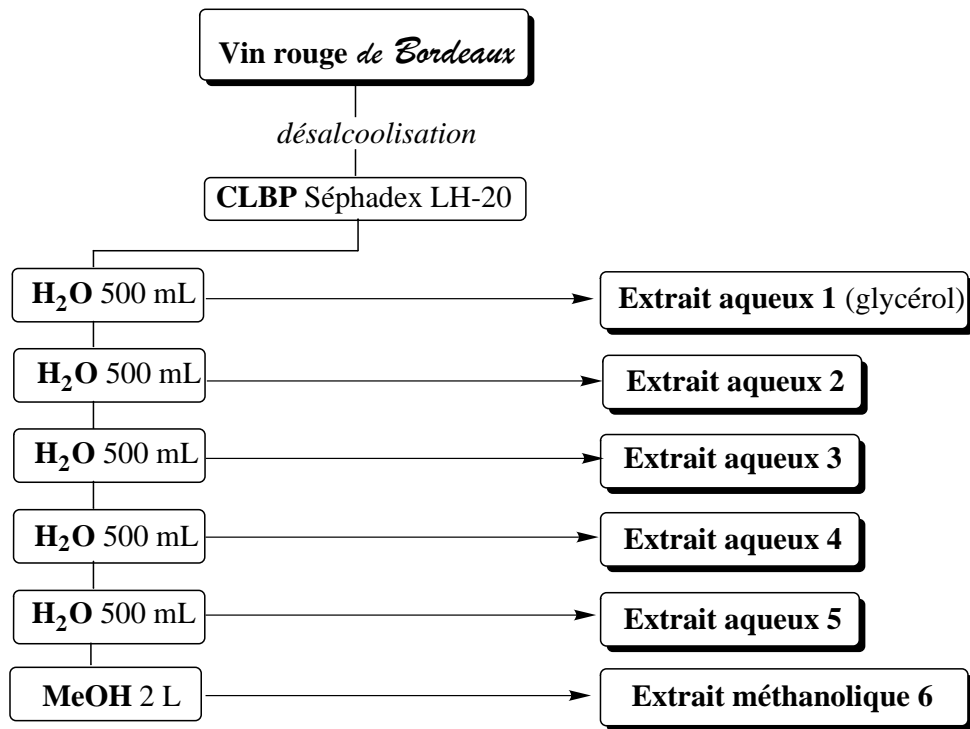


Fig. 1 : Fractionnement général d'un vin rouge bordelais

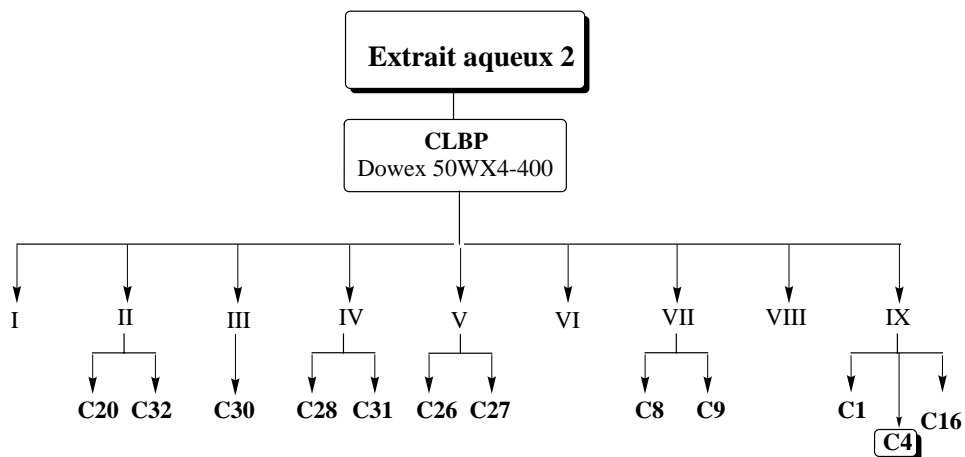


Fig. 2 : Fractionnement général de l'extrait aqueux 2

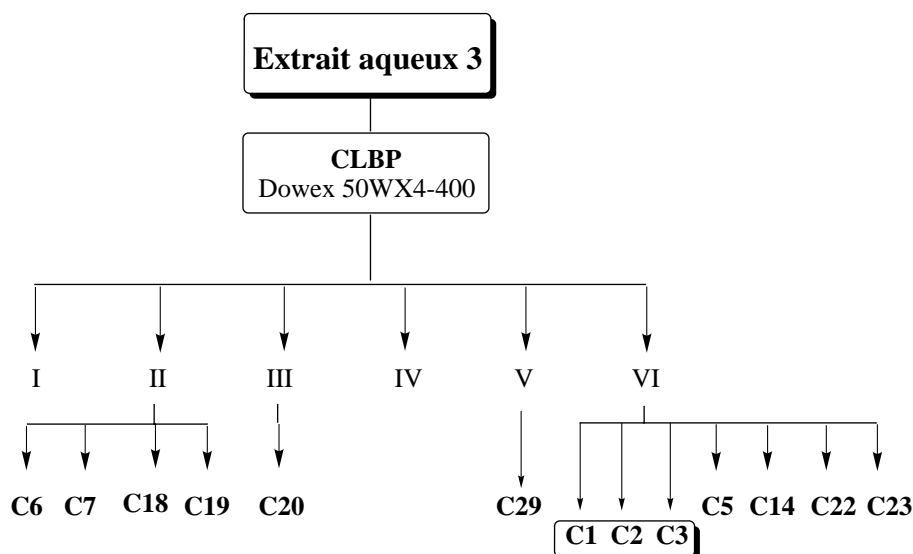


Fig. 3 : Fractionnement général de l'extrait aqueux 3

Ces différentes techniques ont permis d'isoler plus de trente composés phénoliques, dont quatre d'entre eux constituent une nouvelle famille de polyphénols dénommés « **castavinols** ». L'un est isolé à partir de l'extrait aqueux 2 (noté **C4**) et trois à partir de l'extrait aqueux 3 (notés **C1**, **C2**, **C3**).

II - Caractérisation structurale de la nouvelle série des castavinols

L'utilisation de diverses techniques spectrométriques, en particulier la résonance magnétique nucléaire haute résolution mono et bidimensionnelle ^1H et ^{13}C , a conduit à la caractérisation des castavinols, série originale par son squelette en C6-C3-C6-C4 (Fig. 4).

Les caractéristiques RMN ^1H et ^{13}C figurent dans les tableaux I et II.

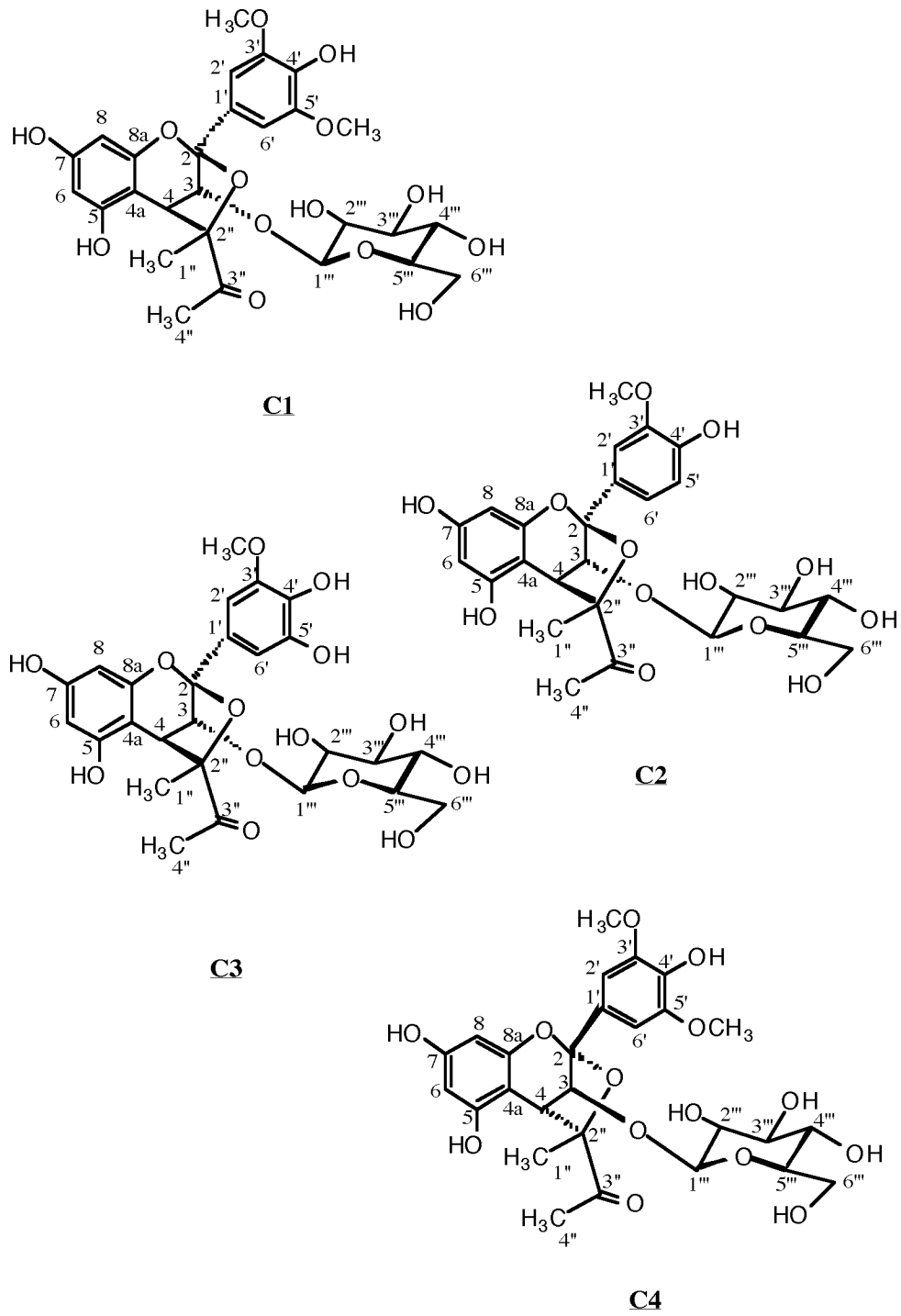


Fig. 4 : Structures de la série des castavinols

**Tableau I : RMN ¹H (500 MHz) de C1, C2, C3, C4
dans D₂O (δ, J, [Hz])**

Génine	<u>C1</u>	<u>C2</u>	<u>C3</u>	<u>C4</u>
1''	1,48 <i>s</i>	1,35 <i>s</i>	1,32 <i>s</i>	1,34 <i>s</i>
4''	2,68 <i>s</i>	2,53 <i>s</i>	2,52 <i>s</i>	2,52 <i>s</i>
CH₃O	4,12 <i>s</i>	4,0 <i>s</i>	3,96 <i>s</i>	3,98 <i>s</i>
3	5,04 <i>sl</i> (4,1)*	4,91 <i>sl</i> (3,3)*	4,90 <i>sl</i> (2,7)*	5,08 <i>sl</i> (2,6)*
4	4,39 <i>sl</i> (3,9)*	4,28 <i>sl</i> (3,2)*	4,23 <i>sl</i> (3,4)*	4,27 <i>sl</i> (2,2)*
6	6,37 <i>sl</i> (3,5)*	6,24 <i>sl</i> (3,3)*	6,21 <i>sl</i> (4,3)*	6,23 <i>sl</i> (2,8)*
8	6,26 <i>sl</i> (3,6)*	6,11 <i>sl</i> (3,3)*	6,09 <i>sl</i> (4,3)*	6,11 <i>sl</i> (3,1)*
2'	7,33 <i>s</i>	7,46 <i>s</i>	7,05 <i>s</i>	7,19 <i>s</i>
5'		7,09 <i>d</i> (8,3)		
6'	7,33 <i>s</i>	7,35 <i>d</i> (8,3)	7,07 <i>s</i>	7,19 <i>s</i>
Glucose				
1'''	4,21 <i>d</i> (8,0)	4,15 <i>d</i> (8,0)	4,10 <i>d</i> (7,8)	4,44 <i>d</i> (7,8)
2'''	3,18 <i>m</i>	3,05 <i>m</i>	3,03 <i>m</i>	3,08 <i>m</i>
3'''	3,40 <i>m</i>	3,29 <i>m</i>	3,26 <i>m</i>	3,43 <i>m</i>
4'''	3,49 <i>m</i>	3,37 <i>m</i>	3,32 <i>m</i>	3,27 <i>m</i>
5'''	3,40 <i>m</i>	3,29 <i>m</i>	3,26 <i>m</i>	3,27 <i>m</i>
6'''	3,89 <i>dd</i> (5,5 et 12,3)	3,77 <i>dd</i> (5,7 et 12,3)	3,58 <i>dd</i> (4,0 et 12,0)	3,58 <i>dd</i> (4,0 et 12,0)
	4,05 <i>d</i> (12,3)	3,93 <i>d</i> (12,3)	3,91 <i>d</i> (12)	3,76 <i>d</i> (12,0)

* : largeur du signal à mi-hauteur.

**Tableau II : RMN ^{13}C (125 MHz)
des composés C1, C2, C4 dans D_2O (δ)**

Génine	<u>C1</u>	<u>C2</u>	<u>C4</u>
CH₃O	57,4	56,9	57,3
2	109,8	109,7	110,1
3	81,9	82,1	80,8
4	45,6	45,6	43,5
4a	103,5	103,6	103,6
5	155,3	155,3	155,3
6	97,3	97,3	97,3
7	157,9	157,8	157,9
8	96,1	96,0	96,0
8a	153,7	153,7	153,8
1'	127,0	127,8	127,2
2'	106,1	112,5	106,1
3'	148,4	148,1	148,3
4'	136	146,8	135,9
5'	148,4	116,2	148,3
6'	106,1	121,3	106,1
1''	20,6	20,6	20,9
2''	98,6	98,6	98,4
3''	217,1	217,3	217,0
4''	26,1	26,1	26,1
Glucose			
1'''	102,9	103,1	100,9
2'''	74,0	74,0	74,0
3'''	76,64	76,56	76,74
4'''	70,3	70,3	70,3
5'''	76,56	76,48	76,96
6'''	61,6	61,6	61,7

D'après les données recueillies, les quatre castavinols présentent la même structure. De ce fait, seule l'analyse structurale du composé **C1** est décrite.

L'étude du spectre RMN ^1H du castavinol **C1** montre les signaux :

- de deux protons aromatiques équivalents, H2' et H6' du cycle B à 7,33 ppm ;
- de deux protons aromatiques non équivalents, H6 et H8 du cycle A à 6,37 et 6,26 ppm, facilement échangeables en présence de D_2O ;
- d'un résidu glucosidique ;
- de deux méthoxyles équivalents liés à un aromatique à 4,12 ppm,
- et de deux méthyles résonnant sous forme de singulets et 2,68 et 1,48 ppm.

Le spectre ^{13}C J-modulé [14] révèle la présence de 24 signaux comptant pour 27 atomes de carbone, dont le carbonyle d'une fonction cétone à 217,1 ppm, confirmée par une bande à 1694 cm^{-1} sur le spectre IR.

Le spectre de masse FAB^- confirme ces données (ion moléculaire à $m/z = 579$), ainsi que le spectre UV avec un maximum d'absorption à 269 nm.

Les corrélations entre les différents protons hétérosidiques observées sur le spectre COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$ [15,16] sont en faveur d'un résidu β -D-glucopyranose, confirmé par les déplacements chimiques des carbones (d'après le spectre HMQC [17]) et par la valeur de la constante de couplage du proton anomère ($J = 8\text{ Hz}$). Le site de glycosylation est déterminé à partir de la corrélation ^3J observée sur le spectre HMBC [18] entre le proton anomérique et le carbone à 81,9 ppm attribué à C3. Le singulet à 4,12 ppm, intégrant pour six protons, est caractéristique de deux groupes méthoxyles symétriques en position 3' et 5' sur le cycle B, séparés d'un hydroxyle sur le carbone C4'. L'attribution des déplacements chimiques des carbones C6 et C8 ne peut être faite comme dans le cas des proanthocyanidols [19] par la corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton H2 et le carbone C8a, le carbone C2 étant quaternaire. Cependant l'argument qui nous permet de distinguer le proton H6 du proton H8 est fourni par la tache de corrélation sur le spectre ROESY $^1\text{H}-^1\text{H}$ [20] entre les protons H2', H6' du cycle B et le proton à 6,26 ppm, de ce fait attribué au proton H8. À partir de ces attributions, les déplacements chimiques à 155,3 et 153,7 ppm peuvent être

attribués aux carbones C5 et C8a respectivement, qui montrent tous deux une corrélation avec le signal du proton H4 à 4,39 ppm. Hormis les corrélations attendues du proton H4 avec les carbones C3 (à 81,9 ppm) et C4a (à 103,5 ppm), deux corrélations sont observées avec des carbones quaternaires résonnant à 109,8 ppm (C2) et 98,6 ppm (C2''), ainsi qu'avec le carbonyle à 217,1 ppm (C3''). Ces deux derniers carbones oxygénés corrélerent avec deux groupes méthyléniques (à 2,68 et 1,48 ppm), révélant la présence d'une unité supplémentaire à quatre atomes de carbone, liée au squelette de base en C6-C3-C6.

Quant à la stéréochimie relative des carbones C3 et C4, elle est déduite de la faible intensité de la corrélation entre les signaux des protons H3 et H4, ces protons résonnant sous la forme de singulets larges, typiques d'une faible constante de couplage.

Une étude conformationnelle en 3D, réalisée sur les stéréoisomères des séries **2R** et **2S**, révèle un angle dièdre H(3)-C(3)-C(4)-H(4) de 80,6°, compatible avec la valeur de la constante de couplage relevée (Fig. 5).

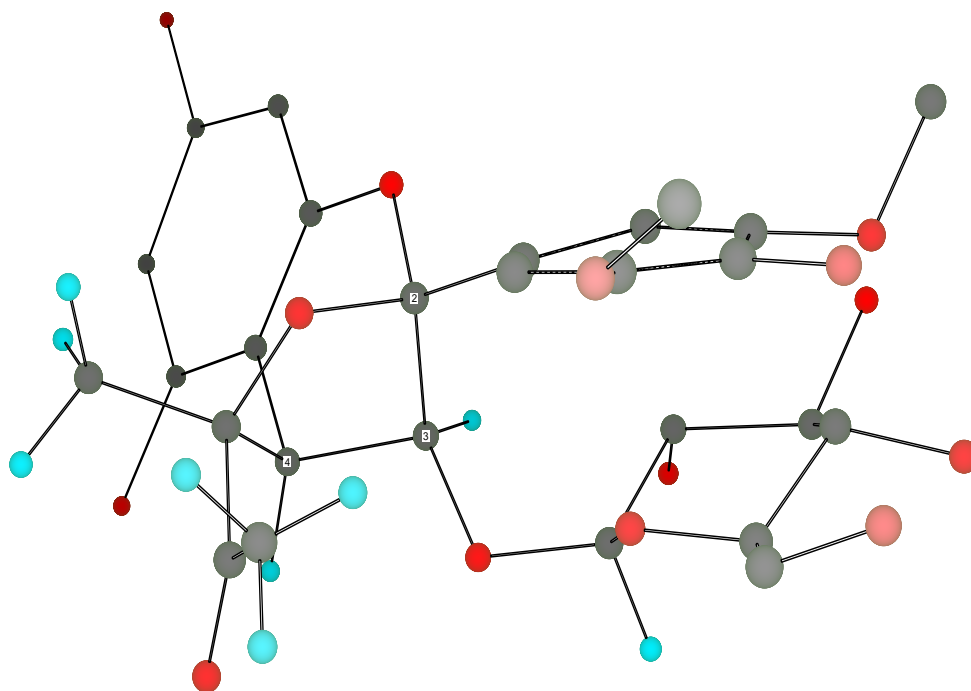


Fig. 5 : Modélisation du castavinol **C1**

Le même modèle construit avec la configuration opposée du carbone C3 conduit à un angle dièdre de 39° et une grande constante de couplage, en désaccord avec les résultats obtenus.

Les castavinols **C2** et **C3** ne diffèrent du précédent que par le mode de substitution du cycle B. Le quatrième **C4** diffère du composé **C1** uniquement par les valeurs des déplacements chimiques des protons glycosidiques.

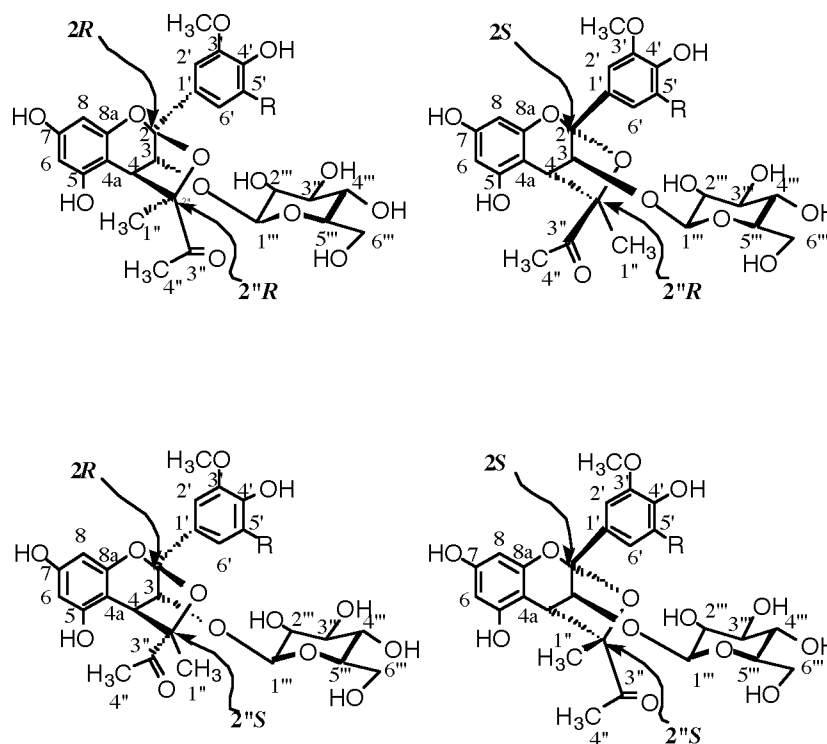


Fig. 6 : Isoméries possibles pour la série des castavinols.

Ces différences ne peuvent s'expliquer que par isomérisie. Bien que ces molécules possèdent quatre centres asymétriques : C2, C3, C4 et C2'', seuls quatre isomères sont possibles, les carbones C2 et C4 étant interactifs. En effet, le carbonyle du diacétyle peut s'additionner sur les faces α ou β du cycle pyridium, conduisant respectivement aux séries **2S** et **2R**. D'autre part, pour chacun de ces cas (α ou β), une isomérisie des carbones du cycle C et du carbone C2'' est également possible. Si par exemple, le castavinol **C1** est attribué à l'isomère **2R,2''R** (et de ce fait les castavinols **C2** et **C3**), le

castavinol **C4** peut se différencier de **C1**, i) soit par l'inversion des carbones du cycle C, ii) soit du carbone C2'' conduisant respectivement aux isomères **2S,2''R** et **2R,2''S**. Tous ces isomères doivent être envisagés puisqu'aucun argument ne permet de trancher entre les séries **2R** et **2S** (Fig. 6).

III - Comparaison entre anthocyanosides et castavinsols.

Les castavinsols présentent de fortes similitudes avec les anthocyanosides (pigments des vins rouges), la principale différence étant qu'ils ne sont pas colorés (Fig. 7).

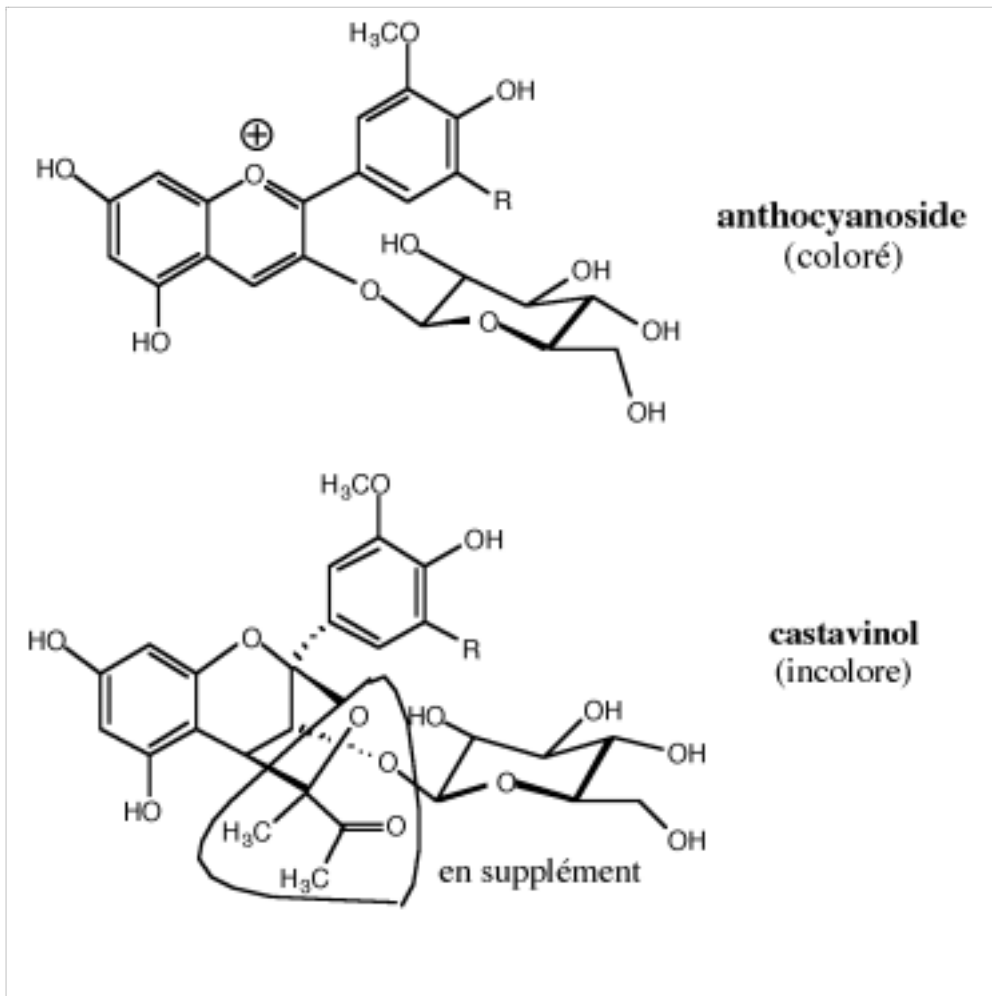


Fig. 7 : Comparaison structurale entre anthocyanosides et castavinsols

S'agissant de composés naturels, l'existence d'une voie probable de biogenèse peut constituer une confirmation de la structure. La totalité du squelette carboné et oxygéné du 3-*O*-glucoside de malvidine étant retrouvé, ceci laisse à penser qu'il s'agit très probablement du précurseur des structures **C1** et **C4**. De même le 3-*O*-glucoside de péonidine et le 3-*O*-glucoside de pétunidine seraient à l'origine des castavinols **C2** et **C3**. En outre un métabolite à quatre carbones dioxycénés, tel que le diacétyle (métabolite de la levure et des bactéries lactiques), pourrait réagir par addition nucléophile sur les trois précurseurs anthocyaniques pour former les nouvelles molécules de la série castavinol. Ceci permet de proposer un schéma biogénétique représenté dans la figure 8.

Ces molécules résultent ainsi de l'action des levures sur des métabolites de la vigne (anthocyanes) et sont donc caractéristiques de cette étape de fermentation. Pour cette raison, les castavinols doivent être considérés comme des molécules typiques du vin. Ce sont les **premiers polyphénols spécifiques du vin**.

Ce mécanisme biogénétique est conforté par une réaction chimique, la réaction de Bate-Smith, utilisée habituellement pour la mise en évidence de composés procyanidoliques :

*En milieu acide et en présence de l'oxygène de l'air, en chauffant une petite quantité de 5'-méthoxy-castavinol **C1**, une intense coloration rouge caractérise la formation d'un cation pyrilium, qui s'oxyde en un nouvel anthocyane, substitué par le reste à quatre carbones sur le C4.*

Ainsi, la réaction de Bate-Smith est aujourd'hui étendue à la nouvelle famille des castavinols (Fig. 9).

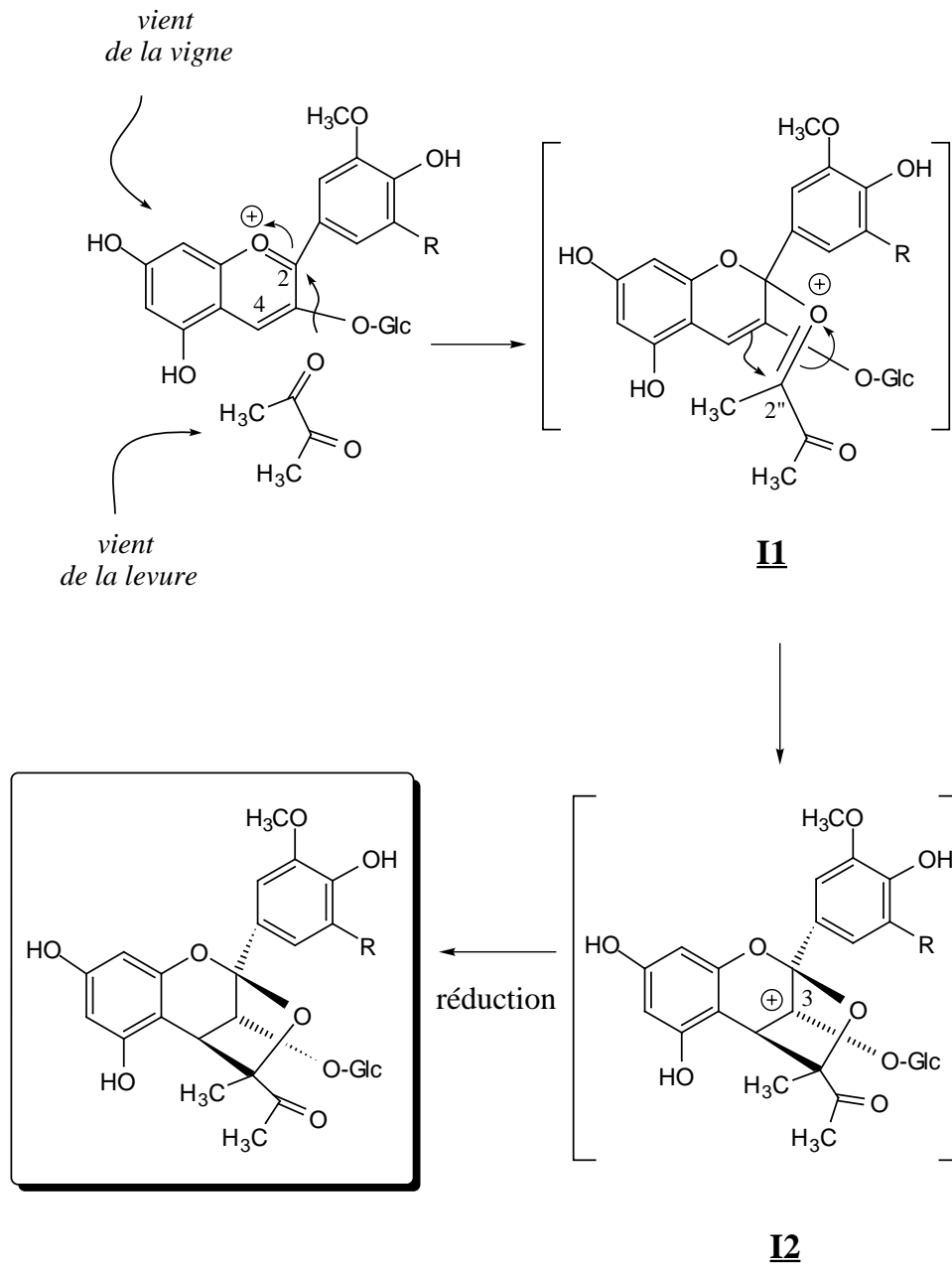


Fig. 8 : Proposition d'un schéma biogénétique des structures castavinols

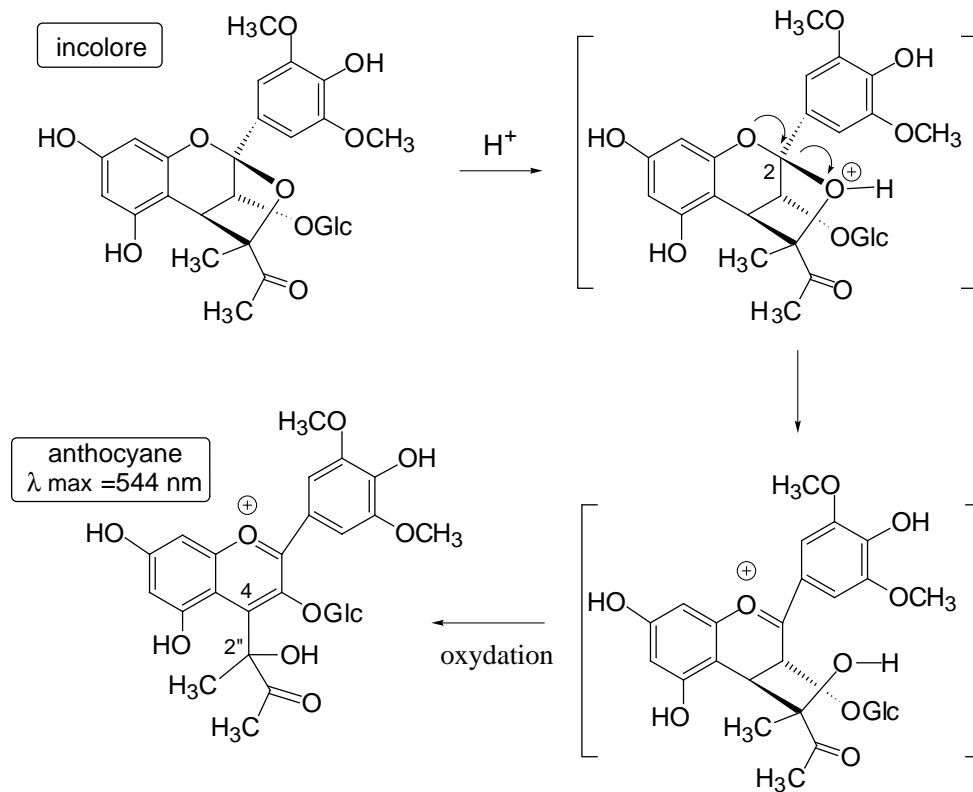


Fig. 9 : Réaction de Bate-Smith positive avec les castavinols

Outre le fait que ce réarrangement confirme la structure de ces nouveaux composés, il est important de noter que ceux-ci conduisent à des anthocyanosides pour lesquels un déplacement bathochrome de 10 nm environ est observé par rapport aux anthocyanes parents. Comme relevé dans la littérature [21,22], lors de la caractérisation de nouveaux pigments (dérivés du 4-vinylphénol) d'un vin rouge, les anthocyanosides alkylés en C4 sont plus stables.

Si on considère que de tels réarrangements peuvent tout à fait concerner les castavinols, sur le long terme, au cours du vieillissement des vins rouges de Bordeaux, il est possible d'expliquer une partie de l'évolution de leur couleur : les castavinols joueraient le rôle de réservoirs de coloration en même temps que de protecteurs contre l'oxydation puisqu'ils agissent comme réducteurs.

CONCLUSION

L'utilisation conjointe de diverses techniques chromatographiques et spectrométriques (en particulier la résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle) ont permis d'isoler et de caractériser plus de trente substances phénoliques d'un vin rouge de Bordeaux, parmi lesquelles une nouvelle famille, la série des castavinols.

Cette étude permet non seulement de faire progresser la connaissance du contenu polyphénolique du vin rouge bordelais, mais également d'apporter de nouvelles explications aux phénomènes complexes de l'évolution de la couleur de ces vins au cours de leur vieillissement.

Ces travaux ne peuvent qu'encourager d'autres investigations pour l'identification de nouvelles structures polyphénoliques extraites directement à partir des vins rouges, en s'intéressant particulièrement aux extraits polaires, en raison des propriétés particulières des substances isolées.

Ces nouveaux polyphénols doivent être soumis à des études ultérieures, afin de comprendre les implications œnologiques liées à leur présence dans les vins, mais également pour évaluer les conditions dans lesquelles ils se forment, et les propriétés biologiques qui les caractérisent.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - Frankel (E.N.), Kanner (J.), German (J.B.), Parks (E.), Kinsella (J.E.) - Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. - *Lancet*, 1993, **341**, 454-457.
- 2 - Uchida (S.), Edamatsu (R.), Hiramatsu (M.), Mori (A.), Nonaka (G.I.), Nishioka (I.), Niwa (M.), Ozaki (M.) - Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals. - *Med. Sci. Res.*, 1987, **15**, 831-832.

- 3 - Ricardo Da Silva (J.M.), Darmon (N.), Fernandez (Y.), Mitjavila (S.) - Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. - *J. Agric. Food Chem.*, 1991, **39**, 1549-1552.
- 4 - Baspeyras (M.) - *Propriétés bénéfiques des vins rouges du Bordelais*. - Thèse Doct. Méd., Bordeaux, 1985.
- 5 - Masquelier (J.) - *Les constituants du vin présentant une action hypocholestérolémiant*e - C. R. Congrès Médical International pour l'Étude Scientifique du Vin et du Raisin, Bordeaux, 1961.
- 6 - Barrière (B.) - *Vin et athérosclérose* - Thèse Doct. Pharm., Bordeaux, 1981.
- 7 - Melzer (R.), Fricke (U.), Holzl (J.) - Vasoactive properties of procyanidins from *Hypericum perforatum* L. in isolated porcine coronary arteries. - *Arzneim. Forsch. / Drug Res.*, 1991, **41** (I), 481-483.
- 8 - Nakashima (H.), Murakami (T.), Yamamoto (N.), Sakagami (H.), Tanuma (S.), Hatano (T.), Yoshida (T.), Okuda (T.) - Inhibition of human immunodeficiency viral replication by tannins and related compounds. - *Antiv. Res.*, 1992, **18**, 91-103.
- 9 - Scalbert (A.) - Antimicrobial properties of tannins. - *Phytochemistry* , 1991, **30**, 3875-3883.
- 10 - Frankel (E.N.), Waterhouse (A.L.), Teissedre (P.L.) - Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. - *J. Agr. Food Chem.*, 1995, **43**, 890-894.
- 11 - Balas (L.) - *Tanins catéchiques : isolement, hémisynthèse et analyse structurale par RMN 2D homo- et hétéro-nucléaire. Contribution à l'étude des tanins du raisin et des vins de Bordeaux*. - Thèse Doct. 3e Cycle. Fac. Pharm., Bordeaux, 1992.
- 12 - Castagnino (C.) - *Étude des polyphénols glycosylés des vins rouges de Bordeaux*. - Thèse Doct. 3e Cycle. Fac. Pharm., Bordeaux, 1996.

- 13 - Castagnino (C.), Vercauteren (J.) - Castavinol, a new series of polyphenolic structures from Bordeaux red wines. - *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 7739-7742.
- 14 - Lecoq (C.), Lallemand (J.Y.) - Precise Carbon -13 N.M.R. Multiplicity Determination. - *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1981, **4**, 150-152.
- 15 - Aue (W.P.), Bartholdi (E.), Ernst (R.R.) - Two-dimensional spectroscopy. Application to nuclear magnetic resonance. - *J. Chem. Phys.*, 1976, **64**, 2229-2246.
- 16 - Nagayama (K.), Kumar (A.), Wuthrich (K.), Ernst (R.R.) - Experimental techniques of two-dimensional correlated spectroscopy. - *J. Magn. Reson.*, 1980, **40**, 321-334.
- 17 - Bax (A.), Subramanian (S.) - Sensitivity-Enhanced two-dimensional heteronuclear shift correlation NMR spectroscopy. - *J. Magn. Reson.*, 1986, **67**, 565-569.
- 18 - Bax (A.), Summers (M.F.) - ¹H and ¹³C assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR. - *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 2093-2094.
- 19 - Balas (L.), Vercauteren (J.) - Extensive high resolution reverse 2D NMR analysis allows structural elucidation of procyanidin oligomers. - *Magn. Reson. Chem.*, 1994, **32**, 386-393.
- 20 - Bax (A.), Davis (D.G.) - Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. - *J. Magn. Reson.*, 1985, **63**, 207-213.
- 21 - Fulcrand (H.), Cameira Dos-Santos (P.J.C.), Sarni-Manchado (P.), Cheynier (V.), Favre-Bonvin (J.) - Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. - *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1996, **7**, 735-739.
- 22 - Dos-Santos (P.J.C.), Brillouet (J.M.), Cheynier (V.), Moutounet (M.) - Detection and partial characterization of new anthocyanin-derived pigments in wine. - *J. Sci. Food Agric.*, 1996, **70**, 204-208.

ABSTRACT

1996 : the molecules from Bordeaux red wines for next decades ?

A series of glycosylated polyphenols with a new skeleton, named castavinol, has been isolated from a Bordeaux red wine. The structural elucidation of these four new natural products was achieved by several spectroscopies, by nuclear magnetic resonance particularly. The most probable pathway for their biogenesis and chemical properties related to the colour modification upon ageing of wines are given.

Key-words : red wine, extraction, structural analysis (NMR), polyphenol, castavinol.
