

Recherches sur les macromolécules du bois de chêne de tonnellerie Interactions avec les flavan-3-ols des vins et les aldéhydes du bois de chêne

Résumé : Le bois est le matériau qui fut utilisé en remplacement des différents récipients de conservation et de transport antique des vins. Les chênes européens et particulièrement *Quercus robur* et *Q. petraea* sont largement utilisés en tonnellerie grâce à leurs propriétés mécaniques, physiques et chimiques exceptionnelles, apportant des caractéristiques sensorielles extrêmement appréciées.

La connaissance de la diversité de la composition du matériel végétal et de sa composition en polymères tels que les polysaccharides, les lignines et les ellagitanins permet de mieux appréhender les différents phénomènes se produisant lors de l'élevage des vins en barriques. C'est pourquoi, nous avons mis au point une méthode de fractionnement par précipitations sélectives et de caractérisation des polymères extractibles du bois : lignines, polysaccharides et ellagitanins.

Grâce à la technique de pyrolyse/GC-MS, les fractions lignines et polysaccharides sont étudiées *in situ*. Un profil aromatique des produits formés durant la chauffe peut être établi, les bois de chênes de différentes espèces peuvent être différenciés (chimiotaxinomie).

Nous présentons également une caractérisation partielle des ellagitanins polymériques dans le bois de chêne *Quercus petraea* Liebl. et *Q. robur* L., ainsi qu'une caractérisation structurale des lignines extraites du bois de cœur.

Nous terminons par une étude sur les interactions entre les flavan-3-ols des vins et les aldéhydes du bois et la formation de polymères par additions nucléophiles.

Mots clés : bois de chêne, macromolécules, structure, composition, caractérisation, flavan-3-ols, aldéhydes, barriques, polymérisation, couleur, vins blancs, lignanes, ellagitanins polymérisés.

Research on the macromolecules of oak wood cooperage Interactions with wine flavan-3-ols and oak wood aldehydes

Summary : Wood is the material which was used to replace the various containers of conservation and ancient transport of the wines. The European oaks and particularly *Quercus robur* and *Q. petraea* are largely used in cooperage thanks to their exceptional mechanical, physical and chemical properties, bringing extremely appreciated sensory characteristics.

The knowledge of the composition diversity of the plant material and its composition out of polymers such as polysaccharides, lignins and ellagitannins makes it possible to better apprehend the various phenomena occurring during wine ageing in barrels. That is why, we developed a global method of fractionation by selective precipitations and a characterization of extractable polymers of wood : lignins, polysaccharides and ellagitannins.

Thanks to the pyrolysis/GC-MS technique, the lignin and polysaccharide fractions are studied *in situ*. An aromatic profile of the products formed during toasting can be established, oak wood of various species can be differentiated (chimiotaxinomy).

We also present a partial characterization of the polymeric ellagitannins in *Quercus petraea* Liebl. and *Q. robur* L. wood, as well as a structural characterization of the lignins extracted from heartwood.

We finish by a study on the interactions between the wine flavan-3-ols and oak wood aldehydes, and the formation of polymers by nucleophilic additions.

Keywords : oak wood, macromolecules, structure, composition, characterization, flavan-3-ols, aldehydes, barrels, polymerization, colour, white wines, lignans, polymerized ellagitannins.

2007

Recherches sur les macromolécules du bois de chêne de tonnellerie
Interactions avec les flavan-3-ols des vins et les aldéhydes du bois de chêne

Marie-Françoise NONIER

N° d'ordre : 3400

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX 1

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par **Mme Marie-Françoise NONIER**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : CHIMIE ORGANIQUE

**RECHERCHES SUR LES MACROMOLECULES DU BOIS DE CHENE DE
TONNELLERIE INTERACTIONS AVEC LES FLAVAN-3-OLS DES VINS
ET LES ALDEHYDES DU BOIS DE CHENE**

Soutenue le : 17 Juillet 2007

Après avis de :

M. Claude ANDARY	Professeur – Université de Montpellier I	Rapporteur
M. Victor De FREITAS	Professeur – Université de Porto	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

M. Henri CRAMAIL	Professeur – Université de Bordeaux I	Président
M. Claude ANDARY	Professeur – Université de Montpellier I	Rapporteur
M. Victor De FREITAS	Professeur – Université de Porto	Rapporteur
M. Eric FOUQUET	Professeur – Université de Bordeaux I	Directeur
M. Nicolas VIVAS	Directeur du Département Recherche Tonnellerie DEMPTOS	Directeur

Membre invité :

M. Jean-Louis PUECH	Directeur de Recherche – CNRS – Montpellier	Examineur
---------------------	---	-----------

A mes parents ;

A ma famille ;

A Eric ;

Avec toute mon affection

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier bien sincèrement la Tonnellerie Demptos pour l'appui financier et pour la confiance qu'elle a su m'accorder au cours de ces années.

Je tiens tout particulièrement à remercier Monsieur Nicolas VIVAS, Directeur du département Recherche & Développement de la Tonnellerie Demptos, et co-directeur de ma thèse, pour ses conseils et sa confiance ainsi que Nathalie VIVAS De GAULEJAC, Chargée de Recherches au sein du laboratoire, pour son soutien.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Eric FOUQUET, Professeur à l'Université de Bordeaux I, et directeur de ma thèse, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour sa confiance et ses conseils en chimie organique.

Monsieur Claude ANDARY, Professeur à l'Université de Montpellier, et Monsieur Victor De FREITAS, Professeur à l'Université de Porto, m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je leur exprime mes très sincères remerciements.

Monsieur Henri CRAMAIL, Professeur à l'Université de Bordeaux I, m'a fait l'honneur de lire mon travail, et de faire partie de mon jury de thèse. Monsieur Jean-Louis PUECH, Directeur de Recherches à l'INRA de Montpellier I, m'a fait l'honneur de lire mon travail et de rédiger un compte-rendu en tant qu'examineur. Je leur exprime mes très sincères remerciements.

Je tiens également à remercier :

- Isabelle PIANET et Michel LAGUERRE pour leur collaboration dans les domaines de la RMN ;
- Christiane VITRY pour son assistance technique en spectrométrie de masse
- Toute l'équipe du CESAMO pour m'avoir accueillie chaleureusement dans leur laboratoire.

Sommaire

Abréviations/symboles/unités	1
Introduction générale	3
CHAPITRE I.....	11
Fractionnement et caractérisation des polymères extractibles du bois (lignines, polysaccharides et ellagitanins)	
I. Introduction	13
II. Protocole de fractionnement des macromolécules du bois de chêne.....	14
III. Caractérisation de la fraction lignine	15
III.1. Caractérisation par spectroscopie infra-rouge.....	16
III.2. Thioacidolyse et analyse GC/MS des produits de dégradation.....	18
III.3. Désulfuration et analyse GC/MS des produits de dégradation	20
III.4. Produits obtenus après pyrolyse.....	22
III.5. Caractérisation par ¹ H RMN	24
III.5.1. Analyse de fractions lignines peracétylées par RMN ¹ H.....	25
III.5.2. Analyse des fractions lignines peracétylées par RMN ¹³ C	26
IV. Caractérisation de la fraction polysaccharide	27
IV.1. Hydrolyse acide et GC/MS des produits de dégradation	27
IV.2. Produits obtenus après pyrolyse.....	28
V. Caractérisation de la fraction ellagitanins.....	29
V.1. La réaction d'oxydation à l'acide nitreux : la méthode de Bate-Smith (Bate-Smith, 1972)	31
V.2. La dégradation acide	31

V.3. Analyse par HPLC/LSIMS	32
V.4. Analyse par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	34
V.5. Analyses par MALDI-TOF/MS	35
VI. Conclusion	37
Partie expérimentale du chapitre I.....	39
I. Méthode de fractionnement.....	39
II. Détermination des lignines	39
II.1. Thioacidolyse	39
II.2. Désulfuration	40
II.3. Pyrolyse	41
II.4. Analyse par spectroscopie IR	42
II.5. Analyses RMN du proton (¹ H).....	42
III. Détermination des polysaccharides	42
III.1. Hydrolyse acide.....	42
III.2. Pyrolyse : voir le paragraphe au-dessus.	43
IV. Détermination des ellagitanins	43
IV.1. Réaction d'oxydation à l'acide nitreux	43
IV.2. Dégradation acide	43
IV.3. HPLC/LSIMS	44
IV.4. Détermination qualitative par HPLC	45
IV.5. Analyse par chromatographie d'exclusion stérique (SEC).....	45
IV.6. Analyses par MALDI-TOF/MS	46
CHAPITRE II	47
Caractérisation par Pyrolyse/GC/MS des lignines et des polysaccharides <i>in situ</i>	
et isolé	
I. Introduction	49
II. Pyrolyse GC/MS du bois.....	50
III. Pyrolyse GC/MS des lignines.....	55

IV. Pyrolyse-GC/MS des polysaccharides	59
V. Applications	61
V.1. Profil aromatique des produits formés durant la chauffe	61
V.2. Chimiotaxinomie de différentes espèces de bois de chêne	63
VI. Conclusion	66
Partie expérimentale du chapitre II	67
I. La préparation des échantillons	67
II. Analyses par pyrolyse	68
CHAPITRE III.....	71
Caractérisation partielle des ellagitanins polymériques dans le bois de chêne	
<i>Quercus petraea</i> Liebl. et <i>Q. robur</i> L.	
I. Introduction	73
II. Evolution de la teneur en ellagitanins durant le vieillissement du bois de chêne	74
III. Caractérisation partielle des ellagitanins polymériques solubles (EPs)	77
IV. Voies possibles de formation des EPs dans le bois.....	81
IV.1. Obtention des EPs synthétiques	81
IV.2. Spectres UV	82
IV.3. Spectres IR	83
V. Etude des douelles présentant des tâches.....	85
VI. Conclusion	87
Partie expérimentale du chapitre III.....	89
I. Généralités.....	89
II. Echantillons de chêne.....	89
III. Mesure de la couleur	89
IV. Extraction des polyphénols	90
V. Analyses par HPLC.....	90
VI. Analyses par SEC	90

VII. Purification des ellagitanins polymériques solubles (EPs)	91
VIII. Quantification des ellagitanins	92
VIII.1. Quantification des ellagitanins solubles	92
VIII.2. Quantification des ellagitanins insolubles	92
IX. Détermination des phénols	93
X. Spectre IR	93
XI. Analyses par RMN	93
XII. Oxydation chimique in vitro	94
XIII. Réaction de thioacidolyse	94

CHAPITRE IV

Structure des lignines extraites du bois de coeur de *Quercus petraea* Liebl. et *Q. robur* L.

I. Introduction	99
II. Lignines (Fraction A)	100
II.1. Structure de la chaîne latérale	102
II.2. Groupes phénoliques	104
II.3. Aspect quantitatif	105
III. Identification des lignanes dans le bois de chêne <i>Q. petraea</i>	106
IV. Structures des lignanes (Ln)	111
IV.1. Chaînes latérales	111
IV.2. Groupes aromatiques ou phénoliques	115
V. Conclusion	117
Partie expérimentale du chapitre IV	119
I. Matériels	119
II. Extraction des lignines	119
III. Extraction et identification par GC/MS des lignanes issus du bois de chêne <i>Q. petraea</i>	119
III.1. Lignanes libres	120
III.2. Lignanes glycosylés	121

IV. Extraction et purification des lignanes Ln1 et Ln2	122
V. Expériences RMN.....	123
V.1. Préparation de l'échantillon	123
V.2. Les spectres RMN	123
V.3. Les expériences ^1H - ^1H	124
V.4. Les expériences ^1H - ^{13}C	124
CHAPITRE V	125
Interaction entre les flavan-3-ols des vins et les aldéhydes du bois de chêne : formation des polymères par additions nucléophiles	
Introduction.....	127
<i>A- Etude de la cinétique des produits de condensation en milieu modèle</i>	131
I. Les sites réactifs de la (+)-catéchine.....	134
II. Réactions avec les aldéhydes furaniques.....	136
II.1. Le furfuraldéhyde	136
II.2. Comparaison avec d'autres aldéhydes furaniques.....	147
II.2.1. Cas de l'hydroxyméthylfurfuraldéhyde (HMF)	147
II.2.2. Cas du méthyl-5-furfuraldéhyde (M-5-F)	154
III. Réactions avec les aldéhydes phénoliques	160
III.1. La syringaldéhyde	160
III.2. Comparaison avec d'autres aldéhydes phénoliques.....	166
IV. Impact du SO₂ sur ces réactions de condensation en milieu modèle	172
V. Conclusion.....	179
Partie expérimentale du chapitre V-A	181
I. Réactions	181
II. Analyses HPLC/UV-Visible	181
III. Analyses LC/ESI-MS	182

IV. Spectres d'absorption.....	182
V. Analyses RMN	182
<i>B- Etude structurale des produits de condensation.....</i>	185
I. Etude structurale par RMN	185
II. Etude conformationnelle	192
III. Conclusion.....	199
Partie expérimentale du chapitre V-B.....	201
I. Préparation des composés 1,2 et 3.....	201
II. Expériences RMN	201
III. Mécanique moléculaire	202
IV. Etude conformationnelle par la méthode de Monte Carlo	202
<i>C- Impact sur la couleur des vins blancs</i>	205
I. Pouvoir colorant des adduits (+)-catéchine-aldéhydes du bois de chêne.....	205
II. Réactions de condensation flavanols-aldéhydes du bois dans les vins blancs	208
III. Conclusion.....	212
Partie expérimentale du chapitre V-C	213
I. Purification d'adduits (+)-catéchine-aldéhydes du bois.....	213
II. Spectres d'absorption	213
III. Application dans les vins blancs.....	213
Conclusion générale.....	215
Bibliographie	223

Abréviations/symboles/unités

A ou Ax	position axiale
BF ₃	trifluorure de bore
BSTFA	<i>N,O</i> -bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
¹³ C	carbone 13
COSY	Correlated SpectroscopY
CuSO ₄	Sulfate de cuivre
Da	Dalton
DCl	acide chlorhydrique deutéré
δ	déplacement chimique (ppm)
D ₂ O	eau deutérée
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfert
DHB	acide 2,5-dihydroxybenzoïque
E ou Eq	position équatoriale
EPs	Ellagitanins polymérisés
éq	équivalent
EtOH	Ethanol
FC	Folin-Ciocalteu
G	unité Gaïacyle
GC	chromatographie en phase gazeuse
¹ H	proton
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HMF	HydroxyMéthylFurfuraldéhyde
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HNaSO ₃	hydrogénosulfite de sodium
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HPTLC	chromatographie sur couche mince haute performance
H ₃ PO ₄	acide orthophosphorique
EI	Impact électronique
IR	Infra Rouge

J	constante de couplage exprimée en Hertz
ϕ	noyaux phényles
LC	Liquid Chromatography
LSIMS	Liquid Secondary Ion Mass Spectrometry
[M-H] ⁻	espèce déprotonée d'une molécule
M	Masse moléculaire
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight
MeOH	Méthanol
M-5-F	Méthyl-5-Furfuraldéhyde
MM2*, MM3*	Molecular Mechanics
M _p	Masse moléculaire au pic
M _w	Masse moléculaire moyenne
NaOH	Hydroxyde de sodium
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
ppm	partie par million
PYR	PYROlyse
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY	Rotating Overhauser Enhancement Spectroscopy
S	unité Syringyle
SEC	Size Exclusion Chromatography
SIM	Selected Ion Monitoring
SM	Spectrométrie de Masse
TIC	Courant Ionique Total
THF	TétraHydroFurane
TMCS	Triméthylchlorosilane
TMS	Triméthylsilane
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
UV	Ultra Violet

Introduction générale

Le bois est le matériau qui fut utilisé en remplacement des différents récipients de conservation et de transport antique des vins.^{1,2} Le chêne (du latin *caxanum*) occupe un des premiers rangs parmi les espèces forestières de par sa longévité, ses grandes dimensions et ses multiples utilisations. Les chênes européens et particulièrement *Quercus robur* et *Q. petraea* sont largement utilisés en tonnellerie^{1,3,4} grâce à leurs propriétés mécaniques, physiques et chimiques exceptionnelles, apportant des caractéristiques sensorielles extrêmement appréciées. En plus de ces différences entre les chênes dues à l'espèce, d'autres variables peuvent modifier les caractéristiques des barriques : l'origine géographique des arbres, la fabrication des douelles, la méthode de séchage et le degré de chauffe.^{5,6,7,8,9,10}

Le bois de chêne possède une partie active, la plus externe, appelée aubier qui véhicule la sève brute, pauvre en composés phénoliques. Ces derniers s'accumulent lors du processus de duraminisation. Au cours de cette étape l'aubier perd sa fonction pour devenir un simple tissu de soutien. Ensuite, lors des années successives le duramen ou bois de cœur continue son évolution. C'est le vieillissement du bois. Au cours de cette seconde étape les composés phénoliques s'insolubilisent partiellement et le bois prend une couleur sombre.

Le bois de chêne présente une très grande variété de composés organiques et minéraux.^{11,12} Parmi ceux-ci, on trouve des composés volatils minoritaires et des composés fixes qui regroupent les molécules de faible poids moléculaire et les macromolécules. L'ensemble de ces composés participe à la qualité des bois.^{13,14,15}

¹ Taransaud, J. Le livre de la tonnellerie. La roue des livres (Ed.), **1976**, Paris

² Remy, B. *Rev. Forest. Fr.*, XLIII, **1991**, 4, 190-300

³ Keller, R. Les chênes dans le monde. Guimberteau, G. (Ed.), Vigne et vin publications internationales, Bordeaux, **1992**, 7-28

⁴ Vivas, N. *J. Sci. Tech. Tonnellerie*, **1995**, 1, 17-48

⁵ Sarni, F., Moutounet, M., Puech, J.L., Rabier, P. *Holzforchung*, **1990**, 44, 461-466

⁶ Chatonnet, P. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **1993**, numéro spécial, 39-49

⁷ Chatonnet, P., Boidron, J.N., Dubourdieu, D., Pons, M. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **1994**, 28, 337-357

⁸ Klumpers, J., Scalbert, A. et Janin, G. *Phytochemistry*, **1994**, 36, 1249-1252

⁹ Viriot, C., Scalbert, A., Herve du Penhoat, C.L.M., Moutounet, M. *Phytochemistry*, **1994**, 36, 1253-1260

¹⁰ Moutounet, M., Masson, G., Scalbert, A., Baumes, R., Lepoutre, J.P., et Puech, J.L. *Rev. Fr. Oenol.*, **1995**, 151, 25-31

¹¹ Haluk, J.P., Schloegel, F., Metche, M. *Holzforchung*, **1991**, 45, 437-444

¹² Filliatre, C. Du bois au papier. In « La chimie du pin et du vin : du végétal à la table à travers les processus naturels ou les procédés industriels », Union des physiciens, **1994**, Bordeaux

¹³ Inquinbert, M.H. Elaboration traditionnelle d'un fût en tonnellerie. Etude de la sélection et du séchage des merrains de chênes : leur incidence sur un millésime médocain. Mémoire DNO, Université Bordeaux II, France, **1978**

¹⁴ Pontallier, P., Salagoity-Auguste, M.H., Ribéreau-Gayon, P. *Connaissance Vigne Vin*, **1982**, 16, 45-61

Dans le bois de chêne, appelé duramen, les composés sont situés dans trois compartiments en fonction de leurs aptitudes à être libérés : ^{16,17,18}

- Les composés solubles, libérés spontanément au cours de l'élevage des vins en barriques ; il s'agit pour l'essentiel de petites molécules telles que les coumarines, les acides phénols, les aldéhydes phénols, les ellagitanins oligomères, les oses, les cations et les anions ;
- Les substances extractibles, qui nécessitent pour être libérées des réactions d'hydrolyse permettant de diminuer leur degré de réticulation ; ce sont des polysaccharides et des lignines dont certaines chaînes se sont rompues pour permettre leur extraction ;
- Les substances liées, totalement insolubles ; elles correspondent à des formes oxydées et condensées des ellagitanins, à des polysaccharides et des lignines incrustées dans la paroi et liées de façon covalente entre elles, on retrouve également des fractions phénoliques emprisonnées de façon irréversible dans des pores du bois. Ce dernier compartiment est partiellement accessible après gonflement des parois par des solutions alcalines.

Le duramen renferme également des ellagitanins polymérisés. Leurs présences suspectées par Klumpers *et al.*⁸ a été démontrée.¹⁹ Il s'agit de formes oxydées des ellagitanins fortement colorées. Elles représentent plus de 50% de la couleur du bois. Ces chromophores solubles sont produits au cours de processus oxydatifs par génération de radicaux libres. La présence de métaux de transition facilite cette réaction et conduit rapidement à partir d'une solution fraîche d'ellagitanins à des formes polymérisées colorées.

Selon que les échantillons de bois sont prélevés dans le duramen externe, plus récent, ou le duramen interne, plus vieux, la composition et la couleur du bois sont totalement différentes.

¹⁵ Vivas, N., Glories, Y., Donèche, B., Gueho, E. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, **1991**, 13, 11, 149-153

¹⁶ Marché, M., Joseph, E. *Rev. Fr. Oenol.*, **1975**, 57, 1-107

¹⁷ Peng, S., Scalbert, A., Monties, B. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 775-778

¹⁸ Monties, B. Composition chimique des bois de chêne : composés phénoliques, relations avec quelques propriétés physiques et chimiques susceptibles d'influencer la qualité des vins et des eaux-de-vie. In *"Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie"*. Guimberteau, G. (Ed.), Vigne et vin publications internationales, Bordeaux, **1992**, 59-72

Ce qui explique les difficultés liées à la reproductibilité de l'élevage des vins en barriques provenant d'un même lot de bois.²⁰ Des problèmes concernant l'homogénéité de l'échantillonnage, pour l'étude comparée de la composition de bois, ont été envisagés par Masson *et al.*²¹ L'origine de cette hétérogénéité est donc en partie interprétée. On doit y ajouter la notion d'origine botanique et géographique.^{4,22}

Une partie des composants du bois est solubilisée et passe dans les vins au cours de leur conservation en barriques. L'extraction des constituants du bois au cours de l'élevage en barriques a été fréquemment étudiée pour les eaux-de-vie et les whisky.^{23,24,25} Ces substances influencent alors sur la composition et la qualité des vins.^{15,26,27,28,29,30,31,32}

L'utilisation des barriques provoque une modification appréciable de la composition de la couche 0-10 mm en contact avec le vin. Les ellagitanins sont facilement extraits ; mais une partie est oxydée *in situ*. Les polysaccharides neutres extractibles sont facilement libérés. Dès la première année la couche interne des fûts perd 75% de ce type de polysaccharides. Il s'agit probablement de chaînes polysaccharidiques tapissant la surface des parois ; elles sont largement sous formes combinées. Ainsi la fraction des polysaccharides du bois extraite au cours de l'élevage en barriques se présente sous forme de combinaisons polysaccharides-ellagitanins. Les travaux antérieurs ont montré que la lignine est peu affectée au cours de l'élevage des eaux de vie en barriques.²⁵ Pour être extraite la lignine nécessite des conditions brutales telle que la fash

¹⁹ Vivas, N. Recherches sur la qualité du chêne français de tonnellerie (*Q. petraea* Liebl., *Q. robur* L.) et sur les mécanismes d'oxydo-réduction des vins rouges au cours de leur élevage en barriques. Thèse, Université de Bordeaux II, France, **1997**

²⁰ Feuillat, F. Etude de caractère exploratoire sur quelques aspects de la qualité du chêne de tonnellerie en relation avec la qualité des vins. Mémoire DEA, Sciences du bois, Université de Nancy I, France, **1991**

²¹ Masson, G.; Puech, J.L.; Moutounet, M. *Phytochemistry*, **1994**, 37, 1245-1249

²² Vivas, N., Glories, Y., Bourgeois, G., Vitry, C. *J. Sci. Tech. Tonnellerie* 2, **1996**, 24-49

²³ Puech, J.L., Jouret, C., Deibner, L. *Ind. Alim. Agric.*, **1978**, 95, 13-22

²⁴ Conner, J.M., Paterson, A., Pigott, J.R. *J. Sci. Food Agric.*, **1992**, 60, 349-353

²⁵ Conner, J.M., Paterson, A., Pigott, J.R. *J. Sci. Food Agric.*, **1993**, 62, 169-174

²⁶ Singleton, V.L. Some aspects of wooden container as a factor in wine maturation. In "*Chemistry of wine making*", **1974**, 137, A.D. (Ed.), 311

²⁷ Marsal, F., Sarre, C. *Connaissance Vigne Vin*, **1987**, 21, 71-79

²⁸ Marsal, F., Sarre, C., Boidron, J.N., Dubourdiou, D. *Connaissance Vigne Vin*, **1988**, 22, 33-38

²⁹ Moutounet, M., Rabier, Ph., Puech, J.L., Verette, E., Barillere, J.M. *Sci Aliments*, **1989**, 9, 35-51

³⁰ Moutounet, M., Rabier, Ph., Sarni, F., Scalbert, A. Les tanins du bois de chêne. Les conditions de leur présence dans les vins. In "*Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie*", Guimberteau, G. (Ed.), Vigne et vin publications internationales, Bordeaux, **1992**, 75- 79

³¹ Glories, Y. Les phénomènes oxydatifs liés à la conservation sous bois. In "*Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie*", Guimberteau, G (Ed.), Vigne et vin publications internationales, Martillac, **1992**, 93-102

³² Chatonnet, P. Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne. Thèse doct. ès Sciences, Université Bordeaux II, France, **1995**

hydrolyse.^{33,34} Cependant une fraction de lignines fortement dégradées, de faibles masses moléculaires peut être solubilisée.^{18,35} Au côté de cette lignine des lignanes peuvent aussi passer en solution.²⁹

Le brûlage des barriques affecte également la composition des douelles. On considère que le brûlage provoque la dégradation des polysaccharides, des composés phénoliques et des lignines.^{5,36,37} Mais on observe sur plusieurs mois d'élevage que les barriques issues de chauffes fortes libèrent plus d'ellagitanins dans les vins³⁰ et les eaux-de-vie³⁸ que les barriques non chauffées ou faiblement chauffées. Ainsi la dégradation des ellagitanins dans les couches superficielles est compensée par l'amélioration de l'extraction.

De très nombreux auteurs se sont intéressés à la fraction volatile du bois de chêne, essentiellement parce que ces molécules interviennent dans l'arôme du bois^{39,40,41} et participent aux caractères olfactifs des vins et des eaux-de-vie.^{42,43,44,45,46,47,48} En revanche, les travaux généraux sur les composés non volatils des bois de chênes sont beaucoup moins nombreux.^{11,16} Ils concernent des études portant sur une famille de composés phénoliques comme par exemple les lignines⁴⁹, les ellagitanins^{9,50} ou les coumarines.⁵¹ L'ensemble de ces composés phénoliques est susceptible de participer aux mécanismes oxydoréducteurs lors de l'élevage⁵² et de modifier

³³ Puech, J.L., Robert, A., Moutounet, B. *Holzforschung*, **1989**, 43, 235-238

³⁴ Monzie, P., Pichon, M., Lombardo, G., Schwob, Y. *CR JIEP*, **1982**, 11, 233-257

³⁵ Singleton, V.L. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1995**, 46, 98-115

³⁶ Chatonnet, P., Boidron, J.N., Pons, M. *Connaissance Vigne Vin*, **1989**, 23, 223-250

³⁷ Puech, J.L., Maga, J. *Rev. Œnol.*, **1993**, 70, 13-16

³⁸ Rabier, Ph., Moutounet, M. Evolution d'extractibles du bois de chêne dans une eau-de-vie vieillie en fûts. In "*Les eaux-de-vie traditionnelles d'origine viticole*", Bertrand, A. (Ed.), Lavoisier, Paris, **1991**, 220-230

³⁹ Nabeta, K., Yonekubo, J., Miyake, E. *Mokuzai Gakkashi*, **1986**, 32, 921-927

⁴⁰ Chatonnet, P. Incidences du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins. Applications technologiques. Diplômes d'études et de recherches, Bordeaux II, France, **1991**

⁴¹ Marco, J., Artagona, J., Larrechi, M.S., Ruis, F.X. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1994**, 45, 192-200

⁴² Puech, J.L. *Am J Enol Vitic*, **1984**, 35, 77-81

⁴³ Boidron, J.N., Chatonnet, P., Pons, M. *Connaissance Vigne Vin*, **1988**, 22, 275-294

⁴⁴ Nondedeu, L., Leauté, R., Granchamps, B., Bonnichon, C., Laurichesse, D., Trichet, P. *Progr. Agric. Vitic.*, **1988**, 105, 505-518

⁴⁵ Dubois, P. *Rev. Fr. Œnol.*, **1989**, 120, 19-24

⁴⁶ Dubourdiou, D. Vinification des vins blancs secs en barriques. In "*Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie*", Guimberteau, G. (Ed.), Vigne et vin publications internationales, Martillac, **1992**, 137-143

⁴⁷ Dubois, P. *Rev. Fr. Œnol.*, **1994**, 144, p. 28-36; 145, p. 27-39; 146, 46-58

⁴⁸ Viriot, C., Scalbert, A., Lapierre, C., Moutounet, M. *J Agric Food Chem.*, **1993**, 41, 1872-1879

⁴⁹ Jouin, D., Tollier, M.T., Monties, B. *Cellulose Chem. Technol.*, **1988**, 22, 231-243

⁵⁰ Hervé du Penhoat, C.L.M., Michon, V.M.F., Ohassan, A., Peng, S., Scalbert, A., Gage, D. *Phytochemistry*, **1991**, 30,1, 329-332

⁵¹ Salagoïty-Auguste, M.H., Tricard, C., Sudraud, P. *J. Chromatogr.*, **1987**, 392, 379-387

⁵² Vivas, N., Glories, Y. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1996**, 47, 103-107

les caractères gustatifs des vins⁵³. Pour ces raisons, une étude complète s'avère importante et indispensable.

La connaissance de la diversité de composition du matériel végétal et de sa composition en polymères tels que les polysaccharides, les lignines et les ellagitanins peuvent aider à l'avancement des méthodes et des procédés. Elle permet de mieux appréhender les différents phénomènes se produisant lors de l'élevage des vins en barriques. C'est pourquoi nous avons dirigé ce travail en cinq axes :

Nous avons tout d'abord mis au point une méthode de fractionnement par précipitations sélectives et de caractérisation des polymères extractibles du bois (lignines, polysaccharides, ellagitanins).

Grâce à la technique de pyrolyse/GC-MS, les fractions lignines et polysaccharides ont été étudiées *in situ* et isolées. Un profil aromatique des produits formés durant la chauffe a pu être établi, permettant ainsi une différenciation des diverses espèces de bois de chênes (chimio-taxonomie).

Dans une troisième partie, nous présentons une caractérisation partielle des ellagitanins polymériques dans le bois de chêne *Quercus petraea* Liebl. et *Q. robur* L.

La structure des lignines extraites du bois de cœur de *Quercus petraea* Liebl. et *Q. robur* L. a été établie et présentée dans une quatrième partie.

Puis enfin, nous avons étudié les interactions entre les flavan-3-ols des vins et les aldéhydes du bois de chêne, conduisant à la formation de polymères par additions nucléophiles. Nous avons établi ensuite l'impact de ces adduits sur la couleur et la qualité des vins élevés en barriques neuves.

⁵³ Pocok, K.F., Sefton, M.A., Williams, P.J. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1994**, 45, 429-434

CHAPITRE I

Fractionnement et caractérisation des polymères extractibles du bois (lignines, polysaccharides, et ellagitanins)

I. Introduction

Les barriques sont fabriquées avec du bois de cœur de chêne (*Quercus robur*, *Q. petraea*) et parfois avec d'autres espèces de chêne (*Q. alba*, *Q. stellata*) et avec du châtaignier (*Castanea sativa*)⁵⁴. Quelle que soit le type de chêne étudié, la composition a des valeurs similaires :

- 40% de cellulose
- 20% d'hémicellulose
- 25% de lignines
- 10% d'ellagitanins
- 5% d'oses, lipides, stérols, substances volatiles et substances minérales

85% du bois est constitué de macromolécules polysaccharidiques (cellulose, hémicellulose) et polyphénolique (lignines). Sur ce groupe de constituants, on note peu de variation entre les principales espèces de chênes utilisées en tonnellerie.⁵⁵

Des études se sont intéressées à la composition des parois cellulaires en utilisant des méthodes spécifiques et destructives (acide concentré, chaleur, ...), aboutissant, pour chaque méthode utilisée, à un seul groupe de polymères insolubles, comme les lignines de Brauwn.⁵⁶ Dans notre cas, nous avons développé une méthode globale qui nous permet d'obtenir les trois familles distinctes des polymères extractibles du bois de chêne, en une seule fois.

Nous avons mis au point une méthode de fractionnement par précipitations sélectives des principaux groupes des macromolécules du bois de cœur de chêne. Le protocole comporte trois étapes successives présentées sur la Figure 1. Les méthodes de caractérisation utilisées sont la spectroscopie infra-rouge associées à d'autres techniques plus spécifiques pour chaque groupe.⁵⁷

Dans la partie qui suit, ces méthodes de caractérisation sont développées pour chaque famille d'extrait : les lignines (Fraction A), les polysaccharides (Fraction B), les ellagitanins (Fraction C).

⁵⁴ Vivas, N. Manuel de Tonnellerie, Ed. Féret, Bordeaux, France, **2002**

⁵⁵ Peraza-Cramas, C.P. Las maderas de roble en la fabricacion de barricas. In "*Jordanas técnicas sobre utilizacion de barrica de roble en la crianza de vinos de Rioja*", Relondo, A.L. (Ed.), Ramondin, Logrono, **1986**, 11-42

⁵⁶ Monties, B. Les lignines. In "*Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés*", (Ed.) Bordas, Paris, **1980**, 122-155

⁵⁷ Nonier, M.F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Absalon, C., Vitry, C., Fouquet, E. *J. Sci. Food Agric.*, **2005**, 85, 343-353

II. Protocole de fractionnement des macromolécules du bois de chêne

Le protocole, que nous avons développé pour fractionner les macromolécules du bois de chêne, comporte trois étapes successives présentées sur la Figure 1 :

- a- précipitation d'une fraction insoluble dans l'eau (Fraction A)
- b- précipitation d'une fraction insoluble dans l'éthanol/eau (9 :1 ; v :v) (Fraction B)
- c- isolement d'une fraction soluble à la fois dans l'eau et dans un mélange éthanol/eau (Fraction C)

Nous avons étudié et fait varier différents paramètres pour optimiser la méthode : solvants, température, lumière, temps.

Différentes méthodes et techniques analytiques ont été utilisées et développées pour caractériser chaque famille d'extrait : les lignines (Fraction A), les polysaccharides (Fraction B), les ellagitanins (Fraction C).

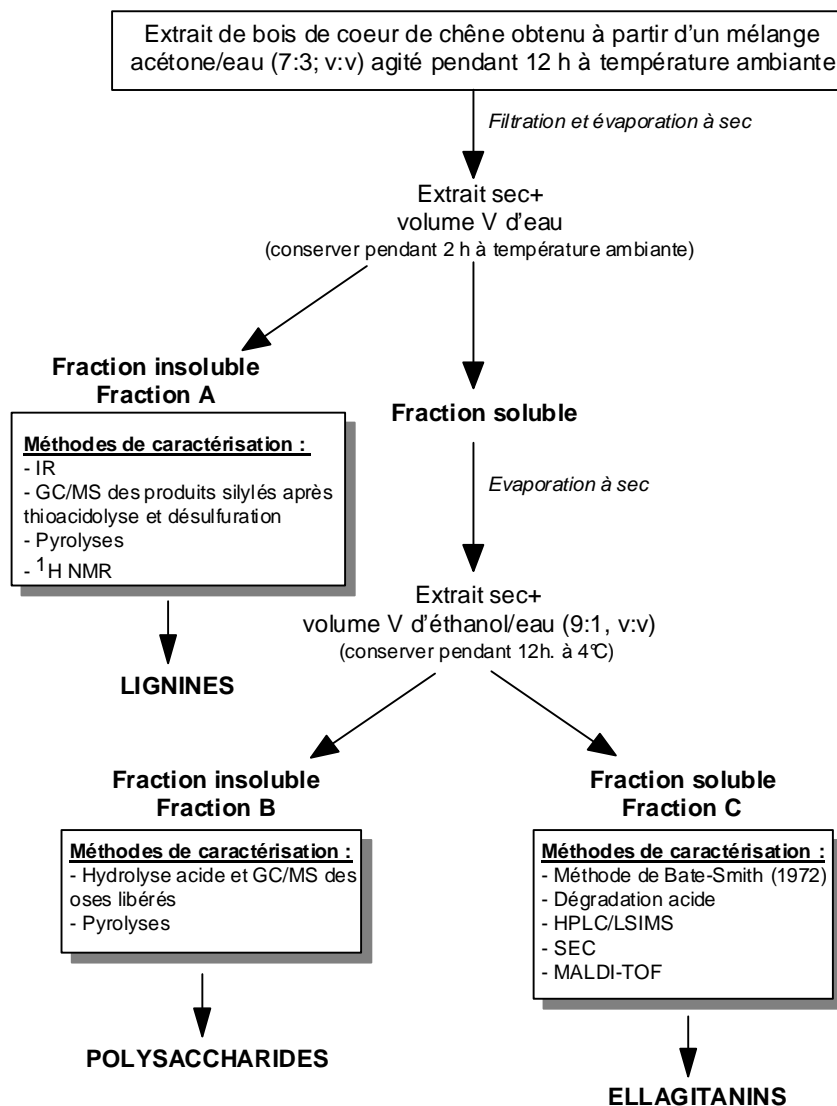


Figure 1 : Protocole de fractionnement par précipitations sélectives des macromolécules du bois de chêne⁵⁷

III. Caractérisation de la fraction lignine

Le bois de cœur de chêne est riche en lignines. Selon les auteurs et les méthodes d'extraction employées, elles représentent 25 à 30 % du poids du bois.^{49,58,59,60} Les lignines

⁵⁸ Browning, B.L., Isenberge, I.H. In "wood chemistry", Wise E.; Jahn, E.C. (eds.), Academic press, New York, **1952**

⁵⁹ Lai, Y.Z., Sarakanen, K.W. In "Lignins: occurrence, formation, structure, reactions, chap. 5", Sarakanen, K.V.; Ludwig, C.H. (Eds.), **1971**

⁶⁰ Fengel, D., Wegener, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reaction. De Gruyter, Berlin, **1984**

imprègnent la paroi cellulaire⁶¹ et sont principalement localisées dans la paroi primaire.⁶² Dans les travaux de Klauditz^{63,64}, on attribue leur participation aux propriétés mécaniques du bois et à leur hydrophobicité. Le caractère hétérogène des lignines est un facteur important⁵⁶ qui est à l'origine de la grande variabilité de composition et de structure entre espèces^{65,66}, au sein d'une même espèce^{67,68,69} et même en fonction de leur position dans les tissus.⁷⁰ Ainsi, les quelques travaux consacrés à la structure des lignines des chênes¹⁸ sont difficilement généralisables et restent dépendants de l'échantillonnage et des objectifs, souvent spécifiques, de l'étude.

III.1. Caractérisation par spectroscopie infra-rouge

Le spectre infra-rouge de la fraction A (native) présente une première série de bandes communes à de nombreuses structures phénoliques : 3605-3150 (élongation des O-H dans les fonctions alcools et phénols), 3000-2800 cm^{-1} (élongation des C-H aliphatique et aromatique dans les groupements méthyl et méthylène). Puis une deuxième série de bandes caractéristiques des lignines : 1630-1580 (vibration du squelette aromatique et élongation des C=O), 1505-1480 (déformation des C-H dans les groupes $-\text{CH}_2$ et $-\text{CH}_3$). Enfin, une troisième série de bandes : 1328-1320 (élongation des O-H et C-O dans les alcools tertiaires), 1122-1118 (aryl- alkyl éthers), 1045-1038 cm^{-1} (aryl-aryl éthers ; déformation des C-O dans les alcools primaires et déformation des C=O non conjugués) (Figure 2 et tableau 1).

⁶¹ Rowell, R. The chemistry of solid wood. *Adv. Chem. Ser.*, **1984**, 207, 1-614

⁶² Catesson, A.M.. Les tissus végétaux. Ultrastructure, biogenèse. In "Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaire non azotés", Monties, B. (Ed.), Gauthier-Villars, Paris, **1980**, 1-29

⁶³ Klauditz, W. *Holzforschung*, **1952**, 6, 70-82

⁶⁴ Klauditz, W. *Holzforschung*, **1957**, 11, 110-116

⁶⁵ Faix, O. *Holzforschung*, **1991**, 45, 21-27

⁶⁶ Rolando C, Monties B and Lapierre C. Thioacidolysis. In "Methods in lignins chemistry" Lin.S.Y., CDence C.W. (Ed.) Springer; Verlag, Berlin, **1992**, 334-349

⁶⁷ Lapierre, C. Hétérogénéité les lignines de peuplier : mise en évidence systématique Thèse doctorat d'état, Université Paris-Sud, **1986**

⁶⁸ Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C. *Holzforschung*, **1986**, 40, 47-81

⁶⁹ Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C. *Holzforschung*, **1986**, 40, 113-118

⁷⁰ Hardell, W.E., Leary, G.J., Stoll, M., Westermarck, U. *Svensk. papperstid.* **1980**, 83, p. 44-49 - 83, 71-74

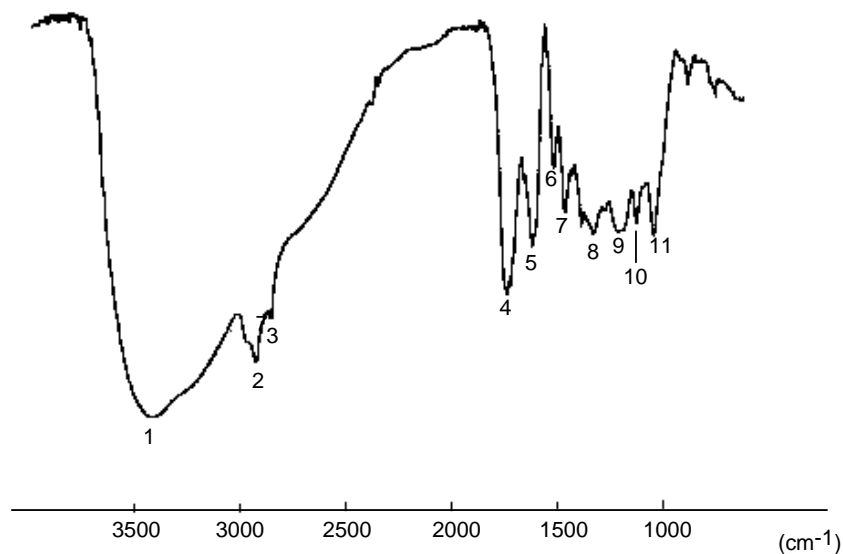


Figure 2 : Spectre infrarouge de la fraction A – Les différents chiffres indiqués sur les bandes sont identifiés dans le tableau 1

Tableau 1 : Attribution des bandes de vibration entre 4000 et 700 cm^{-1} pour le spectre IR de la fraction A non dérivée

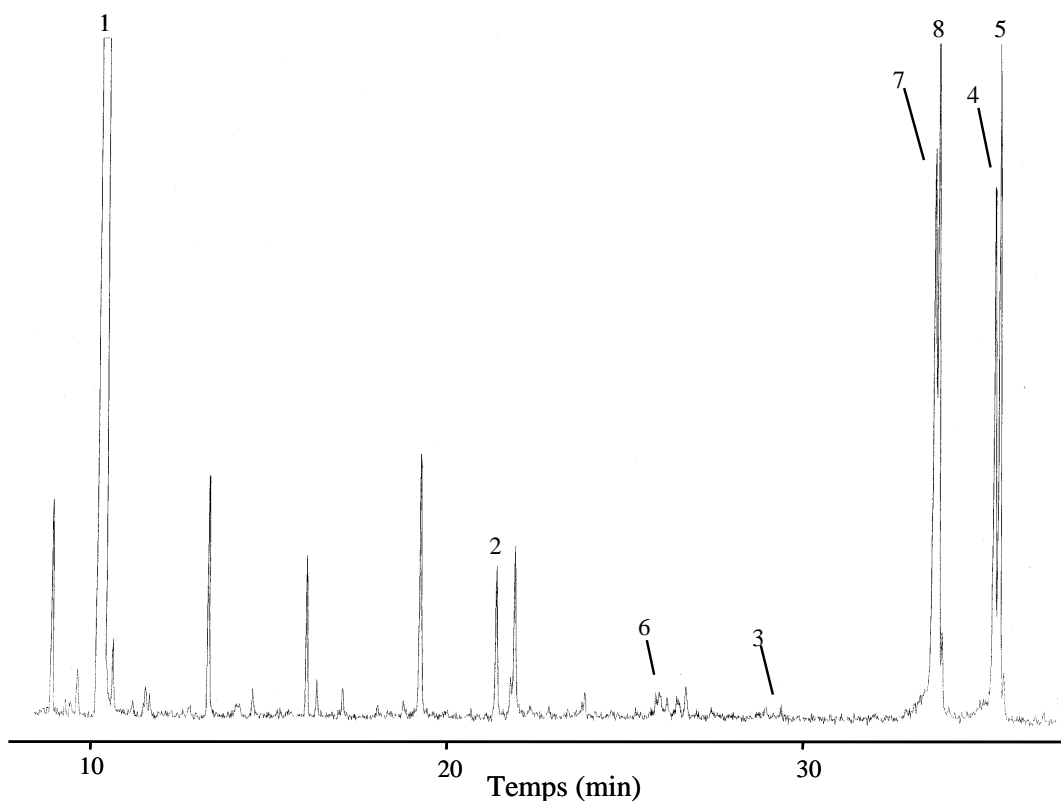
Vibration (cm^{-1})	Zone avec un maximum	Origine de la bande	Maximum (cm^{-1})	
cf. Figure 2				
3695	1	3605-3150	<i>élongation O-H dans les fonctions alcool et phénol</i>	3404
	2	3000-2800	<i>élongation C-H (aliphatique et aromatique) dans les groupes méthyl et méthylène</i>	2922
2780	3	2852	<i>élongation C-H dans les phénoliques -CH₂ and -CH₃</i>	2852
1900	4	1800-1709	<i>C=O élongation dans les quinones, carbonyles non conjugués et les fonctions esters</i>	1750
	5	1630-1580	<i>Vibration du squelette aromatique et élongation C=O; S>G, G condensés>G etherifiés.</i>	1614
	6	1510-1500	<i>Vibration du squelette aromatique; G>S.</i>	1505
	7	1505-1480	<i>Déformation des C-H dans les -CH₂ and -CH₃.</i>	1495
	8	1328-1320	<i>S+G condensés; élongations O-H and C-O dans les alcools tertiaires</i>	1325
	9	1220-1205	<i>élongation C-O aromatiques; C-O-C des éthers aryl-alkyl</i>	1210
	10	1122-1118	<i>Aryl-alkyl éthers</i>	1120
	11	1045-1038	<i>Aryl-aryl éthers, G>S; et déformation C-O dans les alcools primaires et déformation des C=O non conjugués.</i>	1041

La technique par spectroscopie infra-rouge apporte quelques informations mais pas suffisamment pour déterminer la nature de cette fraction. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour caractériser la fraction A.

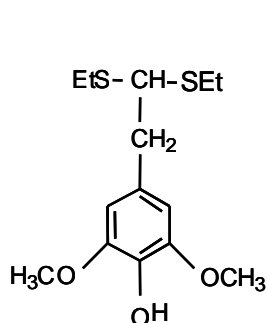
III.2. Thioacidolyse et analyse GC/MS des produits de dégradation

La réaction de thioacidolyse est une réaction de catalyse acide qui conduit à une dépolymérisation des lignines. C'est une méthode récemment développée. Les liaisons alkyl- et aryléthers sont rompues dans le dioxane en présence d'un acide fort : $\text{Et}_2\text{O}\cdot\text{BF}_3$ et d'un nucléophile : EtSH (éthanethiol). La rupture des liaisons éther est également spécifique, mais cette méthode est plus complète que d'autres comme la thioacétolyse. La détection des groupes « trithioéthyles » des composés phénylpropane démontre sans ambiguïté la présence des structures aryl-éther, les structures les plus caractéristiques rencontrées dans les lignines. Sur cette base, la réaction de thioacidolyse est considérée comme la meilleure méthode pour caractériser les lignines.

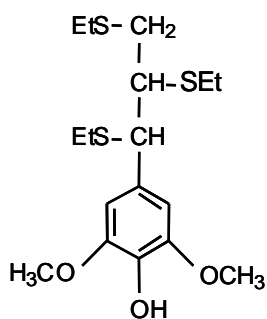
La figure 3 présente les analyses obtenues par chromatographie en phase gazeuse des produits de dégradation obtenus après thioacidolyse de la fraction A.



Structures des dérivés syringyles

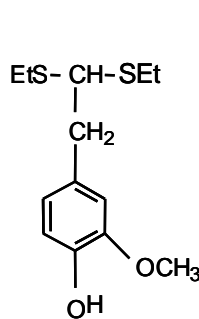


3 : SCH₂-CHR₂

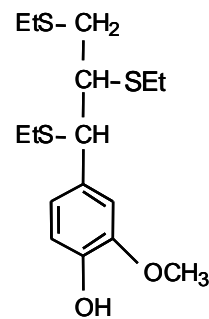


4 - 5 : SCHR-CHR-CH₂R
(érythro/thréo)

Structures des dérivés guaiacyles



6 : GCH₂-CHR₂



7 - 8 : GCHR-CHR-CH₂R
(érythro/thréo)

Figure 3 : Chromatogramme GC des produits triméthylsilylés de la Fraction A après thioacidolyse et structures des produits de thioacidolyse identifiés dans les lignines (EtS : éthanethiol ; S : unités syringyles ; G : unités guaiacyles ; R : EtS)

Les fragmentations (en masse) des dérivés triméthylsilylés (Tableau 2) ont été comparées avec celles publiées dans la littérature dans le but d'identifier les différents pics obtenus par chromatographie en phase gazeuse.

Tableau 2 : Principaux produits de thioacidolyse de la Fraction A et leurs fragmentations

Pics	Produits identifiés	Ions moléculaires et principales fragmentations m/z (intensité relative)							
Produits de thioacidolyse des xylanes									
1	CHR2-CH2R	210 (19)	149 (37)	135 (100)	107 (9)	89 (41)	75 (11)		
2	CHR2-CHR-CH2R	284 (5)	161 (23)	135 (100)	101 (38)	89 (2)	75 (71)		
Produits de thioacidolyse des lignins									
<i>Structures syringyl</i>									
3	S-CH2-CHR2	374 (16)	310 (4)	252 (5)	239 (50)	222 (12)	209 (10)	135 (100)	73 (25)
4 and 5	S-CHR-CHR-CH2R (erythro/threo)	448 (4)	325 (4)	299 (100)	269 (4)	265 (13)	239 (2)	161 (4)	75 (17) 73 (17)
<i>Structures guaiacyl</i>									
6	G-CH2-CHR2	344 (10)	283 (8)	222 (15)	209 (27)	192 (9)	179 (3)	135 (100)	117 (11) 73 (24)
7 and 8	G-CHR-CHR-CH2R (erythro/threo)	418 (2)	403 (3)	296 (4)	295 (3)	269 (100)	235 (21)	75 (16)	73 (22)

Les structures des composés, représentés par les principaux pics, sont regroupées sur la Figure 3. Les pics 1 et 2 sont attribués aux « xylanes » produits lors de la thioacidolyse. Ils proviennent essentiellement des unités xylose des polysaccharides et sont considérés comme des impuretés. Les unités guaiacyles et syringyles sont présentes exclusivement dans cette fraction. Sur le chromatogramme, les produits 4 et 5 puis 7 et 8 sont les plus importants et correspondent aux principaux produits de thioacidolyse ; ils sont respectivement attribués aux formes « érythro » et « thréo » des monomères guaiacyles et syringyles des lignines.

L'identification de ces différents produits de thioacidolyse mono- et diméthoxylés, indique que la fraction A représente la fraction lignine. Ceci sera confirmé par les analyses ultérieures.

III.3. Désulfuration et analyse GC/MS des produits de dégradation

La méthode précédente a été étendue à la détection des structures condensées des lignines. La désulfuration des produits de thioacidolyse, conduisent aux dimères qui représentent les différents types de liaisons des lignines ; ces composés peuvent être séparés par chromatographie en phase gazeuse. La meilleure caractérisation des lignines (aspect qualitatif) est réalisée avec les dilignols qui sont produits après ces deux réactions consécutives : étapes de thioacidolyse et désulfuration.

La figure 4 présente le chromatogramme GC des produits de dégradation de la fraction A après thioacidolyse et désulfuration au Nickel de Raney, et les structures des produits identifiés.

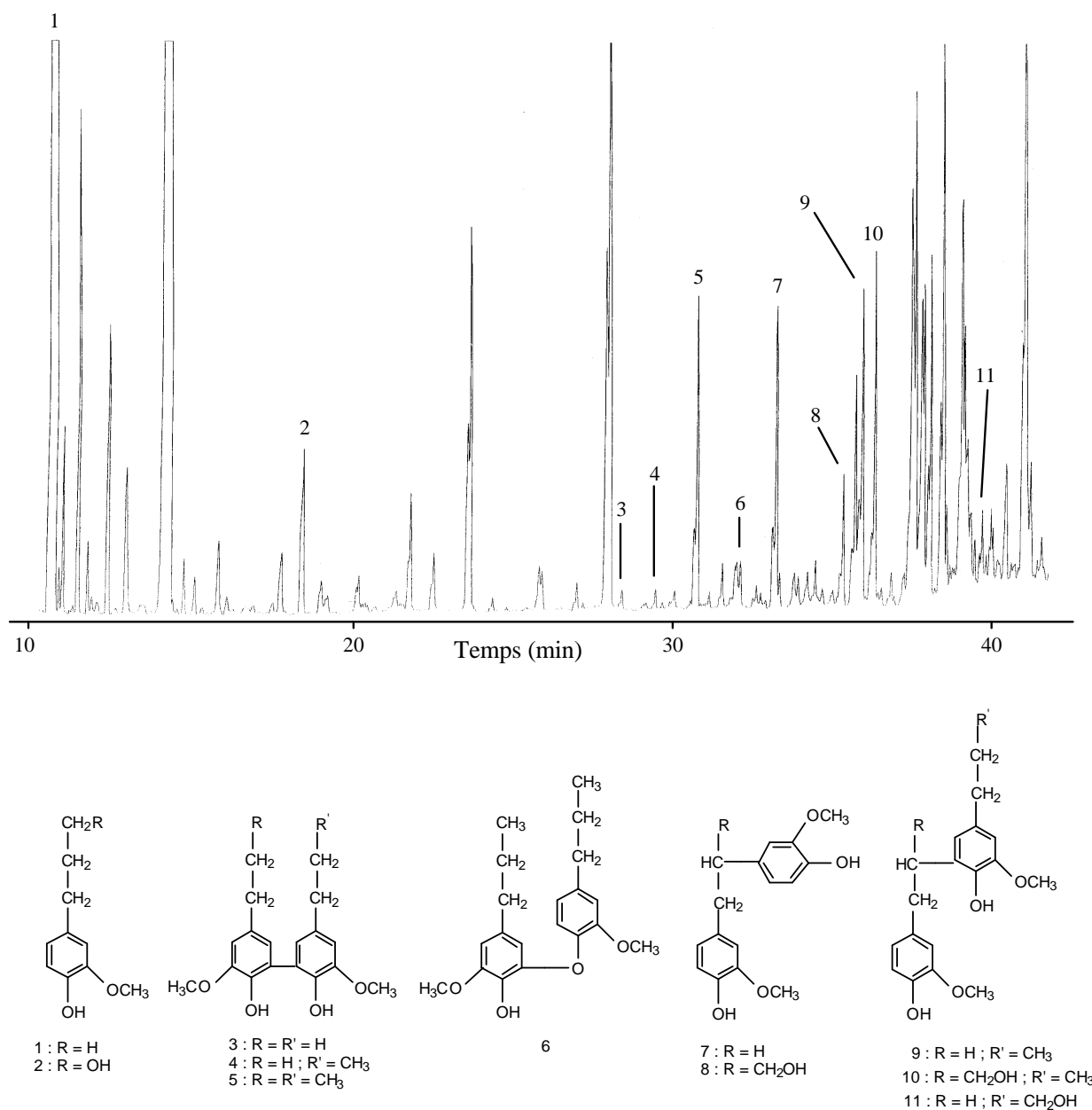


Figure 4 : Chromatogramme GC des produits de dégradation de la fraction A après thioacidolyse et désulfuration au Nickel de Raney, et les structures des produits identifiés.

La caractérisation de ces produits de dégradation a été réalisée à partir de l'étude comparative de leurs fragmentations (en masse) (Tableau 3) avec celles publiées dans la littérature.⁷¹

⁷¹ Lapierre, C., Pollet, B., Monties, B., Rolando, C. *Holzforchung*, **1991**, 45, 61-68

Tableau 3 : Principaux produits de désulfuration de la fraction A et leurs fragmentations

Pics chromatographiques	Ion moléculaire et principales fragmentations m/z (intensité relative)										
1	238 (61)	223 (20)	209 (100)	208 (49)	193 (5)	179 (67)	149 (16)	73 (61)			
2	326 (100)	311 (19)	236 (17)	221 (12)	210 (22)	209 (14)	206 (64)	205(48)	179 (9)	149 (6)	89 (14) 73 (93)
3	446 (60)	431 (15)	417 (12)	416 (11)	358 (3)	357 (5)	329 (5)	147 (3)	73 (100)		
4	460 (77)	445 (20)	431 (12)	430 (11)	401 (4)	147 (4)	73 (100)				
5	474 (86)	459 (19)	445 (17)	444 (9)	385 (4)	357 (7)	313 (4)	147 (3)	73 (100)		
6	402 (100)	387 (22)	373 (29)	343 (10)	209 (10)	179 (9)	157 (3)	73 (54)			
7	418 (15)	403 (4)	209 (100)	193 (4)	179 (17)	149 (4)	73 (41)				
8	460 (30)	445 (5)	251 (17)	209 (100)	207 (13)	193 (6)	179 (14)	149 (3)	73 (55)		
9	520 (17)	505 (7)	417 (5)	311 (94)	223 (1)	209 (31)	192 (7)	179 (15)	149 (5)	73 (100)	
10	562 (28)	504 (2)	472 (7)	353 (14)	263 (8)	239 (5)	209 (48)	191 (26)	179 (10)	149 (3)	147 (4) 73 (100)
11	548 (39)	533 (5)	460 (4)	339 (17)	223 (10)	209 (100)	193 (9)	179 (15)	149 (3)	89 (5)	73 (70)

La fraction est caractérisée par :

- Les produits monomères de dégradation : le 4-propylguaiacol (1) provenant de la désulfuration des principaux monomères de thioacidolyse est ainsi le produit final de la liaison non condensée β -O-4 des unités guaiacyl-propane. Le pic 2 correspond à l'alcool dihydroconiférol.

- Les produits dimères de dégradation : la liaison 5-5 biphényle est illustrée par les 3-5 dilignols. Le pic 5 est le 2,2'-dihydro-3,3'-diméthoxy-5,5'-dipropylbiphényle. Les dimères 3 et 4 proviennent des structures 5-5 biphényles qui ont perdu des groupes C_γ durant la thioacidolyse. La liaison 4-O-5-biphényléther est représentée par le dilignol 6. Le pic 7 correspond aux dérivés triméthylsilylés du diguaiacyléthane ; la formation de ce dilignol est étroitement associée avec celle du dilignol 9. La liaison β -5 intervenant dans les structures de type phénylcoumarane est représentée par les dilignols 8, 10 et 11.

III.4. Produits obtenus après pyrolyse

La technique de couplage Pyrolyse/chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (PYR/GC/MS) est une méthode usuellement employée pour la caractérisation des lignines et des polysaccharides. La PYR/GC/MS est basée sur la dépolymérisation des macromolécules par la chaleur. Pour les sous-unités des polymères qui ne sont pas ou sont faiblement volatiles, l'augmentation en température permet leur dégradation par la chaleur et l'identification des

produits formés.⁷² L'ensemble des produits de pyrolyse, séparés par chromatographie en phase gazeuse et identifiés par spectrométrie de masse, amène à une caractérisation de l'échantillon initial, qui dans sa forme première ne conviendrait pas pour une analyse simple en GC/MS, du fait de son haut poids moléculaire. La figure 5 présente le chromatogramme TIC des produits de dégradation par la chaleur, obtenu après pyrolyse de la fraction A à 450°C.

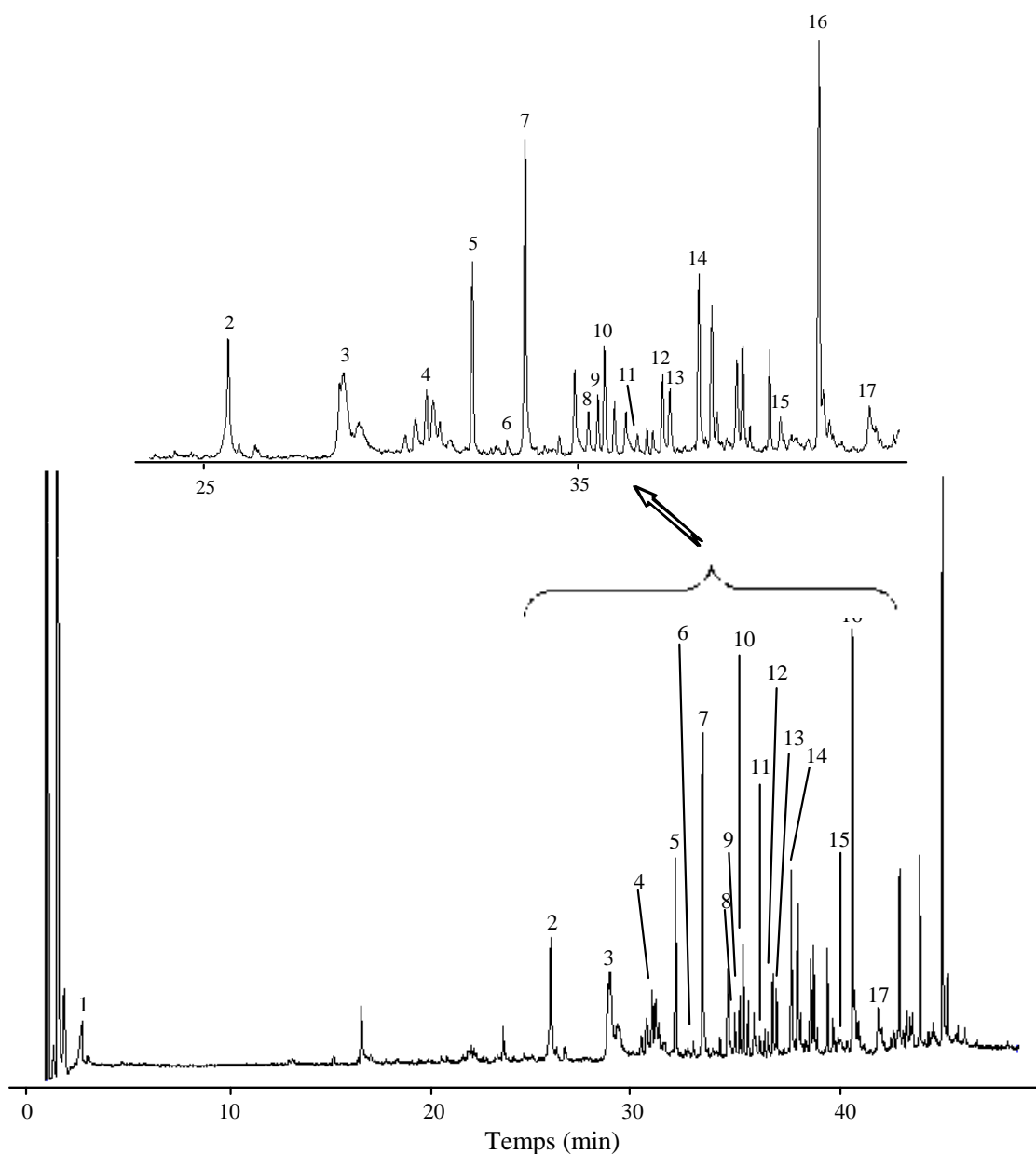


Figure 5 : Chromatogramme TIC des produits de dégradation par la chaleur, obtenu après pyrolyse de la fraction A à 450°C.

⁷² Vitiello, D. Etude analytique des produits de pyrolyse et d'extraction des bois tropicaux. Thèse docteur-ingénieur, Université de Bordeaux I, France, 1982

Un certain nombre de pics a été identifié (Tableau 4).

Tableau 4 : Principaux produits de pyrolyse de la fraction A et leurs fragmentations

Pics	Produits	Principaux ions de fragmentation (70 eV), m/z (intensité relative)									
1	Acide acétique	61 (18)	44 (20)	43 (100)							
2	Guaiacol	124 (100)	109 (79)	95 (4)	81 (55)						
3	p-méthyl guaiacol	138 (100)	123 (72)	110 (45)	95 (43)	81 (17)	67 (53)	44 (69)			
4	p-éthyl guaiacol	152 (49)	137 (100)	122 (17)	109 (7)	81 (9)	91 (14)	79 (11)	69 (10)	44 (80)	
5	4-hydroxy-2-méthylacétophénone	150 (100)	135 (40)	107 (36)	79 (12)	77 (13)					
6	Eugénol	164 (100)	149 (48)	137 (23)	131 (25)	121 (22)	103 (27)	91 (20)	77 (32)	65 (6)	
7	Syringol	154 (100)	139 (20)	125 (2)	111 (16)	93 (15)	81 (2)	79 (3)	39 (14)		
8	Vanilline	152 (100)	137 (6)	122 (23)	109 (32)	92 (5)	81 (40)	76 (10)	53 (22)		
9	Iso-eugénol	164 (100)	149 (33)	137 (7)	131 (20)	121 (22)	103 (32)	91 (27)	77 (26)	65 (9)	
10	Acide vanillique	168 (100)	153 (48)	137 (2)	125 (34)	108 (2)	97 (14)	85 (10)	79 (18)	65 (11)	53 (16)
11	Guaiacylpropane	166 (30)	137 (100)	122 (25)	94 (12)						
12	Acétovanillone	166 (46)	151 (100)	136 (3)	123 (31)	108 (9)	79 (5)	77 (9)	67 (9)	65 (10)	52 (10)
13	Syringaldehyde	182 (52)	167 (100)	151 (11)	139 (6)						
14	Coniféryl alcool	180 (50)	151 (30)	124 (42)	109 (23)	91 (38)	77 (30)	65 (28)	51 (36)		
15	Allyl-4-syringol	194 (30)	153 (100)	125 (20)	110 (20)	93 (18)					
16	Methoxyeugénol	194 (100)	179 (15)	167 (15)	151 (14)	147 (14)	131 (20)	119 (25)	91 (32)		
17	Acétosyringone	196 (12)	181 (63)	153 (9)	123 (6)	109 (5)	107 (5)	93 (8)	91 (12)	85 (10)	83 (34)
		82 (16)	81 (13)	77 (10)	69 (36)						

Essentiellement, une classe de composés est reconnaissable, à savoir les phénols avec de multiples substituants méthoxy et alkyles. On retrouve des molécules aromatiques comme le 2-hydroxy-*p*-hydroxyphényle (unités guaiacyles ou unités G) (pics : 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12), et le 2,6-diméthoxy-*p*-hydroxyphényle (unités syringyles ou unités S) (pics : 7, 15).

Le principal composé identifié dans le pyrogramme est le pic 7 : syringol. Le pic 14, correspondant à l'alcool coniférylique, est largement présent dans le pyrolysate de la fraction A. Tous ces composés sont présents essentiellement dans la fraction A.

III.5. Caractérisation par ^1H RMN

Les méthodes d'études structurales par RMN doivent être employées comme des techniques complémentaires dans l'analyse des lignines. La nature macromoléculaire et réticulée de la lignine ne permet pas d'accéder à la structure complète de ce type de substance. En revanche, la RMN permet de déterminer la présence (RMN qualitative) et la proportion (RMN quantitative) des principales liaisons intermonomériques et la nature du squelette carbonné. De

très nombreux travaux concernent les lignines de peuplier^{73,74,75}, de bouleau, de tremble ou de pin^{76,77}, mais les publications sur le chêne sont très peu nombreuses.

III.5.1. Analyse de fractions lignines peracétylées par RMN ¹H

La RMN ¹H monodimensionnelle donne peu d'informations structurales (Figure 6). Le spectre se présente sous la forme de larges enveloppes couvrant une même catégorie de protons.

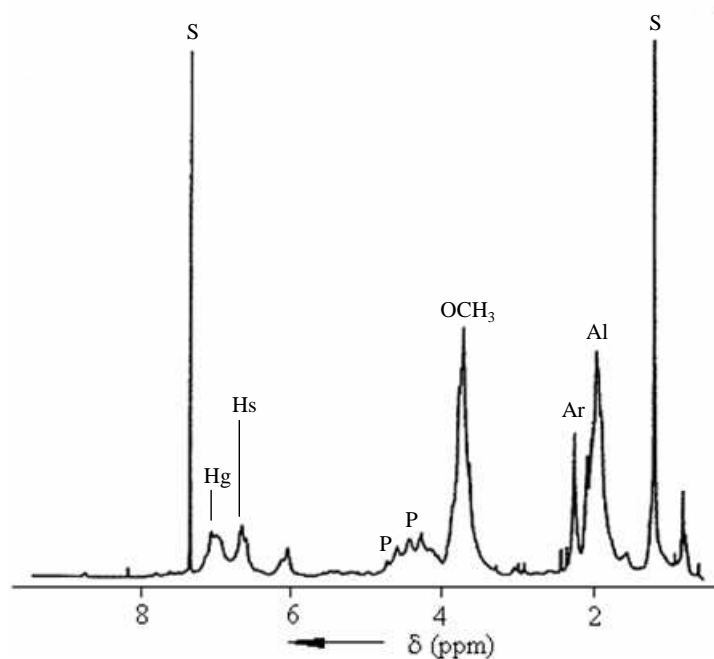


Figure 6 : Spectre RMN du proton (CDCl₃) de la fraction A peracétylée.

S : solvant ; P : contaminant polysaccharidique ; Ar : acétates aromatiques ; Al : acétates aliphatiques ; Hs, Hg : protons aromatiques des motifs syringyles et guaïacyles.

En utilisant les résultats de la littérature^{69,78}, nous avons attribué les signaux du spectre 1D du proton de l'unité syringyle : δ 6,6 ppm et de l'unité guaïacyle : δ 6,9-7,05 ppm. L'analyse de ce spectre confirme que la fraction A contient principalement des unités phénoliques monométhoxylées (guaïacyles) et diméthoxylées (syringyles).

⁷³ Haluk, J.P., Traope, O., Metche, M. *C.R. JIEP*, **1978**, 8, 214-240

⁷⁴ Monties, B., Lapiere, C., Gaudillère, J.P., Guittet, E., Vilhorgne, M., Lallemand, J.Y. *CR JIEP*, **1982**, 11, Toulouse, 388-394

⁷⁵ Lapiere, C., Lallemand, J.Y., Monties, B. *Holzforchung*, **1982**, 40, 113-118

⁷⁶ Gagnaire, D., Robert, D. *C.R. JIEP*, Toulouse, **1982**, 11, 373-380

⁷⁷ Nimz, H. *CR JIEP*, **1978**, 8, Nancy, 185-206

⁷⁸ Ede, R.M., Brunow, G., Somola, L.K., Lemmeytyinen, J. *Holzforchung*, **1990**, 44, 95-101

III.5.2. Analyse des fractions lignines peracétylées par RMN ^{13}C

Depuis les travaux généraux de Nimz et son équipe^{77,79,80}, complétés par ceux de Kringstad et Mörck⁸¹, Lapierre *et al.*⁸², Fernandez *et al.*⁸³, Miyakoshi et Chen⁸⁴, les signaux obtenus en RMN ^{13}C peuvent être attribués en comparaison avec de nombreux modèles moléculaires de synthèse.

Le spectre RMN ^{13}C (Figure 7) est plus informatif. Il peut être divisé en trois zones distinctes : 200-165 ppm pour les carbones des fonctions carbonyles, 165-100 ppm pour les carbones aromatiques et 100-50 ppm pour les carbones des chaînes latérales. La proportion des carbones aromatiques des motifs syringyles et guaiacyles s'équilibre.

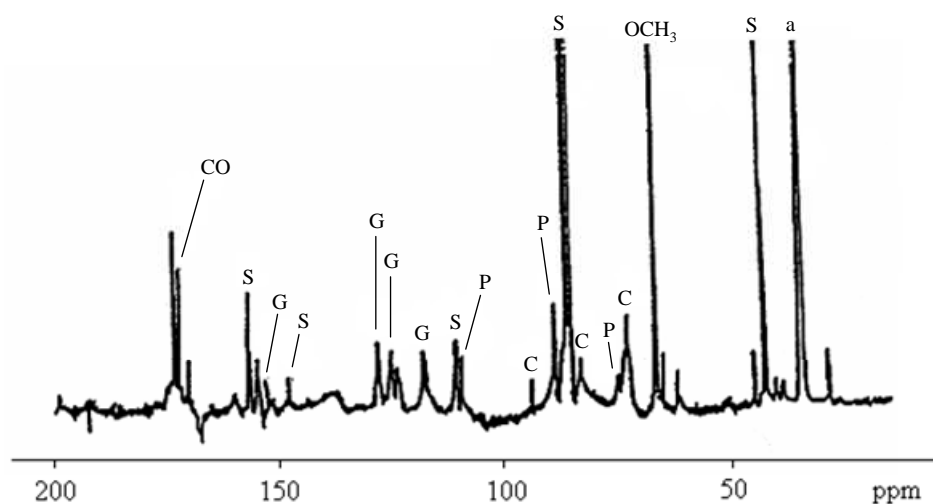


Figure 7 : Spectres RMN ^{13}C (CCl_3) de la fraction lignines sous forme peracétylée

S : solvant ; P : contaminant polysaccharidique, a : acétates ; CO : carbonyles ; C : carbones des chaînes latérales des structures aryl-glycérol et aryl-éther (C_γ , C_α , C_β) ; S : carbones aromatiques des motifs syringyles ; G : carbones aromatiques des motifs guaiacyles

⁷⁹ Nimz, H.H., Robert, D., Faix, O., Nermr, M. *Holzforchung*, **1981**, 35, 16-26

⁸⁰ Nimz, H.H., Tschirner, Stähle, M., Lehmann, R., Schlosser, M. *J. Wood Chem. Technol.*, **1984**, 4, 265-284

⁸¹ Kringstad, K.P., Mörck, R. *Holzforchung*, **1983**, 37, 237-244

⁸² Lapierre, C., Monties, B., Guittet, E.; Lallemand, J.Y. *Holzforchung*, **1984**, 38, 333-342

⁸³ Fernandez, N., Mörck, R., Johnsrud, C.J., Kringstad, K. *Holzforchung*, **1990**, 44, 35-38

⁸⁴ Miyakoshi, T., Chen, C.L. *Holzforchung*, **1991**, 45, Suppl., 41-47

IV. Caractérisation de la fraction polysaccharide

Nos travaux précédents ont montré que le bois renferme majoritairement de la cellulose fortement cristallisée. Pour des conditions douces d'extraction (milieu aqueux, hydroalcoolique, faiblement alcalin, ...) la cellulose n'est pas soluble. Pour l'extraire, il convient de recourir à des conversions sous forme de nitrate, d'acétate, de méthyl ou de carboxyméthylcellulose. En revanche, la fraction hémicellulosique bien que minoritaire, par rapport à la cellulose, est aisément solubilisée et peut alors se retrouver dans les vins et les eaux-de-vie élevés en barriques. D'où l'intérêt porté à ce type de produits.

Les hémicelluloses se composent de chaînes moléculaires plus courtes que la cellulose et possèdent en outre des ramifications portées par la chaîne principale. Les oses constitutifs sont des pentoses (xylose, arabinose, ...), des hexoses (glucose, mannose, galactose, ...), des acides hexauroniques (acide galacturonique, acide glucuronique, ...) et des désoxyoses (rhamnose, fucose, ...).

IV.1. Hydrolyse acide et GC/MS des produits de dégradation

Les fragmentations en masse des dérivés triméthylsilylés comparées avec celles trouvées en librairie, et les temps de rétention comparés avec ceux obtenus pour quelques standards disponibles, confirment que la fraction B est composée exclusivement de sucres. L-arabinose, D-galactose, D-xylose, D-glucose, D-mannose et L-rhamnose sont les principaux oses identifiés (Figure 8).

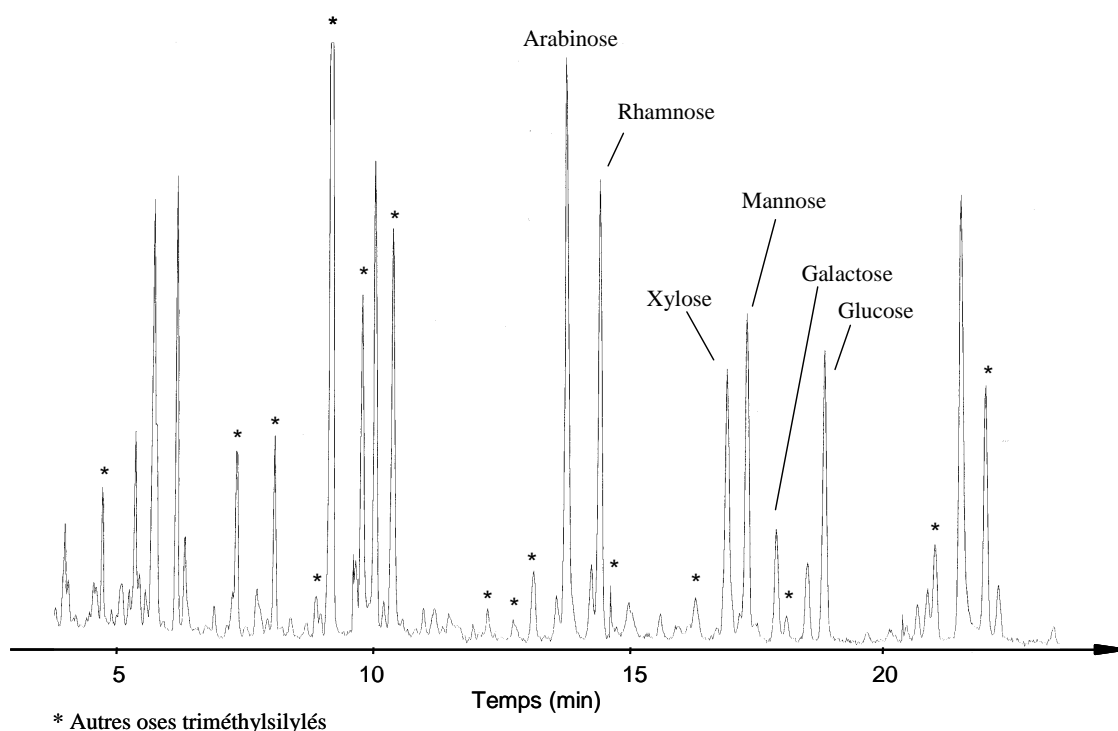


Figure 8. Chromatogramme GC des produits de dégradation triméthylsilylés de la Fraction B après hydrolyse acide

Nous savons que les unités hémicellulosiques sont facilement hydrolysables par les acides en leurs monomères et on retrouve également les acides uroniques suivants : acide D-glucuronique, acide 4-*O*-méthylglucuronique, acide D-galacturonique. D'autres sucres (notés * sur la figure 8) ont été observés avec des fragmentations typiques dont les intensités relatives sont différentes, cependant nous n'avons pas pu identifier ces sucres avec certitude. Ainsi la fraction B représente la fraction polysaccharidique de l'extrait de bois de chêne.

IV.2. Produits obtenus après pyrolyse

Essentiellement deux classes de composés sont reconnaissables. Il s'agit des dérivés furaniques et pyraniques (Tableau 5).

Tableau 5 : Principaux produits de pyrolyse de la Fraction B et leurs fragmentations

Pics	Produits	Principaux ions de fragmentations (70 eV), m/z (intensité relative)							
1	Acide acétique	61 (18)	44 (20)	43 (100)					
2	4-méthyl-2,3-dihydrofurane	84 (100)	83 (50)	69 (15)	55 (30)				
3	3-furaneméthanol	98 (100)	81 (6)	69 (20)	53 (14)	41 (26)			
4	Furfural	96 (36)	95 (85)	67 (8)	39 (100)				
5	2-méthyl furane	82 (29)	81 (17)	53 (14)	43 (100)				
6	2-propyl furane	110 (31)	81 (100)	53 (97)	39 (24)				
7	5-méthyl-2(3H)-furanone	98 (11)	55 (21)	43 (100)					
8	2,4-diméthyl furane	96 (98)	95 (70)	81 (10)	67 (95)	53 (50)	41 (52)	39 (48)	
9	1-(2-furanyl)-éthanone	110 (28)	95 (85)	68 (14)	67 (12)	44 (100)	43 (38)	39 (52)	
10	Cyclohexanone	98 (100)	83 (11)	70 (20)	69 (25)	55 (98)	42 (78)		
11	2-(5H) furanone	84 (52)	55 (100)	39 (38)	27 (50)				
12	Phénol	94 (100)	66 (40)	65 (38)	39 (30)				
13	5-méthyl-2-furfural	110 (79)	109 (91)	81 (17)	66 (11)	65 (11)	55 (35)	53 (100)	
14	3-méthyl-2,5-furandione	112 (2)	68 (40)	53 (11)	40 (40)	39 (100)			
15	5-(hydroxyméthyl)-2-furfural	126 (45)	109 (38)	97 (76)	69 (41)	53 (19)	41 (100)	39 (84)	

Ils sont le résultat de multiples déshydratations et réarrangements dus à la chaleur et peuvent être considérés comme les marqueurs de pyrolyse des polysaccharides. Les principaux composés identifiés sont listés dans le tableau 5.

La pyrolyse des lignines amène à des quantités plus importantes de produits de dégradation, et à des composés qui sont plus facilement identifiables que la pyrolyse de polysaccharides. Ceci est dû à la stabilité de la partie aromatique des lignines à la chaleur lors de la pyrolyse et sous l'impact d'électrons du spectromètre de masse. Par opposition, les polysaccharides subissent de multiples modifications avec la pyrolyse et ainsi de nombreux isomères de position se forment dont les spectres de masse sont parfois difficilement interprétables à cause de la faible intensité ou de l'absence de l'ion moléculaire net.

V. Caractérisation de la fraction ellagitanins

Le cœur du bois de chêne contient une grande quantité de composés phénoliques, et en particulier les ellagitanins. Deux ellagitanins isomères sont prédominants dans le bois de chêne : la vescalagine et la castalagine.^{9,85} Plus récemment, les ellagitanins dimères et les formes

⁸⁵ Vivas, N., Laguerre, M., Glories, Y., Bourgeois, G., Vitry, C. *Phytochemistry*, **1995**, 39, 1193-1199

pentosylées ont été décrits^{50,86,87} roburines A, B, C, D, E et grandinine. Leurs structures sont présentées sur la Figure 9.

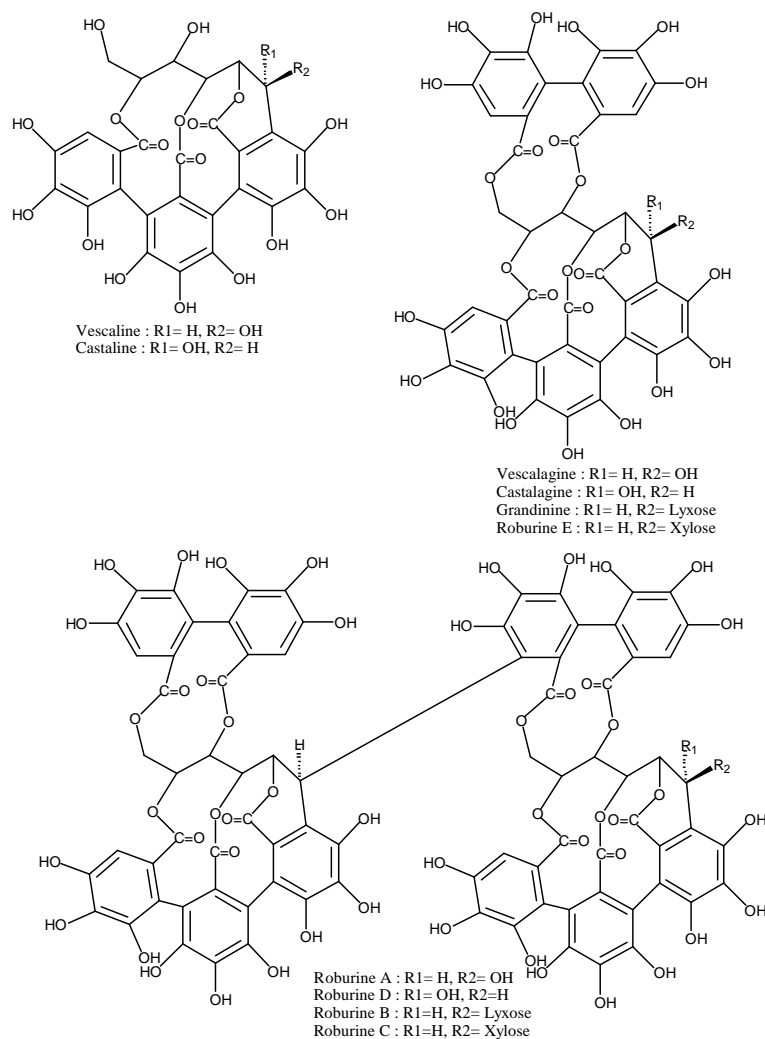


Figure 9 : Structures des ellagitanins identifiés dans les extraits de bois de cœur

⁸⁶ Nonaka GI, Ishimaru K, Azuma R, Ishimatsu M and Nishioka I, *Chem Pharma Bull*, **1989**, 37, 2071-2077

⁸⁷ Hervé du Penhoat, C.L.M., Michon, V.M.F., Ohassan, A., Peng, S., Viriot, C., Scalbert, A., Gage, D. *J Chem Soc Perkin Trans*, **1991**, 1, 1653-1660

V.1. La réaction d'oxydation à l'acide nitreux : la méthode de Bate-Smith (Bate-Smith, 1972)

Dans cette méthode proposée par Bate-Smith⁸⁸, les esters de l'acide hexahydroxydiphénique et du glucose sont oxydés par l'acide nitreux sous azote. La réaction conduit à une coloration bleue. Cette réaction a été appliquée à la fraction C. Après 60 minutes au bain-marie à 30°C, la solution change de couleur et devient bleue (caractéristique de la présence d'ellagitanins) et l'intensité colorante a été mesurée à 600 nm par spectrophotométrie. Cette méthode est utilisée pour caractériser un groupe spécifique de tanins : les ellagitanins C-glucosiques.

V.2. La dégradation acide

La méthode proposée est adaptée de celle mise au point par Peng *et al.*¹⁷ Elle est basée sur l'hydrolyse acide des ellagitanins, au bain-marie, suivi d'un dosage par HPLC de l'acide ellagique libéré. Cette réaction a été appliquée à la fraction C à différentes concentrations. Les résultats sont regroupés dans la figure 10.

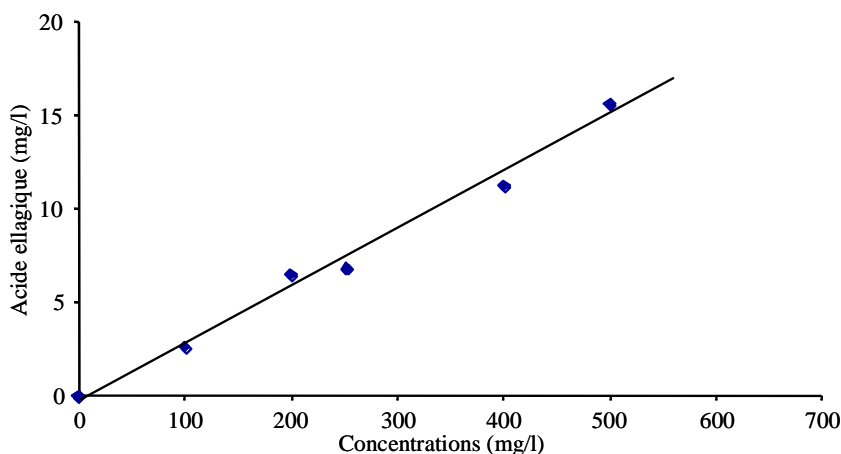


Figure 10 : Dégradation acide de la fraction C

⁸⁸ Bate-Smith, E.C. *Phytochemistry*, **1972**, 11, 1153-1156

L'acide ellagique est formé durant la réaction, démontrant que la fraction C contient des ellagitanins.⁸⁹ Nous avons observé que plus la concentration de la fraction C augmente et plus de l'acide ellagique est libéré.

V.3. Analyse par HPLC/LSIMS

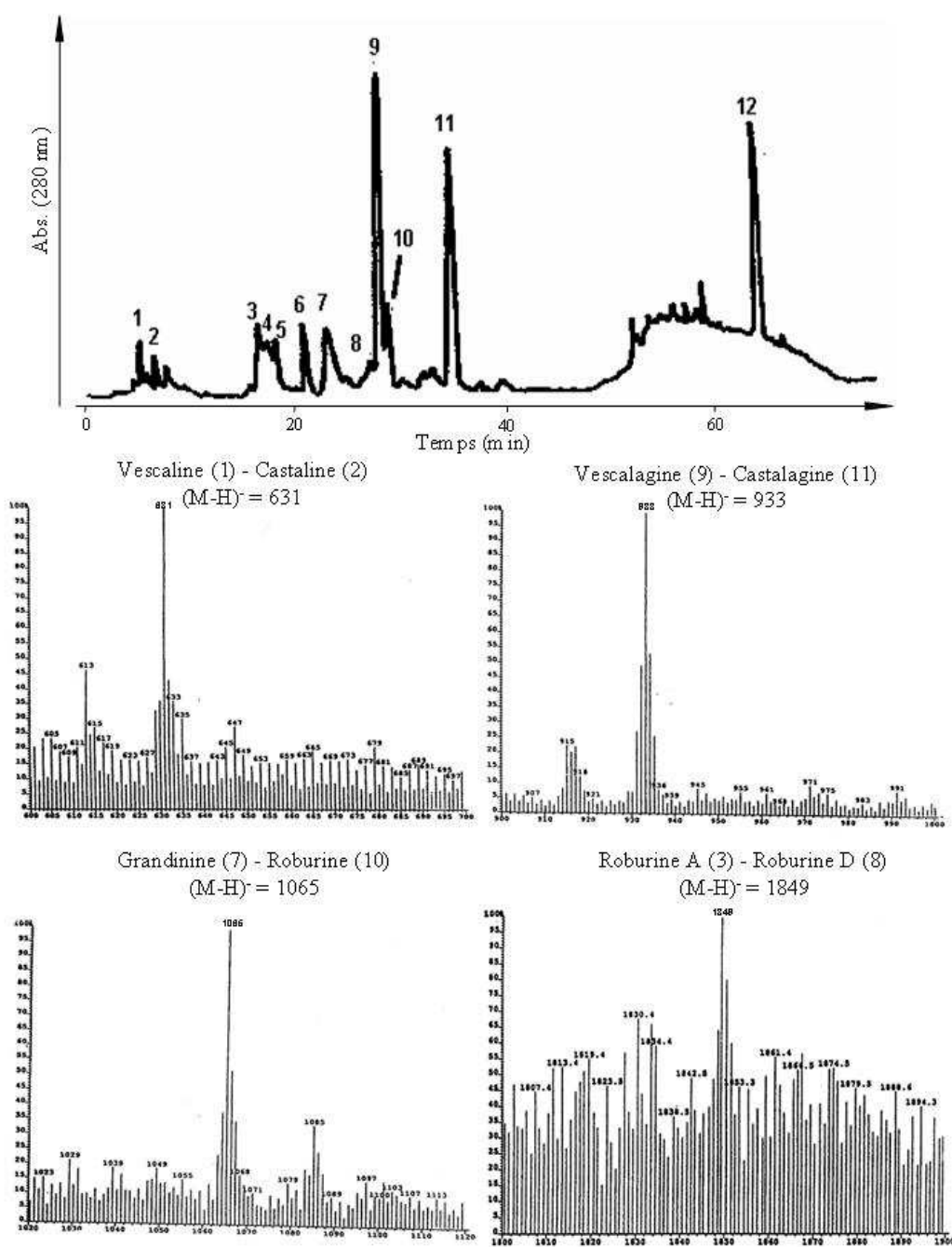
Le couplage HPLC/LSIMS permet de confirmer l'attribution des pics, une étape usuellement utilisée en comparant le spectre UV et le temps de rétention des molécules identifiées avec des produits et échantillons de référence. Le chromatogramme de la fraction C et les spectres de masse LSIMS enregistrés au sommet de certains pics sont regroupés sur la figure 11.

Dans l'échantillon, nous avons trouvé de l'acide ellagique indiquant que la fraction C contient des ellagitanins.⁸⁹ La présence de cet acide est facilement expliquée par l'hydrolyse de nombreux ellagitanins du bois. Nous avons également identifié la vescaline et la castaline par LSIMS, m/z : 631 $[M-H]^-$: elles sont considérées comme les produits d'hydrolyse respectifs de la vescalagine et de la castalagine.^{9,29} La présence de ces molécules dans les extraits de bois de cœur *Q. robur* a déjà été reporté par Mayer *et al.*^{90,91} Quatre monomères sont identifiés : vescalagine/castalagine et grandinine/roburine E, caractérisés, respectivement, pour la première paire par m/z : 933 $[M-H]^-$ et pour la seconde paire par m/z : 1065 $[M-H]^-$ due à l'adjonction d'un pentose. Le couplage HPLC/LSIMS nous permet également d'identifier deux dimères : roburine A/roburine D (m/z : 1849 $[M-H]^-$). La vescalagine et la castalagine apparaissent comme les principaux ellagitanins dans la fraction.

⁸⁹ Scalbert, A., Monties, B., Janin, G. *J. Agric. Food Chem.*, **1989**, 37, 1324-1329

⁹⁰ Mayer, V.W., Gabber, W., Riestler, A., Koger, H. *Ann Chem*, **1967**, 707, 177-192

⁹¹ Mayer, V.W., Seitz, H., Jochims, J.C., Schauerte, K., Schillinj, G. *Ann Chem*, **1971**, 751, 60-73



V.4. Analyse par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

La fraction C est acétylée avec un mélange : pyridine/anhydride acétique ; les composés peracétylés sont séparés par SEC, en utilisant les colonnes TSK Gel G avec uniquement le THF comme solvant. Dans les analyses SEC, la fraction C est éluée en trois pics chromatographiques détectés en UV (Figure 12).

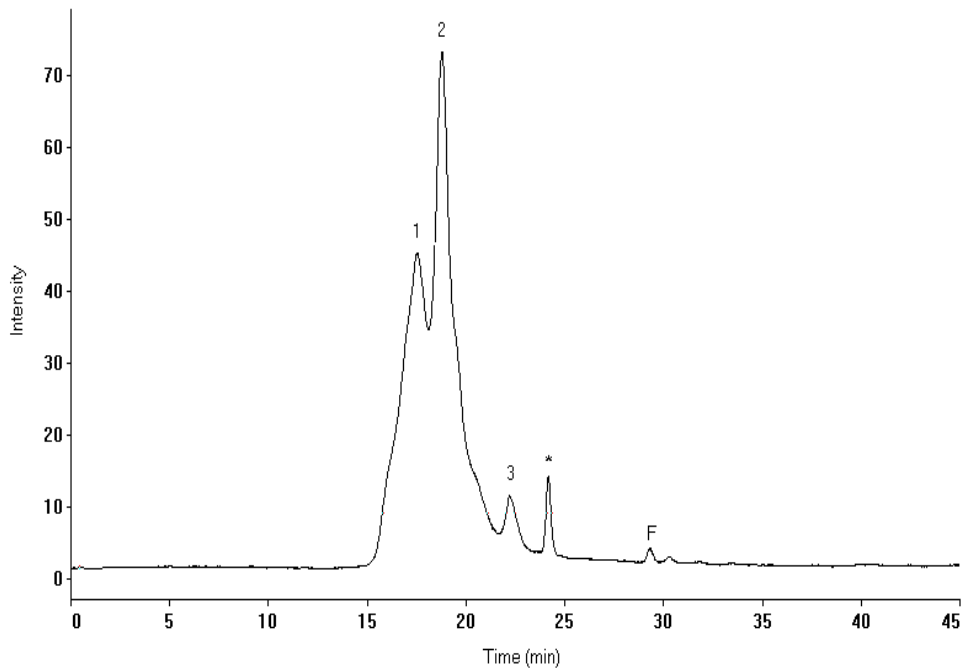


Figure 12 : Chromatogramme SEC de la fraction C peracétylée provenant des extraits de bois de cœur (Colonnes TSK-gel à $\lambda=280$ nm).

1 : Dimères ; 2 : Monomères ; 3 : Acide ellagique ; F : Marqueur ; * : résidus de peracétylation

La courbe de calibration est obtenue avec des standards « polystyrènes ». Ainsi la distribution « M_p » obtenue est exprimée en équivalent polystyrènes. Il est très difficile de trouver des standards pour les ellagitanins, car ils ne sont pas commercialisés ; néanmoins, nous avons utilisé l'acide ellagique comme standard. Les trois pics obtenus correspondent à l'acide ellagique ($t_R = 22.17$ min), aux monomères ($t_R = 18.27$ min) et aux dimères ($t_R = 17.48$ min) selon leurs temps de rétention⁸ et les valeurs de leurs M_p . Presque tous les polymères sont inclus dans ces

trois pics. Le pic correspondant aux monomères est le plus élevé : 59.5% suivi par celui des dimères.^{92,93,94}

V.5. Analyses par MALDI-TOF/MS

Le principe consiste en diluant l'échantillon dans une matrice de petites molécules organiques absorbant fortement à la longueur d'ondes de 370 nm. Le mélange est irradié avec un faisceau laser ; la relaxation de l'énergie absorbée permet très rapidement la volatilisation de l'échantillon. Dans ces conditions, les molécules non cassées sont absorbées et ionisées. Le spectre MALDI-TOF de la fraction C présente huit pics facilement identifiables :

- pic 1 : vescaline/castaline
- pic 3 : monomères : vescalagine/castalagine
- pic 5 : dimères : roburine A/roburine D
- pic 7 : trimères
- pics 2, 4, 6, 8 : les formes pentosylées correspondantes (m/z de la forme native + 132 Da) : grandinine/roburine E (respectivement pour les monomères vescalagine/castalagine) ; roburine B/roburine C (respectivement pour les dimères roburine A/roburine D) et finalement la forme pentosylée des trimères (Figure 13 et Tableau 6).

⁹² Viriot, C., Scalbert, A., Herve du Penhoat, C.L.M., Rolando, C., Moutounet, M. *Journal of Chrom. A*, **1994**, 662, 77-85

⁹³ Fernandez de Simon, B., Cadahia, E., Conde, E., Garcia-Vallejo, M.C. *J Coop Sci Technol.*, **1998**, 4, 91-98

⁹⁴ Fernandez de Simon, B., Cadahia, E., Conde, E., Garcia-Vallejo, M.C. *J Agric Food Chem.*, **1999**, 47, 1687-1694

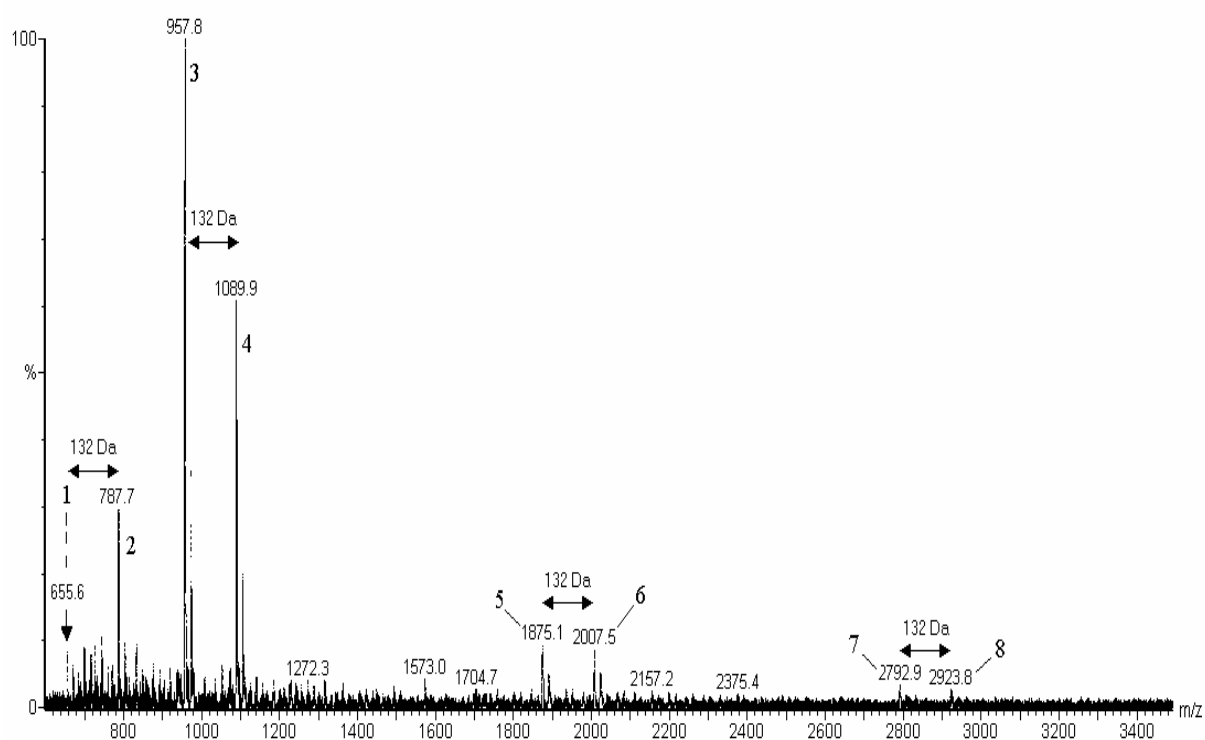


Figure 13 : Spectre de masse MALDI-TOF de la fraction C extraite de bois de cœur de chêne (mode réflectron).

Pics identifiés : 1, vescaline/castaline ; 2, formes pentosylées de la vescaline/castaline ; 3, monomères ; 4, formes pentosylées des monomères ; 5, dimères ; 6, formes pentosylées des dimères ; 7, trimères ; 8, formes pentosylées des trimères – $m/z=132$ Da : groupes xylose ou lyxose

Tableau 6 : Pics identifiés par MALDI-TOF dans la Fraction C (modes réflectron et positif)

Pics	Ellagitanins	$M + Na^+$ (Calculé)	$M + Na^+$ (Observé)
1	Vescaline/Castaline	655.4	655.6
2	Formes pentosylées Vescaline/Castaline	787.7	787.7
3	Monomères	957.6	957.8
4	Formes pentosylées des monomères	1089.7	1089.9
5	Dimères	1874.2	1875.1
6	Formes pentosylées des dimères	2006.4	2007.5
7	Trimères	2790.9	2792.9
8	Formes pentosylées des trimères	2923.0	2923.8

La vescaline et la castaline (pic à m/z 655) sont présentes très minoritairement dans le bois de chêne ; elles correspondent au monomère (pic à m/z 957) ayant subi la perte d'une molécule d'acide ellagique.

Nous avons observé que ce sont les formes monomères qui ont la meilleure réponse en MALDI-TOF.

VI. Conclusion

Cette étude présente une nouvelle méthode de séparation et de purification des macromolécules du bois de chêne à savoir les lignines, les polysaccharides et les tanins (ellagitanins). La complexité structurale de ces molécules a nécessité l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires pour caractériser chaque famille de molécules : IR, GC, GC/MS, LC/MS, RMN ^1H , SEC, MALDI-TOF/MS.

De plus, il est intéressant de noter que la pyrolyse des fractions lignines et polysaccharides apporte des informations concernant la composition du bois de chêne. C'est pourquoi, nous allons dans le prochain chapitre centrer notre étude sur la pyrolyse/GC/MS du bois de chêne.

Partie expérimentale du chapitre I

I. Méthode de fractionnement

Une méthode sélective de précipitation des molécules polymérisées ou combinées à haut poids moléculaire a été développée par Glories⁹⁵ dans le but de fractionner les tanins des vins rouges. En appliquant le même principe, nous avons mis au point une méthode de fractionnement par précipitations sélectives des principaux groupes des macromolécules du bois de cœur de chêne. Le protocole comporte trois étapes successives : précipitation d'une fraction insoluble dans l'eau (Fraction A) ; précipitation d'une fraction insoluble dans l'éthanol/eau (9 :1 ; v :v) (Fraction B) ; isolement d'une fraction soluble à la fois dans l'eau et dans un mélange éthanol/eau (Fraction C). Les méthodes de caractérisation utilisées sont la spectroscopie infra-rouge associées à d'autres techniques plus spécifiques pour chaque groupe.

Pour la préparation des extraits de bois, la sciure (*Q. petraea*) (60 mesh) est extraite avec un mélange acétone/eau (7 :3 ; v :v) à température ambiante pendant 12 heures. L'extrait est filtré, l'acétone et l'eau étant évaporés sous pression réduite.

II. Détermination des lignines

II.1. Thioacidolyse

La méthode appliquée, décrite en détail par Rolando *et al.*⁶⁶ et développée par Lapierre⁶⁷, consiste à la thioacidolyse de la lignine. Le réactif de thioacidolyse se compose de la façon suivante : BF₃ étherate (0,2 M) dans un mélange dioxane:éthanethiol dans les proportions : 8/75/1 (v/v/v). Les produits de dégradation, plus exactement les dérivés thioéthyls, sont analysés par GC/MS après silylation (BSTFA/TMCS). La quantité de réactifs indiquée par les auteurs précédents a été modifiée : 30 mg de la fraction A sont ajoutés à 14 ml du réactif de thioacidolyse. Le résidu final est redissous dans 2 ml de dichlorométhane ; 1 ml de la solution

⁹⁵ Glories, Y. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. Thèse Doct. ès Sciences, Université Bordeaux II, France, **1978**

organique ainsi obtenue est silylé avec 500 µl de *N,O*-bis(triméthylsilyle)trifluoroacétamide (BSTFA+1%TMCS) et 50 µl de pyridine (grade GC) dans un vial de 2 ml fermé par un bouchon téfloné hermétiquement et placé à température ambiante. La réaction de silylation est complète après 4 heures.

Les conditions d'analyses chromatographiques sont les suivantes :

- Colonne DBXLB (J&W scientific USA) : 30 m x 0,25 mm id x 0,25 µm
- Programmation de températures : 80°C (pendant 1 min) jusqu'à 120°C en raison de 50°C/min puis jusqu'à 260°C en raison de 4°C/min et 320°C en raison de 8°C/min
- Température de l'injecteur : 240°C
- 1 µl sont injectés en mode « splitless »

La détection est réalisée avec un spectromètre de masse (type magnétique) : VG-Autospec EQ (Micromass, Manchester, UK), fonctionnant en mode électron avec une énergie d'ionisation de 70 eV et la température de la ligne de transfert est programmée à 240°C.

II.2. Désulfuration

La méthode employée est décrite par Lapierre *et al.*⁷¹ Elle consiste d'une part à la thioacidolyse de la lignine suivi par la désulfuration des produits obtenus après thioacidolyse.

Le réactif de thioacidolyse se compose de la façon suivante : BF₃ étherate (0,2M) dans un mélange dioxane:éthanethiol dans les proportions : 8/75/1 (v/v/v). La quantité de réactifs indiquée par les auteurs précédents a été modifiée : 1 ml de la solution organique de dichlorométhane (obtenue précédemment par thioacidolyse) est ajouté à 3 ml de la solution aqueuse de Nickel de Raney et 15 ml de méthanol. Le résidu final est redissous dans 0.5 ml de dichlorométhane et silylé avec 500 µl de *N,O*-bis(triméthylsilyle)trifluoroacétamide (BSTFA+1%TMCS) et 50 µl de pyridine (grade GC) dans un vial de 2 ml fermé par un bouchon téfloné hermétiquement et placé à température ambiante. La réaction de silylation est complète après 1 heure.

Les conditions d'analyses chromatographiques sont les suivantes :

- Colonne DBXLB (J&W scientific USA) : 30 m x 0,25 mm id x 0,25 μm
- Programmation de températures : 80°C (pendant 1 min) jusqu'à 120°C en raison de 50°C/min puis jusqu'à 260°C en raison de 4°C/min et 320°C en raison de 8°C/min (pendant 10 min).
- Température de l'injecteur : 240°C
- 2 μl sont injectés en mode « splitless »

La détection est réalisée avec un spectromètre de masse (type magnétique) : VG-Autospec EQ (Micromass, Manchester, UK), fonctionnant en mode électron avec une énergie d'ionisation de 70 eV et la température de la ligne de transfert est programmée à 240°C.

II.3. Pyrolyse

L'analyse est réalisée grâce à un pyrojecteur II couplé sur un chromatographe en phase gazeuse Varian (Les Ulis, France) 3400 CX, lui-même équipé par un spectromètre de masse trappe à ions : Varian Saturn 4D. Les fractions sont placées dans le pyrolyseur et les expériences sont répétées trois fois. La température de pyrolyse est de 450°C.

Les conditions d'analyses chromatographiques sont les suivantes :

- Colonne RTX-20 WCOT : 30 m x 0,25 mm id x 1 μm (Restek, Bellefonte, USA)
- Programmation de températures : 50°C (pendant 10 min) jusqu'à 280°C en raison de 6°C/min
- Température de l'injecteur : 240°C
- Quelques μg sont introduits dans le pyrolyseur
- L'analyse est effectuée en mode « splitless »

La détection est réalisée avec un spectromètre de masse (type trappe à ions) fonctionnant en mode électron avec une énergie d'ionisation de 70 eV et la température de la ligne de transfert est programmée à 240°C. Les spectres de masse sont enregistrés grâce à un logiciel.

L'identification est réalisée par l'étude des fragmentations, une banque de données (NIST) et par comparaison avec les résultats obtenus dans la littérature. Quand cela est possible, les identifications sont faites par comparaison des standards purs.

II.4. Analyse par spectroscopie IR

Les spectres IR sont réalisés à partir de pastilles de la fraction A et de KBr, entre 4000 et 700 cm^{-1} . Le spectromètre IR est appareil Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France). L'attribution des bandes IR est effectuée selon les corrélations proposées par Puech⁹⁶, Faix⁶⁵ et Collier *et al.*⁹⁷

II.5. Analyses RMN du proton (¹H)

Les spectres RMN sont obtenus après acétylation des échantillons (voir le protocole ci-dessous).

Ils sont réalisés grâce à un DPX 400-Mhz (Bruker, Wissembourg, France). Le solvant est du chloroforme deutéré. 64 scans sont accumulés avec une fenêtre spectrale de 4789 hz. La résolution est de : 1247 Hz par point.

III. Détermination des polysaccharides

III.1. Hydrolyse acide

Une quantité connue (2 mg) de la fraction B est lyophilisée. Le liophilisat est hydrolysé avec 2 ml d'acide trifluoroacétique (4 M) à 100°C pendant 4 heures dans un tube fermé hermétiquement. L'hydrolysate obtenu est séché par évaporation et silylé avec 20 μl de pyridine anhydre, 70 μl de (BSTFA+1%TMCS) et 10 μl d'acide trifluoroacétique dans un tube fermé hermétiquement pour un bouchon téfloné. Le tube est placé à 60°C pendant 30 minutes pour faciliter la réaction et dissoudre les deux phases (qui peuvent apparaître quand les réactifs sont ajoutés).

Les conditions d'analyses chromatographiques sont les suivantes :

- Colonne CPSIL 5CB (Chrompack, The Netherlands) : 25 m x 0,25 mm id x 0,12 μm
- Programmation de températures : 120°C jusqu'à 320°C en raison de 2°C/min
- Température de l'injecteur : 280°C

⁹⁶ Puech, J.L. Vieillissement des eaux-de-vie en fûts de chêne. Extraction de la lignine et de ses produits de dégradation. Thèse, Université Paul Sabatier, Toulouse, **1978**

⁹⁷ Collier, W.E., Schultz, T.P., Kalasinsk, V.F. *Holzforchung*, **1992**, 46, 523-528

- 2 µl sont injectés en mode « split »

La détection est réalisée avec un spectromètre de masse (type magnétique) : VG-Autospec EQ (Micromass, Manchester, UK), fonctionnant en mode électron avec une énergie d'ionisation de 70 eV et la température de la ligne de transfert est programmée à 220°C.

III.2. Pyrolyse : voir le paragraphe au-dessus.

IV. Détermination des ellagitanins

IV.1. Réaction d'oxydation à l'acide nitreux

1 ml de la solution à doser est mélangé avec 1 ml de méthanol et 160 µl d'acide acétique à 6%, puis l'oxygène est chassé par un courant d'azote pendant 10 min. 160 µl de nitrite de sodium sont ajoutés suivi d'un bref balayage d'azote (1 min). Le tube est fermé hermétiquement et la réaction se développe pendant 60 min dans un bain-marie à 30°C. L'intensité colorante qui se forme est mesurée at 600 nm.

IV.2. Dégradation acide

La méthode proposée est adaptée de celle de Peng *et al.*¹⁷ Elle est basée sur l'hydrolyse acide des ellagitanins au bain-marie, suivie par une analyse quantitative HPLC de l'acide ellagique libre. 2,5 mg de la fraction C (sèche) sont introduits dans un tube à hydrolyse fermé par un bouchon téfloné et solubilisés dans 5 ml du mélange [méthanol/acide chlorhydrique (2 M)]. L'acide ellagique présent, et l'acide ellagique libéré, après deux heures d'hydrolyse acide (bain d'huile à 100°C), est dosé. La différence entre les deux valeurs correspond à l'acide ellagique libéré par les ellagitanins. La détermination quantitative par HPLC a été réalisée à l'aide d'un système Waters (Saint-Quentin, Yvelines, France).

Les conditions d'analyses chromatographiques par HPLC sont les suivantes :

- Colonne phase inverse : Interchrom C18 (250 mm x 4,6 mm x 10 µm)

- Programmation gradient : 0 à 30% de B en 3 min, augmentation du pourcentage de B jusqu'à 50% en 2 min, jusqu'à 70% en 5 min, jusqu'à 80% en 5 min et finalement pour atteindre 100% en 2 min
- Solvant A : H₂O/H₃PO₄ et pH ajusté à 2,4
- Solvant B : MeOH/H₃PO₄ et pH ajusté à 2,4
- Débit constant de 1 ml/min
- Volume d'injection : 20 µl

La détection est réalisée grâce à un détecteur UV dont la longueur d'ondes est fixée à 370 nm.

IV.3. HPLC/LSIMS

1 mg de la fraction C est solubilisé dans un minimum d'un mélange : méthanol/eau (6 :4) pour l'analyse par HPLC couplé, au travers d'un diviseur de flux, à un détecteur UV et un spectromètre de masse « LSIMS » en utilisant le principe décrit par Vivas *et al.*⁸⁵ La méthode de séparation HPLC est décrite dans le prochain paragraphe. Quelques modifications ont été effectuées : dans un premier temps, pour augmenter la détection LSIMS, 2% de glycérol, qui intervient comme une matrice, sont ajoutés dans les solvants d'élution, et dans un deuxième temps, le volume d'injection a été augmenté à 100 µl pour augmenter la qualité des spectres enregistrés. Les spectres sont obtenus avec un appareil VG-Autospec EQ équipé d'un canon à césium, en mode négatif, avec les conditions suivantes :

- Volume d'injection : 20 µl
- Calibration : 200-1500 Da avec l'iodure de césium comme sel
- Matrice : thioglycérol
- Energie de bombardement : 35 KeV ; 2 µA
- Température < 40°C

IV.4. Détermination qualitative par HPLC

La technique de séparation chromatographique est basée sur la méthode développée par Scalbert *et al.*⁹⁸

Les conditions d'analyses chromatographiques par HPLC sont les suivantes :

- Volume d'injection : 20 µl
- Colonne phase inverse : Interchrom C18 (250 mm x 4,6 mm x 10 µm)
- Programmation gradient : 0 à 10% de B en 40 min puis augmentation du pourcentage de B jusqu'à 100% en 25 min
- Solvant A : H₂O/H₃PO₄ (999 :1)
- Solvant B : MeOH/H₃PO₄ (999 :1)
- Débit constant de 1 ml/min
- Volume d'injection : 20 µl

La détection est réalisée grâce à un détecteur UV dont la longueur d'ondes est fixée 280 nm.

IV.5. Analyse par chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

L'étude de la distribution Mp de la fraction C est réalisée en utilisant les dérivés acétyles. L'échantillon (10 mg) du matériel végétal séché et conservé au congélateur, est acétylé avec un mélange de pyridine et d'anhydride acétique (1 :1 ; v :v) pendant trois jours à température ambiante. Le précipité obtenu, en versant le mélange dans de l'eau glacée, est récupéré par centrifugation. Ce précipité est alors lavé avec de l'eau distillée, puis du méthanol et finalement avec du chloroforme. Il est séché puis redissout avec 0,5 ml de THF et filtré avant analyses par SEC.

L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique est réalisée en utilisant un appareil Thermo Quest (Coutaboeuf, France), équipé de trois colonnes (300 x 7,8 mm) : TSK gel G 1000 HXL, TSK gel G 2000 HXL, TSK gel G 2500 HXL, en série, protégées avec une colonne de

⁹⁸ Scalbert, A., Duval, L., Peng, S., Monties, B., Herve du Penhoat, C.L.M. *J Chromatogr.*, **1990**, 502, 107-119

garde constituée du même matériel. Les conditions d'analyse sont : THF comme éluant ; débit : 1 ml/min ; volume d'injection : 20 µl ; et le temps d'analyse : 45 min. La courbe de calibration est obtenue avec des standards de polystyrène, et l'acide ellagique peracétylé. La détection est effectuée grâce à un détecteur UV (Spectra series UV-150) (Termo Quest, Courtaboeuf, France) et un réfractomètre (Spectra series RI-150). L'ensemble est piloté par le logiciel PL Caliber (PL Laboratories, Marseille, France) et est utilisé par l'acquisition des résultats.

IV.6. Analyses par MALDI-TOF/MS

MALDI-TOF/MS

Les spectres MALDI sont réalisés grâce à un Tofspec E (Micromass, Manchester, UK). La source d'irradiation provient d'un faisceau laser avec une longueur d'ondes à 337 nm. La durée de l'impulsion laser est de 3 ns/impulsion. Les analyses sont effectuées en mode réflectron, avec une polarité positive et une tension d'accélération de 20 kV.

Préparation de l'échantillon pour analyses MALDI-TOF

L'échantillon est dissous dans le méthanol (10 mg/ml) puis mélangé avec une solution méthanolique (10 mg/ml) de matrice (acide 2,5-dihydroxybenzoïque ; plus communément appelé DHB). Pour améliorer la formation des ions, du chlorure de sodium est rajouté. L'échantillon, la matrice et le sel sont mélangés : respectivement, 10 : 1 : 1 (v : v : v). 0.5-1 µl de la solution résultante sont placés sur la plaque MALDI. Après évaporation du solvant, la plaque MALDI est introduite dans le spectromètre de masse.

CHAPITRE II

Caractérisation par pyrolyse/GC/MS des lignines et des polysaccharides *in situ* et isolé

I. Introduction

De nombreuses espèces de bois de chêne sont traditionnellement utilisées en tonnellerie dans la fabrication de barriques. Durant le vieillissement des vins et spiritueux en barriques, des composés extractibles sont solubilisés et affectent la composition et la qualité des produits.^{42,29} De façon générale, les barriques sont fabriquées avec du bois de cœur de chêne, les plus fréquents étant : *Q. robur*, *Q. petraea* et *Q. alba* et occasionnellement : *Q. accutissima*, *Q. garryana*).⁵⁴ Les fractions extractibles les plus importantes sont les ellagitanins polymérisés, lignines, lignanes^{99,100} et les polysaccharides.⁴⁸

L'étude des constituants du bois est souvent menée une fois qu'ils ont été extraits et purifiés. Quoiqu'il en soit, une étude *in situ* pourrait aussi apparaître comme une approche intéressante. La méthode habituellement utilisée est basée sur la combinaison de la pyrolyse avec la spectrométrie de masse.^{101,102,103} Cette technique est relativement récente et a été montrée comme d'un grand intérêt pour l'étude des macromolécules qui tendent à subir des modifications structurales durant des étapes d'extraction¹⁰⁴ dues à des dépolymérisations partielles qui sont indispensables à leur isolement.

La PYR-GC/MS est une technique analytique qui est capable d'amener des informations concernant la structure des composants du bois de chêne, admettant que les produits de pyrolyse représentent à un degré plus ou moins fort, les unités structurales formant les macromolécules. La PYR-GC/MS est basée sur la dépolymérisation des macromolécules par la chaleur suivie de l'identification des fragments par spectrométrie de masse. Pour les unités polymérisées qui ne sont pas ou peu volatiles, l'augmentation de la température permet leur dégradation thermique et ensuite l'identification des produits volatils formés.⁷² Néanmoins l'information obtenue par cette technique dépend de la température de pyrolyse choisie. Une faible température peut causer l'évaporation de certains composés adsorbés provenant du réseau de macromolécules qui ne sont pas les premiers constituants des macromolécules.^{105,106} D'autre part, une forte température de

⁹⁹ Puech, J.L. *Am J Enol Vitic*, **1981**, 32, 111-114

¹⁰⁰ Vivas, N., Pianet, I., Bougeois, G., Vitry, C., Servens, C., Glories, Y. *Am J Enol Vitic.*, **1998**, 49, 49-55

¹⁰¹ Meuzelaar, H.L.C., Haverkamp, J., Hileman, F.D., Elsevier (Ed.), *Appl. Sci.*, Amsterdam, **1982**

¹⁰² Gutteridge, C.S., Sweatman, A.J., Norris, J.R. In *Analytical pyrolysis, techniques and applications*, K.J. Voorhees (Ed.), Butterworths, London, **1984**, 324

¹⁰³ De Groot, W.F., Pan, W.P., Rahman, M.D., Richards, G.N. *Am. Chem. Soc., Fuel Chemistry*, **1987**, 32, 30-43

¹⁰⁴ Tollier, M.T., Monties, B., Lapierre, C., Hervé du Penhoat, C.L.M., Rolando, C. *Holzforchung*, **1986**, Suppl. 40, 75-79

¹⁰⁵ Saiz-Jimenez, C., De Leeuw, J.W. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **1987**, 11, 367-376

¹⁰⁶ Saiz-Jimenez, C. *Environ. Sci. Technol.*, **1994**, 28, 1773

pyrolyse produirait une trop importante dégradation de l'échantillon, apportant des fragments moléculaires de faibles poids moléculaires et produisant des réactions secondaires.^{106,107,108}

L'étude du choix de la température de pyrolyse des lignines et des polysaccharides pourrait avoir une importance dans la détermination de la température la plus appropriée pour la pyrolyse des substances du bois de chêne, ou du moins pour étudier les unités élémentaires des macromolécules du bois de chêne. La température de pyrolyse est classiquement choisie sans avoir accompli une étude détaillée des effets de la température de pyrolyse sur les macromolécules du bois de chêne. Notre objectif est de choisir la température de pyrolyse la plus appropriée pour des échantillons sélectionnés dans le but d'obtenir le plus d'informations possibles concernant la structure chimique du bois de chêne et de ses macromolécules. Le travail présenté dans ce chapitre nous permettra d'étudier la composition du bois de chêne et de ses polymères extractibles correspondants (lignines, polysaccharides) afin d'établir le profil aromatique des produits formés durant la chauffe et la chimio-taxonomie des différentes espèces de bois de chêne.¹⁰⁹

II. Pyrolyse GC/MS du bois

Les échantillons de chêne proviennent du bois de cœur d'arbres âgés de 120 ans environ, situés dans des forêts homogènes et convenablement conduites. Quatre espèces différentes de bois de chêne sont étudiées : *Q. petraea* du centre de la France, *Q. acutissima* du nord-est de la Chine, *Q. garryana* de l'Orégon (USA) et *Q. alba* du Missouri (USA). Seulement le premier quart du tronc, destiné à la tonnellerie, est utilisé dans cette étude.

Les quatre espèces de bois de chêne étudiées présentent le même pyrogramme à 450°C, seules les intensités relatives de chaque composé varient selon l'espèce (Tableau 7). Nous présentons (Figure 14), à titre d'exemple, le pyrogramme du bois de chêne *Quercus garryana*.

¹⁰⁷ Saiz-Jimenez, C. *Naturwissenschaften*, **1994**, 81, 451-453

¹⁰⁸ Saiz-Jimenez, C. *Org. Geochem.*, **1995**, 23, 81

¹⁰⁹ Nonier, M.F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Absalon, C., Soulié, Ph., Fouquet, E. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2006**, 75, 181-19

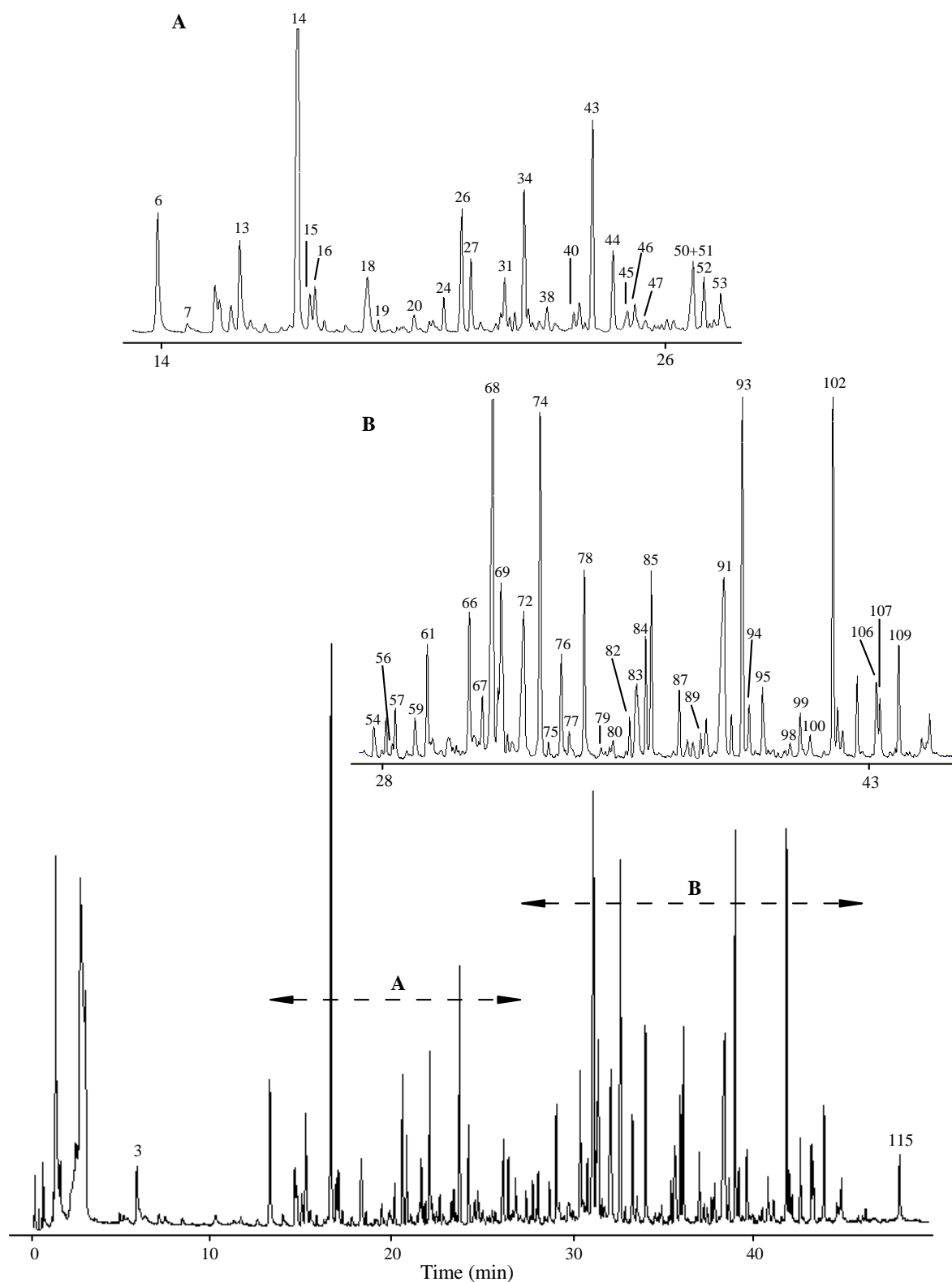


Figure 14 : Pyrogramme de bois de chêne *Quercus garryana* à T=450°C

L'attribution des pics est présentée dans le tableau 7 et leurs aires respectives sont données comme une moyenne pour chaque échantillon analysé.

Tableau 7 : Produits de pyrolyse de différents bois de cœur *Quercus sp.* (450°C) et leurs aires relatives

N°	Composés	Intensité relative (%)			
		<i>Q. petraea</i>	<i>Q. accutissima</i>	<i>Q. alba</i>	<i>Q. garryana</i>
1	Acide acétique, méthyl ester	Tr. ^a	Tr.	Tr.	Tr.
2	Acide acétique, méthyl ester				
3	1,2-propanediol	0.5	1.8	2.1	1.2
4	N.I.	0	0	0.6	0
5	N.I.	0	0	0.25	0
6	1,2-éthanediol, monoacétate	2.4	4.3	2.6	2.4
7	Cyclopentanone	0.2	0.2	0.3	Tr.
8	2,2-diméthyl-5-hexen-3-ol	0	0	1.5	0
9	N.I.	1	3.5	4.2	0.95
10	2-méthyl pentène-1-one	0.2	0.9	0	0.65
11	Diméthyl propylamine	0.2	2.1	0	0.5
12	N.I.	0	0	1.7	0
13	2-butenal, 2-méthyl	1.6	0.2	0	1.6
14	Furfural	8.2	3.6	7.7	8.2
15	Furfuryl alcohol	0.7	0.7	1.8	0.6
16	2-pyran-2-one	0.7	0.5	0.6	0.8
17	N.I.	0.2	0.2	0.4	0.8
18	5-méthyl 2(3H)-furanone	0.7	1.1	1.2	0.8
19	4-propyl 4H-1, 2, 4-triazol-3-amine	0.2	0.2	Tr.	0.15
20	2H-pyran-2-one	0.4	0.5	0.4	0.3
21	cyclopent-2-ène-1,4-dione	0	0	0.1	0.15
22	N.I.	0	0	0.2	0
23	N.I.	1.2	0.9	0	0.2
24	5,6-dihydro-2H-pyran-2-one	0	0	0.2	0.45
25	déhydro-3-méthylène 2,5-furandione	0.2	0.2	0	0
26	Cyclohexanone	1.3	5.2	3.5	2.1
27	2-furamenthanol isomère	1.1	1.4	1.2	1.0
28	N.I.	0	0	0	0.1
29	N.I.	0	0	0.1	0
30	N.I.	0	0	0	0.3
31	N.I.	1.2	1.6	1.0	0.9
32	N.I.	0	0	0	0.2
33	N.I.	0	0	0	0.2
34	5-méthyl furfural	2.9	1.4	2.3	2.2
35	N.I.	0	0	0	0.3
36	N.I.	0	0	0	0.1
37	N.I.	0	0	0	0.15
38	2H-pyran-2-one	1.4	0.2	0.5	0.45
39	4 (1H)-pyridinone	0.2	0.2	0	0.1
40	3-méthyl-5-méthyliden-2(5H)-furanone	0.2	0.2	0.1	0.25
41	N.I.	0.9	2.0	0.5	0.5
42	3-méthyl 2 (5H)-furanone	0.2	0.2	0	0.08

43	1,4-dihydro-1,4-diméthyl-5H-tétrazol-5-one	5	3.5	6.8	3.1
44	Cyclotène	1.4	1.6	1.1	1.3
45	N-N'-diméthylpipérazine	0.5	0.2	0	0.4
46	2,5-diméthyl-3-méthylène p-dioxane	0.2	0.2	0.2	0.6
47	4-éthyl cyclohexanone	0.2	0.2	0.02	0.2
48	N.I.	0	0	0.1	0
49	N.I.	0.2	0.2	0	0.2
50	N.I.	0.2	0.2		
51	Guaiacol	1.2	2.7	2.2	0.15
52	N.I.	0.8	2.0	0.9	0.9
53	1-(2-furanyl) 1-propanone	0.7	0.2	0.3	0.8
54	Maltol	0.2	0.2	0.5	0.5
55	N.I.	0.2	3.1	1.7	0.5
56	4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-méthyl	0.2	0.2	0.4	0.1
57	Furaneméthanol	0.2	0.2	0	0.7
58	N.I.	0.2	0.2	0	0.08
59	δ-décalactone	0.2	0.9	0	0.6
60	N.I.	0	0	0.8	0
61	4H-pyran-4-one, 3,5-dihydro-3,5-dihydroxy-5-méthyl-	0.2	2.0	0	1.5
62	2-méthoxy-4-méthylphénol	1.6	1.9	1.7	
63	N.I.	0.2	0.2	0.1	0.06
64	N.I.	0	0	1.1	0
65	N.I.	0	0	0.3	0
66	N.I.	3.2	1.1	1.3	2
67	N.I.	0.7	0.5	0.4	0.6
68	2-furancarboxaldehyde, 5-(hydroxyméthyl)-	6.6	0.8	4.7	7.5
69	N.I.	2.4	1.0	0	3.3
70	1,2-benzendiol, 3-méthoxy-	0.2	0.2	0.4	0.2
71	N.I.	0.2	1.8	0	0
72	N.I.	0.2	0.2	0	3.3
73	4,4-diméthyl-5-oxo acide pentanoïque	3.8	0.2	0	0
74	1-(2-hydroxy-5-méthylphényl) éthanone	5.2	4.7	3.4	5
75	3-hydroxy-5-méthyl-4H-pyrane-4-one	0.2	0.2	Tr.	0.15
76	N.I.	2.6	0.2	0	1.4
77	Eugenol isomère	0.3	1.1	0.4	0.2
78	Syringol	2.8	4.6	3.2	2.4
79	Pyrogallol	0.2	0.2	0	0.2
80	Isoeugenol	0.2	0.8	0.2	0.3
81	Ethyl sorbate	0.2	0.2	0	0.07
82	N.I.	0	0	0	0.4
83	Vanilline	0.8	0.9	0.7	0.7
84	Eugenol	1.6	2.9	1.4	1.2
85	Acide vanillique	2.5	3.0	3	2.2
86	N.I.	0.2	0.7	0	0.08
87	p-propylguaïacol	0.9	0.5	0.7	0.8
88	(E)-3,5-diméthyl-2-(1'-propenyl) phénol	0.2	0.7	0.7	0.3
89	Acétovanillone	0.4	0.5	0.3	0.3
90	Syringaldéhyde	0.2	0.5	0.5	0.6
91	Lévoglucosane	1.6	0.5	3.1	5.3
92	Vanillyl méthylcétone	0.2	0.2	0.4	0.5
93	Acétovératrone	6.5	6.5	5.7	4.6
94	N.I.	0	0	0	0.6
95	Phénol-2,6-diméthoxy-4-(propenyl) isomère	1.0	1.6	1.5	1.0

96	Méthyl myristate	0.2	0.2	0	0
97	Antiarol	0.2	0.2	0	0
98	Phénol-2,6-diméthoxy-4-(propenyl) isomère	0.2	0.2	Tr.	0.2
99	Phénol-2,6-diméthoxy-4-(propenyl) isomère	0.7	0.5	0.6	0.4
100	Ethyl vanillyléther	0.2	0.2	0.3	0.35
101	Myristate isopropyl	0.2	0.2	0	0
102	Phénol-2,6-diméthoxy-4-(propenyl)	5.1	4.9	0.35	4.4
103	Méthyl 10-hydroxydec-trans-8-ène-4,6-diynoate	0.8	0.8	0.5	0.7
104	N.I.	0	0	0.3	0
105	N.I.	0.2	0.2	1.3	1.0
106	Acétosyringone	1.2	1.4	1.2	1.1
107	Acide 3-méthoxycinnamique	0.2	0.2	0.7	0.9
108	Méthyl palmitate	0.2	0.2	0	0.1
109	Butyryl-3-méthylphloroglucinol	1.4	0.9	0.9	1.4
110	Trans-3-ethoxy-5-isopropyl-2-propylcyclohexène	0.7	0.2	0.6	0.6
111	N.I.	0.2	0.2	0	0
112	Sesquiterpène	0	0	0	Tr.
113	N.I.	0.9	0.5	0.2	0
114	Methyl stearate	0.2	0.2	0	0
115	2-allyl-3-ethoxy-4-méthoxyphénol	0.2	0.2	0.1	1.0
116	Acide hexadecanoïque butylester	0.2	0.2	0	0
117	Dioctyl phtalate	0.2	0.2	0	0

^aTr. : traces

^bN.I. : not identified

Les produits de dégradation sont classés comme des substances issues des sucres (C) et des phénols (P). Tous les résultats présentés sont basés sur les aires normalisées des pics identifiés dans les pyrogrammes. Trois classes de composés sont reconnaissables :

- Dérivés furaniques (C) ; pics : 14, 15, 18, 25, 27, 34, 40, 42, 53, 57, 68
- Dérivés pyraniques (C) ; pics : 16, 20, 24, 38, 39, 61, 75, 79
- Dérivés phénoliques (P) avec des substituants variés : méthoxys et alkyles. Ce dernier groupe peut être divisé en différentes molécules avec des parties aromatiques :
 - * *p*-hydroxyphényle (H)
 - * 2-méthoxy -*p*-hydroxyphényle (unités guaiacyles ou G) ; pics : 51, 62, 77, 80, 83, 84, 87, 89
 - * 2,6-diméthoxy-*p*-hydroxyphényle (unités syringyles ou S) ; pics : 78, 95, 98, 99, 102.

Tandis que les unités phénoliques : H, G et S sont des constituants monomériques des macromolécules de lignines, les dérivés furaniques et pyraniques sont les produits de multiples déshydratations et réarrangements des sucres sous l'influence de la chaleur et peuvent être considérés comme les marqueurs de pyrolyse des polysaccharides (par exemple pic 14).^{110,111}

La pyrolyse des lignines donne naissance à plus de produits plus facilement identifiables que ceux obtenus par pyrolyse des polysaccharides. Ceci est dû à la stabilité de la partie aromatique des lignines, sous l'influence de l'énergie thermique apportée par le pyrolyseur et sous l'effet de l'impact électronique du spectromètre de masse.

A l'inverse, les polysaccharides subissent de multiples déshydratations sous l'effet de la pyrolyse, qui produisent des isomères variés dont le spectre de masse est difficile à interpréter du fait du faible poids moléculaire, de l'absence d'ions, ou de la similitude avec de nombreux autres composés.^{110,111}

III. Pyrolyse GC/MS des lignines

Nous avons extrait, selon la méthode présentée dans le chapitre I, la fraction lignine pour chaque espèce de bois étudié précédemment à savoir : *Q. petraea*, *Q. accutissima*, *Q. garryana* et *Q. alba*.

La fraction lignine des quatre espèces de bois de chêne présente le même pyrogramme. Nous présentons (Figure 5), à titre d'exemple, le chromatogramme d'ion total des produits de dégradation thermique obtenu après pyrolyse (à 450°C) des lignines extraites du bois de chêne *Quercus garryana*.

De nombreux pics sont identifiés et sont regroupés dans le tableau 4.

Seulement une classe de composés est identifiable : les phénoliques avec de nombreux substituents méthoxys et alkyles. Ce groupe peut être divisé en deux sous-unités aromatiques : G (pics : 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12) et S (pics : 7, 15). En plus, nous avons trouvé diverses unités H : phénols (leur proportion relative est inférieure à 1% du courant d'ion total (TIC)). Le principal composé identifié dans le pyrogramme est le pic 7 : syringol. Le pic 14, correspondant à l'alcool coniférylique, est très largement présent dans le pyrolysate.

¹¹⁰ Ralph, J., Hatfield, R.D. *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39, 1426-1437

¹¹¹ Galletti, G.C., Bocchini, P. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **1995**, 9, 815-826

Différents essais ont été conduits de 300 à 600°C pour étudier la cinétique de thermogénèse des composés et pour déterminer la température optimale pour la caractérisation structurale des lignines. Les résultats sont regroupés sur la figure 16 pour les composés majeurs représentant plus de 1% du TIC.

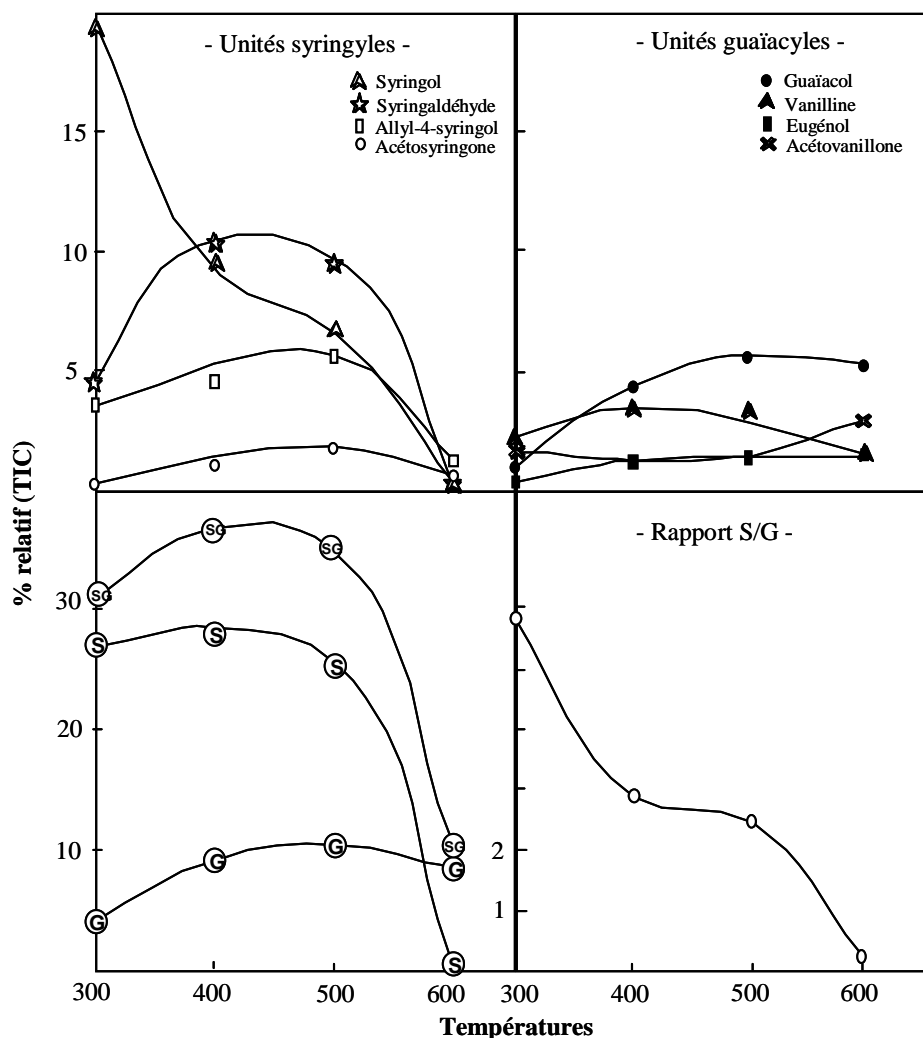


Figure 16 : Evolution des unités S, G et du rapport S/G selon la température de pyrolyse

Les molécules identifiées peuvent être classées en trois familles chimiques :

- Les phénols volatils : syringol, allyl-4-syringol, pour les unités S ; et guaiacol, eugénol pour les unités G
- Les aldéhydes phénoliques : syringaldéhyde pour les unités S et vanilline pour les unités G
- Les cétones aromatiques : acétosyringone pour les unités S et acétovanillone pour les unités G

Les lignines des bois des angiospermes sont des hétéropolymères tridimensionnels formés par copolymérisation de deux alcools phénylpropénoïques (alcool coniférylique (G), alcool sinapylique (S)). Il est bien connu que la dépolymérisation des lignines produit des aldéhydes phénoliques. Durant la première étape de la pyrolyse, l'alcool est dépolymérisé et thermo-oxydé en leurs aldéhydes correspondants. Théoriquement, la dépolymérisation des lignines devrait conduire à la formation de coniféraldéhyde et sinapaldéhyde. En fait, nous avons trouvé seulement l'aldéhyde sous une forme phénylée, la vanilline et le syringaldéhyde pour respectivement les unités G ou S (Figure 17).

Parmi les phénols volatils, les unités S comme le syringol et l'allyl-4-syringol sont produits plus tôt que les unités G comme le guaiacol et l'eugénol. Généralement, excepté à de hautes températures (600°C), les pyrographes présentent une majorité d'unités S plutôt que d'unités G. Au-dessus de 500°C, les unités S des lignines sont plus sensibles à la réaction de pyrolyse comparées aux unités G qui requièrent de fortes températures pour une dépolymérisation thermique. L'évolution du ratio S/G confirme cette observation. En accord avec d'anciens travaux¹¹², le thermotraitement amène à une importante dépolymérisation de la lignine S, mais simultanément des réactions de repolymérisation induisent une augmentation du degré de polymérisation, suivi par une chute de la thermosensibilité des nombreux produits finis. A de fortes températures (supérieures à 500°C), peu de composés sont attribués à la thermodégradation de la lignine S.

D'un autre côté, la lignine G a besoin de fortes températures pour libérer les produits volatils, due probablement à un fort état de polymérisation. Durant la première étape de thermolyse, les lignines localisées dans les parois secondaires riches en unités « S » sont dégradées à de fortes températures, la dégradation thermique concerne plus particulièrement les parois primaires contenant les lignines riches en unités G.¹⁸

IV. Pyrolyse-GC/MS des polysaccharides

Nous avons extrait, selon la méthode présentée dans le chapitre I, la fraction polysaccharidique pour chaque espèce de bois étudié précédemment à savoir : *Q. petraea*, *Q. accutissima*, *Q. garryana* et *Q. alba*.

La fraction polysaccharidique des quatre espèces de bois de chêne présente le même pyrogramme. Nous présentons (Figure 18), à titre d'exemple, le chromatogramme d'ion total des produits de dégradation thermique obtenu après pyrolyse (à 450°C) des polysaccharides extraits du bois de chêne *Quercus garryana*.

¹¹² Lapiere, C., Monties, B., Vassal-Gonthier, A., Dworkin, A. *J. Appl. Polym. Sci.*, **1986**, 32, 4561-4572

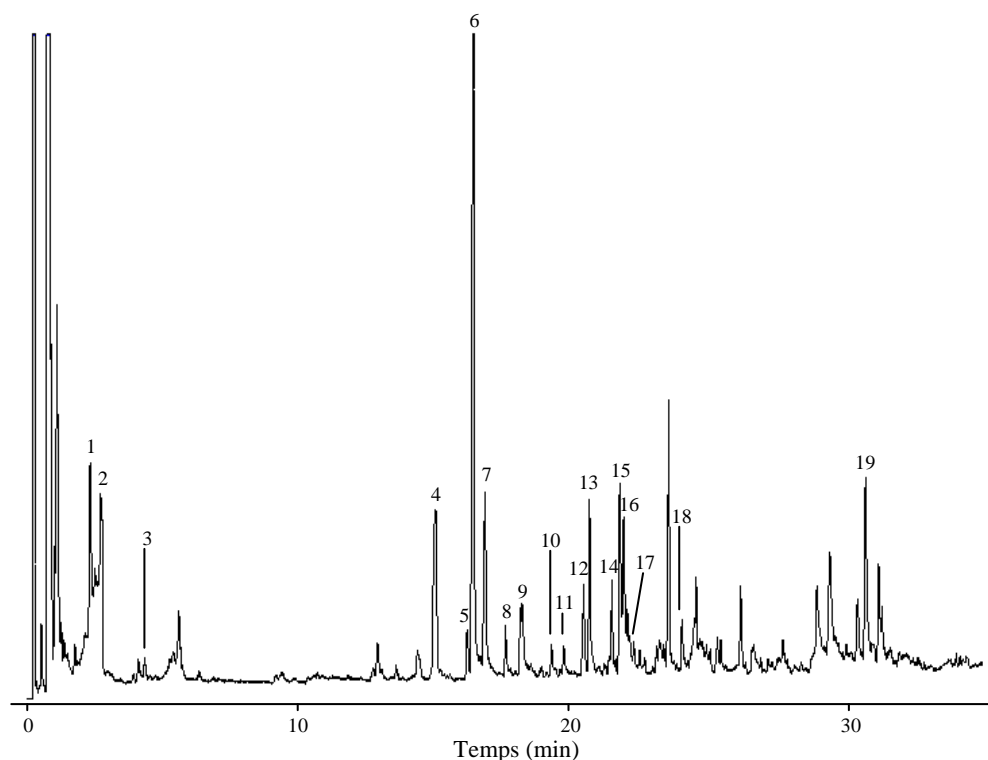


Figure 18 : Pyrogramme de polysaccharides à T=450°C

Deux classes de composés sont identifiables : les dérivés furaniques et pyraniques. Les principaux composés identifiés sont listés dans le tableau 9.

Des molécules variées, dérivant des sucres sont identifiées. Elles sont composés des fragments suivants : 2,3- et 2,5-furaldéhydes, 4-hydroxy-5,6-dihydro-(2H)-pyran-2-one, 5-hydroxyméthyl-2-fufuraldéhyde. Les 2,3- et 2,5- furaldéhydes proviennent de la pyrolyse des unités pentose de l'hémicellulose, tandis que le 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde provient des unités glucose de la cellulose. Le ratio entre les hauteurs des pics (96, 126) est, en moyenne, égal à 1.9 ± 0.2 . Bien que la cellulose soit plus abondante dans le bois, l'hémicellulose est plus facilement dégradée thermiquement. La structure cristalline d'une partie de la cellulose explique sa résistance¹¹³. Durant la réaction de pyrolyse, les dérivés furaniques libérés par la dégradation thermique de l'arabinose et du xylose sont prédominants. Différents essais ont été menés à différentes températures, de 300 à 600°C. Généralement, les pyrogrammes ont révélé une majorité de composés furaniques. L'abondance de produits thermiques formés est maximale à 450°C ; tandis qu'à 600°C, la quantité de composés furaniques diminuent.

¹¹³ Barnoud, F. In "Les polymères végétaux: Polymères pariétaux et alimentaires non azotés", B. Monties, Bordas, Paris, 1980, 66

V. Applications

V.1. Profil aromatique des produits formés durant la chauffe

La figure 14 présente le chromatographe de la dégradation thermique du bois de chêne à 450°C. Plusieurs familles de composés aromatiques sont identifiées : aldéhydes phénoliques, phényl cétones, phénols volatils, aldéhydes furaniques. Nous savons que les lignines imprègnent la matrice polysaccharidique des parois cellulaires du bois. Les composés phénoliques volatils, les aldéhydes phénoliques et les phényl cétones, sont tous des produits de dégradation thermique des lignines. Parmi eux, certaines molécules ont une odeur douce conférant des notes odorantes fumées, épicées et phénoliques au bois qui peut lui-même influencer les caractéristiques aromatiques des vins et des eaux-de-vie vieillissant en barriques, en donnant plus spécialement des odeurs fumées, épicées, de vanille. La thermolyse de la lignine produit une grande quantité de composés phénoliques volatils (Figure 15). Les molécules fortement aromatiques sont présentes sous la forme de dérivés monométhoxylés (séries G) et diméthoxylés (séries S). Parmi ces molécules, le syringol est particulièrement intéressant car il possède une odeur intense de fumée (Tableau 10).

A haute température (au-dessus de 600°C), la réactivité thermique des lignines est plus faible et la synthèse des P (dérivés phénoliques) diminue. A faible concentration, ces substances sont favorablement perceptibles dans les vins. Le chauffage apporte une réelle apparition de deux molécules aldéhydiques dont notamment le syringaldéhyde qui reste le plus abondant mais sans impact aromatique. Les quantités maximales de ces composés apparaissent pour des températures de pyrolyse autour de 500°C ; la vanilline contribue intensément à l'odeur de vanille dans le bois de chêne. La quantité de phényl cétones libérées n'est pas négligeable. Bien que le rôle organoleptique des phényl cétones soit relativement limité (Tableau 10), la vanillone a des notes de vanille et d'héliotropes qui pourraient augmenter l'odeur de vanille. Dans les eaux-de-vie, une transformation de la vanillone en vanilline a été démontrée, mais cette réaction n'existe probablement pas dans les vins du à la faible teneur en alcool.

Les polysaccharides sont les principaux composants du bois. Approximativement 38-42% de la matière sèche du bois de chêne est représenté par la cellulose, principalement trouvé dans les parois secondaires. L'intensité de chauffage du bois de chêne a une influence directe sur certains composés extractibles. La cellulose du bois chauffé produit une grande quantité

d'aldéhydes furaniques. Les hexoses, comme le glucose dans la cellulose, conduisent à la formation d'hydroxy-méthyl-5-furfuraldéhyde et méthyl-5-furfuraldéhyde. Leur rôle, en terme d'aromaticité, est négligeable (Tableau 10). Néanmoins, certains produits de dégradation de ces substances peuvent jouer un rôle organoleptique via des réactions de Maillard. Les hémicelluloses constituent un groupe de polysaccharides hétérogènes qui est bio synthétisé en différentes étapes à partir de la cellulose. Comme la cellulose, la majorité des hémicelluloses participe à la structure des parois cellulaires. Le pourcentage d'hémicellulose est en général compris entre 22 et 28% (en relation avec la matière sèche du bois). Quand le bois de chêne est chauffé, les pentoses, les principaux constituants des hémicelluloses, produisent du furaldéhyde qui a un arôme d'amande.

Nous avons aussi trouvé des produits avec des structures de type « pyranes » et « furanes » résultant des réactions de Maillard. Ces produits formés sont des composés aromatiques dont la description olfactive est grillée. Ils proviennent de la dégradation thermique des sucres en présence de substances azotées. Initialement, les sucres, et certains composés aminés forment un composé N-glucoside conduisent à un dérivé d'Amadori instable après plusieurs réarrangements. Ce dérivé forme des composés aromatiques avec une structure énonone quand il est chauffé. Parmi eux, le cyclotène et le maltol qui sont les plus importants au regard de leur seuil aromatique (Tableau 10).

Tableau 10 : Caractéristiques aromatiques des produits de pyrolyse et leur origine

Précurseurs d'arômes	Thermoformations	Molécules	Arômes	Index d'aromaticité (AI)*
LIGNINES	Dépolymérisation/ Oxydation	Vanilline	Vanille	1.10^{-2}
		Syringaldéhyde	–	–
		Syringol	Fumé	$1,5.10^{-3}$
		Allyl-4-syringol	Fumé	$3,3.10^{-4}$
		Guaiacol	Fumé	4.10^{-2}
		Méthyl-4-guaiacol	Fumé, épicé	$4,6.10^{-2}$
		Eugénol	Epicé	6.10^{-3}
		Acétosyringone	–	–
		Acétovanillone	Vanille	$1,2.10^{-4}$
POLYSACCHARIDES	Dégradation	Furaldéhyde	Amande	$1,5.10^{-4}$
		Hydroxyméthylfuraldéhyde	–	–
		5-méthyl furaldéhyde	Amande grillée	$6,7.10^{-5}$
OSSES/AZOTE	Réactions de Mallard	Maltol	Grillé	$4,3.10^{-4}$
		Cyclotène	Grillé	$7,5.10^{-4}$

* AI = $1/PT_{100}$; PT = Seuil de perception; PT_{100} = PT relatif au PT de la vanilline (PT vanilline = 100)

V.2. Chimiotaxinomie de différentes espèces de bois de chêne

Dans le domaine de la chimiotaxinomie, l'identification des espèces de plantes par pyrolyse-GC/MS représente une méthode rapide et utile. Le principal problème consiste à identifier une série discriminatoire de molécules pour les utiliser comme marqueurs. Par la suite, l'analyse en ligne et employant un logiciel d'exploitation, permet d'enregistrer et de traiter les informations données par la pyrolyse. Cette technique nous permet de différencier quelques espèces de chênes *Quercus* : *Q. petraea* provenant du centre de la France, *Q. alba* provenant du Missouri (USA), *Q. garryana* provenant de l'Orégon (USA) et *Q. acutissima* provenant du nord-est de la Chine. Toutes ces espèces sont des *Lepidobalanus* (chêne blanc). Cette tentative de différenciation est basée sur les produits de pyrolyse et non sur les composés natifs.

Nous avons regroupé dans le tableau 11 les valeurs des intensités relatives (en %) des phénols volatils, des composés furaniques et dérivés, du méthoxyeugénol et isomères, de l'hydroxyméthylfurfuraldéhyde, de la δ -déalactone, et du guaiacol pour les quatre familles de chêne étudiées (*Q. acutissima*, *Q. garryana*, *Q. petraea* et *Q. alba*). Six échantillons ont été analysés par famille de chêne (voir le tableau annexe). La figure 19 présente les résultats statistiques correspondants.

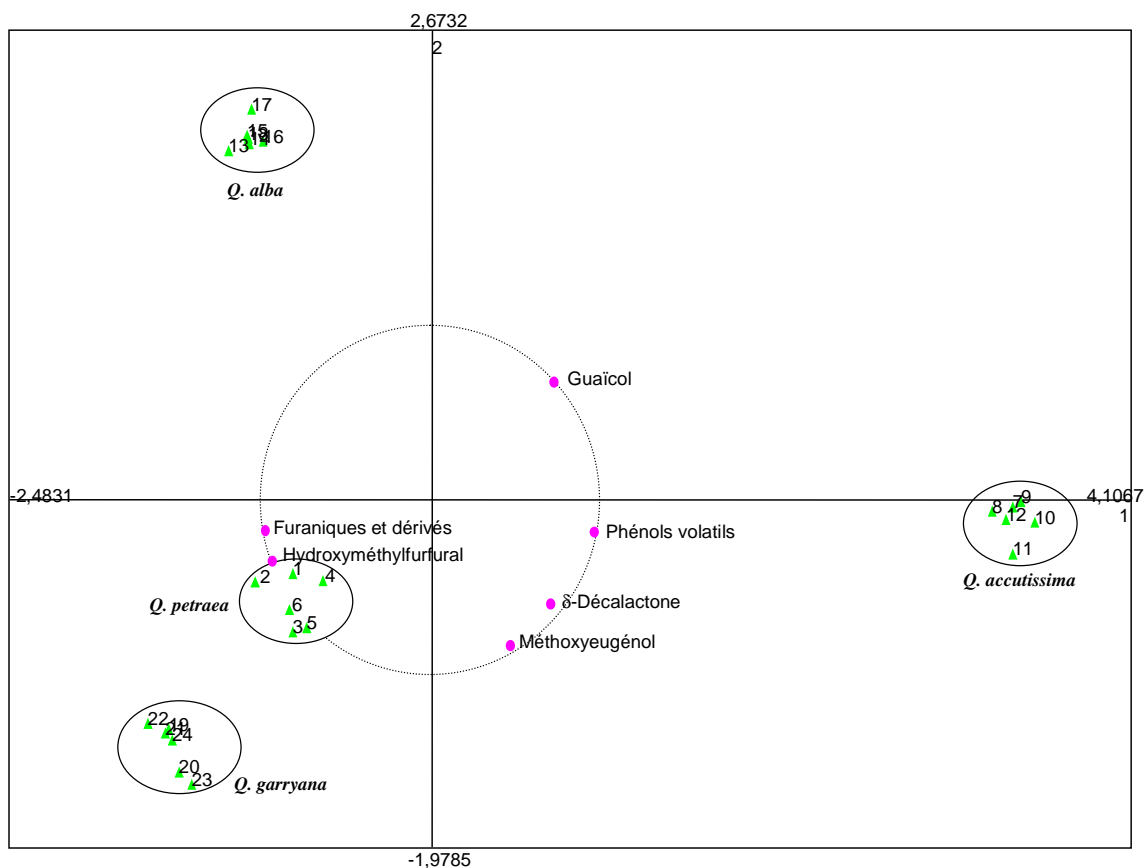


Figure 19 : Analyse multi-facteurs des échantillons de bois de chêne (n=6, nombre d'échantillons analysés pour chaque groupe d'espèces de chêne)

Quatre différents groupes se distinguent de façon bien distincte, correspondant aux quatre espèces étudiées. Les deux axes représentent 94% de l'information donc cela est suffisant pour présenter seulement cette corrélation. Premièrement, nous avons noté que *Q. garryana* est caractérisé par la présence de l'hydroxyméthylfurfuraldéhyde (HMF) et du méthoxyeugénol; tandis que le *Q. accutissima* est caractérisé par la présence des phénols volatils et de la δ-décalactone.

Tableau 11 : Différentiation de plusieurs espèces de *Quercus*

Composés	Intensité relative (%)			
	<i>Q. petraea</i>	<i>Q. accutissima</i>	<i>Q. alba</i>	<i>Q. garryana</i>
Phénols volatils	14,2	20	10,55	11,05
Furaniques et dérivés	21,7	10	19,3	22,1
Méthoxyeugénol et isomères	7	7,2	2,4	6
Hydroxyméthylfurfural	6,6	0,8	4,7	7,5
δ-décalactone	0,2	0,9	0	0,6
Guaiacol	1,2	2,7	2,2	0,15
$L^a/(P_0)^b$	1	>2	<1	<1

^a L : somme totale des produits de pyrolyse des lignines

^b P₀ : somme totale des produits de pyrolyse des polysaccharides

Composés	Intensité relative (%)																							
	<i>Q. petraea</i>						<i>Q. accutissima</i>						<i>Q. alba</i>						<i>Q. garryana</i>					
Phénols volatils	13,8	13,6	14	14,6	14,5	14,2	19,8	19,6	21	20,5	20,8	20	10,4	10,65	10,5	10,7	10,4	10,55	11,1	11,2	11	9,95	11,1	11,05
Furaniques et dérivés	21	22,3	21,4	21,6	21,8	21,7	9,7	9,5	9,6	10,3	10,4	10	19,7	19,4	19,2	19,3	19,35	19,3	22,1	22,15	22,2	22,4	22	22,1
Méthoxyeugénol et isomères	6,8	6,6	7,3	7,1	7,5	7	7,2	7,5	7	7,3	7,5	7,2	2,4	2,5	2,3	2,6	2,2	2,4	5,8	6,2	6,1	6,15	6,3	6
Hydroxyméthylfurfural	6,2	6,9	6,5	6,1	6,9	6,6	0,8	0,9	0,8	0,8	0,9	0,8	4,8	4,85	4,6	4,65	4,75	4,7	7,5	7,65	7,4	7,3	7,7	7,5
δ-décalactone	0,15	0,2	0,2	0,16	0,2	0,2	0,9	0,8	0,85	0,95	0,9	0,9	0	0	0	0	0	0	0,6	0,65	0,55	0,55	0,7	0,6
Guaiacol	1,2	1,3	1,1	1,4	1,4	1,2	2,8	2,7	2,7	2,9	2,6	2,7	2,1	2,25	2,15	2,3	2,4	2,2	0,15	0,1	0,15	0,2	0,15	0,15
$L^a/(P_0)^b$	0,99	1	0,98	0,99	1	1	>2	>2	>2	>2	>2	>2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

^a L : somme totale des produits de pyrolyse des lignines

^b P₀ : somme totale des produits de pyrolyse des polysaccharides

Dans ces conditions, il est facile d'identifier *Q. accutissima*, parmi les autres espèces, dû à la grande quantité de δ-décalactone, plus de deux fois la quantité de phénols volatils (syringol, guaiacol, eugénol et ses dérivés) et moins de la moitié des composés furaniques (et dérivés). En plus, *Q. accutissima* est caractérisé par une très faible quantité d'hydroxyméthylfuraldéhyde. Le calcul du rapport des produits totaux de pyrolyse de la lignine sur les produits totaux de pyrolyse des polysaccharides (L/P₀), nous permet de distinguer trois familles de bois de chêne :

1. $L/P_0 \cong 1$ pour les bois français *Q. petraea*
2. $L/P_0 > 2$ pour les bois chinois *Q. accutissima*
3. $L/P_0 < 1$ pour les bois américains *Q. alba* et *Q. garryana*

La distinction entre *Q. garryana* et *Q. alba* est basée sur la quantité d'HMF qui est deux fois plus élevée dans *Q. garryana* comparé à *Q. alba* (4,7 pour *alba* et 7,5 pour *garryana*), la

quantité de méthoxyeugénol et ses isomères qui est abondante (plus que le double) dans *Q. garryana* comparé à *Q. alba* (2,4 pour *alba* et 6 pour *garryana*) et la quantité de guaiacol qui est plus faible dans *Q. garryana* que dans *Q. alba* (0,15 et 2,2 respectivement).

VI. Conclusion

Ces travaux nous ont permis d'une part de connaître la composition du bois de chêne et de savoir différencier différentes espèces de chênes par pyrolyse-GC/MS. Nous pouvons désormais à partir de certains critères précis (comme la teneur en hydroxyméthylfurfuraldéhyde, en méthoxyeugénol, guaiacol, δ -décalactone) distinguer quatre espèces de chêne : *Q. garryana*, *Q. acutissima*, *Q. alba* et *Q. petraea*.

D'autre part, ils ont permis de mettre en évidence les caractéristiques aromatiques des produits de pyrolyse de la lignine pouvant avoir un impact sur les qualités olfactives et gustatives des vins ou eaux-de-vie élevés en fûts de chêne.

Partie expérimentale du chapitre II

I. La préparation des échantillons

Le bois est coupé ou scié puis est séché naturellement pendant 24 mois. Les différents échantillons sont broyés puis réduits en sciures dans de l'azote liquide, avant d'être tamisés dans le but de ne garder que les particules inférieures ou égales à 60 mesh. Les échantillons sont lyophilisés puis congelés pour une bonne conservation et sont analysés dans les deux mois.

La préparation des extraits de bois de chêne : la sciure (60 mesh) est extraite avec un mélange acétone/eau (7 :3 ; v :v) à température ambiante pendant 12 heures. L'extrait est filtré, l'acétone et l'eau sont évaporés sous pression réduite (Figure 1).

Le principe de la méthode de précipitations sélectives des molécules polymérisées ou combinées de hauts poids moléculaires a été déjà décrite dans le but de fractionner les tanins des vins rouges. En utilisant le même principe, nous avons développé une méthode de fractionnement par précipitations sélectives des principaux groupes des macromolécules du bois de chêne.⁵⁷ Notre protocole est composé de trois grandes étapes :

- Précipitation spontanée de la fraction insoluble dans l'eau : fraction lignines
- Précipitation de la fraction insoluble dans le mélange éthanol/eau (9 :1, v/v) : fraction polysaccharides
- Et isolement de la fraction soluble à la fois dans l'eau et dans une solution aqueuse d'éthanol : fraction ellagitanins.

Les méthodes de caractérisation sont la spectroscopie IR (pastilles KBr....) associée à des techniques spécifiques pour chaque groupe.

II. Analyses par pyrolyse

L'analyse est réalisée grâce à un « pyrojecteur SGE II » (Figure 20) couplé à un chromatographe en phase gazeuse Varian (Les Ulis, France) 3400 CX, lui-même équipé d'un spectromètre de masse trappe à ions : Varian Saturn 4D.

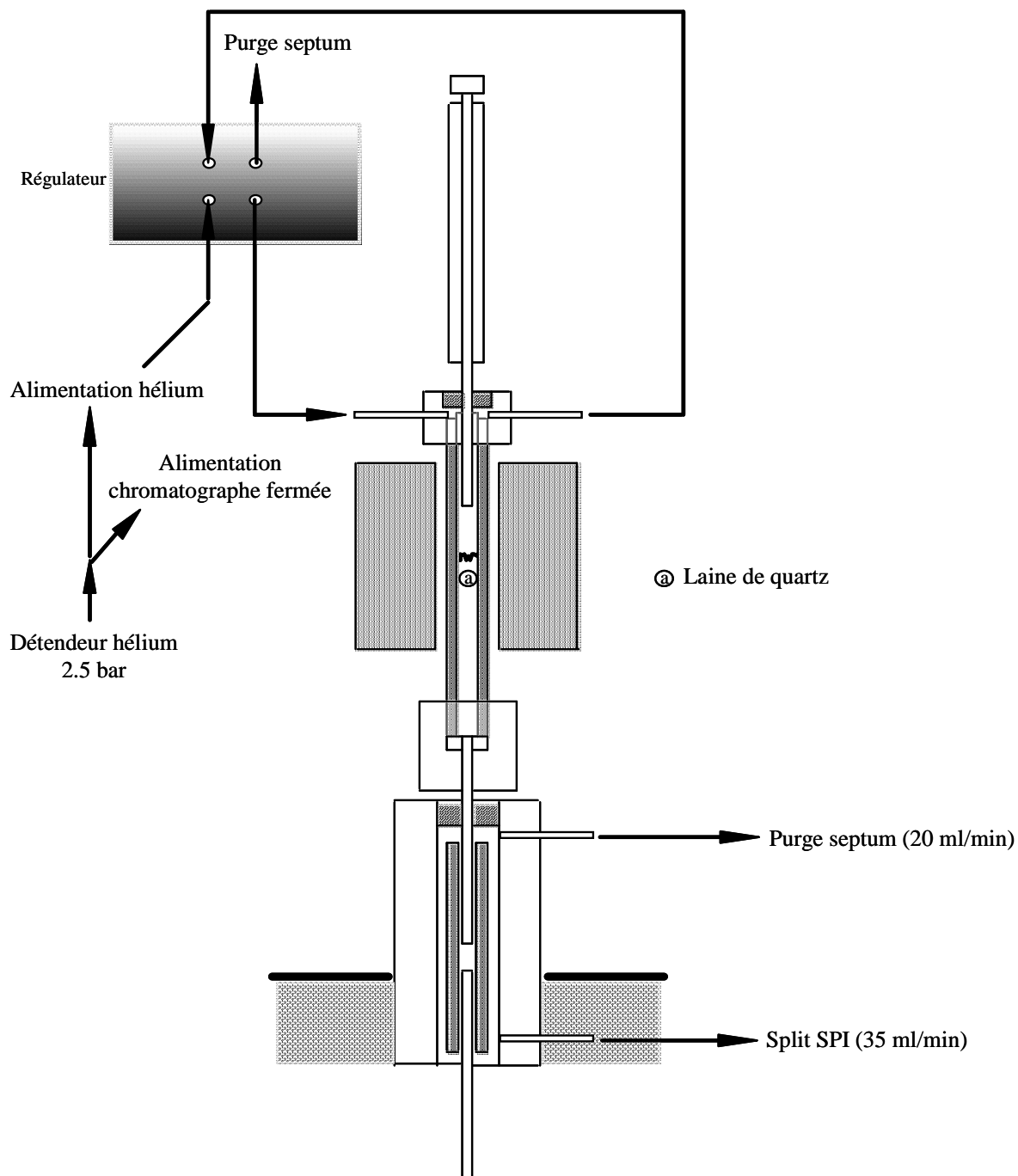


Figure 20 : Schéma du pyrojecteur « Pyrojecteur SGE » utilisé pour les analyses en ligne PYR/GC/MS

Les échantillons sont placés dans le pyrolyseur (approximativement 0,1 – 0,2 mg) et les expériences sont répétées trois fois. Les expériences ont été menées à différentes températures : 300, 400, 450, 500, 600°C. Le profil général des pyrogrammes est obtenu en utilisant la technique EI-MS. La séparation des produits de pyrolyse est réalisée en utilisant les conditions ci-dessous :

Les conditions d'analyses chromatographiques sont les suivantes :

- Colonne RTX-20 WCOT : 30 m x 0,25 mm id x 1 µm (80% diméthyl et 20% de diphénylpolysiloxane) (Restek, Bellefonte, USA)
- Programmation de températures : 50°C (pendant 10 min) jusqu'à 280°C en raison de 6°C/min
- Température de l'injecteur : 240°C
- 0,1 – 0,2 mg sont introduits dans le pyrolyseur
- L'analyse est effectuée en mode « splitless »

La détection est réalisée avec un spectromètre de masse (type trappe à ions) fonctionnant en mode électron avec une énergie d'ionisation de 70 eV et la température de la ligne de transfert est programmée à 240°C. Les spectres de masse sont enregistrés grâce à un logiciel.

L'identification est réalisée par l'étude des fragmentations, et par comparaison des temps de rétention avec ceux des composés rapportés dans la littérature et dans la librairie « National Institute of Standards library (NIST) ». Quand cela est possible, les identifications sont faites par comparaison des standards purs.

La quantification est basée sur l'aire des pics (l'intégration totale des composés identifiés est égale à 100). Le rapport syringyle/guaiacycle (S/G) est calculé en divisant la somme de l'aire des pics de l'ensemble des unités syringyles par la somme de l'aire des pics de l'ensemble des unités guaiacycles.

CHAPITRE III

Caractérisation partielle des ellagitanins polymériques dans le bois de chêne *Quercus petraea* Liebl. et *Q. robur* L.

I. Introduction

Le bois de cœur de *Quercus petraea* et *Q. robur* contient 10% en poids d'ellagitanins C-glucosidique.^{9,87,89} Ces esters hexahydroxydiphényloyl (HHDP), la principale source de résistance du bois sec de chêne¹¹⁴, l'aident à se protéger contre la pourriture fongicide ou les attaques bactériennes¹¹⁵ et confère une sensation d'astringence aux extraits de bois.⁵³ L'étude des ellagitanins est importante car ce groupe de tanins hydrolysables est utilisé dans de nombreuses applications industrielles et alimentaires.¹¹⁶ Il est partiellement responsable de la couleur du bois de chêne, qui elle-même contribue à sa qualité sur le marché.^{117,118} De plus, les ellagitanins affectent beaucoup la qualité et la composition des vins^{22,29} et eaux-de-vie¹¹⁹ élevés en fûts de chêne.

Les formes monomériques et oligomériques des ellagitanins sont bien connues.^{85,87} Les constituants majeurs des ellagitanins oligomériques des extraits du bois de cœur sont la vescalagine (1) et castalagine (2) (Figure 21).

Beaucoup de publications ont reporté la présence des tanins condensés polymériques.¹²⁰ Pour les ellagitanins, les quelques études partielles ont exclu la participation de la dégradation microbienne des polyphénols dans les tissus des plantes.¹²¹ Ces études ont mis en évidence l'insolubilisation¹⁷ et l'hydrolyse^{9,122} durant le vieillissement du bois de cœur. Une tentative de caractérisation partielle de la fraction polymérique des ellagitanins a été présentée par Klumpers *et al.*⁸

Les procédés de duraminisation et d'oxydation sont les principales réactions intervenant lors des changements polymériques dans le bois de cœur.

Pour étudier les formes polymérisées des ellagitanins provenant du bois de cœur des chênes de type *Quercus petraea* et *Q. robur*, nous allons analyser les transformations des

¹¹⁴ Hart, J.H., Hillis, W.E. *Phytopathology*, **1972**, 62, 620-626

¹¹⁵ Scalbert, A. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 3875-3883

¹¹⁶ Vivas, N., Bourgeois, G., Vitry, C., Freitas, V., Glories, Y. *J. Sci. Food Agric.*, **1996**, 72, 309

¹¹⁷ Janin, G., Mazet, J.F., Flot, J.L., Hofmann, P. *Rev. For. Fr.*, **1990**, 52, 134-139

¹¹⁸ Klumpers, J., Janin G. *Holz als Roh-und Werkstoff*, **1992**, 50, 161-171

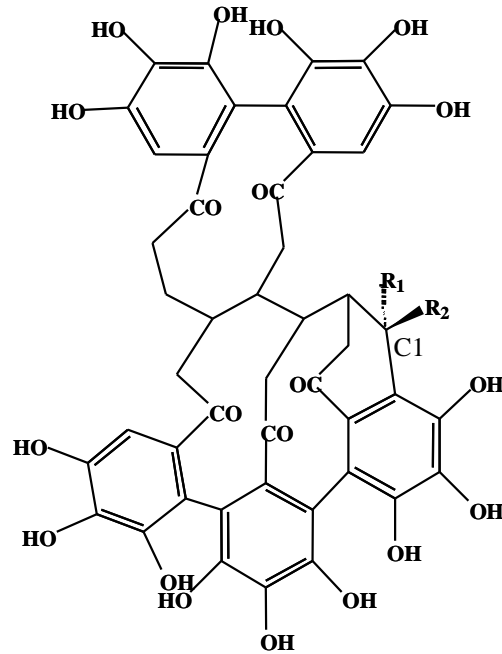
¹¹⁹ Puech, J.L., Rabier, Ph., Moutounet, M. *Elaboration et connaissance des spiritueux : recherche de la qualité, tradition et innovation*. Cantagrel (Ed.), Lavoisier, Paris, **1993**

¹²⁰ Lavisci, P., Scalbert, A., Masson, D., Janin, G. *Holzforschung*, **1991**, 45, 291-296

¹²¹ Scalbert, A. In: *Plant polyphenols: synthesis, properties, significance*; Hemingway R.W., Laks P.E., Ed.; Plenum Press, New-York, **1992**

¹²² Vivas, N., Glories, Y., Bourgeois, G., Pianet, I., Vitry, C., Barbe, B. *Origine de la vescaline et de la castaline du bois de cœur de Quercus petraea* Liebl. In: *Polyphenols communication 96*. Vercauteren J., Cheze C., Dumon M.C., Weber J.F., Ed.; Groupe Polyphénols, Bordeaux, **1996**, 41-42

ellagitanins durant le vieillissement du bois, puis étudier la caractérisation partielle des ellagitanins polymériques solubles (EPs) et, finalement, les conditions requises pour la formation des formes polymérisées des ellagitanins.



1 vescalagine : R1= H, R2= OH
2 Castalagine : R1= OH, R2= H

Figure 21 : Structures moléculaires de la vescalagine (1) et castalagine (2)

II. Evolution de la teneur en ellagitanins durant le vieillissement du bois de chêne

Sur deux billes de bois de *Q. petraea* de 175 ans, nous avons collecté de la sciure issue de l'aubier, de la partie externe du duramen (premier tiers), de la partie centrale (deuxième tiers) et interne (dernier tiers) (Figure 22).

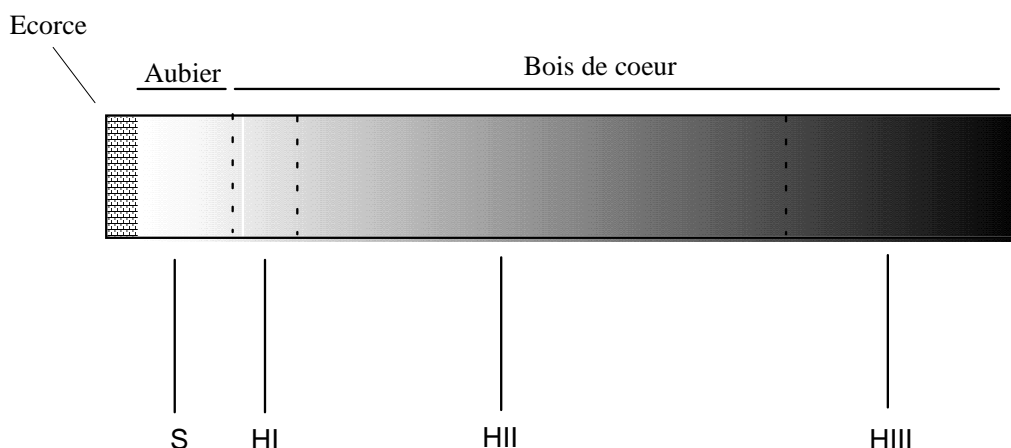


Figure 22 : Localisation de l'aubier et bois de cœur dans une coupe transversale. S : aubier (échantillons rejetés) ; HI : bois de cœur jeune (10 premières années) ; HII : bois de cœur extérieur ; HIII : bois de cœur interne (bois de cœur foncé)

Sur les échantillons extraits par le mélange acétone-eau (7 :3, v/v), on détermine l'extrait sec, les phénols totaux et les ellagitanins solubles par hydrolyse acide et dosage HPLC de l'acide ellagique formé. Après extraction, la sciure est lavée par le mélange acétone-eau puis hydrolysée pour estimer la fraction insoluble des ellagitanins.¹⁷ Les résultats représentent la moyenne de trois dosages et sont regroupés tableau 12.

Tableau 12 : Evolution de la teneur en phénols totaux de l'extrait sec et des ellagitanins de différents échantillons d'aubier et de bois de cœur (extrait acétone/eau de bois *Q. petraea*) (sauf indication contraire, les résultats sont exprimés en mg/g de bois)

	Extrait sec	Index de phénols totaux ¹	Ellagitanins solubles (a)	Ellagitanins insolubles (b)	(a)/(b)
<i>1ère série</i> ²					
Aubier	32 ±8,4	5 ±0,8	11 ±2,5	trace	-
Bois de coeur I ³	138 ±11,5	24,5 ±5,2	112 ±14,3	22 ±7,3	5,1
Bois de coeur II ³	146 ±13,2	27 ±2,5	108 ±12,7	28 ±7,5	3,8
Bois de coeur III ³	95 ±9,6	19,5 ±1,4	89 ±9,5	37 ±7,4	2,4
<i>2ème série</i> ²					
Aubier	51 ±5,3	3 ±1,2	5 ±1,3	5 ±3,2	1
Bois de coeur I ³	118 ±12,6	22 ±3,5	126 ±13,8	19 ±9,4	6,6
Bois de coeur II ³	125 ±11,7	20 ±2,7	109 ±17,2	24 ±7,8	4,5
Bois de coeur III ³	105 ±10,8	16,5 ±1,7	64 ±10,3	29 ±7,3	2,2

¹ Index de Folin Ciocalteu (D.O. g⁻¹ de bois)

² Arbres âgés approximativement de 175 ans

³ Voir Figure 21 pour la légende

Les deux billes de bois conduisent à des observations similaires. D'un côté, le processus de duraminisation transforme l'aubier en bois de cœur se traduisant par l'augmentation de la quantité d'extrait sec soluble en relation avec l'accumulation des polyphénols et en particulier des ellagitanins. D'un autre côté, le processus de vieillissement des couches de duramen plus ancien, amène à une diminution des monomères et dimères d'ellagitanins quantifiés par HPLC (vescalagine, castalagine, grandinine, roburines A-E). Les ellagitanins insolubles augmentent régulièrement de la partie HI à HIII. Le rapport ellagitanins solubles/ellagitanins insolubles ((a)/(b)) diminue à mesure que le duramen analysé vieillit.

L'augmentation des ellagitanins insolubles (+15, +10 mg/g, respectivement pour la première et la deuxième série) ne correspond pas à la diminution des ellagitanins solubles (-23, -62 mg/g, respectivement pour la première et la seconde série). Nous suggérons qu'il y a très certainement une forme intermédiaire des ellagitanins polymériques solubles (EPs) avant que l'insolubilisation totale n'ait lieu.

De nombreuses méthodes ont été développées pour quantifier la couleur à partir des données spectrales. La Commission Internationale de l'Eclairage (CIE) a proposé en 1976 un système de mesure de la couleur utilisant trois valeurs et notées $L^*a^*b^*$, qui essaie de rapprocher les écarts de couleur mesurés aux écarts de couleur tels qu'ils sont perçus par l'œil humain. L représente la clarté, il s'agit de la perception achromatique qui évolue du noir (sombre) au blanc (clair) correspondant à des valeurs comprises entre 0 (noir) et 100 (blanc). La perception chromatique est évaluée par a^* et b^* . Le premier correspond à l'axe rouge (0/+60), vert (0/-60) et le second, à l'axe jaune (0/+60), bleu (0/-60). L'avantage de la méthode est de pouvoir mesurer des couleurs sur des surfaces solides et des liquides avec des appareillages adaptés. Le système spectrophotométrique utilisant des mesures de densité optique à des longueurs d'ondes remarquables ne se faisant que sur des solutions. Par des modèles mathématiques connus, il est possible de passer des mesures spectrophotométriques aux coordonnées $L^*a^*b^*$ pour des solutions limpides.

Grâce à cette méthode, nous avons obtenu les valeurs L , a^* , b^* pour l'aubier, le bois de cœur (HI, HII, HIII). Ces valeurs sont reportées sur la figure 23.

Nous observons que la couleur du bois, corrélée avec l'accumulation des ellagitanins insolubles (EI), fonce, devient plus sombre (diminution de L) et plus rouge (augmentation de a^*).

Les résultats obtenus ne démontrent aucune relation significative entre la teneur en ellagitanins insolubles (EI) et le paramètre b^* .

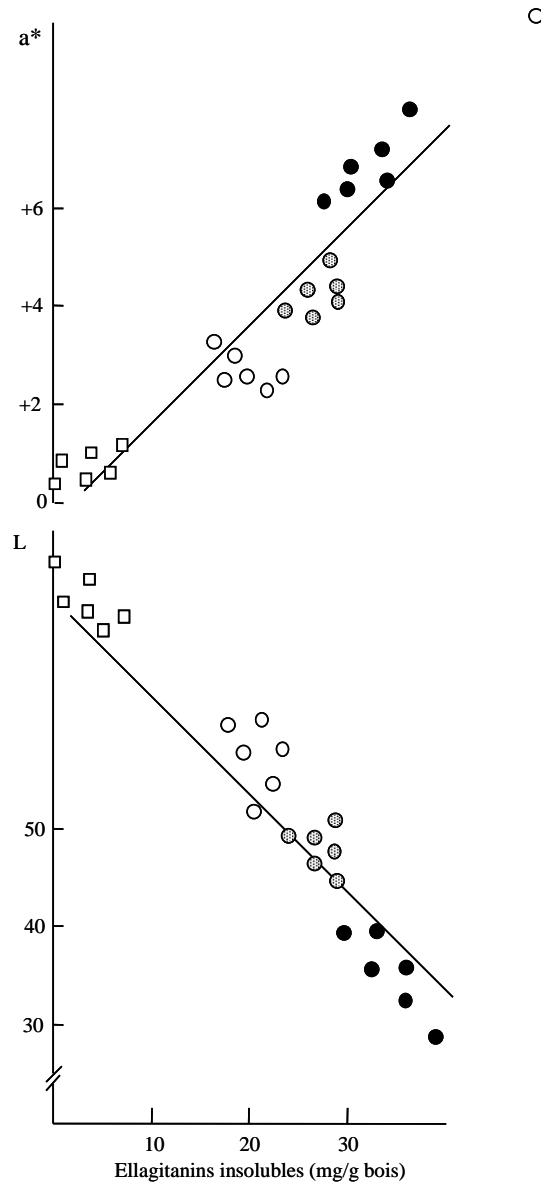


Figure 23 : Coloration de l'aubier (carré blanc) et bois de cœur (HI : rond blanc ; HII : rond gris ; HIII : rond noir) en relation avec la teneur des ellagitanins insolubles (EI). La couleur est donnée d'après le système CIELAB.

$L/EI, r=-0,89$ et $a^*/EI, r=0,94$

III. Caractérisation partielle des ellagitanins polymériques solubles (EPs)

Les ellagitanins polymériques solubles sont extraits des échantillons de bois par un mélange acétone/eau. Les analyses SEC des échantillons HI-HIII sont alors enregistrées (Figure 24).

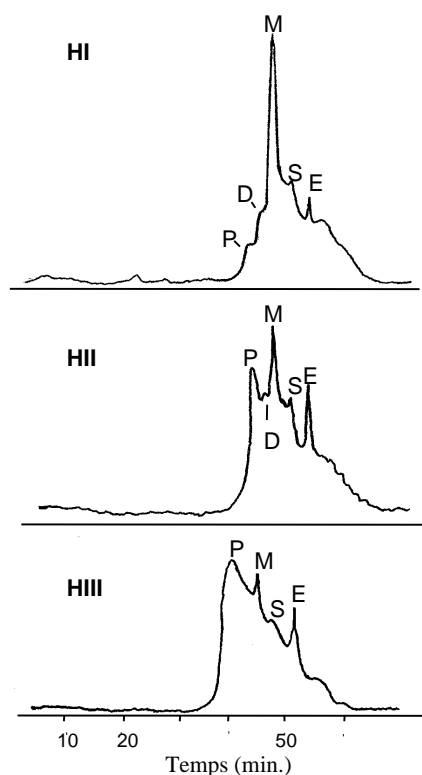


Figure 24 : Chromatogramme d'exclusion stérique d'extraits de bois de cœur. E : acide ellagique ; S : vescaline, castaline ; M : ellagitanins monomériques ; D : ellagitanins dimériques ; P : ellagitanins polymériques

Cette technique apporte une bonne séparation des masses moléculaires moyennes en nombre (M_n) des polymères, des oligomères et des phénols de faible masse moléculaire. Le bois de cœur frais (HI) présente principalement des monomères et dimères ; en accord avec les travaux précédents⁹, durant le processus de duraminisation, nous avons noté une réaction d'hydrolyse partielle des ellagitanins identifiée par une augmentation des pics attribués à l'acide ellagique, la vescaline et la castaline (HII-HIII). Dans le vieux bois (HIII), une des réactions majeures est la formation et l'accumulation des ellagitanins polymériques insolubles. Nous avons choisi trois étapes de purification pour l'estimation de la fraction EPs (pour les détails, voir la partie expérimentale).

- Premièrement, la séparation des fractions solubles et insolubles dans l'éthanol à 90% en volume, 12h à 4°C ; seulement la fraction soluble contient des ellagitanins, tandis que le précipité représente le complexe polysaccharide-ellagitanins.²²

- Deuxièmement, grâce à la technique de chromatographie basse pression en utilisant le gel Sephadex LH20, nous avons collecté une fraction éluée au méthanol (HIIc, Figure 25) et nous avons rejeté les fractions éluées respectivement avec de l'eau (produits d'hydrolyse des ellagitanins vescalagine et castalagine à savoir la vescaline, la castaline et l'acide gallique) et avec 30% en volume de méthanol (ellagitanins monomériques et dimériques). Le contenu de ces fractions est analysé par HPLC en phase inverse. La qualité de la purification est estimée par SEC, comme nous l'avons montré sur la Figure 25 pour les échantillons HII.

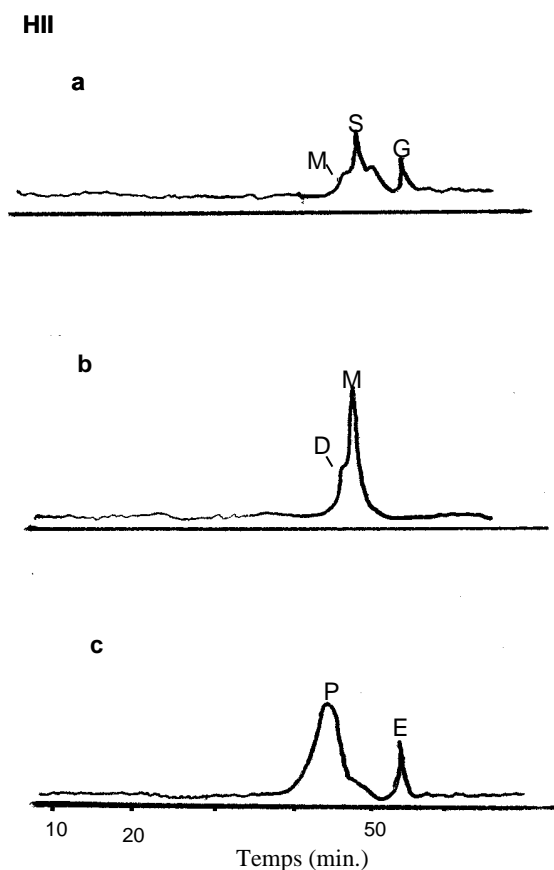


Figure 25 : Chromatogramme d'exclusion stérique des fractions HIIa, HIIb, HIIc obtenu par chromatographie basse pression en utilisant le gel LH20 (a : élution à l'eau ; b : 30% volume de MeOH ; c : MeOH)

G : acide gallique ; E : acide ellagique ; S : vescaline/castaline ; M : ellagitanins monomériques ; D : ellagitanins dimériques ; P : ellagitanins polymérisés (*e.g.* fraction EPs (HII : bois de cœur extérieur))

- Troisièmement, l'acide ellagique résiduel est éliminé par une extraction liquide/liquide par l'éther diéthylique ; la fraction représente les ellagitanins polymérisés (EPs) purs. Puis, par des injections répétées, nous avons collecté suffisamment de fractions HIIc et

HIIIc (obtenue de la même façon que HIIc mais en purifiant HIII au lieu de HII) pour une caractérisation partielle. La SEC à l'aide de colonnes avec gel TSK, donne une masse moléculaire moyenne en nombre : M_n autour de 2700 ± 375 pour HIIc et HIIIc.

Les EPs et l'extrait total de HI-HIII sont analysés par dégradation acide dans du méthanol acidifié, et l'acide ellagique libéré est quantifié par HPLC ; les phénols totaux sont quantifiés par la méthode de Folin-Ciocalteu sous la forme d'un indice (IFC). Le rapport ellagitanins/phénols varie dans les extraits HI-HIII, probablement avec la teneur relative en EPs, et semble constant pour les principaux ellagitanins polymérisés de HIc-HIIIc (Tableau 13).

Tableau 13 : Evolution du rapport ellagitanins/phénols totaux pour un extrait acétone/eau de HI-HIII et de fractions purifiées de polymères d'ellagitanins solubles (EPs) (les résultats sont exprimés en mg/g de bois en équivalent acide gallique pour les phénols et équivalent vescalagine pour les ellagitanins)

	Extrait total			EPs		
	HI	HII	HIII	HIc	HIIc	HIIIc
Ellagitanins¹ / Phénols²	0,68	0,43	0,17	0,02	0,03	0,02

¹ Dégradation acide et détermination de l'acide ellagique

² Test Folin-Ciocalteu

Ceci peut être expliqué par la formation, durant le vieillissement du bois de cœur, de liaisons covalentes entraînant la formation d'unités hexahydroxydiphényles des ellagitanins C-glucosidique. Cette modification structurale affecte la formation d'acide ellagique durant la dégradation acide.

Le degré de pureté et de polymérisation des EPs peut être évalué par des expériences RMN. Grâce à la RMN du solide ¹³C CPMAS, il est possible d'estimer la teneur relative de quelques groupes principaux de composés¹²³ : cellulose (δ 65-62, 75-73, 89, 84, 105 ppm), hémicellulose (δ 21, 172 ppm), lignines (δ 56, 120, 137, 148, 153 ppm) et ellagitanins (δ 145 ppm). Les EPs présentent un large signal seulement à δ 145 ppm. La thioacidolyse de la fraction

¹²³ Davis, M.F., Schroeder, H.R., Maciel, G.E. *Holzforschung*, **1994**, 48, p. 99-105

EPs ne libère pas de produits typiques des lignines et des oses. Ce polymère n'est pas attribué aux formes hétérocomplexes avec des ellagitanins, des lignines et des polysaccharides.

IV. Voies possibles de formation des EPs dans le bois

IV.1. Obtention des EPs synthétiques

Pour obtenir un modèle satisfaisant de la réaction de polymérisation dans le bois de cœur d'arbres vivants, nous avons choisi la castalagine comme substrat monomérique et l'eau distillée stérile avec ajout de facteurs oxydatifs variés (oxygène, peroxyde d'hydrogène, cuivre).

Durant l'expérience, nous avons comparé le développement de la couleur typique jaune/marron des EPs issus de la synthèse, la formation des polymères par chromatographie et les caractéristiques spectrales comparées à celles des EPs naturel. Pour obtenir des polymères colorés de la castalagine, une réaction de Fenton avec H_2O_2 détruit par Cu^{2+} (Figure 26) est utilisée.

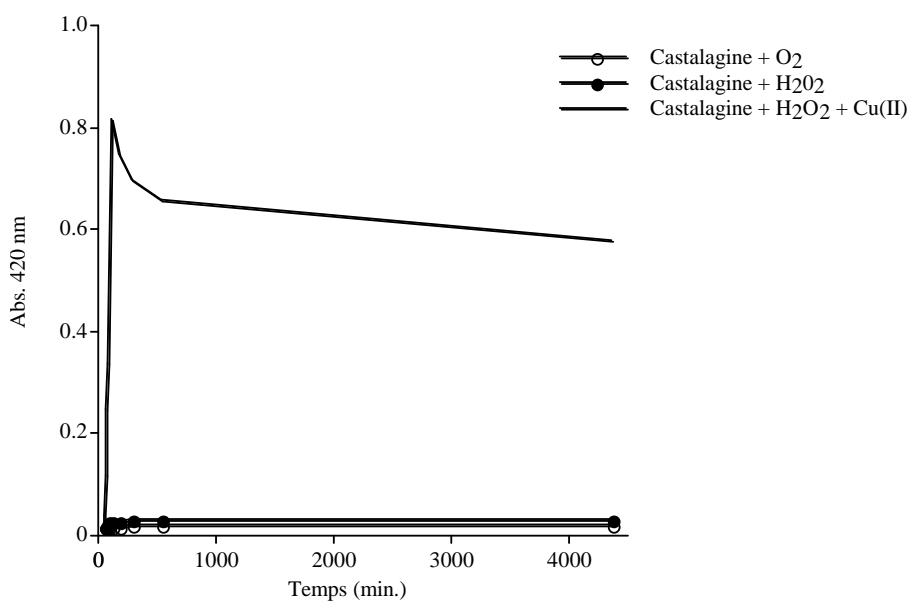
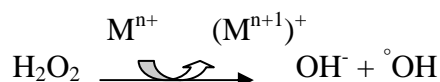


Figure 26 : Développement de la couleur (420 nm) des solutions de castalagine contenant : O₂ et H₂O₂ ($\pm Cu^{2+}$)

La formation des EPs est seulement observée (par SEC) dans ces conditions. Cela suggère que la réaction requiert une oxydation par un agent.

Réaction de Fenton :



Nous avons nommé EPs synthétique, le produit formé par l'oxydation chimique *in vitro* de la castalagine, et purifié par un fractionnement sur gel LH20 avec du méthanol (fraction HIIIc). L'EPs synthétique est collecté puis isolé avec le même protocole que pour l'EPs naturel, et les résultats sont comparés.

IV.2. Spectres UV

Le polymère extrait de HIIIc a le même spectre UV que la castalagine : présence d'un maximum à 230 nm et un épaulement à 280 nm. Les déplacements bathochromes, en solution méthanolique, sont également comparables à ceux observés pour la castalagine (Figure 27). En comparaison, les lignines présentent un maximum distinct autour de 280 nm et un épaulement à 310-320 nm.¹⁰⁰

En présence d'AlCl₃, le maximum à 230 nm varie de +3 nm pour la castalagine et ne change pas pour les EPs naturel et synthétique ; l'épaulement à 280 nm varie de +22 nm pour la castalagine et de +9 nm pour les EPs. L'ajout d'HCl provoque un retour aux valeurs initiales dans les deux cas (280 nm et 371 nm). Par comparaison avec les spectres de l'acide ellagique et l'acide gallique, l'absorption UV à 230 nm peut être attribuée à la partie trihydroxybenzénique de l'acide gallique et l'absorption à 371 nm est attribuée aux structures hexahydroxydibenzéniques dont dérive l'acide ellagique. Ces différentes longueurs d'ondes sont retrouvées sur les spectres des acides purs.

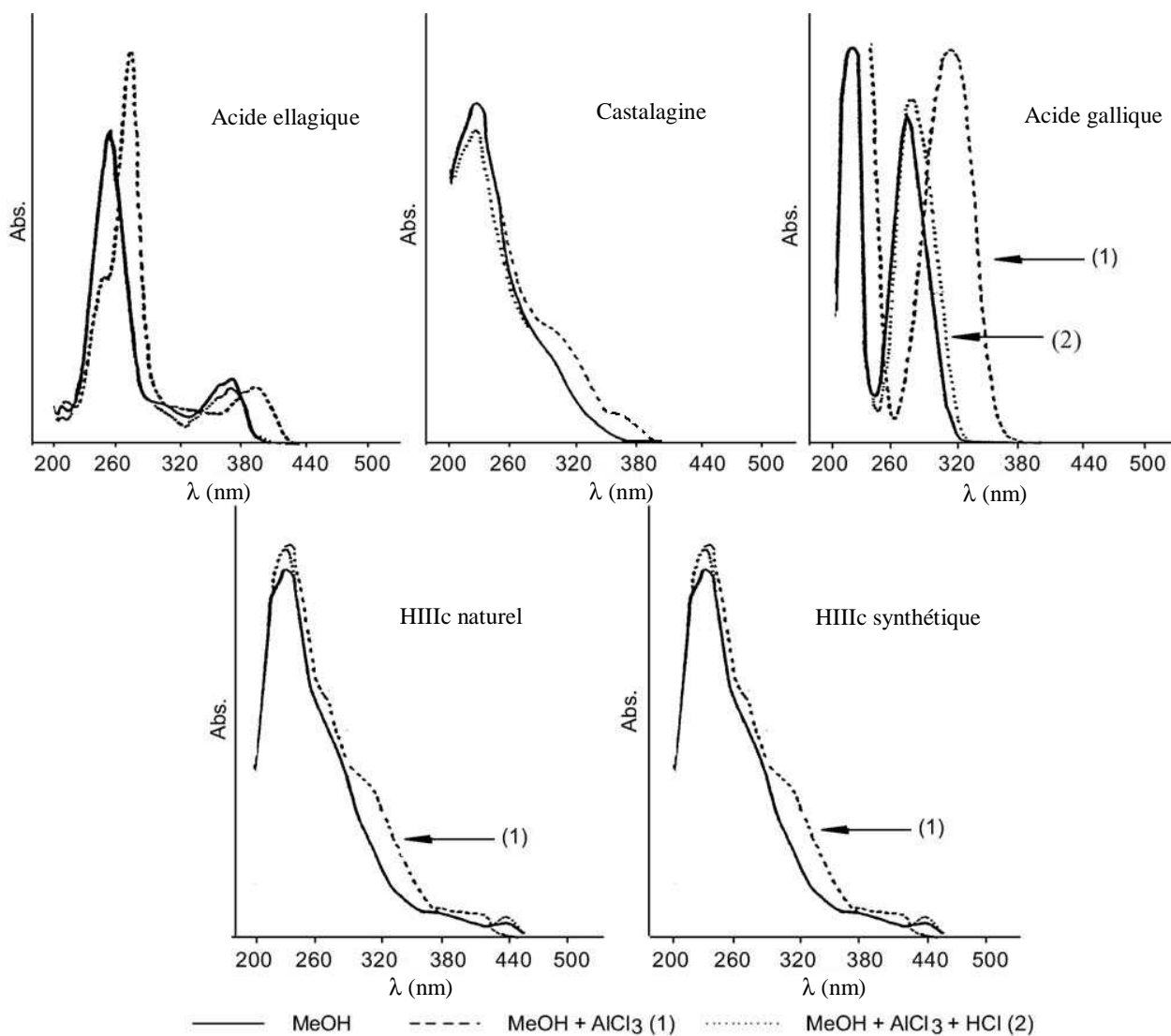


Figure 27 : Spectre UV-Visible et déplacements bathochromes caractéristiques de l'acide ellagique, castalagine, acide gallique, HIIc naturel et HIIc synthétique

IV.3. Spectres IR

Les spectres infrarouge ($4000-700 \text{ cm}^{-1}$) réalisés sur pastilles de KBr sont présentés sur la Figure 28.

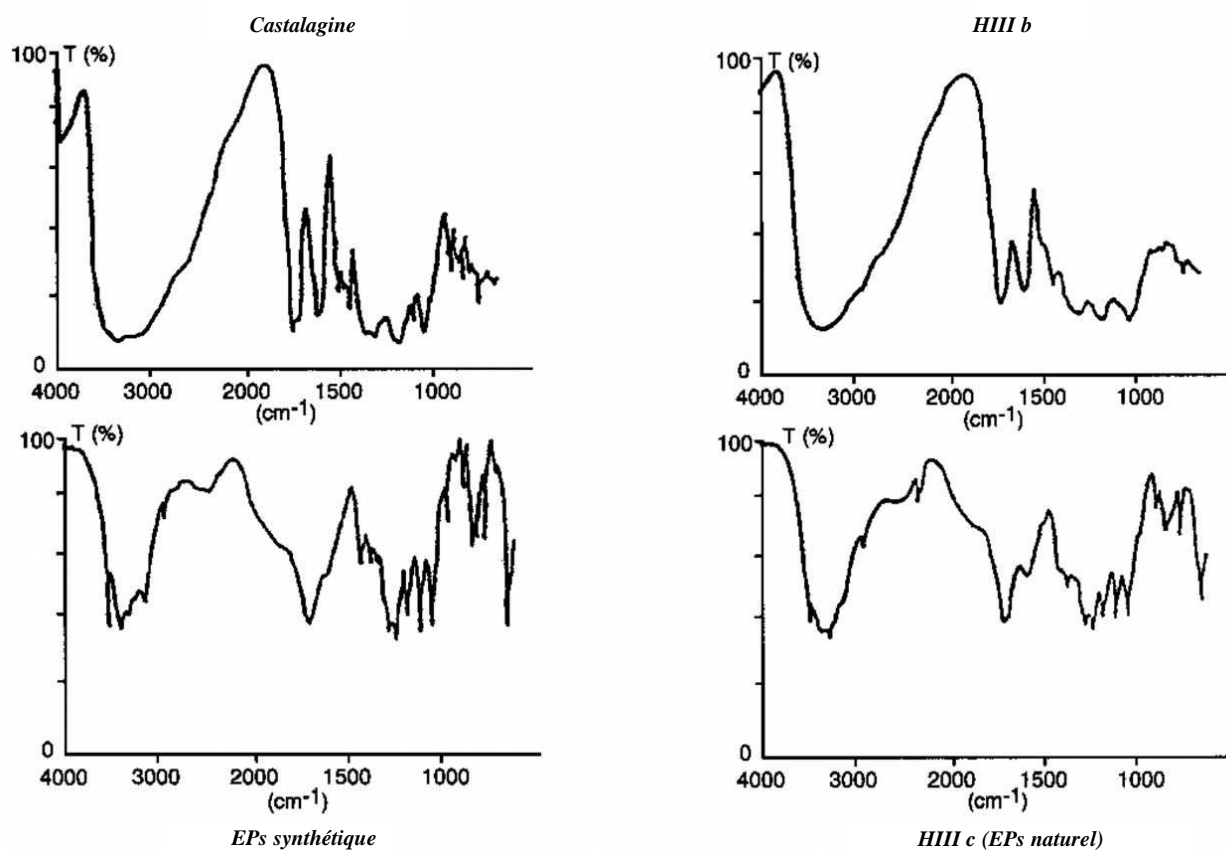


Figure 28 : Spectres IR (4000-700 cm^{-1}) réalisés sur pastilles de KBr

Nous avons noté une large similarité entre les EPs synthétiques et naturels (HIIIc) et la castalagine et les ellagitanins oligomères (HIIIb). Les résultats suivants confirment que les réactions oxydatives interviennent durant la formation des structures ellagitaniques polymérisées. Premièrement, comparé à la castalagine et HIIIb, nous avons noté que la meilleure résolution pour les EPs naturels et synthétiques est entre 3500-3200 cm^{-1} . Toutes les bandes de vibration correspondent à la fonction $-\text{OH}$. Il est présumé que le processus de polymérisation oxydative permet une association d'une partie des $-\text{OH}$. Deuxièmement, après oxydation, les bandes de vibration à 1740 cm^{-1} , dues aux esters saturés, disparaissent, tandis que les bandes à 1715 cm^{-1} apparaissent. Ceci peut correspondre aux liaisons $\text{C}=\text{C}$. Troisièmement, les bandes caractéristiques des ellagitanins natifs (1455-1445, 1510-1500, 1620-1615 et 1740 cm^{-1}) diminuent et disparaissent. Les transformations oxydatives ne permettent pas seulement la polymérisation entre les molécules mais aussi induisent des modifications majeures dans la structure des produits natifs. Quatrièmement, la présence dans les deux produits oxydés des bandes à 1250 cm^{-1} et dans la zone 830-890 cm^{-1} , est caractéristique de la présence des structures époxy.

V. Etude des douelles présentant des tâches

Seuls les ellagitanins polymérisés au côté des lignanes ont un rôle colorant significatif. Ces chromophores selon Klumpers *et al.*⁸, participent directement ou indirectement à la couleur des vins et des eaux-de-vie élevés en barriques.

Nous avons étudié 5 douelles différentes présentant visuellement des tâches brunes (N1, N2, N3, N4, N5) et une douelle témoin non tâchée (Témoin). Nous avons graté à 7 mm de profondeur jusqu'à disparition des tâches. Nous avons fractionné les macromolécules (fraction A : lignines ; fraction B : polysaccharides ; fraction C : ellagitanins) selon la méthode mise au point et décrite dans le chapitre I.⁵⁷

Nous avons analysé la fraction ellagitanins sur les 6 échantillons de sciure prélevés (Ellag. Témoin, Ellag. N1, Ellag. N2, Ellag. N3, Ellag. N4, Ellag. N5) par SEC. Nous constatons (Figure 29 et tableau 14) que les profils (N1, N2, N3, N4, N5) sont différents de celui du témoin.

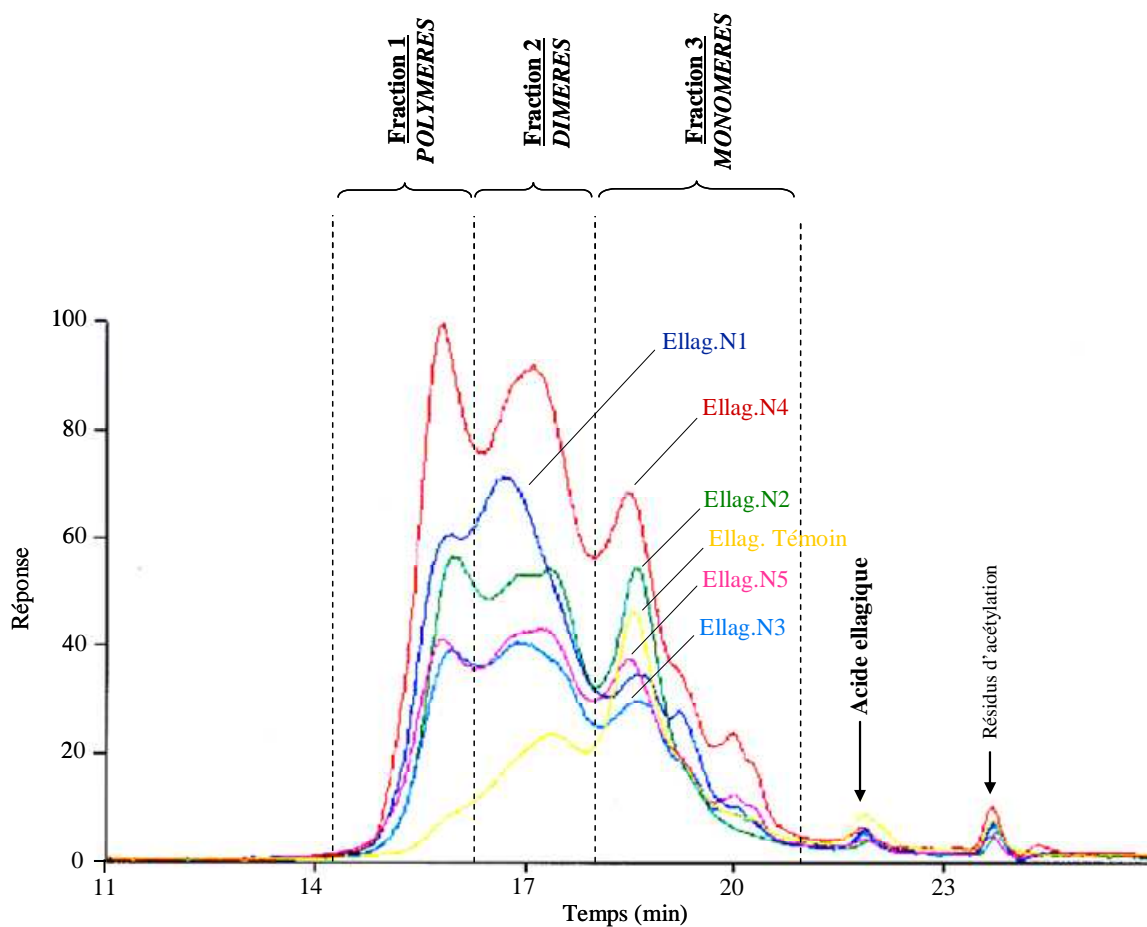


Figure 29 : Chromatogrammes SEC pour les fractions C des 6 douelles : Ellag. Témoin, Ellag. N1, Ellag. N2, Ellag. N3, Ellag. N4, Ellag. N5.

Tableau 14 : Proportion de chaque fraction (1 : fraction polymérisée ; 2 : dimères ; 3 : monomères) obtenue par SEC pour les fractions C des 6 douelles : Ellag. Témoin, Ellag. N1, Ellag. N2, Ellag. N3, Ellag. N4, Ellag. N5.

	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3
Ellagitanin Témoin	Traces	37%	57%
Ellagitanin N1	21%	54%	25%
Ellagitanin N2	29%	41%	32%
Ellagitanin N3	25%	42%	33%
Ellagitanin N4	28%	40%	31%
Ellagitanin N5	24%	41%	35%

Ils présentent une fraction polymérisée notée 1 importante (variant de 21 à 29%) par rapport au témoin qui ne possède pas cette fraction.

Nous pouvons noter également que plus les masses molaires moyennes (M_w) sont élevées (Ellag. N1, N2, N3, N4, N5) plus les D.O. 280 et 420 sont élevées. Et inversement plus M_w est faible (Ellag. Témoin) plus les D.O. 280 et 420 sont faibles (Tableau 15).

Tableau 15 : Valeurs de la masse molaire moyenne : M_w obtenue par SEC et des densités optiques à 280 nm et 420 nm pour les fractions C des 6 douelles : Ellag. Témoin, Ellag. N1, Ellag. N2, Ellag. N3, Ellag. N4, Ellag. N5.

	D.O. 280	D.O. 420	M_w
Ellagitanin Témoin	0,161	0,43	2144
Ellagitanin N1	0,237	0,64	5641
Ellagitanin N2	0,369	0,7	3711
Ellagitanin N3	0,606	0,79	3805
Ellagitanin N4	0,556	1,12	4703
Ellagitanin N5	0,746	1,15	7106

VI. Conclusion

Dans ce travail, nous contrôlons la formation et les conditions de formation des formes polymériques des ellagitanins provenant du bois de cœur *Q. robur* et *Q. petraea*. Nous observons une accumulation des formes polymériques des ellagitanins durant le vieillissement du bois de chêne. Les analyses se sont focalisées seulement sur la partie extractible des EPs, donc l'étude concerne l'étape intermédiaire de développement des EPs vers une insolubilisation totale.

Dans ces conditions, les formes polymériques ne peuvent être extraites et étudiées car le niveau de polymérisation est trop élevé et les associations avec les composés des cellules du bois sont la cause de cette insolubilisation.

Nos résultats, dans les conditions *in vitro*, montrent que la formation des Eps requiert une réaction d'oxydation par voie radicalaire (réaction de Fenton).

Nous pouvons également expliquer la présence de tâches sur les douelles par le fait qu'elles contiennent des ellagitanins très polymérisés. Ces chromophores participent à l'augmentation de la teneur en phénols totaux et accentuent notablement la couleur jaune sur les parties tâchées des douelles.

Partie expérimentale du chapitre III

I. Généralités

La castalagine est isolée et purifiée à partir du duramen de *Q. robur*, dans les conditions décrites par Vivas *et al.*⁸⁵ Les acides gallique et ellagique ont été achetés chez Acros. Tous les solvants employés sont de qualité analytique.

II. Echantillons de chêne

Les échantillons de bois de chêne sont constitués par le bois de cœur d'arbres âgés approximativement de 175 ans, issus de massifs forestiers homogènes, et convenablement entretenus. Seulement le premier quart inférieur du tronc, généralement le bois de tonnellerie, est utilisé pour l'étude. Le bois débité par fendage est séché naturellement pendant 24 mois. Les différents échantillons pris au hasard sur des piles de bois sont rabotés puis réduits en sciure par broyage dans l'azote liquide, avant d'être tamisés pour ne conserver que les particules de dimension inférieure à 60 mesh. Les échantillons sont conservés après lyophilisation pour être analysés dans un délai de deux mois.

III. Mesure de la couleur

La couleur des pièces de bois est mesurée en utilisant un système chromatique CIELAB Minolta 508TM. Les mesures spectrométriques des solutions à 450 nm, 520 nm, 570 nm et 630 nm (système $L^*a^*b^*$) sont mesurées grâce à un spectrophotomètre Anthélie SecomamTM équipé d'une cellule en quartz de 1 cm de trajet optique. Les valeurs L^* , a^* , b^* sont ensuite calculées selon la méthode d'Adams-Nickerson.

IV. Extraction des polyphénols

1 g de sciure (60 mesh) est extrait avec 100 ml d'un mélange acétone/eau (70 :30, v/v) pendant 12 h à température ambiante (autour de 20°C) sous agitation (150 rpm). Les extraits résultant sont filtrés grâce à un filtre de 0,45 µm et séchés.

V. Analyses par HPLC

Les analyses HPLC sont réalisées selon la méthode de Scalbert *et al.*⁸⁹

Les conditions d'analyses chromatographiques par HPLC sont les suivantes :

- Colonne phase inverse : Interchrom C18 (250 mm x 4,6 mm x 10 µm)
- Programmation gradient : 0 à 10% de B en 40 min, augmentation du pourcentage de B jusqu'à 100% en 25 min
- Solvant A : H₂O/H₃PO₄ (999 :1, v/v)
- Solvant B : MeOH/H₃PO₄ (999 :1, v/v)
- Débit constant de 1 ml/min
- Volume d'injection : 20 µl

La détection est réalisée grâce à un détecteur UV dont la longueur d'ondes est fixée à 280 nm.

VI. Analyses par SEC

L'étude de la distribution M_p de la fraction C est réalisée en utilisant les dérivés acétyl. Les échantillons (10 mg) du matériel végétal séché et conservé au congélateur, sont acétylés avec un mélange de pyridine et d'anhydride acétique (1 :1 ; v/v) pendant trois jours à température ambiante. Le précipité obtenu, en versant le mélange dans de l'eau glacée, est récupéré par centrifugation. Ce précipité est alors lavé avec de l'eau distillée, puis du méthanol et finalement

avec du chloroforme. Il est séché puis redissout avec 0,5 ml de THF et filtré avant analyses par SEC.

L'analyse par chromatographie d'exclusion stérique est réalisée en utilisant un appareil Thermo Quest (Courtaboeuf, France), équipé de trois colonnes (300 x 7,8 mm) : TSK gel G 1000 HXL, TSK gel G 2000 HXL, TSK gel G 2500 HXL, en série, protégées avec une colonne de garde constituée du même matériel. Les conditions d'analyse sont : THF comme éluant ; débit : 1 ml/min ; volume d'injection est de 20 µl ; et le temps d'analyse est de 45 min. La courbe de calibration est obtenue avec des standards de polystyrène, et l'acide ellagique peracétylé. La détection est effectuée grâce à un détecteur UV (Spectra series UV-150) (Termo Quest, Courtaboeuf, France) et un réfractomètre (Spectra series RI-150). L'ensemble est piloté par le logiciel PL Caliber (PL Laboratories, Marseille, France) et est utilisé par l'acquisition des résultats.

VII. Purification des ellagitanins polymériques solubles (EPs)

Les ellagitanins polymériques solubles sont extraits de l'extrait acétone/eau des échantillons de bois. Nous avons choisi trois étapes distinctes de purification :

- fractionnement des fractions solubles et insolubles dans l'éthanol 90% en volume, 12 h à 4°C ; seulement la fraction soluble contiennent les ellagitanins (le précipité représentant le complexe polysaccharide-ellagitanin)
- grâce à la chromatographie basse pression en utilisant le gel Sephadex LH20, nous collectons une fraction éluée avec du méthanol et nous rejetons les fractions éluées respectivement avec de l'eau (produits d'hydrolyse de la vescaline et castaline, vescalagine, castalagine et acide gallique) et avec 30% de méthanol (monomères et ellagitanins dimères)
- troisièmement, l'acide ellagique résiduel est éliminé par extraction liquide de la fraction éthanol et représente les EPs purs.

VIII. Quantification des ellagitanins

VIII.1. Quantification des ellagitanins solubles

La méthode proposée est adaptée de celle de Peng *et al.*¹⁷ Elle est basée sur l'hydrolyse acide des ellagitanins au bain-marie, suivie par une analyse quantitative HPLC de l'acide ellagique libre. 2,5 mg de la fraction C (sèche) sont introduits dans un tube à hydrolyse fermé par un bouchon téfloné et solubilisés dans 5 ml du mélange [méthanol/acide chlorhydrique (2 M)]. L'acide ellagique présent, et l'acide ellagique libéré, après deux heures d'hydrolyse acide (bain d'huile à 100°C), est dosé. La différence entre les deux valeurs correspond à l'acide ellagique libéré par les ellagitanins. La détermination quantitative par HPLC a été réalisée à l'aide d'un système Waters (Saint-Quentin, Yvelines, France).

Les conditions d'analyses chromatographiques par HPLC sont les suivantes :

- Colonne phase inverse : Interchrom C18 (250 mm x 4,6 mm x 10 µm)
- Programmation gradient : 0 à 30% de B en 3 min, augmentation du pourcentage de B jusqu'à 50% en 2 min, jusqu'à 70% en 5 min, jusqu'à 80% en 5 min et finalement pour atteindre 100% en 2 min
- Solvant A : H₂O/H₃PO₄ et pH ajusté à 2.4
- Solvant B : MeOH/H₃PO₄ et pH ajusté à 2.4
- Débit constant de 1 ml/min
- Volume d'injection : 20 µl

La détection est réalisée grâce à un détecteur UV dont la longueur d'ondes est fixée à 370 nm.

VIII.2. Quantification des ellagitanins insolubles

La méthode est identique à celle décrite au-dessus. L'hydrolyse n'est pas réalisée sur l'extrait acétone/eau mais sur la sciure de bois totale après extraction.

IX. Détermination des phénols

Les composés phénoliques totaux de l'extrait de bois sont déterminés soit par la méthode au réactif de Folin-Ciocalteu (FC) soit en mesurant l'absorption UV à 280 nm des extraits dilués à 1/100.¹²⁴ La réaction FC est réalisée en introduisant 0,2 ml des fractions, 1 ml du réactif de FC et complétée jusqu'à 20 ml à l'aide d'une solution de carbonate de sodium à 4%. Après 20 minutes à 70°C, l'intensité colorante est mesurée à 750 nm. L'index de FC correspond à la valeur de la densité optique. Ces deux méthodes fournissent des résultats totalement comparables mais ne sont pas spécifiques aux ellagitanins.

X. Spectre IR

Les spectres IR sont réalisés à partir de pastilles de la fraction A et de KBr, entre 4000 et 700 cm⁻¹. Le spectromètre IR est appareil Perkin-Elmer (Courtaboeuf, France). L'attribution des bandes IR est effectuée en accord avec des attributions proposées par Puech⁹⁶, Faix⁶⁵ et Collier *et al.*⁹⁷

XI. Analyses par RMN

La RMN du solide est mesurée par la polarisation croisée de la méthode de l'angle magique de spin (CPMAS ¹³C RMN). Les expériences sont réalisées à l'aide d'un appareil Bruker™ DPX 400. Les conditions expérimentales ont été décrites par Davis *et al.*¹²³ Les échantillons consistent à de la sciure déshydratée (40 mesh). La sciure est introduite dans un tube en verre spécifique aux expériences RMN.

¹²⁴ Vivas, N., Chauvet, S., Sudraud, P., Glories, Y. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **1993**, 86, 919, 215-222

XII. Oxydation chimique in vitro

Pour interpréter la voie de formation de ces polymères colorés, nous avons constitué trois lots de solutions aqueuses stériles de castalagine : castalagine à 1 g/l en présence de 8 mg/l d'oxygène, castalagine à 1 g/l en présence de 8 mg/l d'oxygène en équivalent H₂O₂, enfin la même solution contenant 1 mg/l de cuivre sous forme CuSO₄. La densité optique à 420 nm est suivie au cours du temps.

XIII. Réaction de thioacidolyse

La méthode appliquée, décrite en détail par Rolando *et al.*⁶⁶ et développée par Lapierre⁶⁷, consiste en une thioacidolyse de la lignine. Le réactif de thioacidolyse se compose de la façon suivante : BF₃ (0,2 M) étherate dans un mélange dioxane:éthanethiol dans les proportions : 8:75:1 (v/v/v). Les produits de dégradation, plus exactement les dérivés thioéthyl, sont analysés par GC/MS après silylation (BSTFA/TMCS). La quantité de réactifs indiquée par les auteurs précédents a été modifiée : 30 mg de la fraction A sont ajoutés à 14 ml du réactif de thioacidolyse. Le résidu final est redissous dans 2 ml de dichlorométhane ; 1 ml de la solution organique ainsi obtenue est triméthylsilylé avec 500 µl de *N,O*-bis(triméthylsilyle)trifluoroacétamide (BSTFA+1%TMCS) et 50 µl de pyridine (grade GC) dans un vial de 2 ml fermé par un bouchon téfloné hermétiquement et placé à température ambiante. La réaction de silylation est complète après 4 heures.

Les conditions d'analyses chromatographiques sont les suivantes :

- Colonne DBXLB (J&W scientific USA) : 30 m x 0,25 mm id x 0,25 µm
- Programmation de températures : 80°C (pendant 1 min) jusqu'à 120°C en raison de 50°C/min puis jusqu'à 260°C en raison de 4°C/min et 320°C en raison de 8°C/min
- Température de l'injecteur : 240°C
- 1 µl sont injectés en mode « splitless »

La détection est réalisée avec un spectromètre de masse (type magnétique) : VG-Autospec EQ (Micromass, Manchester, UK), fonctionnant en mode électron avec une énergie d'ionisation de 70 eV et la température de la ligne de transfert est programmée à 240°C.

CHAPITRE IV

Structure des lignines extraites du bois de cœur de *Quercus petraea* Liebl. et *Q. robur* L.

I. Introduction

Le bois de cœur est riche en lignines environ 25-30% du poids du bois sec.^{58,59,60} Les lignines du bois de chêne, comme celles d'autres angiospermes, sont des polymères formés principalement par la copolymérisation de deux alcools phénylpropénoïques : alcool hydroxy-4-méthoxy-3-cinnamique (structure guaiacyle ; alcool coniférilique), alcool hydroxy-4-diméthoxy-3,5-cinnamique (structure syringyle et alcool synapilique). La structure et la composition des bois d'intérêts industriels sont maintenant bien connues, en particulier les lignines naturelles de *Betula* sp.^{125,126}, *Populus* sp.^{75,74,82,127}, *Ginkgo biloba*¹²⁸, *Pinus* sp.¹²⁹ Il y a moins d'information concernant les lignines de bois de chêne et leurs études RMN sont très limitées. Les lignines de bois de chêne ont un impact très important sur les propriétés du bois affectant le vieillissement des vins et spiritueux, particulièrement l'hydrophobie des lignines qui contribue à l'imperméabilité et diminue la fréquence de fuite⁶³. Les lignines, au vue de leur composition, représente une vaste source de composés aromatiques produits durant la chauffe. Dans le domaine particulier de la production de spiritueux, les lignanes dérivés de la dégradation des lignines, contribuent à la couleur des produits commerciaux finaux.⁴²

Les techniques RMN permettent la caractérisation qualitative des lignines natives ou acétylées, les principales unités intermonomériques et les structures des chaînes latérales^{77,79,80} (Figure 30).

Ce chapitre présente d'une part une étude structurale complète des lignines extraites du bois de coeur de *Quercus robur* et *Q. petraea*. La RMN 1H et 13C homo- et hétéronucléaire a été employée, et particulièrement les techniques TOCSY et HMQC.

Et d'autre part, il présente une méthode d'identification des lignanes présents dans le bois de chêne *Q. petraea*, ainsi que leurs impacts sur la couleur du bois de chêne. Il comporte également une étude structurale de deux lignanes du bois de chêne isolés et purifiés.

¹²⁵ Lundquist, K. ¹H NMR spectral studies of lignins. *Nordic Pulp Paper research J.*, **1991**, 3, 140-147

¹²⁶ Fukagawa, N., Meshitsuka, G., Ishizu, A. *J. Wood Chem. Technol.*, **1991**, 11, 373-396

¹²⁷ Bardet, M., Foray, M.F., Robert, D. *Makromol. Chem.*, **1985**, 86, 1495-1504

¹²⁸ Xie, Y., Robert, D., Terashima, N. *Plant Physiol. Biochem.*, **1994**, 32, 243-249

¹²⁹ Terashima, N., Seguchi, Y., Robert, D. *Holzforchung*, **1991**, 45, 35-39

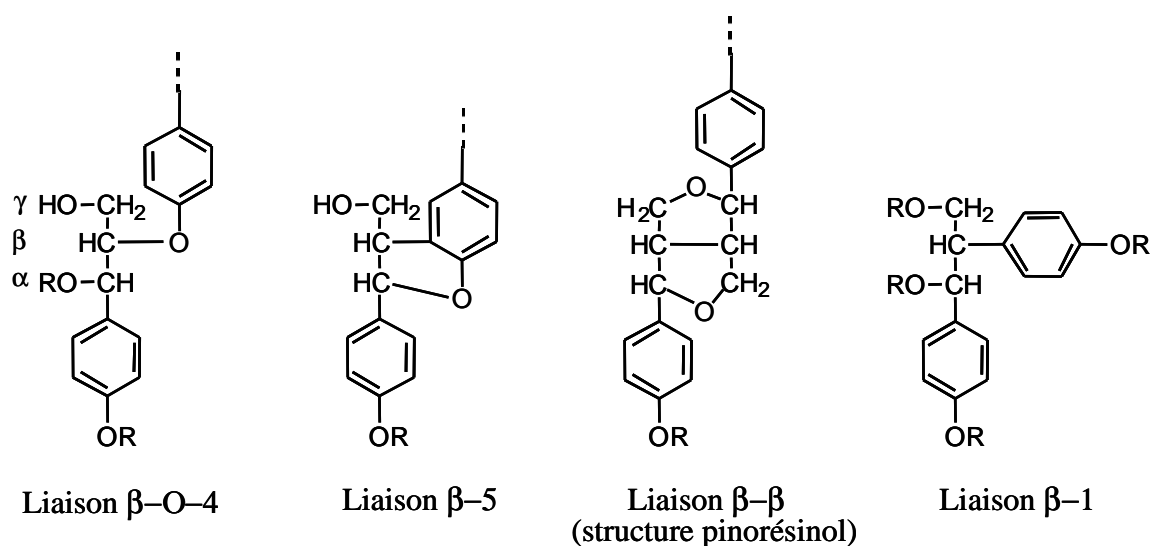


Figure 30 : Principales liaisons intermonomériques rencontrées dans les lignines

Les techniques de la RMN du proton donnent des informations limitées, en se focalisant seulement sur les différents types de protons présents dans les groupes phénoliques et les chaînes latérales. Malgré sa faible sensibilité, la technique de la RMN ^{13}C est beaucoup plus puissante pour la caractérisation structurale des macromolécules. En plus, sous certaines conditions expérimentales spécifiques pour l'enregistrement de spectres, il est possible d'effectuer des analyses structurales quantitatives.¹³⁰ Un développement plus récent des techniques 2D homo- et hétéronucléaire augmente la performance de ces techniques.

II. Lignines (Fraction A)

La technique RMN ^1H monodimensionnelle donne peu d'informations structurales (Figure 31).

¹³⁰ Robert, B. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry. In "Methods in lignins chemistry" Lin, S.Y.; Dence, C.W. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, **1992**, 250-273

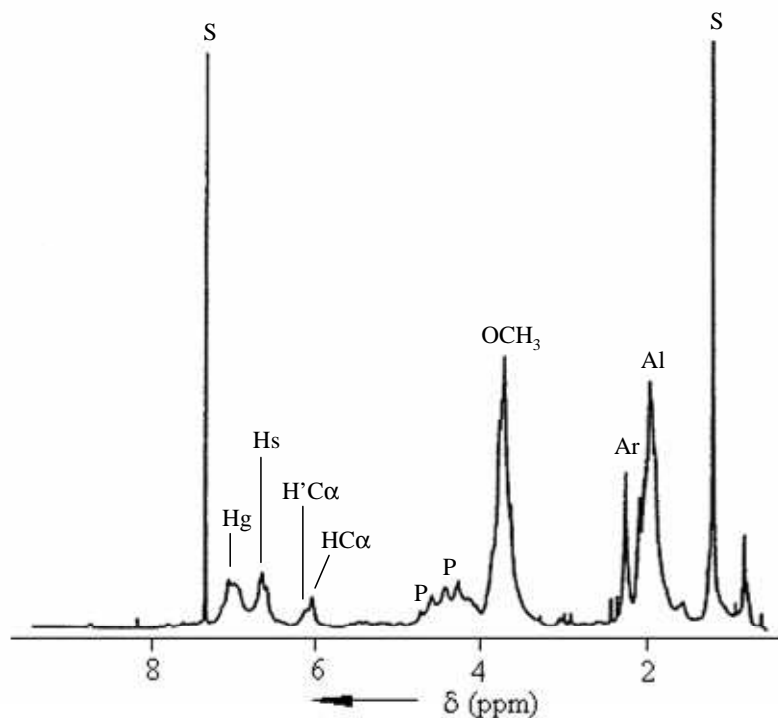


Figure 31 : Spectre RMN ^1H (CDCl_3) de la fraction lignine (Fraction A) sous forme peracétylée. S : solvant ; P : contaminant polysaccharidique ; Ar : acétates aromatiques ; Al : acétates aliphatiques ; Hs, Hg : protons aromatiques des motifs syringyles et guaïacyles ; HC α : protons des C α des chaînes latérales ; HC α , formes érythro ; H' C α , formes thréo

Ce spectre a la forme de larges enveloppes groupant une famille de protons. La comparaison des signaux des protons aromatiques syringyles (Hs) et guaïacyles (Hg) indique que cette fraction lignine possède les deux signaux Hs et Hg à des intensités approximativement égales. Ces résultats sont en accord avec des études de thioacidolyse précédentes.¹⁰⁰ En prenant en compte les travaux d'autres auteurs^{77,80,81,82,83,84}, les signaux RMN ^{13}C obtenus peuvent être attribués par comparaison avec les spectres RMN ^{13}C de nombreuses molécules synthétiques standards (Figure 7).

Le spectre RMN ^{13}C peut être divisé en trois zones distinctes : 200-165 ppm pour les carbones des groupes carbonyles, 165-100 ppm pour les carbones des groupes aromatiques et 100-50 ppm pour les carbones des chaînes latérales. La proportion de l'ensemble des carbones des groupes aromatiques (motifs S et G) s'équilibre. Dans le cas du spectre proton, on retrouve des signaux issus de contaminants polysaccharidiques. Toutes les résonances ^1H et ^{13}C sont attribuées à l'aide des spectres 2D de type HMQC et TOCSY (tableau 16).

Tableau 16 : Attribution RMN des ^1H et ^{13}C de la fraction lignine (les déplacements chimiques sont donnés en ppm avec le TMS comme référence)

N°	δ		Attributions
	^1H	^{13}C	
1	-	171	COOH des acétyles
2	-	153	S3,5
3	7,0	123	G6
4	6,9-7,0	119	G5
5	7,05	112	G2
6	6,6	104	S2,6
7	6,0	74	$\alpha(\beta\text{-O-4})^*$
8	4,75	86	$\alpha(\beta\text{-}\beta)$
9	4,6	81	$\beta(\beta\text{-O-4})^*$
10	3,9-4,3	72	$\gamma(\beta\text{-}\beta)\#$
11	4,1-4,4	63	$\gamma, \gamma(\beta\text{-O-4})^*$
12	3,7	56	OCH3
13	3,1	54	B($\beta\text{-}\beta$)
14	2,3	21	CH3 des acétyles phénoliques
15	2,0	21	CH3 des acétyles des chaînes aliphatiques

* avec deux formes érythro/thréo

axiale et équatoriale

Le choix des expériences TOCSY en remplacement de la COSY a été motivé par le très court temps de relaxation des signaux généralement observé pour les molécules de haut poids moléculaire. Elle permet en outre l'attribution de tous les spins entre eux, en fonction du choix du « spin-lock » ; la COSY accède exclusivement au ^3J . Lorsqu'on choisit convenablement le temps du « spin-lock », le transfert d'aimantation d'un spin à l'autre (spins couplés) permet de distinguer les ^3J des autres couplages. Pour cela, nous avons choisi d'abord un « spin-lock » plus court (40 ms) puis un plus long (100ms) permettant d'observer respectivement les ^3J puis les ^4J et au-delà. Dans ces conditions, nous accédons à l'ensemble du système de spin du polymère. Par combinaison des résultats obtenus par les différentes techniques RMN, les structures des lignines de bois de chêne peuvent être analysées quantitativement et qualitativement.

II.1. Structure de la chaîne latérale

Le spectre du proton 1D de lignines de hauts poids moléculaires donne toujours la même allure (Figure 31). Néanmoins, l'expérience TOCSY est un puissant outil pour analyser la structure de la chaîne latérale des lignines, puisque le couplage réseau peut donner accès au type des unités C3. Deux types majeurs d'unités C3 sont révélés dans les lignines ; la figure 32 montre un exemple de spectres obtenus :

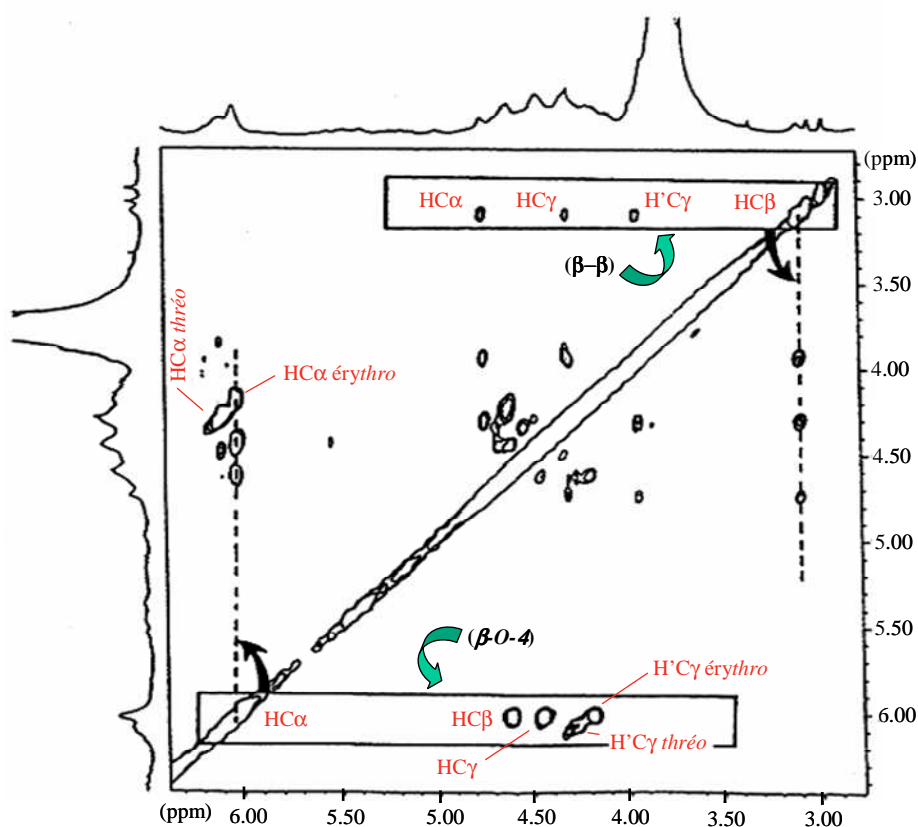


Figure 32 : Détail d'une expérience TOCSY de la fraction lignine.

Attribution des symboles aux protons : α , β , γ correspondent respectivement aux $H\alpha$, $H\beta$ et $H\gamma$.

Attribution des symboles des chaînes latérales : $(\beta-\beta)$ pour liaison pinorésinol et $(\beta-O-4)$ pour liaison $\beta-O-4$

- Les liaisons $\beta-O-4$ aryl éther (Figure 30) : on distingue les deux tâches dues respectivement aux $HC\alpha$, $HC\beta$ et les deux protons, notés $HC\gamma$, $H'C\gamma$. Ces liaisons existent sous les deux formes érythro et thréo mises en évidence sur le spectre 1D 1H (Figure 31). Ces deux formes sont révélées dans la résonance du proton lié au carbone $C\alpha$ de l'unité ; la résonance α ($HC\alpha$) de l'isomère érythro a une résonance proche de 6 ppm et le proton α de l'isomère thréo a une résonance proche de 6,1 ppm. Le rapport de ces deux isomères, déterminé à partir du spectre du proton 1D, est proche de 1. Ce type d'unités représente l'unité majeure C3 (tableau 17).

- Un autre type d'unités C3 observables est le résidu pinorésinol (Figure 30) : liaison C-C dite $\beta-\beta$. Sa présence est relevée par l'expérience TOCSY à partir de l'observation de quatre tâches de corrélation sur la carte TOCSY (Figure 32). Ces tâches présentent des déplacements chimiques caractéristiques des protons α ($HC\alpha$), β ($HC\beta$), et des deux protons γ ($HC\gamma$,

H'Cγ), reflétant les deux protons axiaux et équatoriaux de ce type de résidu. Aucune chaîne latérale libre non estérifiée n'est observée dans cette fraction lignine, telle que l'alcool coniférikique ou des structures aldéhydiques.

Tableau 17 : Détermination de la proportion des différents éléments constituant les lignines

S : unité syringyle ; G : unité guaiacyle ; β-O-4 : liaisons aryl-éther β-O-4 des chaînes latérales ; β-β : liaisons C-C des chaînes latérales

Fraction Lignines		
<i>Chaînes latérales</i>	nβ-O-4 ¹	10
	β-O-4 érythro/thréo	1,0
	nβ-β ¹	0,3
<i>Noyaux aromatiques</i>	nS ¹	8
	nG ¹	7
	S/G ²	1,1
	β-O-4/G	1,3
	β-β/G	0,05

¹ nombre de liaisons β-O-4, β-β et de motifs aromatiques G et S calculé à partir de la masse déterminée par LSIMS (Mw : 2900)

² rapport des motifs syringyls/guaiacyls

II.2. Groupes phénoliques

Deux méthodes sont utilisées pour déterminer la structure des groupes phénoliques dans les lignines. Dans un premier temps, nous avons attribué les déplacements chimiques des protons (sur le spectre 1D ¹H) caractéristiques des deux types majeurs de groupes phénoliques à savoir : groupes syringyles (Hs) et guaiacyles (Hg) sont légèrement différents (proche de 6,6 ppm pour les unités syringyles et proche de 7,1 ppm pour les unités guaiacyles). Il est possible d'observer et de quantifier la présence de ces deux groupes (Figure 31). Les déplacements chimiques ¹³C de ces deux groupes phénoliques sont également bien distincts : particulièrement le carbone lié à un proton (proche de 108 ppm pour C2 et C6 motifs syringyles, et proche de 116 ppm pour les C2 et C5 et 122 ppm pour le C6 des motifs guaiacyles). Dans un deuxième temps, nous avons pratiqué une expérience HMQC (¹H-¹³C). Ces expériences révèlent ces deux types de groupes

phénoliques. Ces spectres ne mettent pas en évidence la présence de groupes phénoliques caractérisés par la présence de trois résonances d'unités carboxyl liées à des groupes acétyles.⁸⁰

II.3. Aspect quantitatif

L'attribution de tous les protons et des carbones étant réalisée, il est alors possible de quantifier certains aspects structuraux de la molécule à savoir : le rapport entre les unités syringyles et guaiacyles et le rapport des deux chaînes latérales observées, β -O-4 aryl éther et pinorésinol (tableau 17). La quantification est déterminée à partir du spectre du proton et présente un rapport syringyle/guaiacyle de 1.1. Un tel résultat est en accord avec le rapport mesuré à partir de thioacidolyse.¹⁰⁰ Le rapport β -O-4 aryl-éther et pinorésinol est aussi déterminé pour les unités guaiacyles et est proche de 1,3 et 0,05. Le rapport (guaiacyle + 2xsyringyle)/OMe est proche de 0,8 et non 1 comme attendu (1 groupe -OCH₃ par unité G et 2 par unité S). Une telle valeur reflète des erreurs expérimentales puisque les résonances utilisées pour déterminer les rapports sont assez larges pour générer des erreurs de mesure.

Connaissant la masse molaire moyenne déterminée par la technique LSIMS (2900 Da)¹³¹, et les différents rapports observés à l'aide des spectres RMN, après l'élucidation de la structure (Tableau 17), il est possible de calculer le nombre approximatif de chaque élément structural identifié (chaînes β -O-4 aryl-éther et pinorésinol, groupes aromatiques syringyles et guaiacyles) pour une molécule moyenne de la lignine. Ces valeurs sont reportées dans le tableau 18.

¹³¹ Vivas, N., Saint-Cricq de Gaulejac, N., Bourgeois, G., Vitry, C., Pianet I., Barbe B., Glories, Y. *J. Chim. Phys.*, **1998**, 95, 430-436

Tableau 18 : Caractéristiques structurales des lignines (résultats donnés en % à partir du tableau 17)

Fraction Lignines		
<i>Substitution des noyaux aromatiques</i>	S	53
	G	47
<i>Nature des liaisons des chaînes latérales</i>	β-0-4	97
	β-β	3
<i>Structures des lignines</i>		<i>SG(β-0-4)</i>

III. Identification des lignanes dans le bois de chêne *Q. petraea*

Les lignanes appartiennent à la classe de métabolites secondaires produits par dimérisation oxydative de deux unités phénylpropanes. Ils sont présents le plus souvent dans la nature sous leur forme libre tandis que leurs dérivés glycosilés sont présents de façon minoritaire. Le terme « lignane » est appliqué aux dimères optiquement actifs des phénylpropanoïdes liés aux chaînes latérales par l'atome de carbone central. Les lignanes sont le plus souvent présents sous leur forme libre dans la nature, tandis que leurs dérivés glycosilés sont minoritaires.

Les lignanes sont présents essentiellement dans les racines, les rafles, les pépins, les feuilles, les fruits et les arbres. Les concentrations importantes en lignanes (6-24%) ont été trouvées récemment dans les neuds des arbres *Picea abies*.¹³²

Les lignanes jouent probablement un rôle important dans la défense des plantes contre des pathogènes biologiques, du fait de leurs propriétés antimicrobiennes, antifongiques, antivirales, antioxydantes et insecticides. De plus, ils peuvent participer au développement et à la croissance des plantes.¹³³ En plus de leurs rôles dans la nature, les lignanes possèdent aussi des activités pharmacologiques incluant des activités anti-tumorales, anti-inflammatoires, cardiovasculaires¹³⁴, antioxydantes¹³⁵ et antivirales.¹³⁶

¹³² Wilfor, S, Hemming, J., Reunanen, M., Eckerman, C., Holmbom, B. *Holzforschung*, **2003**, 57, 27-36

¹³³ Ayres, D., Loike, J.D. *Chemistry and pharmacology of natural products. Lignans : chemical, biological and clinical properties*, Cambridge University Press, Cambridge, **1990**

¹³⁴ Ghisalberti, E.L. *Phytomedicine*, **1997**, 4, 151-166

¹³⁵ Yamauchi, S., Ina, T., Kirikihira, T., Masuda, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, 68, 183-192

¹³⁶ Charlton, J.L. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 1447-1451

La présence de lignanes augmente la glutathione dans les tissus et ainsi préserve les cellules contre des dégâts oxydatifs.

La recherche de leur présence dans le bois de chêne est motivée par le fait que les lignanes ont des couleurs caractéristiques ; à titre d'exemple, le lyonirésinol présente une couleur rouge vermillon.

Nous avons étudié cinq douelles différentes présentant des tâches brunes (N1, N2, N3, N4, N5) et une douelle témoin (sans tâches). Nous avons graté chaque douelle à une profondeur de 7 mm (jusqu'à disparition des tâches brunes). Les macromolécules sont fractionnées et nous avons retenu la Fraction A pour les analyses.

La figure 33 présente les analyses obtenues par chromatographie en phase gazeuse des produits extraits de la fraction B dans le cas de l'échantillon Témoin. Le profil chromatographique est le même pour les différents échantillons de bois étudiés (à savoir la douelle témoin et les 5 douelles présentant des tâches : N1, N2, N3, N4, N5).

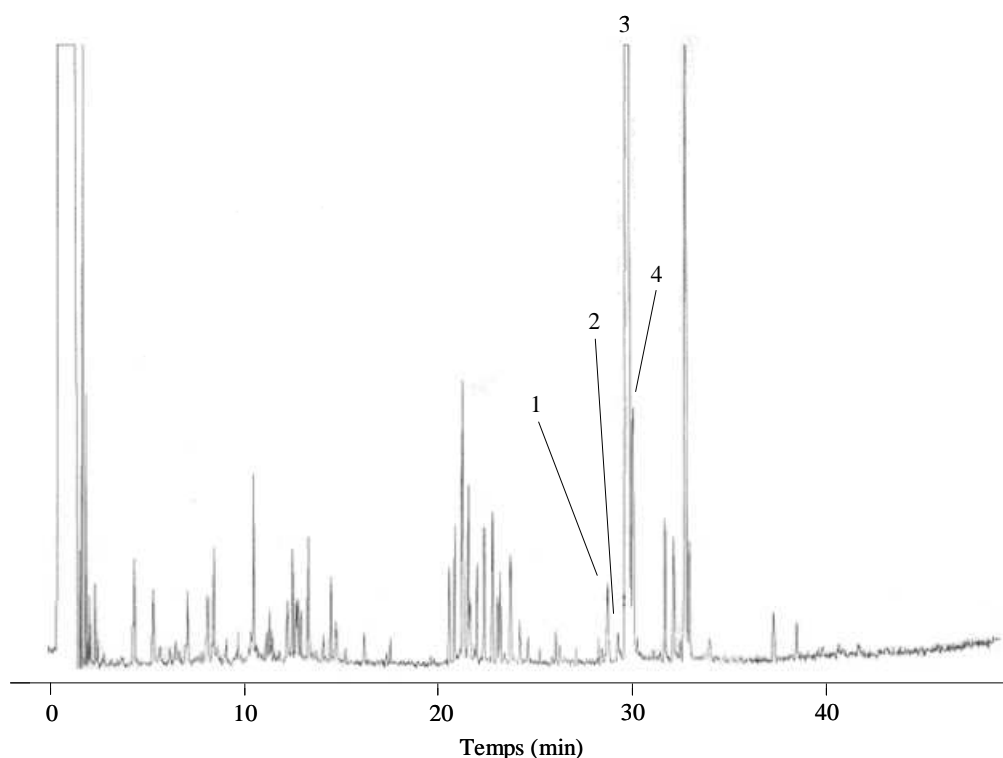


Figure 33 : Chromatogramme GC des lignanes extraits du bois de chêne (Echantillon Témoin).

Les fragmentations (obtenues par spectrométrie de masse) (Figure 34) de certains dérivés triméthylsilylés ont été comparées avec celles publiées dans la littérature^{137,138} dans le but d'identifier certains pics obtenus par GC.

A partir de la fraction soluble dans le dichlorométhane, nous avons pu identifier quatre lignanes présents dans le bois de cœur *Q. petraea* : deux isomères du lyonirésinol, l'isolaricirésinol et le sécoisolaricirésinol (Figure 34).

Le pic 1 a été identifié comme l'isolaricirésinol ; le spectre de masse du dérivé triméthylsilylé (Figure 34) présente les mêmes ions caractéristiques à m/z 648, 558, 527, 468, 455, 437, 424 et 209 comme reporté dans la littérature.^{138,139,140}

Un autre lignane a été identifié comme étant le sécoisolaricirésinol (pic 2) grâce à son spectre de masse (Figure 34) et ses fragments caractéristiques : m/z 650, 560, 470, 424, 403, 350, 261, 209, 179 (décrits par Sicilia *et al.*¹³⁷).

Le fragment à m/z 209 est attribuable à la structure de l'ion tropylium (ion stable). Il peut être le pic de base de certains lignanes contenant deux moitiés méthoxytriméthylsilyl éther benzyl avec soit C7 soit C-7' contenant un ou deux hydrogènes.

Cet ion m/z 209 peut se déplacer à 239 par l'addition d'un second groupe « méthoxy » à la chaîne aromatique.

Les pics 3 et 4 sont attribués au lyonirésinol et son isomère. Leurs ions (Figure 34) à m/z 708, 619, 587, 515, 354, 289, 239 sont attribués à ce lignane. Le lyonirésinol a été identifié par Seikel *et al.*¹⁴¹ dans le bois *Q. rubra* et par Nabeta *et al.*¹⁴² dans le bois *Q. robur*. Vivas¹⁹ a caractérisé ce lignane dans les extraits de bois *Q. petraea*, puis il a démontré la présence des deux isomères dans ces extraits.

Nous démontrons ainsi la présence de lignanes dans les extraits de *Q. petraea*. Ils sont solubles en milieu hydroalcoolique et nous pouvons émettre l'hypothèse que nous pouvons les retrouver dans les vins rouges élevés en barriques.

¹³⁷ Sicilia T., Niemeyer, H.B., Honig D.M., Metzler, M. *J. Agric. And Food Chem.*, **2003**, 51, 1181-1188

¹³⁸ Meagher, L.P., Beecher, G.R., Flanagan, V.P., Li, B.W. *J. Agric. And Food Chem.*, **1999**, 47, 3173-3180

¹³⁹ Bannwart, C., Adlercreutz, H., Wähälä, K., Brunow, G., Hase, T. *Clin. Chim. Acta*, **1989**, 180, 293-302

¹⁴⁰ Ekman, R. *Holzforschung*, **1976**, 30, p. 79-85

¹⁴¹ Seihel, M.K., Hostettler, F.D., Niemann, G.J. *Phytochemistry*, **1971**, 19, 2249-2251

¹⁴² Nabeta, K., Yonekubo, J., Miyake, E. *Mokuzai Gakkaishi*, **1986**, 32, 921-927

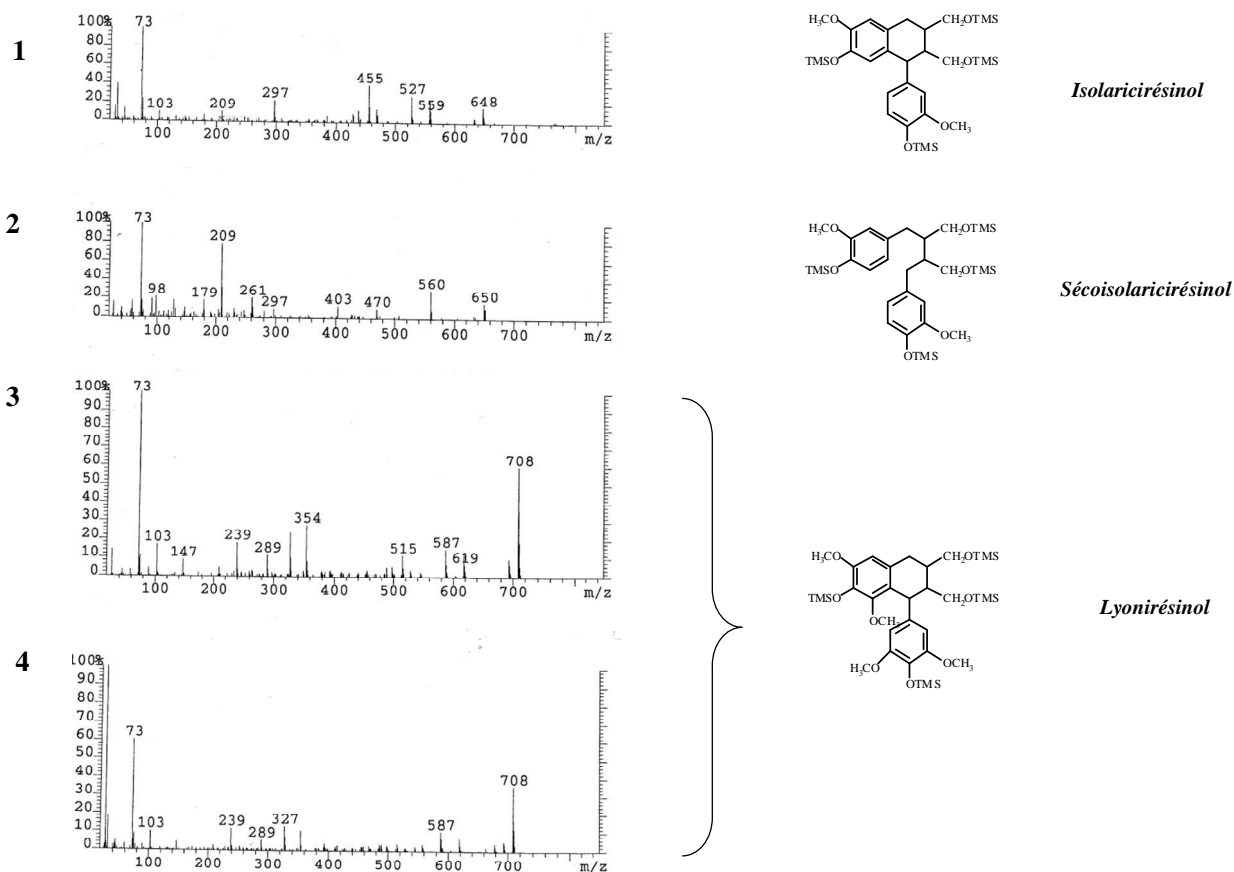


Figure 34 : Spectres de masse et structures des quatre lignanes (pics numérotés 1, 2, 3 et 4 sur la figure) extraits du bois de chêne.

Ces quatre composés sont présents dans l'échantillon témoin et dans les 5 douelles (N1, N2, N3, N4 et N5). Mais leur teneur est supérieure dans les douelles N1, N2, N3, N4 et N5. Le témoin possède une teneur en lyonirésinols proche de 26,4 mg/g alors que les douelles tâchées ont une teneur en lyonirésinols totaux entre 45,7 et 74 mg/g (Tableau 19).

Tableau 19 : Teneur en lyonirésinol dans différents bois de chêne *Q. petraea* (un témoin et 5 douelles présentant des tâches) (les résultats sont exprimés en mg/g)

	Témoin	Ech.N1	Ech.N2	Ech.N3	Ech.N4	Ech.N5
Lyonirésinol 1	25	43	47	70	58	66
Lyonirésinol 2	1,4	2,8	2,9	4	3	4,2
Isolaricirésinol	0,46	0,93	0,96	1,1	1	1,2
Sécoisolaricirésinol	0,16	0,3	0,33	0,38	0,34	0,38
Σ Lyonirésinol	26,4	45,8	49,9	74	61	70,2

Les lignanes ont une couleur rouge vermillon¹⁹ pour certains comme le lyonirésinol et ils peuvent probablement participer à la couleur du bois et de ses extraits. Dans le cas étudié, les douelles N1, N2, N3, N4, N5 présentent une teneur en lyonirésinol qui permettent de penser qu'elles présenteront un aspect plus coloré que le témoin. Ceci est confirmé par les valeurs d'absorbance à 520 nm obtenues pour chaque échantillon (Tableau 20).

Tableau 20 : Teneur totale en lyonirésinol (les résultats sont exprimés en g/g) et valeurs d'absorbances à 520 nm dans différents bois de chêne *Q. petraea* (un témoin et 5 douelles présentant des tâches).

	Témoin	Ech.N1	Ech.N2	Ech.N3	Ech.N4	Ech.N5
Σ Lyonirésinol	26,4	45,8	49,9	74	61	70
Abs. 520	0,055	0,11	0,115	0,122	0,119	0,12

Le témoin a une teneur plus faible en lyonirésinol que les 5 autres douelles mais également une absorbance à 520 nm plus faible. Les douelles présentant des tâches ont des teneurs importantes en lyonirésinol mais également des valeurs d'absorbance à 520 nm relativement plus importantes que le témoin.

Ces résultats nous permettent de dire que la couleur du bois de chêne *Q. petraea* est étroitement liée à la teneur en lignanes et notamment en lyonirésinol. Les autres lignanes identifiés (sécoisolaricirésinol et isolaricirésinol) sont présents dans les extraits de bois de chêne

(témoin et douelles présentant des tâches) mais de façon plus minoritaires que les deux isomères du lyonirésinol.

Nous avons tenté d'extraire d'éventuels lignanes glycosilés présents dans des extraits de bois de chêne. Mais nous n'avons identifié aucun composé de ce type dans nos extraits. Donc, cela suggère que les seuls lignanes présents dans les extraits de bois de chêne sont sous forme libres uniquement.

IV. Structures des lignanes (Ln)

La fraction totale lignane est trop complexe pour permettre une élucidation de la structure des composés présents. Néanmoins, après une seconde étape de purification, nous avons focalisé les analyses uniquement sur la fraction majoritaire des deux lignanes Ln1 et Ln2 (60 :40, w/w).

IV.1. Chaînes latérales

Trois différents types de chaînes sont présents :

* Les chaînes cinnamaldéhydes (CHO-CH=CH-). Ces chaînes sont présentes dans les deux fractions lignanes isolées Ln1 et Ln2.

La présence de ces deux groupes CHO est révélée par la RMN du proton (9.8 et 9.6 ppm pour Ln1 et Ln2 respectivement) et RMN ^{13}C (192,0 et 178,6 ppm). Le spectre DEPT (Figure 35) et la corrélation ^1H - ^{13}C sont en accord avec ces attributions (Figure 36).

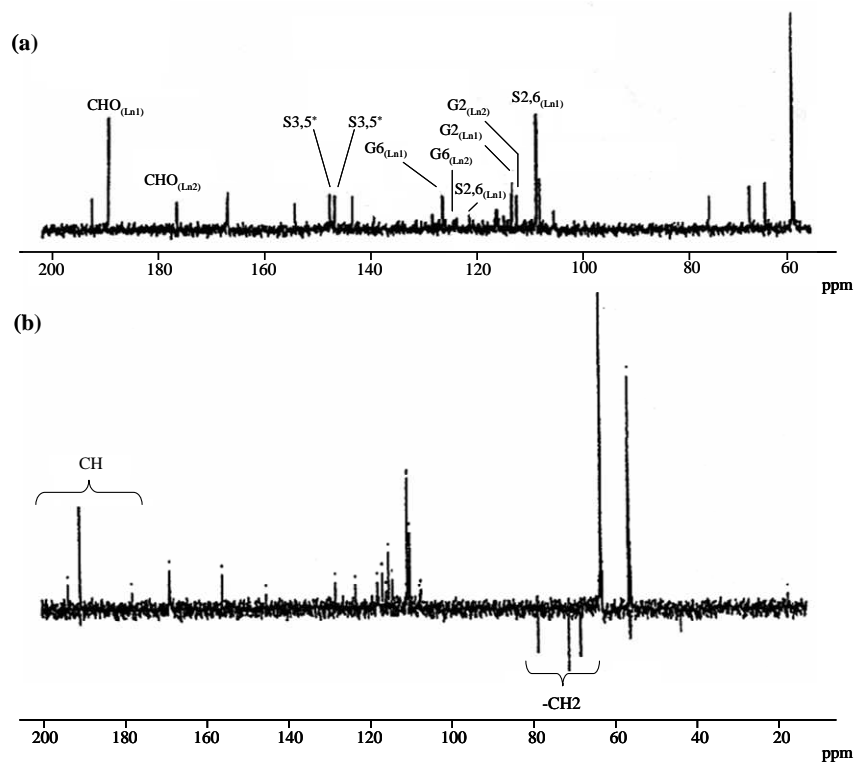


Figure 35 : Spectres ^{13}C (a) et DEPT (b) (* attribution réversible Ln1/Ln2)

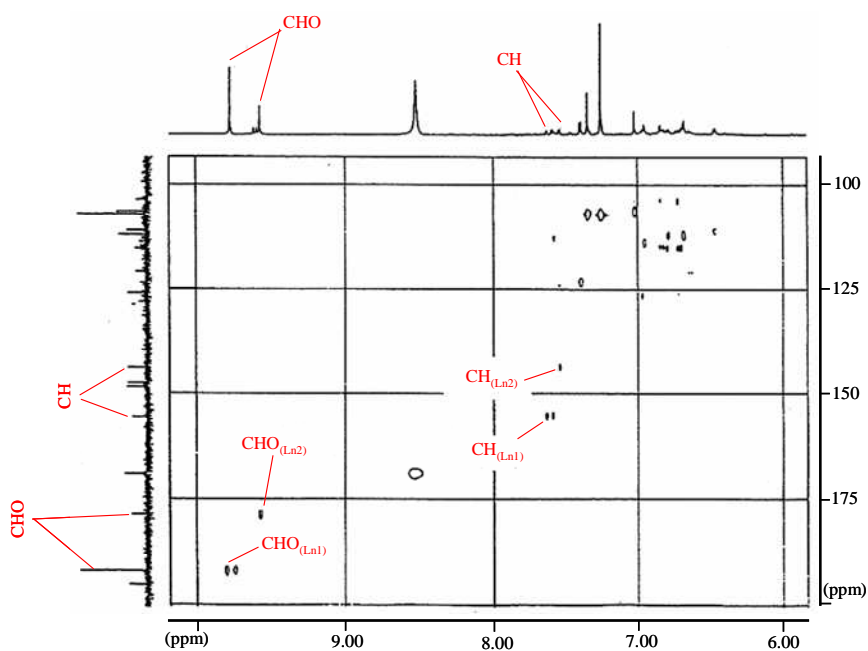


Figure 36 : Attribution par corrélation inverse ^1H - ^{13}C des chaînes latérales CHO-CH=CH- de Ln1 et Ln2

La présence de deux CH éthyléniques très déblindés est caractéristique des deux carbones α d'une chaîne de type cinnamaldéhyde ($\delta^{13}\text{C}$: 155,5 et 144,0 ; $\delta^1\text{H}$: 7,6 et 7,5 pour Ln1 et Ln2)

respectivement, Figure 35). On observe une corrélation entre $\text{CH}\alpha$ et $\text{CHO}\gamma$ sur la carte TOCSY avec un temps de mélange $t_m=100$ ms (Figure 37), indiquant une liaison entre les deux protons dans $\text{Ln}2$.

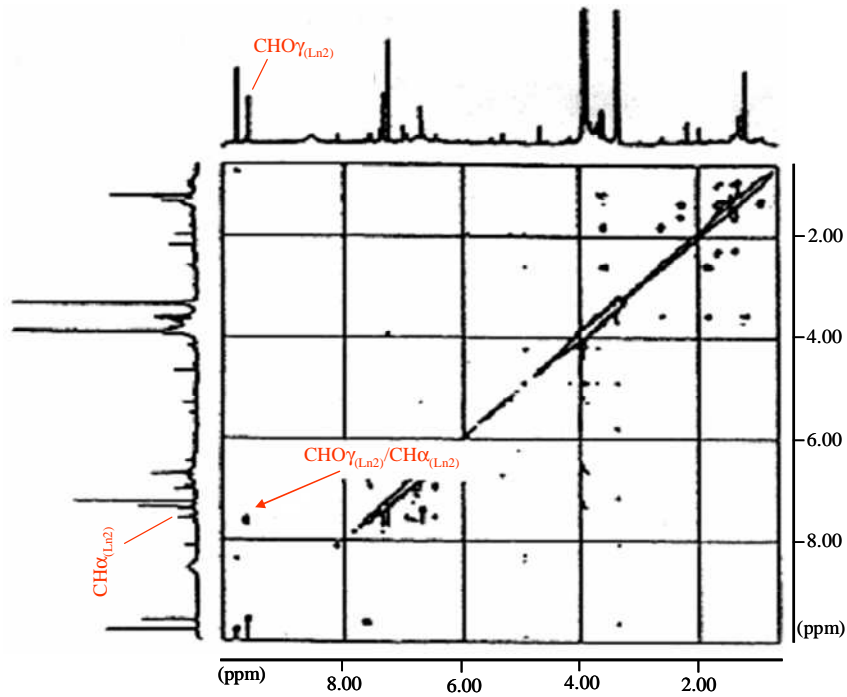


Figure 37 : Spectre TOCSY réalisé pour un temps de mélange t_m de 100 ms de la fraction $\text{Ln}2$.

Enfin ces protons appartenant au $\text{CH}\beta$ résonnent autour de 7 ppm. Dans le spectre COSY (Figure 38), on observe une corrélation entre $\text{CHO}\gamma$ et $\text{CH}\beta$ de $\text{Ln}2$.

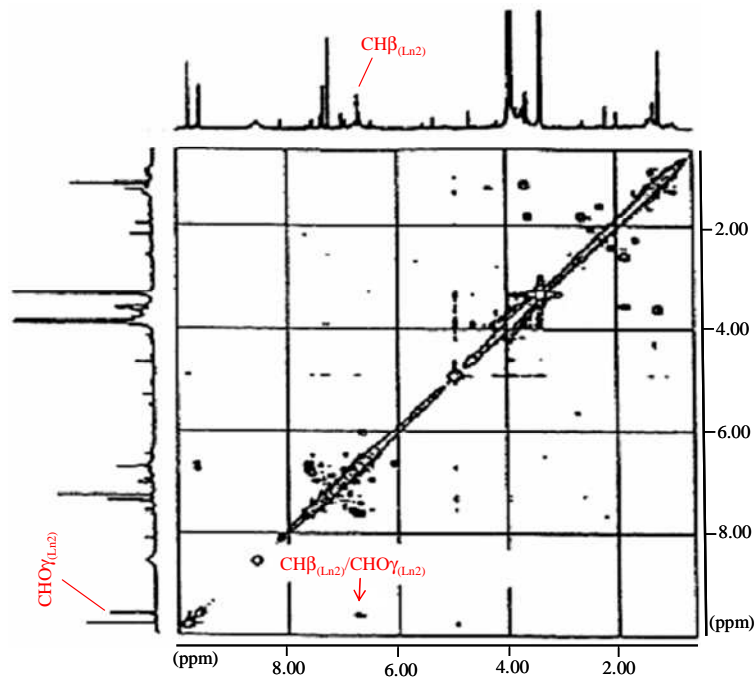


Figure 38 : Spectre COSY $^1\text{H}-^1\text{H}$

Ce type de couplage n'est pas révélé pour Ln1, ce qui peut suggérer l'absence d'une telle structure dans Ln1. Par conséquent, la présence d'une unité de type CHO-φ est possible, le CH résonnant à 155,5 ppm reste à être expliqué. En général, ce dernier type de structures peut être attribué à la présence d'artefacts dans la préparation de la lignine, dus à l'oxydation de l'alcool conifénilique, à la méthode de préparation de l'échantillon par exemple ou au solvant utilisé durant les expériences RMN.^{78,143}

* Chaînes φ-OCH₂-φ. Ces chaînes sont révélées par les déplacements chimiques du proton et ¹³C : δ ¹H, 4,7 ppm mesuré à partir du spectre et 5,3 ppm calculé en utilisant les règles d'additivité de Shoolery ; δ ¹³C, 64,3 ppm. Cette attribution est alors confirmée par l'absence de couplage du CH₂ avec d'autres protons (Figure 39).

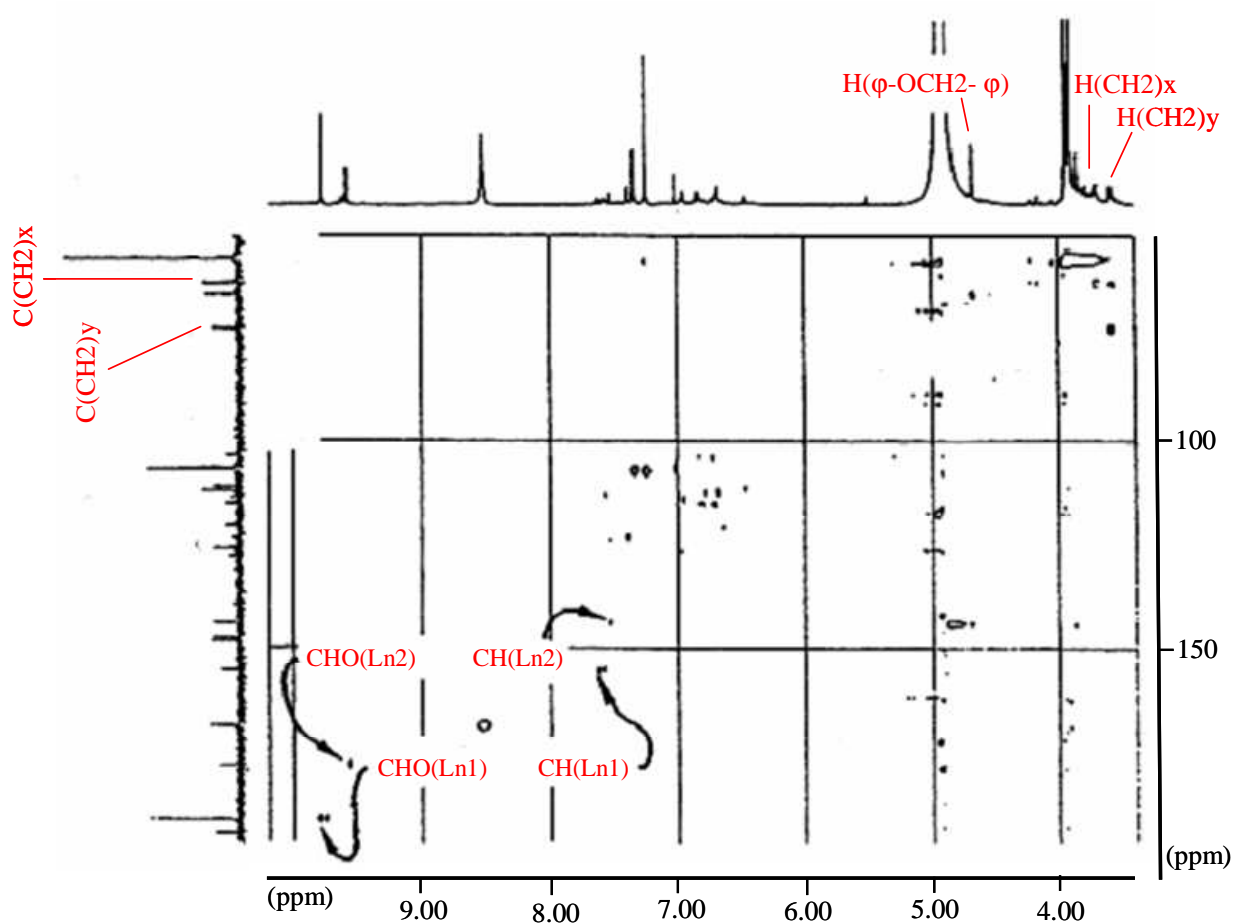


Figure 39 : Spectre de corrélation inverse ¹H-¹³C permettant l'attribution des principales chaînes latérales de Ln1 et Ln2

¹⁴³ Lewis, N.G., Newman, G., Ripmeister, J. *Macromolecules*, **1987**, 20, 752-1

* Autres chaînes : Le spectre DEPT (Figure 358) met en évidence trois types de CH₂. L'un d'entre a été attribué à une chaîne ϕ -OCH₂- ϕ (δ ¹H, 4,7 ppm et δ ¹³C, 64,3 ppm). Les deux autres sont reliés à des protons moins déblindés (δ ¹H, 3,7 et 3,6 ppm ; δ ¹³C, 61,2 et 72,5 ppm respectivement pour chaque CH₂). Ces CH₂ sont probablement impliqués dans des chaînes latérales du type β -O-4 (Figure 40).

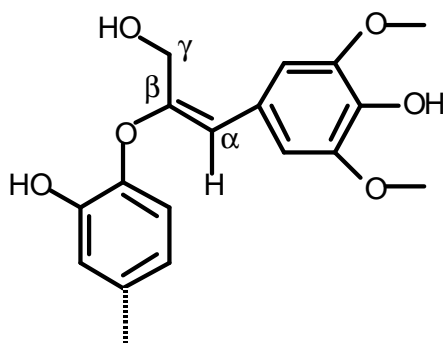


Figure 40 : Structure hypothétique

Dans ce cas particulier, le proton du C α résonnerait autour de 7 ppm et serait observable sur les 2D ¹H-¹³C. Ce proton est corrélé à un carbone situé à 106.5 ppm. La nature du CH de l'ensemble est confirmée par le spectre DEPT.

IV.2. Groupes aromatiques ou phénoliques

Deux types de groupes aromatiques sont présents : les groupes syringyles et guaiacyles. Il n'y a aucun groupe de type hydroxyphényle détecté.

* Les unités syringyles (Figures 35-41) sont facilement identifiables à l'aide de la RMN du proton. Les protons 2 et 6 résonnent en singulet à la même fréquence. On observe deux groupes majeurs syringyles, l'un résonnant à 7.2 ppm et l'autre à 7,3 ppm. En prenant en compte leur aire, le premier appartient à Ln 1 et le second à Ln 2. Grâce à la corrélation ¹H-¹³C inverse, les carbones 2 et 6 sont aussi identifiés : 107,1 et 107,2 ppm respectivement pour Ln 2 et Ln 1. Ces valeurs de déplacements chimiques sont tout à fait en accord avec celles observées pour ce type d'unités. Les carbones quaternaires 3 et 5 qui sont magnétiquement équivalents, résonnent à 148,6 ppm et 147,6 ppm. Néanmoins, avec des expériences de corrélations directes, ils ne peuvent pas être attribués. Des expériences de type HMBC permettent d'attribuer ces carbones.

Finalement, il a été calculé que les carbones 1 et 4 résonneraient entre 120 et 140 ppm. Des carbones quaternaires sont présents dans cette région, mais ne peuvent pas être attribués pour les mêmes raisons.

* Les unités guaiacyles (Figures 35-41) sont attribuées grâce à leurs déplacements chimiques caractéristiques pour ce type d'unités. A l'aide du spectre RMN ^{13}C , nous avons trouvé C6 à 126,1 et 123,5 ppm respectivement pour Ln 1 et Ln 2; C2 à 112,1 et 111,1 ppm pour Ln 1 et Ln 2 respectivement. La corrélation inverse ^1H - ^{13}C confirme les attributions des C2 ; dans le cas des C6, le signal est plus faible, en particulier pour Ln 2, ce qui ne permet pas de visualiser les tâches de corrélation.

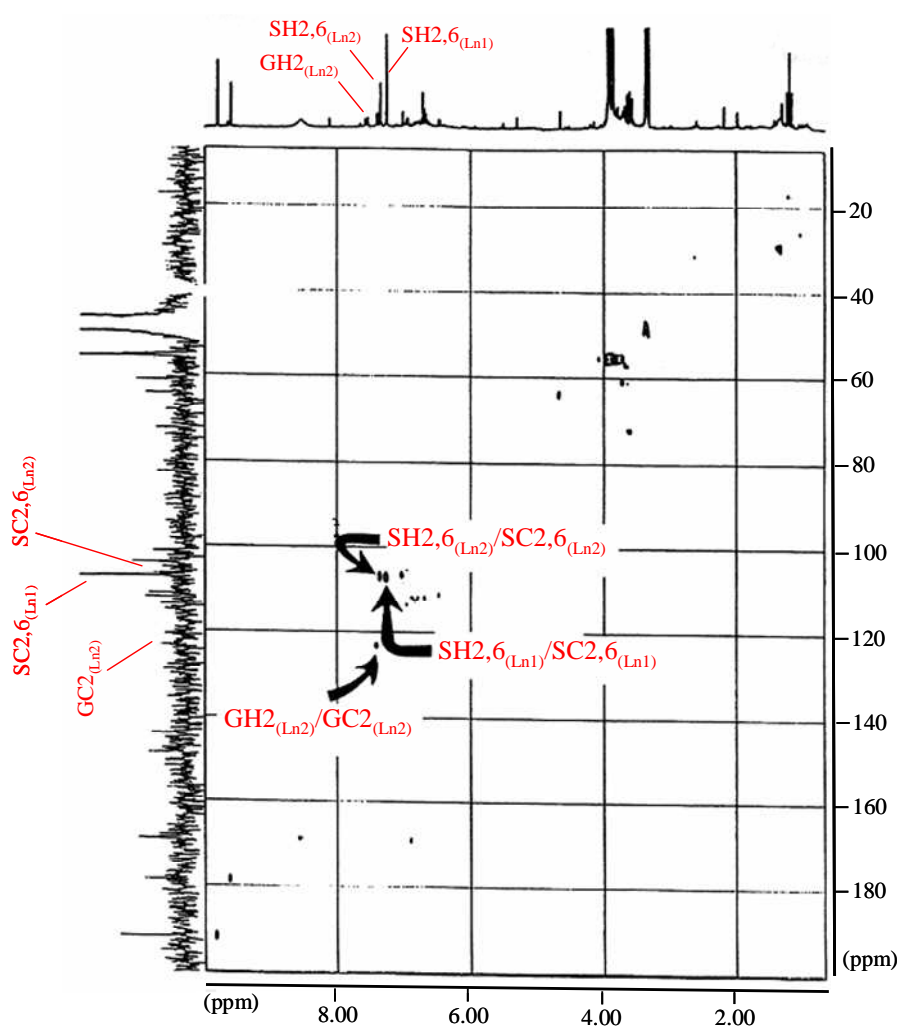


Figure 41 : Détail d'une corrélation inverse ^1H - ^{13}C montrant les unités syringyles et guaiacyles de Ln1 et Ln2

V. Conclusion

Nous présentons une étude structurale complète des lignines et lignanes extraits du bois de coeur de *Quercus robur* et *Q. petraea*. La RMN ^1H et ^{13}C homo- et hétéronucléaire a été employée, et particulièrement les techniques TOCSY et HMQC.

Nous avons également mis en évidence que la couleur du bois de chêne *Q. petraea* est étroitement liée à la teneur en lignanes et notamment en lyonirésinol. Ils sont solubles en milieu hydroalcoolique et nous pouvons émettre l'hypothèse que nous pouvons les retrouver dans les vins rouges élevés en barriques.

Partie expérimentale du chapitre IV

I. Matériels

Les échantillons sont pris dans le bois de cœur de *Q. petraea* provenant de la région de l'Allier (France) et de *Q. robur* provenant de la région du limousin (France). Leurs caractéristiques botaniques sont contrôlées.¹⁴⁴ Deux séries d'échantillons sont prises de bois provenant des mêmes régions mais de différents fournisseurs. Les arbres d'où proviennent les deux séries d'échantillons *Q. petraea* sont âgés d'environ 150-175 ans et ceux d'où proviennent les échantillons *Q. robur* sont âgés de 80 à 110 ans. Les échantillons représentant seulement la partie bois de cœur sont broyés de façon à obtenir de la sciure. Aucune distinction n'est faite entre les différents domaines du bois de cœur : près de l'aubier, au centre de la croissance ou près du milieu de l'arbre. Ils sont tous mélangés et constituent une moyenne représentative de l'échantillon de l'ensemble du bois de cœur.

II. Extraction des lignines

La fraction lignine est obtenue comme décrit dans le chapitre I.

III. Extraction et identification par GC/MS des lignanes issus du bois de chêne

Q.petraea

Nous avons étudié 5 douelles différentes présentant visuellement des tâches brunes (N1, N2, N3, N4, N5) et une douelle témoin non tâchée (Témoin). Nous avons graté à 7 mm de profondeur jusqu'à disparition des tâches. Nous avons fractionné les macromolécules (fraction A : lignines ; fraction B : polysaccharides ; fraction C : ellagitanins) selon la méthode mise au point et décrite dans le chapitre I.

¹⁴⁴ Jacquot, C., Trenard, Y., Diriol, D. Atlas d'anatomie des bois angiospermes (essences feuillues), **1973**, Tome 1-Texte, Tome II-Planches. CTBA et CNRS (Eds.), Paris

Nous nous sommes intéressés à la fraction « lignines ».

III.1. Lignanes libres

200 mg de cette fraction sont redissous dans 5 ml d'eau distillée. 3 mg de cholestérol (étalon interne) sont ajoutés. Puis nous avons fait une extraction liquide-liquide afin d'extraire les lignanes présents dans cette fraction. Nous avons extrait trois fois à l'aide du dichlorométhane. Les trois phases organiques collectées sont réunies ; la phase organique obtenue est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée puis évaporée à sec à l'aide de l'évaporateur rotatif, à température ambiante afin de ne pas détruire les composés volatils.

Le résidu final est triméthylsilylé à l'aide de 1 ml de *N,O*-bis(triméthylsilyle)trifluoroacétamide (BSTFA+1% TMCS) et 800 µl de pyridine (grade GC) dans un vial de 2 ml fermé par un bouchon téfloné hermétiquement et placé à 70°C pendant 30 minutes. L'extrait silylé est ensuite analysé par GC/MS.

Les conditions d'analyses chromatographiques sont les suivantes :

- Colonne DBXLB (J&W scientific USA) : 30 m x 0,25 mm id x 0,25 µm
- Programmation de températures : 60°C (pendant 1 min) jusqu'à 120°C en raison de 50°C/min puis jusqu'à 200°C en raison de 4°C/min et 320°C en raison de 2°C/min
- Température de l'injecteur : 250°C
- 1 µl sont injectés en mode « splitless »

La détection est réalisée avec un spectromètre (type magnétique) : VG-Autospec EQ (Micromass, Manchester, UK), fonctionnant en mode électron avec une énergie d'ionisation de 70 eV et la température de la ligne de transfert est programmée à 230°C.

La quantification est réalisée en mesurant l'aire de chaque pic puis est exprimée en équivalent cholestérol grâce à la courbe d'étalonnage. Les composés ayant de faibles teneurs (pics difficilement intégrales) sont notés « Tr. » : présents sous forme de traces.

Chaque étape de l'expérience est répétée trois fois afin d'étudier la reproductibilité de la méthode.

III.2. Lignanes glycosilés

200 mg de la fraction « lignines » sont extraits avec 30 ml d'un mélange éthanol/eau (80 :20, v/v) pendant 4 heures à 55°C sous agitaion selon la méthode de Sicilia *et al.*¹³⁷ L'extrait éthanolique est filtré et concentré à 10 ml grâce à l'évaporateur rotatif.

Les lignanes glycosilés sont hydrolysés soit à l'aide d'enzymes ou d'acide. Nous avons choisi l'hydrolyse acide. On introduit 3 ml de l'extrait concentré et 270 µl d'acide chlorhydrique concentré ; on agite le mélange pendant 4 heures à 95°C. On ajoute 3 ml d'eau et on centrifuge à 3000 rpm pendant 3 min.

Le surnageant de la centrifugation est extrait trois fois avec un mélange acétate d'éthyle/n-hexane (1 :1, v/v) ; à chaque extraction, le mélange phase aqueuse-phase organique est centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min pour améliorer et accélérer la séparation des phases. Les phases organiques sont collectées, réunies, sont séchées grâce à du sulfate de sodium anhydre puis évaporées à sec à l'aide de l'évaporateur rotatif.

Le résidu final est redissout dans 0,5 ml d'acétonitrile puis silylé à l'aide de 1 ml de *N,O*-bis(triméthylsilyle)trifluoroacétamide (BSTFA+1% TMCS) et 800 µl de pyridine (grade GC) dans un vial de 2 ml fermé par un bouchon téfloné hermétiquement et placé à 70°C pendant 30 minutes. L'extrait silylé est ensuite analysé par GC/MS.

Les conditions d'analyses chromatographiques sont les suivantes :

- Colonne DBXLB (J&W scientific USA) : 30 m x 0,25 mm id x 0,25 µm
- Programmation de températures : 60°C (pendant 1 min) jusqu'à 120°C en raison de 50°C/min puis jusqu'à 200°C en raison de 4°C/min et 320°C en raison de 2°C/min
- Température de l'injecteur : 250°C
- 1 µl sont injectés en mode « splitless »

La détection est réalisée avec un spectromètre de masse (type magnétique) : VG-Autospec EQ (Micromass, Manchester, UK), fonctionnant en mode électron avec une énergie d'ionisation de 70 eV et la température de la ligne de transfert est programmée à 230°C.

IV. Extraction et purification des lignanes Ln1 et Ln2

100 g de sciures sont extraits après deux mois à 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) à l'aide d'une solution hydroalcoolique (12% vol. EtOH, 5 g/l d'acide tartrique, NaOH pour ajuster le pH à 3,5). La solution est ensuite filtrée et évaporée sous vide (40°C). L'extrait sec est placé dans très peu d'eau et déposé en tête d'une colonne remplie de gel LH20 (Pharmacia, colon ne 80x3 cm). L'échantillon est élué successivement avec de l'eau (1 l), du méthanol+20% d'eau (1 l) et finalement avec 100% de méthanol (1 l). La dernière fraction est collectée et le méthanol est évaporé sous vide ; le résidu sec est alors placé dans 100 ml d'eau et est extrait avec du dichlorométhane (2x100 ml puis 1x50 ml). Le dichlorométhane est ensuite évaporé sous vide et l'extrait final est lavé avec du chloroforme (3x50 ml). La fraction est ensuite purifiée avec de l'eau (3x50 ml). Après chaque étape, le précipité est centrifugé (3500 rpm, 15 min). La fraction Ln ainsi obtenue, correspondant au précipité avec l'eau, est congelée à -20°C . Puis une seconde étape de purification est réalisée dans le but de séparer les deux principaux lignanes pour des études RMN. La fraction Ln ainsi obtenue est analysée par HPTLC (cellulose) avec chloroforme/éthyl acétate/acide formique (50 :40 :10, v/v/v). Après migration, la lecture spectrométrique à 340 nm révèle l'existence de six bandes distinctes Rf : 1 (0,17), 2 (0,31), 3 (0,35), 4 (0,51), 5 (0,62), 6 (0,80). Les couleurs de ces bandes varient d'écarlate à orange. Chaque bande est récupérée de la phase stationnaire par élution au MeOH. Après centrifugation, les produits sont introduits en tête de colonne C18. L'élution est réalisée avec de l'eau, puis MeOH/eau (1 :1, v/v) puis MeOH. La fraction méthanol est collectée, séchée sous vide ; puis précipitée avec de l'eau puis lyophilisée. Le spectre UV-Visible des fractions 1-4 présente un double épaulement à 330 nm et 380 nm. Les deux dernières fractions, 5 et 6, présente un seul épaulement à 340 nm. Toutes les fractions collectées absorbent à 280 nm. La pureté chromatographique des échantillons est vérifiée par analyses HPLC (solvant : dioxane/eau, 1 :1, v/v). Seule la fraction 5, la plus abondante, est chromatographiquement pure. Les autres fractions requièrent d'autres purifications. La fraction 5 est, par conséquent, étudiée en utilisant les techniques LSIMS et RMN. La bande purifiée consiste en un mélange 60/40 de deux lignanes. Les masses moléculaires ont été déterminées : 463 (2 ou 3 unités, Ln 1) et 610 (3 ou 4 unités, Ln 2) par LSIMS en mode positif. Il n'est pas possible de séparer ces deux molécules dans nos conditions, probablement dû à leurs structures similaires.

V. Expériences RMN

Tous les spectres RMN 1D et 2D sont réalisés à l'aide d'un appareil Bruker DPX 400 équipé d'une sonde à large bande à gradient inverse de 5 mm. Tous les déplacements chimiques des protons et carbones (exprimés en ppm) sont donnés à partir d'une référence externe qui est le TMS dans le méthanol deutéré.

V.1. Préparation de l'échantillon

Les différentes fractions de lignines sont préalablement peracétylées. 50 mg de chaque fraction sont dissouts dans 20 ml d'un mélange volume à volume de pyridine distillée et d'anhydride acétique, sous azote. La peracétylation se déroule à température ambiante et à l'obscurité durant 48 h. Le mélange est ensuite versé dans un bécher contenant de la glace fondante et abandonné 12 h à 4°C. La lignine peracétylée est alors collectée par centrifugation (2500 tpm, 15 min) et lavée à 5 reprises par de l'eau ultrapure et centrifugée à chaque opération. Le précipité est ensuite séché à l'évaporateur rotatif (<30°C). Le résidu sec est alors repris par du chloroforme distillé et évaporé à sec, l'opération étant répétée trois fois. Les échantillons sont conservés au congélateur avant les analyses.

Les différentes fractions peracétylées sont dissoutes dans le chloroforme deutéré, ou dans le dichlorométhane deutéré pour les fractions natives (Ln). 20 mg de chaque fraction sont solubilisés dans 0.6 ml de solvant.

V.2. Les spectres RMN

Les spectres proton sont habituellement obtenus en utilisant les paramètres suivants : une largeur spectrale de 4800 Hz (12 ppm), une largeur d'impulsion de 7 μ s, un temps de répétition de 7.4 s (3.4 s pour le temps d'acquisition et 4 s pour le délai entre les impulsions) et 64 scans.

Les spectres ^{13}C sont obtenus en utilisant un angle d'impulsion de 90° (8 μ s). Le temps de répétition est proche de 2 s (0,5 s pour le temps d'acquisition et 1,5 s pour le délai entre les impulsions).

V.3. Les expériences ^1H - ^1H

Les spectres TOCSY sont enregistrés dans une fenêtre de 4800 Hz en utilisant une matrice LKX512. La période de « spin-lock » MLEV-17 est fixée à 40 et 100 ms.

V.4. Les expériences ^1H - ^{13}C

Les expériences HMQC sont réalisées en utilisant un champ de gradient B_0 avec les paramètres suivants : les fenêtres F2 sont proches de 4800 Hz (12 ppm) et la fenêtre F1 de 22 000 Hz (210 ppm) avec une matrice LKX256.

CHAPITRE V

Interaction entre les flavan-3-ols des vins et les aldéhydes du bois de chêne : formation des polymères par additions nucléophiles

Introduction

Les proanthocyanidols extraits du raisin (Figure 42) sont responsables de la sensation d'astringence des vins rouges. Ce sont des polymères d'unités flavan-3-ols avec des liaisons C4-C6 ou C4-C8. Le vin vieilli en fûts de chêne durant 12 à 18 mois est une procédure fréquemment utilisée par les viticulteurs dans le but d'améliorer la qualité des vins. Durant cette période, le bois de chêne transfère des aldéhydes phénoliques (la vanilline et le syringaldéhyde) et furaniques (le furfuraldéhyde, l'hydroxyméthylfurfuraldéhyde, le méthyl-5-furfuraldéhyde) ainsi que les ellagitanins au vin, qui contribuent aux propriétés organoleptiques des vins. Les sources de ces aldéhydes, dans le bois de chêne toasté, sont les lignines et polysaccharides.¹⁰⁹

La participation des aldéhydes, en général, et de l'acétaldéhyde en particulier, est maintenant bien caractérisée : ils sont capables de réagir avec les flavanols^{145,146} et/ou les anthocyanes^{147,148,149} par réaction de condensation, dite de Baeyer, catalysée par un acide¹⁵⁰, donnant alors naissance à des produits de condensation composés de deux flavanols (ou un flavanol et une anthocyane) liés par une liaison chimique dépendant de la nature de l'aldéhyde utilisée pour la réaction. De tels produits de condensation ont déjà été détectés dans les vins rouges où ils peuvent intervenir sur la couleur et sur l'évolution de l'astringence.^{145,151,152}

Concernant les vins blancs, aucune recherche spécifique n'a été conduite pour élucider l'origine de la couleur des vins blancs exceptées l'oxydation des tanins.¹⁵³ Certains travaux se focalisent seulement sur des mesures de couleur par spectrophotométrie : mesures directes d'absorbances à des longueurs d'ondes spécifiques, généralement entre 400 et 440 nm ou après

¹⁴⁵ Fulcrand, H., Docco, T., Es.Safi, N.-E, Cheynier, V., Moutounet, M. *J. Chromatogr. A.*, **1996**, 752, 85-91

¹⁴⁶ Saucier, C., Bourgeois, G., Vitry, C., Roux, D., Glories, Y. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 1045-1049

¹⁴⁷ Timberlake, C.F., Bridle, P. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1976**, 27, 97-105

¹⁴⁸ Fulcrand, H., Cameira dos Santos, P.-J., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., Favre-Bonvin, J. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.*, **1996**, 735-739

¹⁴⁹ Escribano-Baillon, T., Dangles, O., Brouillard, R. *Phytochemistry*, **1996**, 41, 1583-1592

¹⁵⁰ Bendz, G., Marttensson, O., Nilsson, E. *Ark. Kemi*, **1967**, 27, 67-77

¹⁵¹ Atanasova, V., Fulcrand, H., Le Guernevé, C., Cheynier, V., Moutounet, M. *Tet. Lett.*, **2002**, 43, 6151-6153

¹⁵² Mateus, N., Silva, A.M.S., Rivas-Gonzolo, J.C., Santos Buelga, B., De Freitas, V.A.P. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 2110-2116

¹⁵³ Simpson, R.F. Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis*, **1982**, 21, 233-239

calcul (système CIE, $L^*a^*b^*$).^{154,155} Au vue de la faible teneur en polyphénols dans les vins blancs¹⁵⁶, il est commun de penser que l'origine de la couleur est due aux tanins et partiellement à certains flavonols (comme la quercétine).¹⁵⁷ Mais dans les blancs comme dans les rouges, toutes les conditions chimiques (flavanols et tanins) et physicochimiques (faibles pH) sont présentes pour initier des réactions d'additions nucléophiles : flavanols ou proanthocyanidols avec différents aldéhydes.^{158,159} Ces réactions conduisent à la formation de nouvelles structures avec une large variété de couleur : jaune, orange, brun ; certaines d'entre elles étant très similaires à la couleur des vins blancs.

Certains vins blancs sont fermentés et élevés en fûts de chêne neufs pendant de nombreuses semaines. Ces procédés induisent une modification dans la composition et la qualité des vins ; particulièrement l'évolution gustative et la couleur.^{32,151,152,160,161,162}

Dans la première partie de ce chapitre, nous focalisons notre travail sur la cinétique de formation de ces composés dans une solution modèle de vin (solution hydroalcoolique) selon la nature de l'aldéhyde. Nous avons étudié les deux classes d'aldéhydes représentatives du bois de chêne; nous avons évalué leur réactivité relative avec la catéchine à deux pH. Puis nous présentons une étude comparative sur la réactivité de ces deux familles d'aldéhydes.

Ces aspects ont une importance cruciale car ces composés de condensation peuvent jouer un rôle important dans l'évolution gustative et de la couleur des vins vieillis en fûts de chêne. Notamment, certains d'entre eux sont décrits pour être mêlés dans un procédé de de-astringence^{163,164}, qui pourrait être suivi facilement en utilisant les différentes techniques RMN.¹⁶⁵

Dans une seconde partie, nous avons effectué une étude structurale complète des produits de condensation entre la (+)-catéchine et un aldéhyde du bois de chêne : le furfuraldéhyde.^{32,160}

¹⁵⁴ Recamales, A.F., Sayago, A., Gonzalez-Miret, M.L., Hernanz, D. *Food Research International*, **2006**, 39, 220-229

¹⁵⁵ Gomez-Miguez, M.J., Gomez-Miguez, M., Vicario, I.M., Heredia, F.J. *J. Food Engineering*, **2007**, 79, 758-764

¹⁵⁶ Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Nonier, M.F. *Bulletin O.I.V.*, **2003**, 865/866, 281-303

¹⁵⁷ Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. *Handbook of enology. The chemistry of wine stabilization and treatments* ; Wiley : New-York, **2000**, Vol. 2

¹⁵⁸ Es-Safi, N.-E, Cheynier, V., Moutounet, M. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 5571-5585

¹⁵⁹ Laurie, V.F., Waterhouse, A.L. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 4668-4673

¹⁶⁰ Barbe, J.C, Da Silva Ferreira, A.C, Bertrand, A. *J. Sci. Tech. Tonnellerie*, **1998**, 4, 107-113

¹⁶¹ Herjavec, S., Jeromel, A., Da Silva, A., Orlic, S., Redzepovic, S. *Food Chemistry*, **2007**, 100, 124-128

¹⁶² Towel, J.P., Waterhouse, A.L. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1996**, 47, 17-20

¹⁶³ Es safi, N.-E, Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 2096-2102

¹⁶⁴ Tanaka, T., Takahashi, R., Kouno, I., Nonaka, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1994**, 3013-3022

¹⁶⁵ Simon, C., Barathieu, K., Laguerre, M., Schmitter, J.M., Fouquet, E., Pianet, I., Dufourc, E.J. *Biochemistry*, **2003**, 42, 10385

Nous présentons également la structure 3D des trois produits de condensation en utilisant les techniques RMN et la modélisation moléculaire.

Dans une dernière partie, nous avons étudié l'impact de ces composés sur la couleur des vins blancs élevés en barriques neuves.

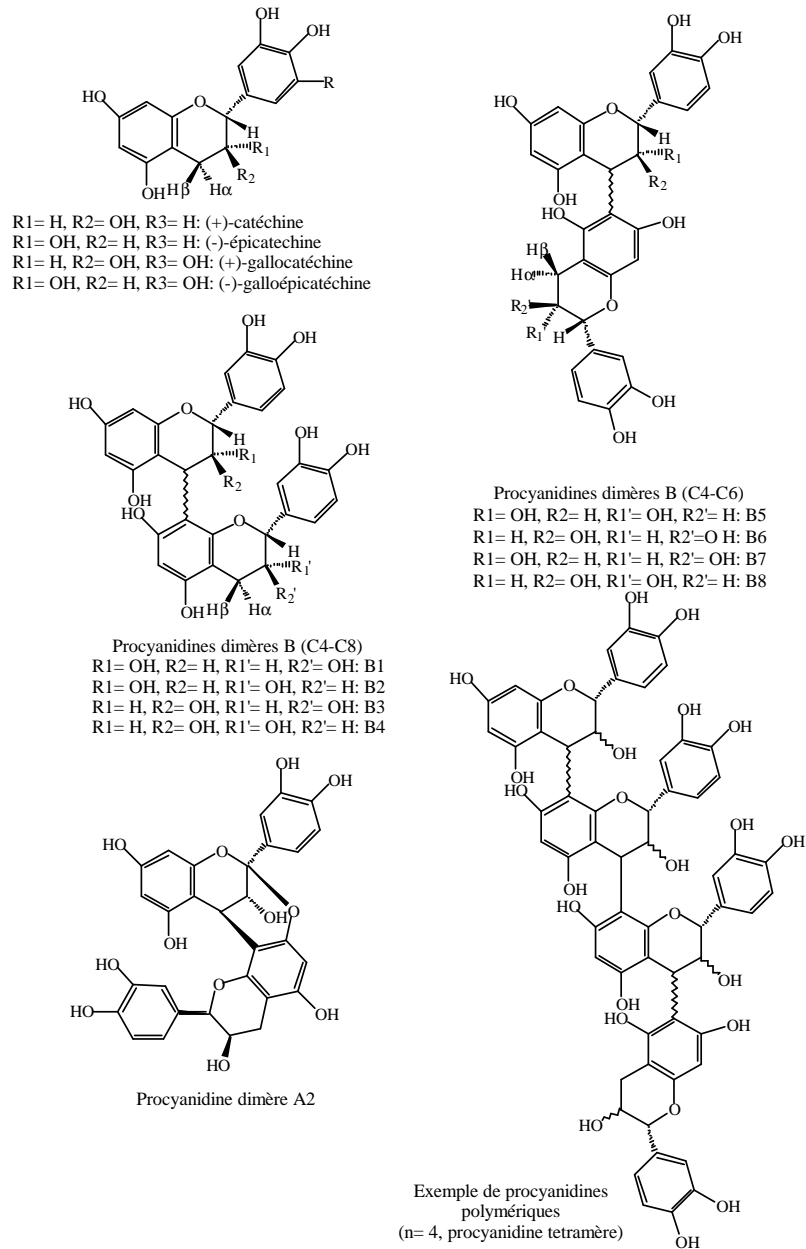


Figure 42 : Structure des proanthocyanidols extraits du raisin

A- Etude de la cinétique des produits de condensation en milieu modèle

Pour étudier les réactions entre les flavanols et les aldéhydes du bois de chêne (Figure 43 et tableau 21), la (+)-catéchine est incubée séparément avec le furfuraldéhyde, l'5-(hydroxyméthyl)furfuraldéhyde, le 5-méthylfurfuraldéhyde, la vanilline et le syringaldéhyde à pH 3 et 3.5. L'évolution des réactifs est suivie par HPLC avec un détecteur UV-Visible dans chaque cas et par RMN ^1H et ^{13}C dans le cas du furfural et de le syringaldéhyde; et l'évolution des produits formés est suivie par HPLC avec une détection UV-Visible, et LC/ESI-MS.¹⁶⁶

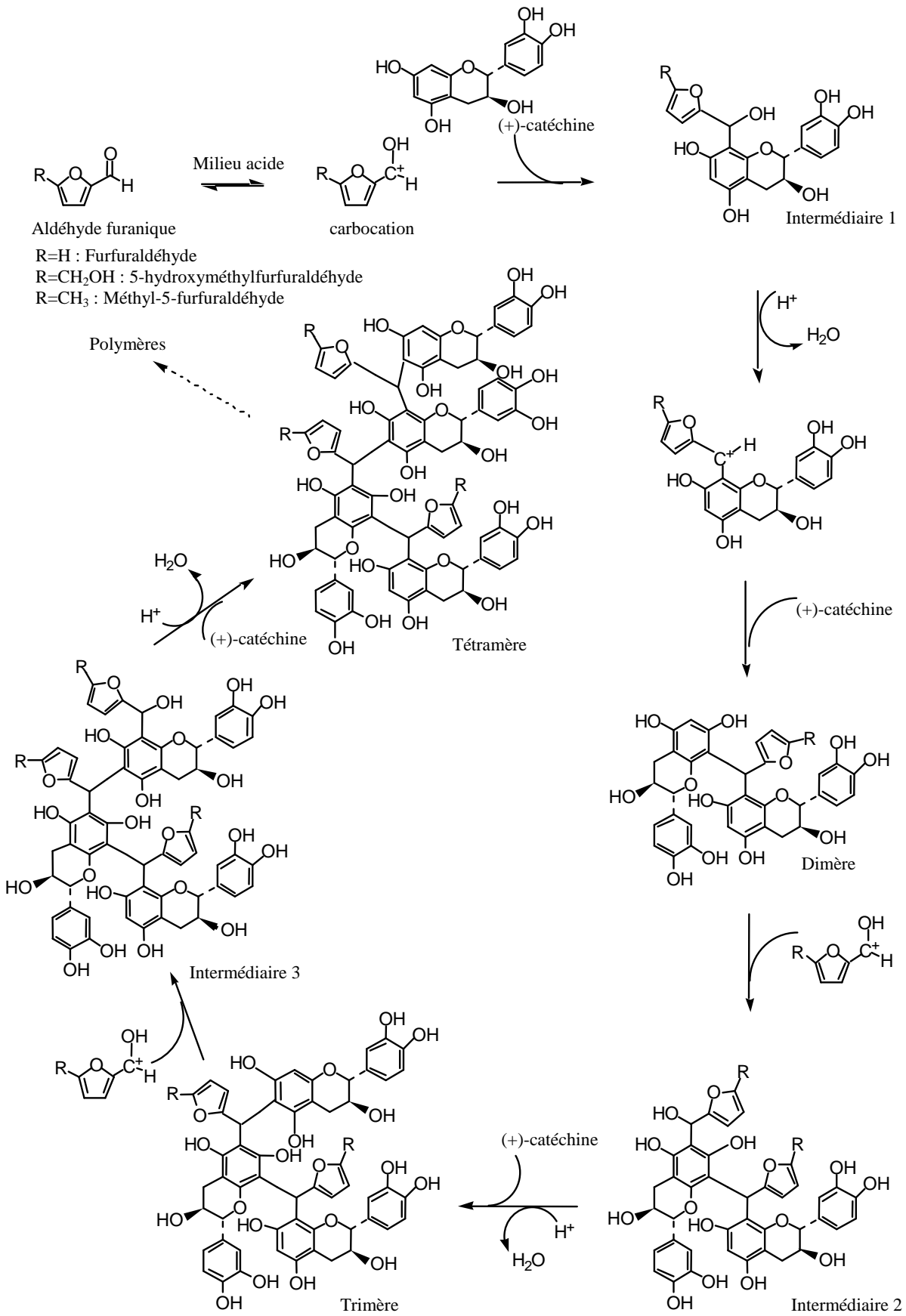
Tableau 21 : Masses moléculaires des produits de condensation attendus dans le cas de réaction de la (+)-catéchine en présence d'aldéhydes du bois en milieu acide

Masse (m/z)	Aldéhydes furaniques			Aldéhydes phénoliques	
	Furfuraldéhyde	Méthyl-5-furfuraldéhyde	Hydroxyméthylfurfuraldéhyde	Vanilline	Syringaldéhyde
Dimères	658	672	688	714	744
Trimères	1026	1054	1086	1138	1198
Tétramères	1394	1436	1484	1562	1652

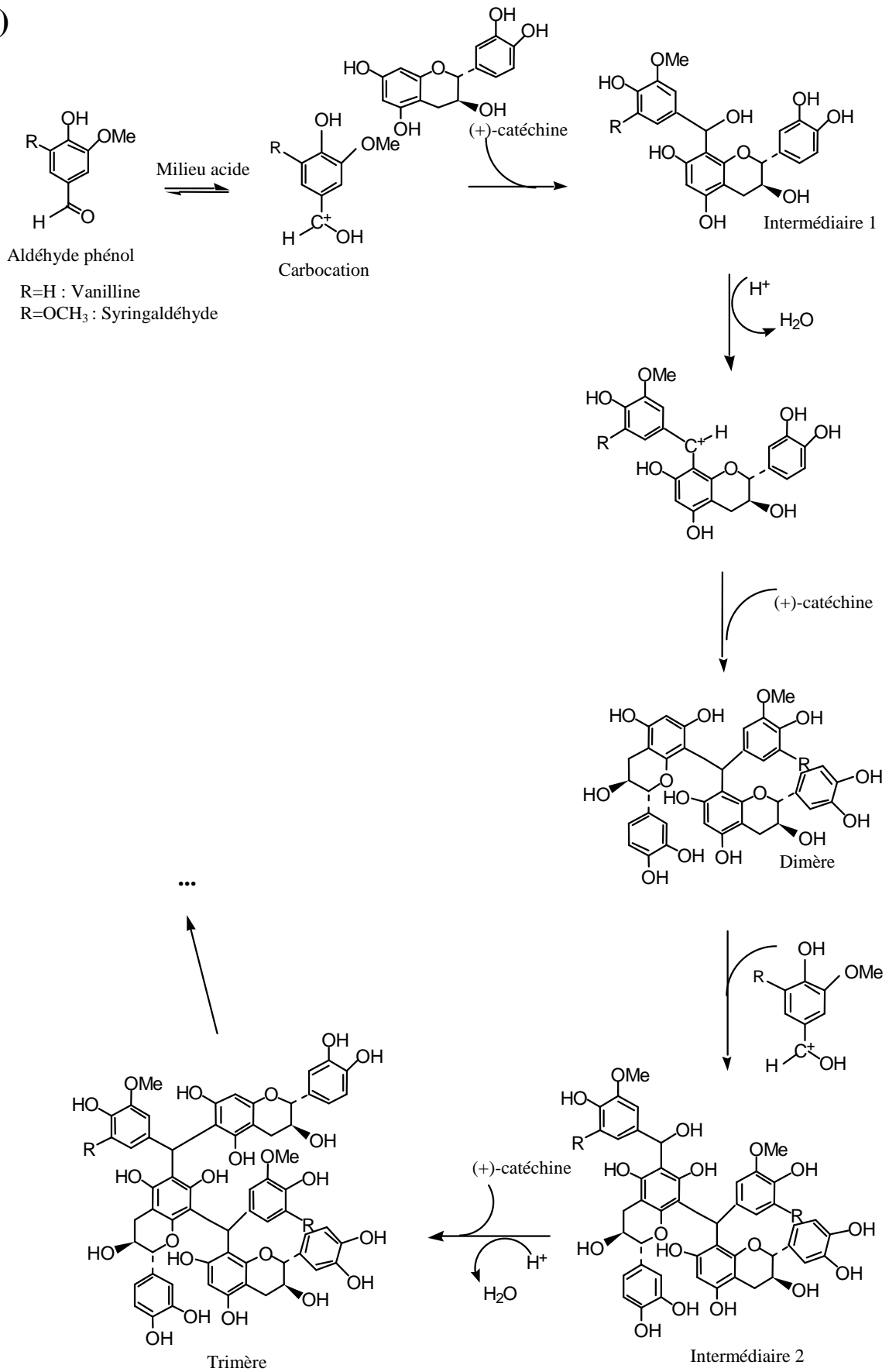
Figure 43 : Schéma réactionnel de la condensation des flavanols en présence d'aldéhydes furaniques (A) ou d'aldéhydes phénoliques (B). Exemple de la (+)-catéchine, d'après le schéma proposé pour l'acétaldéhyde par Timberlake et Bridle.¹⁴⁷

¹⁶⁶ Nonier, M.F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Pianet, I., Fouquet, E. A kinetic study of the reaction of (+)-catechin with aldehydes derived from toasted oak. *J. Sci. Food Agric.*, **2007**, 87, 2081-2091

(A)



(B)



I. Les sites réactifs de la (+)-catéchine

Le spectre RMN de la (+)-catéchine est présenté sur la Figure 44A.

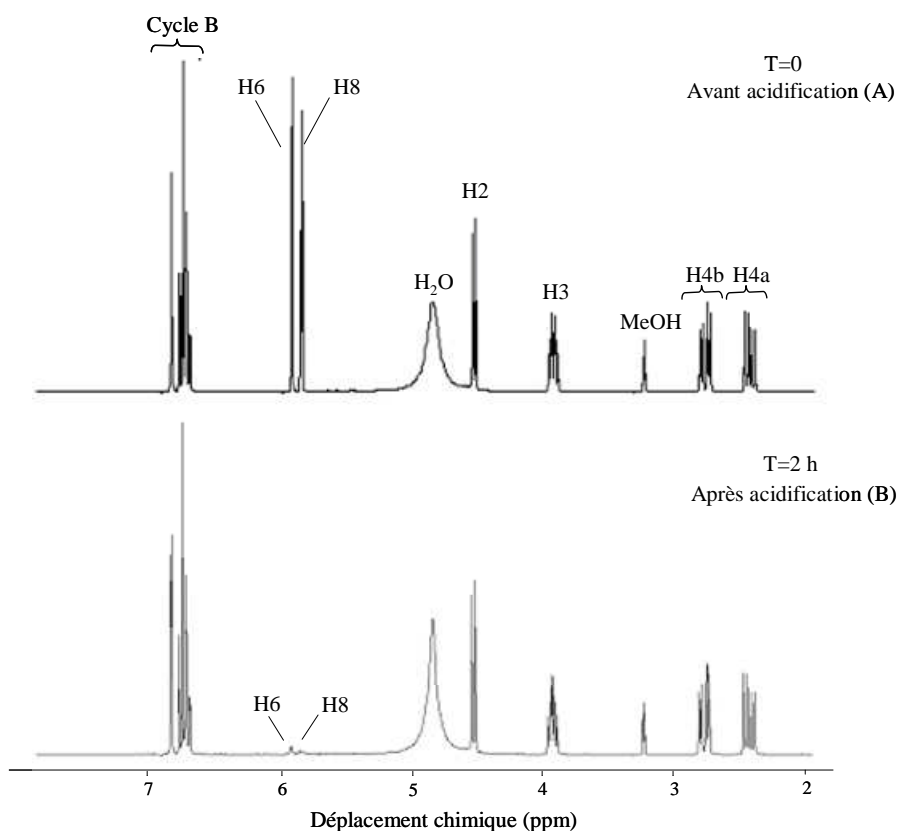


Figure 44 : Démonstration de l'importante réactivité des C6 et C8 de la (+)-catéchine par RMN ^1H (D20 acidifiée avec DCl).

Le spectre RMN d'une solution de (+)-catéchine avec ajout d'une solution de DCl est présenté Figure 44B. Dans ces dernières conditions (après deux heures de réaction), les signaux des protons correspondant aux sites C6 et C8 (autour de 6 ppm) de la (+)-catéchine se sont atténués, ceci confirme que ces deux sites sont réactifs, et peuvent réagir en tant que nucléophiles avec des composés carbonyles^{167,168}, ainsi ils interviennent dans les réactions de polymérisation. Les flavanols peuvent être liés au niveau des sites C6 ou C8, formant 4 isomères avec des liaisons C6-C6, C8-C8 et C6-C8 (R et S), prenant en compte la présence d'un carbone asymétrique pour les isomères C6-C8.

¹⁶⁷ Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Dubourdieu, D. *Traité d'œnologie 2. Chimie du vin*. Ed. Dunod, **1998**

¹⁶⁸ Flanzy, C. *Œnologie, Fondements scientifiques et technologiques*, Ed. Tec & Doc, **1998**

Comme il a été démontré dans le passé en utilisant l'acétaldéhyde^{145,148,169}, une réaction de condensation intervient entre le carbone 6 ou 8 du cycle A de la partie phloroglucinol de la catéchine et la fonction aldéhyde, amenant à la formation des quatre isomères différents où les deux catéchines sont liées par un pont formé avec le squelette de l'aldéhyde. La figure 45 présente, à titre d'exemples, la structure des 4 dimères catéchine-furfuryl-catéchine pouvant se former dans le cas où l'aldéhyde est le furfuraldéhyde.

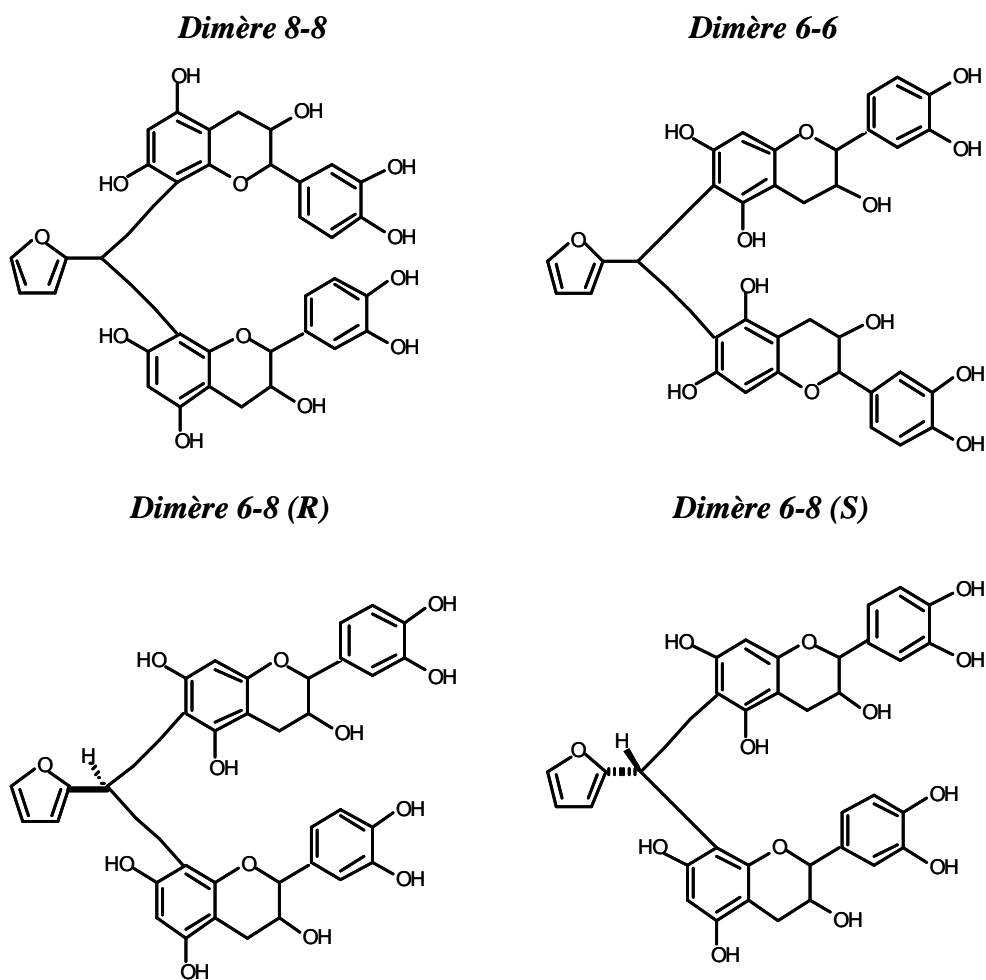


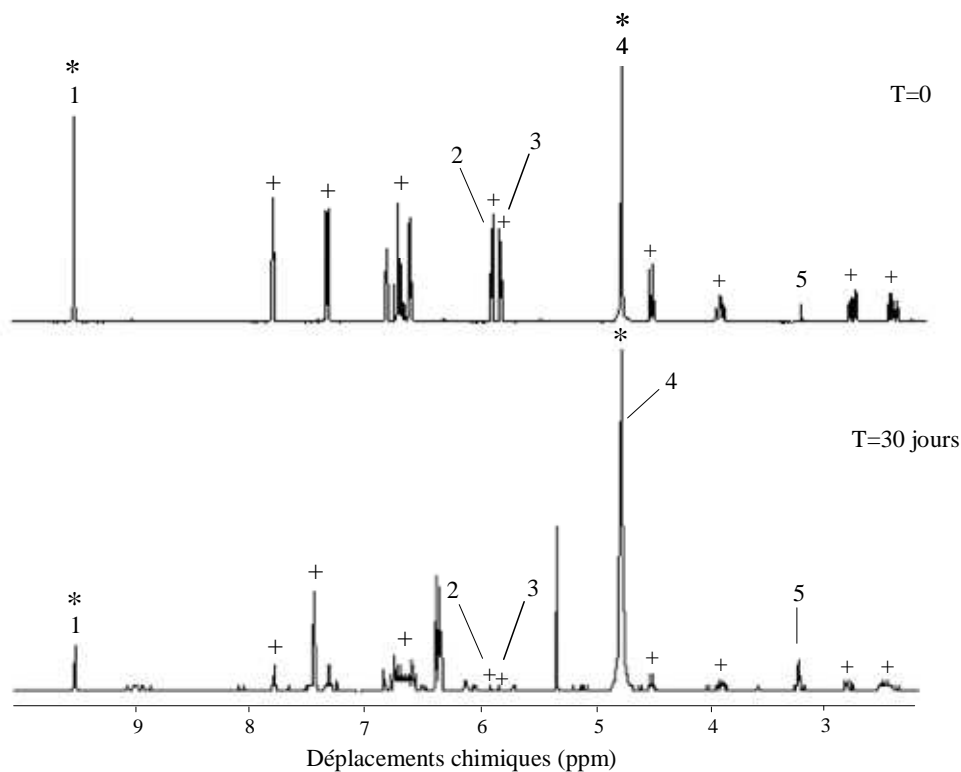
Figure 45 : Structures théoriques des dimères catéchine-furfuryl-catéchine

¹⁶⁹ Saucier, C., Guerra, C., Pianet, I., Laguerre, M., Glories, Y. *Phytochemistry*, **1997**, 46, 229-234

II. Réactions avec les aldéhydes furaniques

II.1. Le furfuraldéhyde

La réaction entre la (+)-catéchine et le furfuraldéhyde a été suivie en utilisant les techniques RMN (^1H) (Figure 46) et HPLC (Figure 47).



1 : Proton de la fonction $-\text{CHO}$ du furfuraldéhyde : 9.5 ppm

2 et 3 : Protons des sites C6 and C8 des sites de la catéchine : respectivement 5.95 et 5.90 ppm

4 : Proton de H_2O : 4.8 ppm

5 : Proton du méthanol : 3.3 ppm

* Furfuraldéhyde

+ (+)-Catéchine

Figure 46 : Suivi cinétique de la composition de la réaction : (+)-catéchine/furfuraldéhyde à l'aide de la RMN ^1H

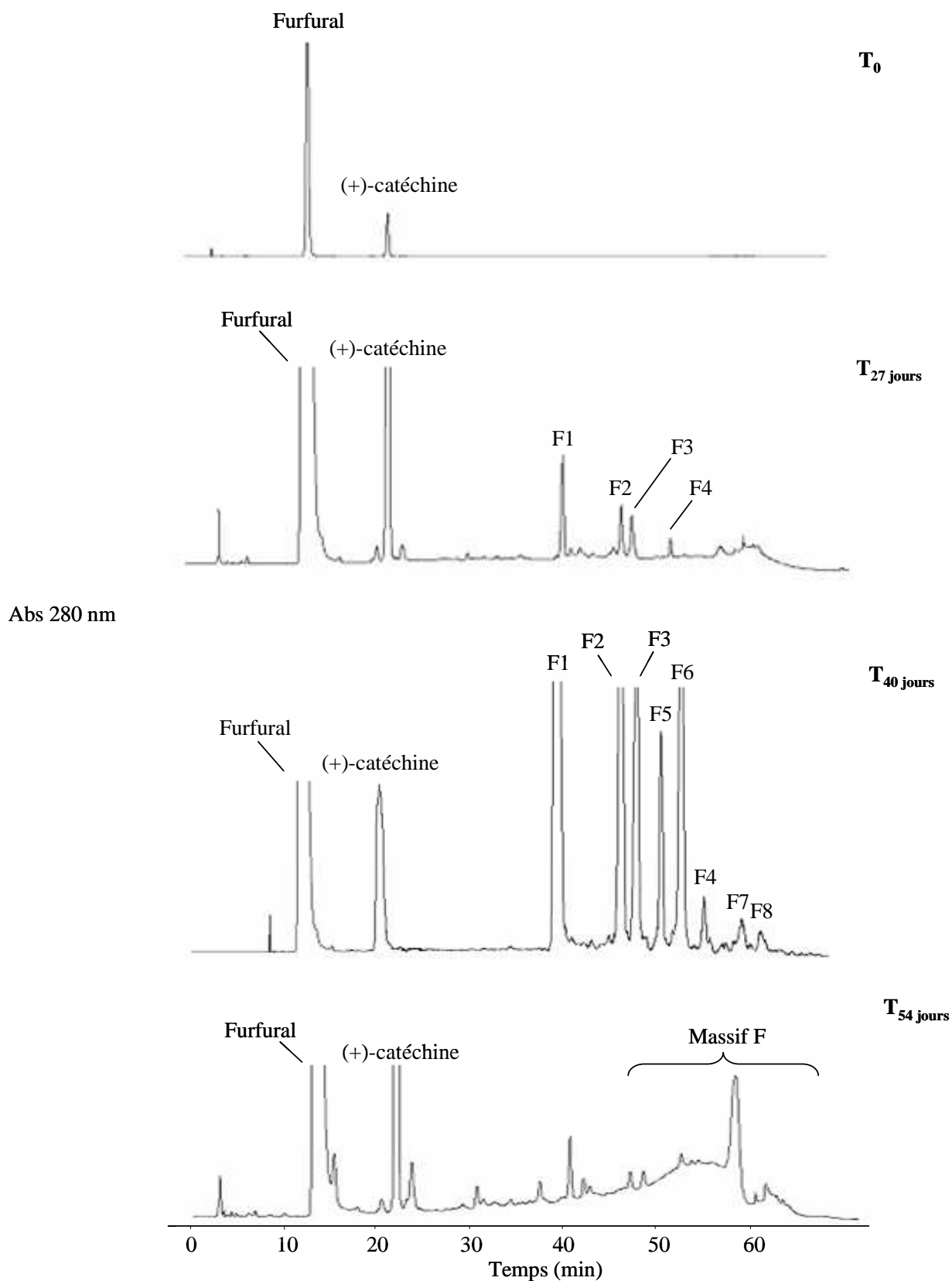


Figure 47 : Chromatogramme HPLC durant la réaction avec le furfuraldéhyde réalisée dans une solution hydroalcoolique à pH=3,5. Le rapport molaire catéchine/aldéhyde est de 1,65/3,14 mM

Quelle que soit la technique utilisée, au cours du temps, on observe une diminution de la concentration de (+)-catéchine, simultanée à l'apparition de nombreux produits initialement absents dans le mélange (Figure 47). Pour illustrer ceci, le Figure 48 présente la décroissance de la catéchine au cours du temps à deux pH différents.

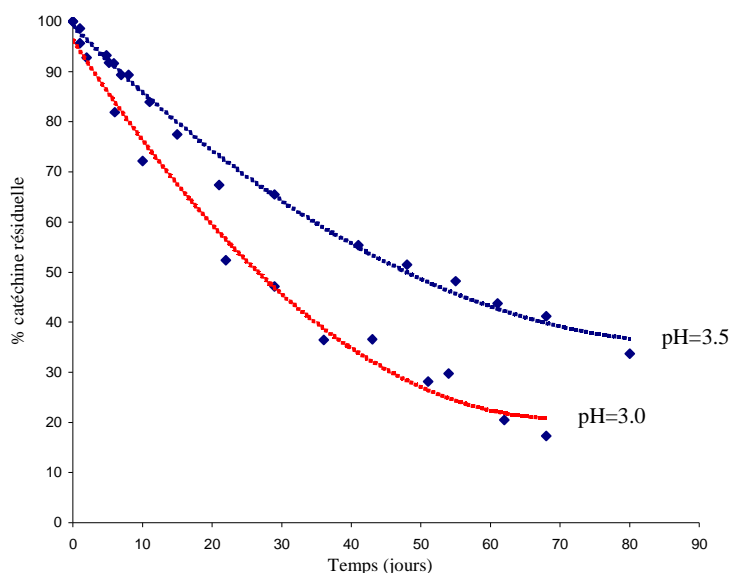


Figure 48 : Influence du pH sur la teneur résiduelle en catéchine durant la réaction de polymérisation avec le furfuraldéhyde. La réaction est réalisée en milieu hydroalcolique à pH=3 ou 3,5 pour un rapport catéchine/furfuraldéhyde : 1,65/3,14 mM. La réaction est suivie par HPLC en phase inverse

La vitesse de réaction augmente quand le pH diminue (Figure 48) dû à la forte activation des carbocations du furfuraldéhyde ou HMF à des pH acides.¹⁷⁰

Les expériences RMN apportent des informations supplémentaires : une augmentation de l'intensité du signal de l'eau (pic à 4,85 ppm) est observée, concomitante à l'augmentation de l'intensité d'une résonance apparaissant à 6,4 ppm et à la disparition des protons attribués au furfuraldéhyde (9,55 ppm) et de la catéchine (5,9 ppm).

Le suivi de l'intensité des H8 et H6 de la catéchine montre que les sites C6 et C8 n'ont pas la même réactivité (Figure 49) : C8 est plus réactif que C6, ce fait est en accord avec les travaux précédents.^{146,171}

¹⁷⁰ Es-Safi, N.-E, Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 74, 2088-2095

¹⁷¹ Guerra, C. Recherches sur les interactions anthocyanes-flavanols : application à l'interprétation chimique de la couleur des vins rouges. Thèse doct. ès Sciences, Université Bordeaux II, France, **1997**

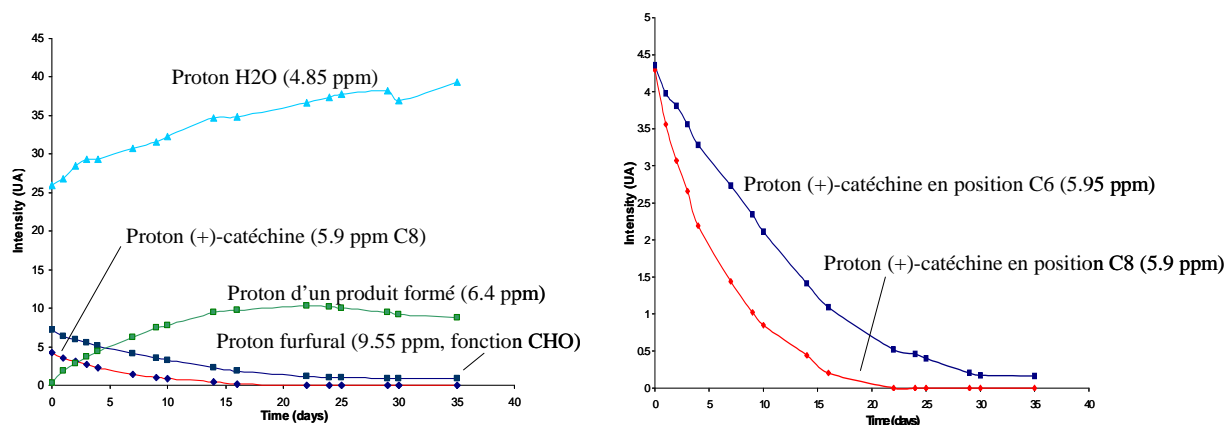


Figure 49 : Comparaison par suivi cinétique (RMN ^1H) des sites C6 et C8 de la (+)-catéchine durant la réaction de polymérisation avec le furfuraldéhyde

- *Caractérisation des produits formés par LC/MS*

Comme dans le cas de l'acétaldéhyde, selon les analyses HPLC/UV, on observe l'apparition de nombreux composés nouveaux (initialement absents dans la solution), indiquant qu'une réaction entre la (+)-catéchine et le furfuraldéhyde se développe.

Parmi les composés formés, les traces UV enregistrées à 280 nm à 27 jours de réaction, ont révélé la présence de quatre produits majeurs en plus de ceux de la (+)-catéchine et du furfuraldéhyde (Figure 47). Les deux premiers pics sur le chromatogramme sont, respectivement, la (+)-catéchine et le furfuraldéhyde, et les quatre autres (F1, F2, F3 et F4) correspondent potentiellement aux produits de condensation de la (+)-catéchine et du furfuraldéhyde. Or la technique LC/UV nous limite dans l'identification des produits formés. La technique LC/MS est alors indispensable.

Les analyses LC/MS, conduites en mode négatif, permettent la détermination de la masse moléculaire des produits majeurs formés pendant cette réaction. Les résultats obtenus indiquent que ces produits sont des dérivés oligomériques consistant en des unités (+)-catéchine liées par des groupes furfuryl selon le mécanisme préalablement décrit par Timberlake et Bridle¹⁴⁷ dans le cas de l'acétaldéhyde (Figure 43).

Les valeurs m/z des composés F1, F2, F3 et F4 détectées à 27 jours de réaction (Figure 50A) montrent que les unités constitutives sont liées par des ponts furfuryl. Les analyses par spectrométrie de masse révèlent que ces composés ont une masse moléculaire égale à 658 ([M-

H]⁻ à m/z 657) et qu'ils correspondent à deux unités (+)-catéchine liées par un pont furfuryl ; ce sont des adduits dimères.

Les traces UV enregistrées à 280 nm à 40 jours de réaction et les analyses LC/MS (en mode négatif), révèlent la présence de deux composés (F5, F6) : ils ont la même masse moléculaire : 1026 ([M-H]⁻ : 1025) (Figure 50B). Ils correspondent à une structure où trois unités (+)-catéchine sont liées par deux ponts furfuryl : ce sont des adduits trimères.

Ces analyses révèlent également à 40 jours de réaction, la présence de deux autres pics (F7, F8) qui ont une masse moléculaire de 1394 ([M-H]⁻ : 1393) (Figure 50C), et correspondent à une structure où quatre unités (+)-catéchine sont liées par trois ponts furfuryl. Ce sont des adduits tétramères.

Le massif F que l'on observe au-delà de 54 jours de réaction renferme des formes polymérisées, non identifiables par LC/MS.

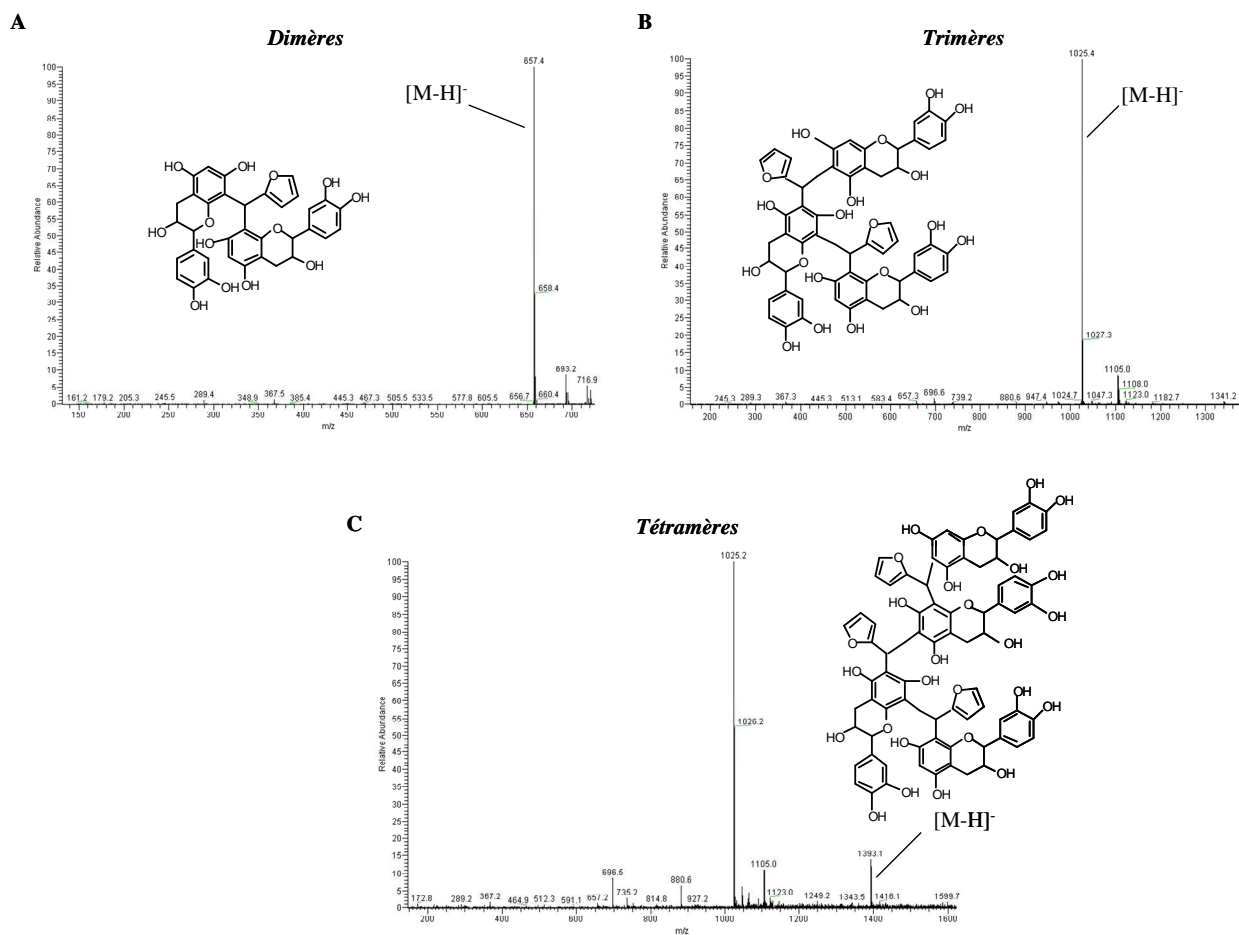


Figure 50 : Spectres de masse des dimères, trimères et tétramères durant la réaction avec le furfuraldéhyde comme aldéhyde

Des analyses complémentaires en sélectionnant un ion spécifique (mode SIM) permettent d'observer des pics non détectables en LC/UV. La Figure 51 représente le courant ionique total (TIC) à 40 jours de réaction ainsi que le chromatogramme en mode SIM : l'ion sélectionné est l'ion m/z 1393 amu correspondant au tétramère. Nous observons sur la trace SIM cinq pics correspondant au tétramère, qui n'apparaissent pas sur le TIC.

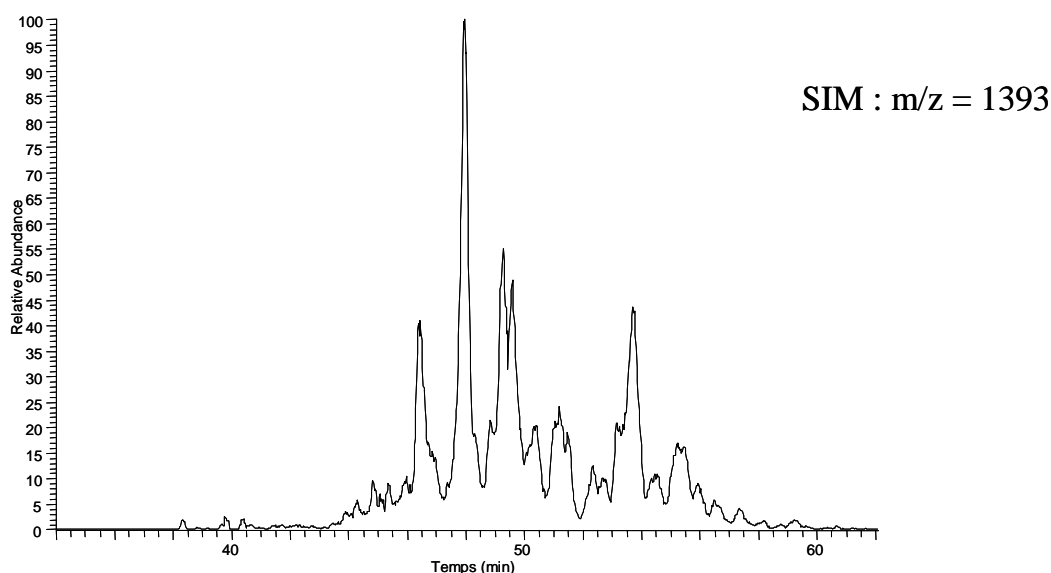
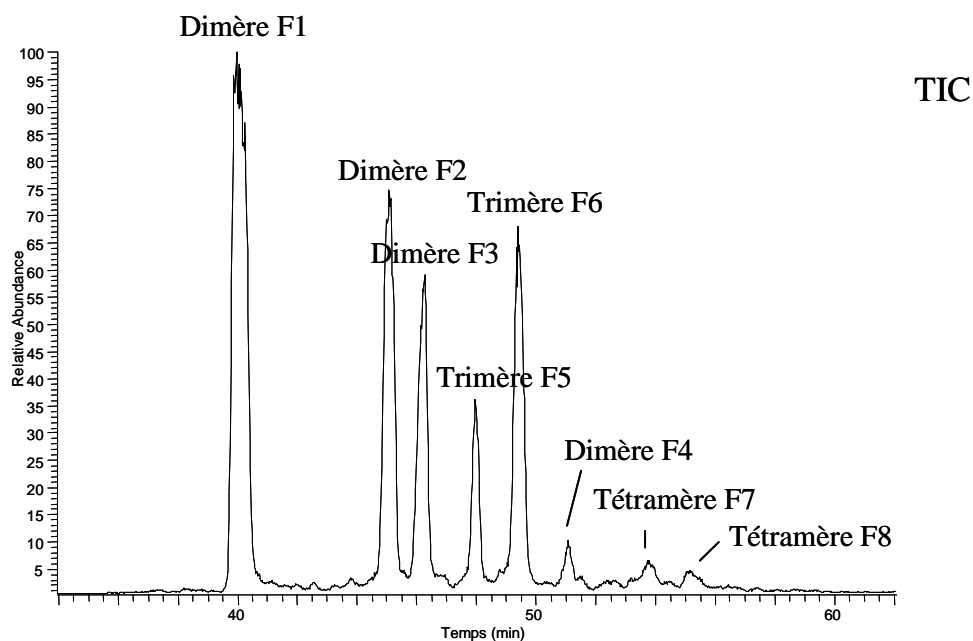


Figure 51 : Chromatogrammes TIC et en mode SIM (ion de masse 1393 sélectionné) durant la réaction avec le furfuraldéhyde réalisée dans une solution hydroalcoolique à pH=3,5. Le rapport molaire catéchine/aldéhyde est : 1,65/3,14 mM

- *Etude cinétique de la réaction*

L'étude cinétique de quatre composés F1, F2, F3, F4 montre que F1 est le composé produit majoritairement et le plus polaire (Figure 52). F2 et F3 sont des produits formés dans des quantités similaires, leurs temps de rétention sont très proches.

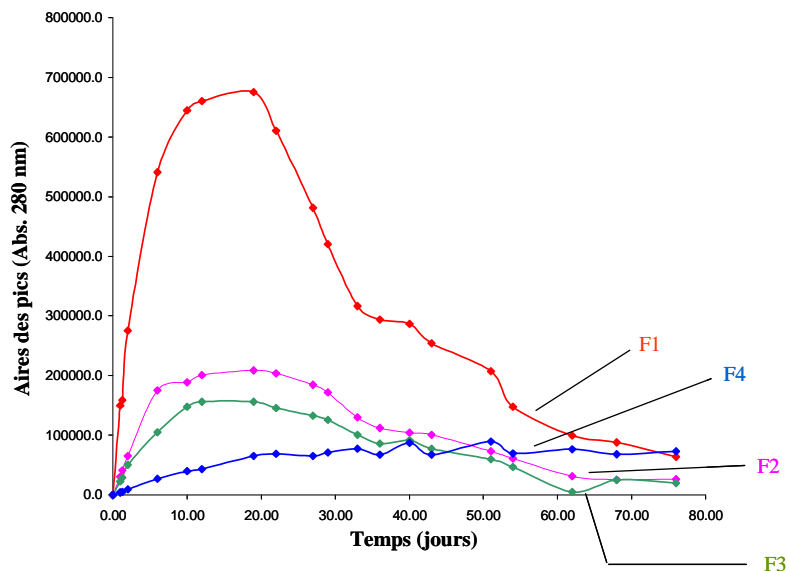


Figure 52 : Evolution des dimères catéchine-furfuryl-catéchine formés durant la réaction conduite en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport catéchine/aldéhyde : 1,65/3,14 mM.

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 52, F1, F2 et F3 atteignent leurs concentrations maximales à 15 jours de réaction. Après 27 jours de réaction, la quantité des dimères F1, F2, F3 et F4 diminue considérablement au profit de trimères et tétramères : F5, F6, F7, F8. Et ces derniers seront eux-mêmes consommés pour former d'autres composés (Figure 53), possédant des temps de rétention plus importants : on peut penser qu'il s'agit de composés plus polymérisés. C'est le massif F qui apparaît à partir de 54 jours de réaction, à des temps de rétention supérieurs à 50 minutes. Ainsi, des composés plus polymérisés apparaissent à partir de 71 jours de réaction sous forme de précipité noir (Figure 55).

L'ensemble de ces évolutions est reporté dans la Figure 53.

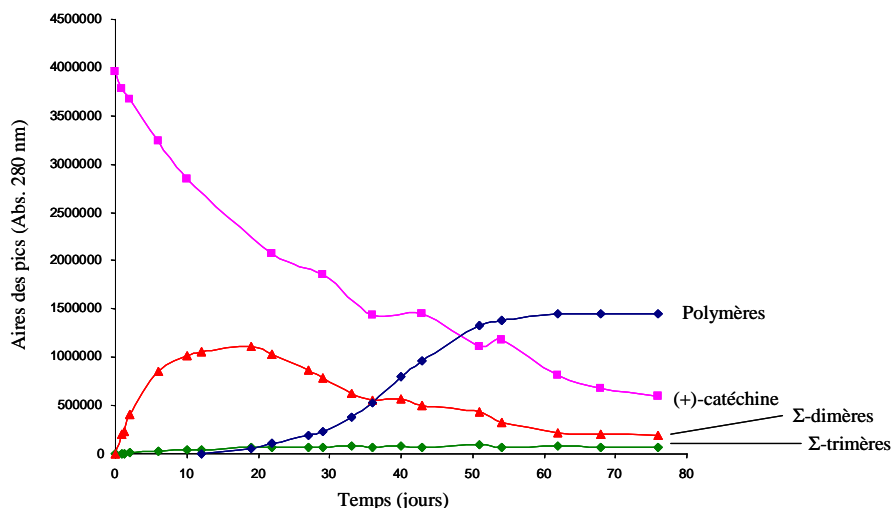


Figure 53 : Evolution des produits formés durant la réaction (+)-catéchine-furfuraldéhyde conduite en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport catéchine/aldéhyde : 1,65/3,14 mM.

Ces formes polymérisées ont déjà été décrites dans des conditions semblables¹⁷² et dans des réactions de polymérisation entre des polyphénols et du furfuraldéhyde, en milieu acide pour produire des aérogels organiques.¹⁷³

La Figure 53 montre que quand les quantités de dimères F1, F2, F3 et F4 diminuent, la quantité du massif augmente. Ceci est en accord avec le schéma réactionnel, qui suggère que les dimères sont consommés durant la réaction de polymérisation.

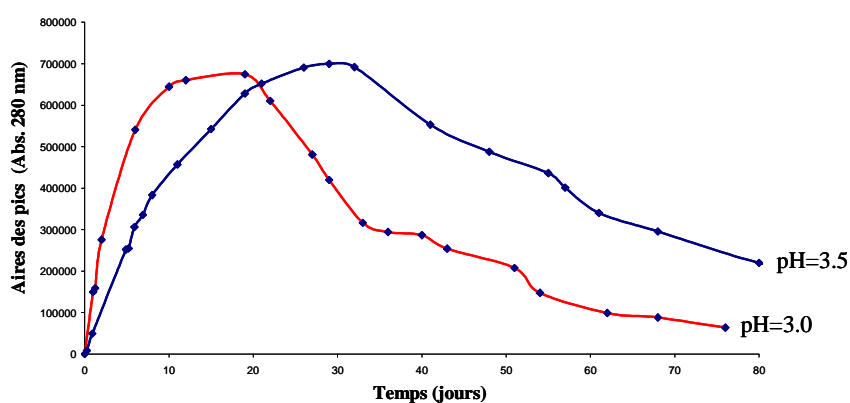
La Figure 54 montre que la valeur du pH influence la formation des produits. La quantité des quatre dimères F1, F2, F3 et F4 augmente plus rapidement à pH 3 qu'à 3,5.

A pH acide, le massif F apparaît à 42 jours de réaction et atteint des concentrations deux fois plus importantes qu'à pH=3,5.

¹⁷² Es-Safi, N.-E., Cheynier, V., Moutounet, M. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 5946- 5954

¹⁷³ Hubresch, L.W. 4th International Symposium on Aerogels, Berkeley, **1994**

Composé F1



Composé F2

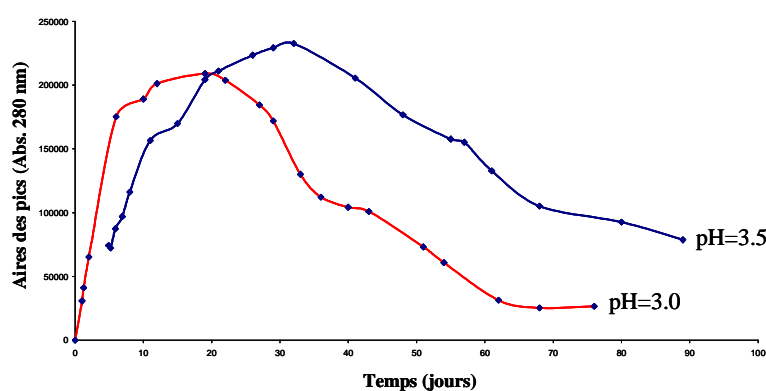


Figure 54 : Influence du pH sur la teneur en dimères F1 et F2 durant la réaction de polymérisation avec le furfuraldéhyde. La réaction est réalisée en milieu hydroalcolique à pH=3,5 pour un rapport catéchine/furfuraldéhyde : 1,65/3,14 mM. La réaction est suivie par HPLC en phase inverse.

- Evolution de la couleur de la solution au cours du temps

Quand la (+)-catéchine est incubée dans ces conditions avec le furfuraldéhyde, la solution se colore progressivement, d'abord en jaune à 54 jours de réaction (Figure 55) puis en jaune de plus en plus foncé.

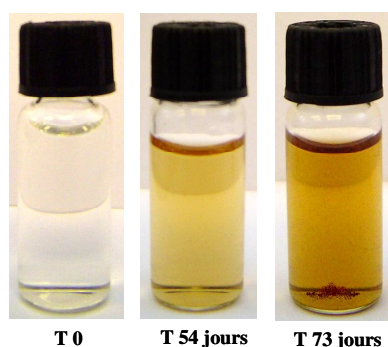


Figure 55 : Observation de la couleur de la solution après 54 et 73 jours de réaction, dans le cas de la réaction catéchine/furfuraldéhyde.

Le chromatogramme HPLC à 440 nm (Figure 56) montre que les produits élués à partir de 57 min (Massif F) absorbent à cette longueur d'onde et semblent être responsables de la coloration jaune de la solution, à 54 jours. Ce massif non résolu renferme des polymères [catéchine-furfuraldéhyde-catéchine]_n. Il est bien connu que quand la polymérisation des polyphénols intervient, des produits formés peuvent évoluer en sels xanthylum absorbant à 440 nm. Donc, il est très probable que le Massif F contienne ce type de produits.

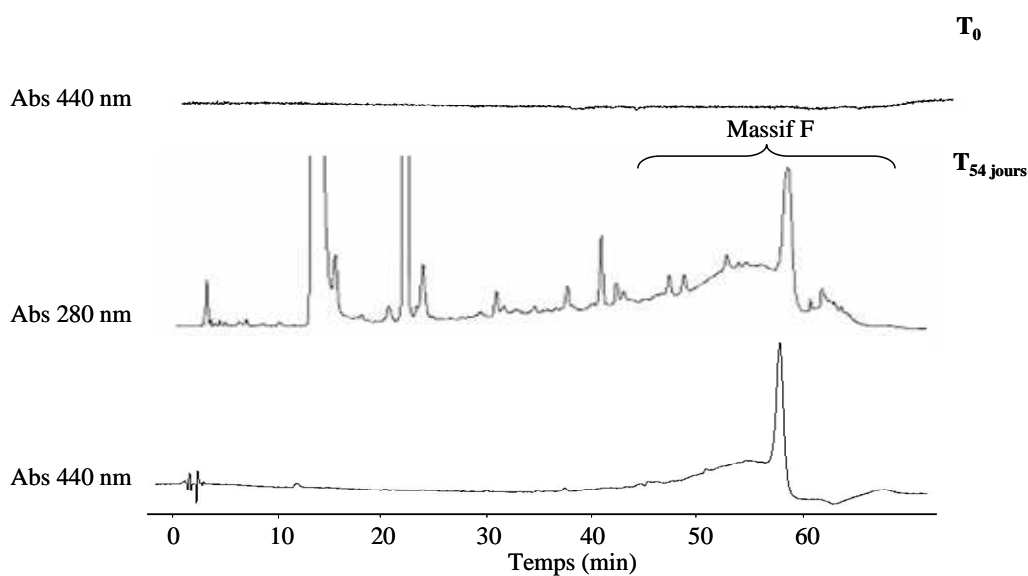


Figure 56 : Chromatogramme HPLC (dans le cas du furfuraldéhyde) à 280 nm et 440 nm

La couleur de la solution est également suivie par spectrophotométrie. Les résultats sont résumés sur la Figure 57.

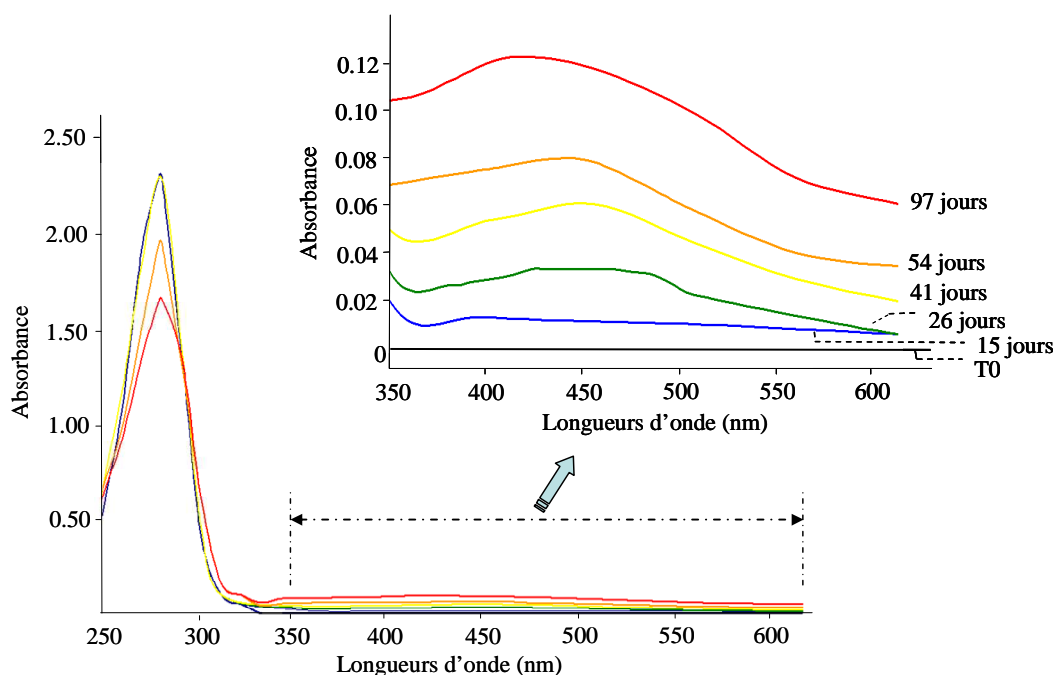


Figure 57 : Spectres visibles (350-600 nm) de la solution durant la réaction entre catéchine-furfuraldéhyde. Les réactions sont réalisées en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport molaire catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM

Nous pouvons noter une augmentation significative de l'absorbance de la solution au cours du temps avec un maximum à 440 nm (jaune). Les nuances sombres observées s'expliquent par un effet bathochrome : une absorption dans les longueurs d'onde élevées (supérieures à 575 nm). L'apparition d'un dépôt à 73 jours est en parfaite corrélation avec la diminution de l'absorbance de la solution à 280 nm. En général, à cette longueur d'ondes, la (+)-catéchine et le furfuraldéhyde ont respectivement une absorbance maximum et une absorbance élevée, dues à la présence des cycles benzéniques et furaniques. La polymérisation conservant ces cycles, cette diminution de l'absorbance est cohérente.

La couleur de la solution est progressivement colorée, premièrement en jaune puis avec des nuances plus sombres. A la fin de la réaction, cette coloration est plus intense à pH 3 qu'à pH 3,5.

II.2. Comparaison avec d'autres aldéhydes furaniques

II.2.1. Cas de l'hydroxyméthylfurfuraldéhyde (HMF)

Quand la (+)-catéchine est incubée en présence d'HMF, une réaction entre les deux réactifs se développe avec la formation de composés oligomériques et polymériques analogues au cas du furfuraldéhyde (Figure 58).

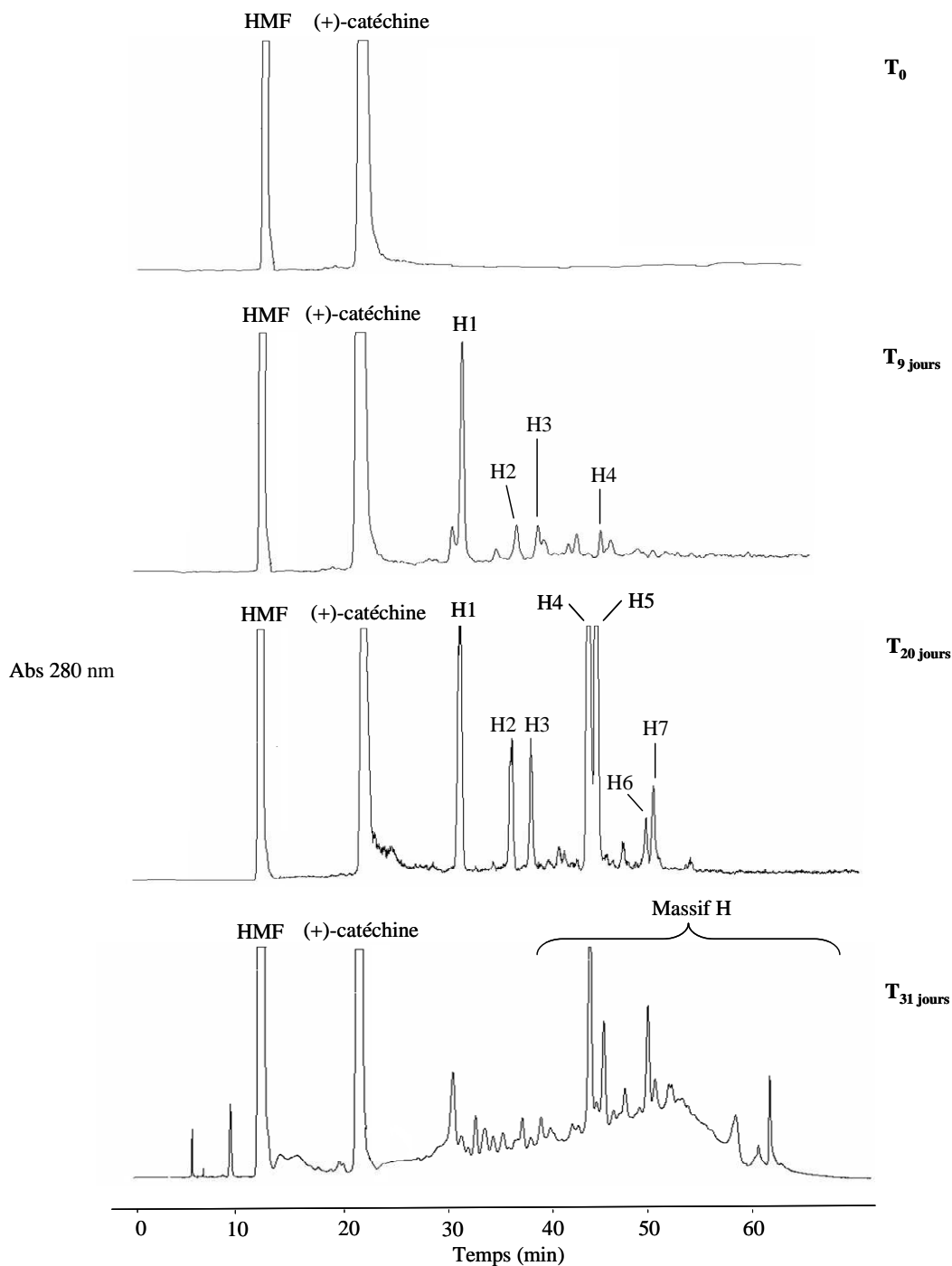


Figure 58 : Chromatogramme HPLC durant la réaction avec l'HMF réalisée dans une solution hydroalcoolique à pH=3,5. Le rapport molaire catéchine/aldéhyde est de 1,65/3,14 mM

- *Caractérisation des produits formés par LC/MS*

Les traces UV enregistrées à 280 nm à 20 jours de réaction et les analyses LC/MS (en mode négatif), montrent que les composés H1, H2 et H3 présentent tous un pic moléculaire à $[M-H]^-$: 687 comme le montre le spectre de masse (Figure 59). Leur masse moléculaire ($M=688$) correspond exactement à une structure dans laquelle deux unités « catéchine » sont liées par un pont hydroxyméthylfurfuryl. Donc H1, H2, H3 sont trois dimères.

Les analyses LC/MS révèlent également la présence de deux autres composés H6, H7 possédant une masse moléculaire égale à 1086 ($[M-H]^-$: 1085) (Figure 59B) et correspondant à des adduits trimères (structure où trois unités « catéchine » sont liées par deux ponts hydroxyméthylfurfuryl).

Les valeurs m/z des composés H4 et H5 détectées à m/z 959 (Figure 59C) ne permettent pas d'établir une structure précise de ces composés qui sont des intermédiaires de réaction. Des analyses MS^2 ont été alors réalisées. La Figure 5C présente les valeurs des m/z mesurées et leur intensité relative correspondante. Une formule moléculaire a pu être émise : $[C_{21}H_{44}O_{19}H]^-$ avec un Δm (erreur) de 4,7 ppm (ou 5,61 Da).

La valeur de la masse à m/z 669 pourrait correspondre à un adduit xanthène dans le mélange (+)-catéchine et hydroxyméthylfurfuraldéhyde selon la structure proposée par Es-Safi *et al.*¹⁷² (structure présentée sur la Figure 59B). La différence entre les valeurs m/z 959 et m/z 669 correspond à la perte d'une unité catéchine. Il est très probable que les composés H4 et H5 soient composés de trois unités « catéchine » et d'un pont hydroxyméthylfurfuraldéhyde : [catéchine-catéchine-hydroxyméthylfurfuraldéhyde-catéchine].

Le pic H non résolu à la fin du chromatogramme n'est pas ionisable dans ces conditions d'analyse.

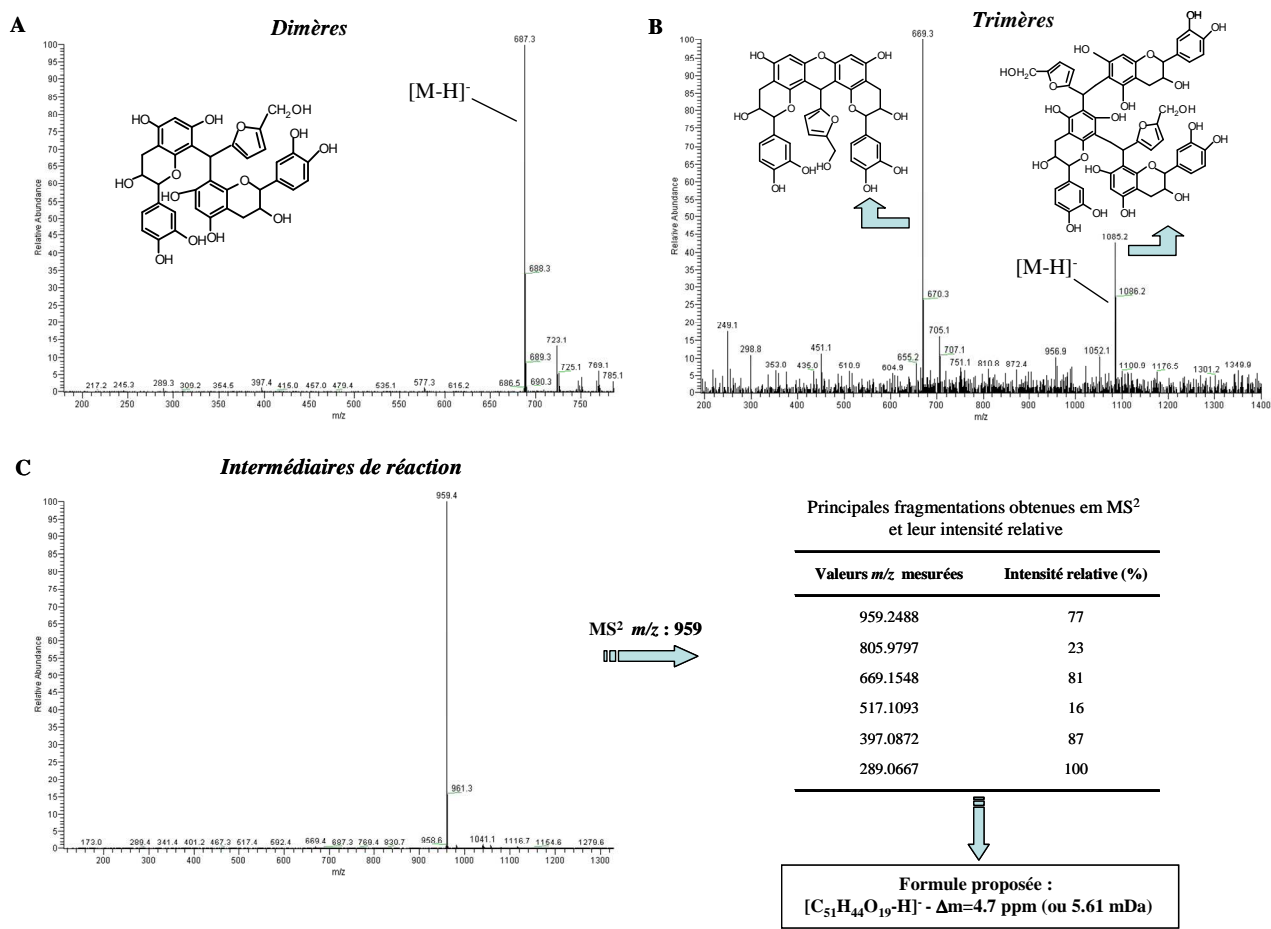


Figure 59 : Spectres de masse des dimères, trimères et intermédiaires de réaction obtenus durant la réaction avec l’HMF comme aldéhyde

Nous avons fait des analyses complémentaires en mode SIM en sélectionnant l’ion 1085, correspondant au trimère. Le chromatogramme correspondant et le TIC à 20 jours de réaction sont présentés sur la Figure 60. Le mode SIM nous permet de détecter 4 autres trimères : H8, H9, H10, H11 que ceux observés sur le TIC (H6, H7).

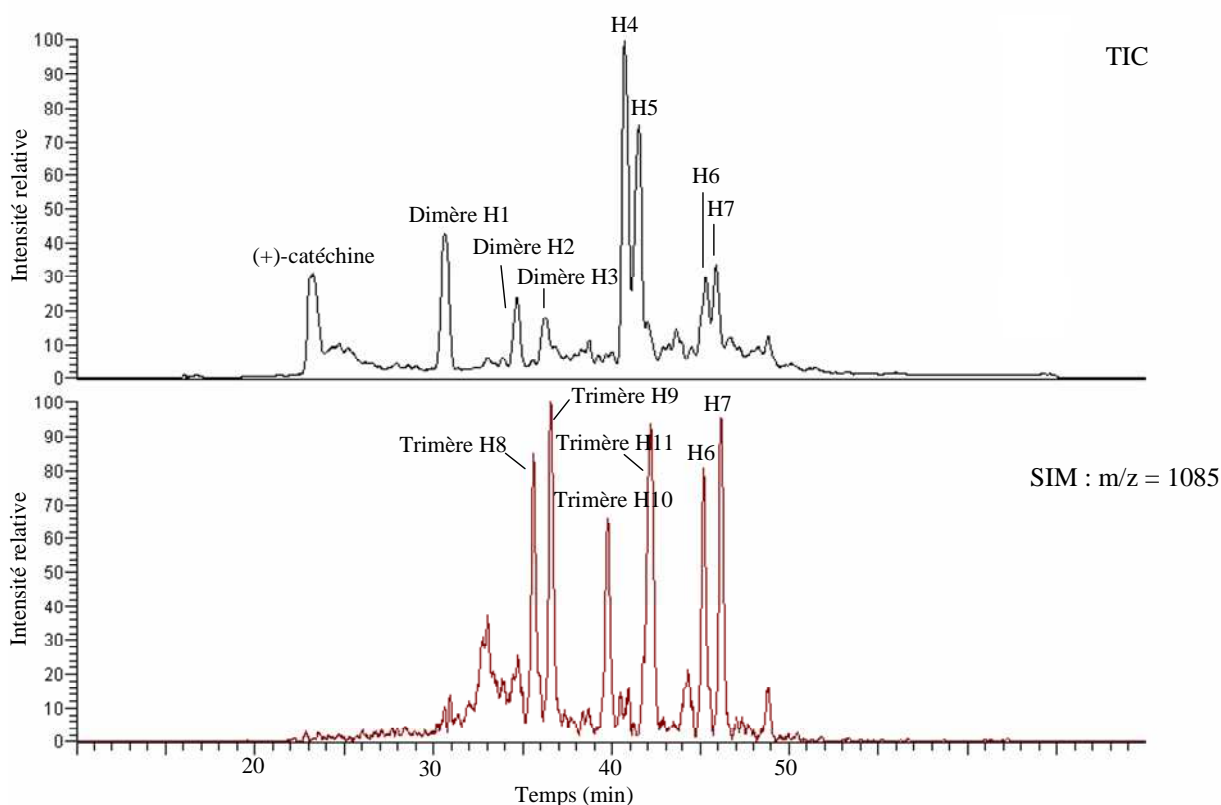


Figure 60 : Chromatogrammes TIC et en mode SIM (ion de masse 1393 sélectionné) durant la réaction avec l’HMF réalisée dans une solution hydroalcoolique à pH=3,5. Le rapport molaire catéchine/aldéhyde est de 1,65/3,14 mM

- *Etude cinétique de la réaction*

Comme dans le cas du furfuraldéhyde, les adduits se forment plus rapidement à pH 3 qu’à pH 3,5. Durant les premiers jours de réaction, quand la (+)-catéchine est incubée avec le HMF, la diminution de la teneur en catéchine s’accompagne par l’apparition de deux pics importants. Ces deux composés sont des intermédiaires de réaction m/z : 959 $[M-H]^-$; ces pics ont une aire maximale à 17 jours de réaction avant de diminuer au profit de la formation des trimères.

Le massif F observé à la fin du chromatogramme dans le cas du furfuraldéhyde apparaît aussi dans le cas de l’HMF : massif H (Figure 58), mais sa présence est observée à partir de 31 jours à pH 3,5, tandis que dans le cas du furfuraldéhyde, ce massif n’apparaît qu’à partir de 54 jours.

Les figures 61 et 62 présentent l'évolution de produits majoritaires formés au cours du temps. Les dimères H1, H2, H3 et trimères H6 tendent à diminuer au profit de formes polymérisées (Massif H). Mais à 73 jours de réaction, nous n'avons pas noté la formation d'un précipité comme dans le cas du furfuraldéhyde. La Figure 53 montre dans le cas du furfuraldéhyde que les polymères se forment à partir de 20 jours à pH 3,5, mais dans le cas de l'HMF, ils se forment à partir de 30 jours (Figure 62). Quant aux dimères formés, ils subissent une consommation plus lente dans le cas de l'HMF que dans le cas du furfuraldéhyde.

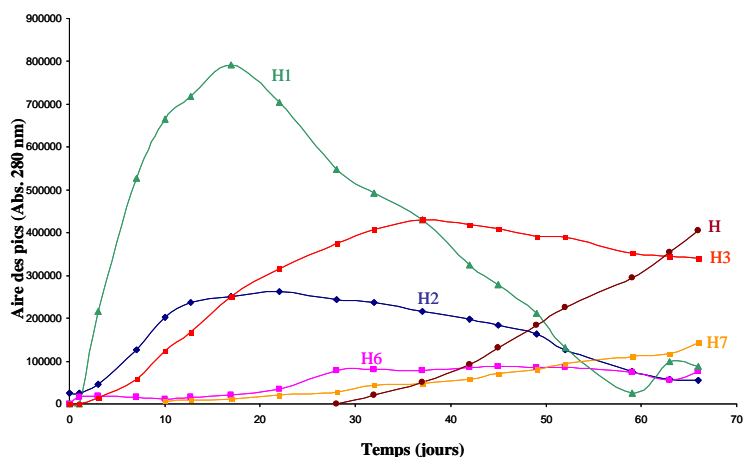


Figure 61 : Evolution des composés : H1, H2, H3, H6, H7 et H formés durant la réaction catéchine-HMF conduite en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM

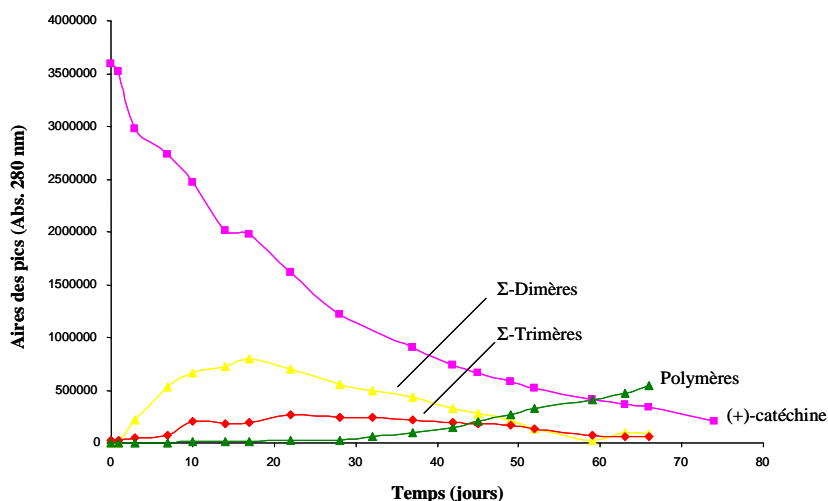


Figure 62 : Evolution des produits formés durant la réaction (+)-catéchine-HMF conduite en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM

- *Evolution de la couleur de la solution au cours du temps*

La Figure 72 montre que la coloration de la solution se trouve aussi marquée avec le HMF qu'avec le furfuraldéhyde. Les spectres visibles obtenus par spectrophotométrie sont présentés sur la Figure 63. La comparaison de ces spectres avec ceux obtenus dans le cas du furfuraldéhyde (Figure 57) nous montre une même augmentation significative de l'absorbance de la solution dans le temps avec un maximum dans le jaune (440 nm).

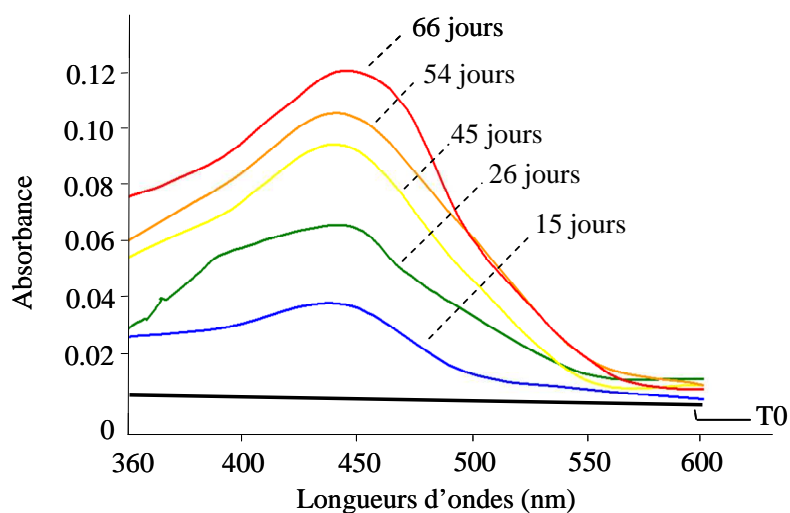


Figure 63 : Spectres visibles (360-600 nm) de la solution durant la réaction entre catéchine-hydroxyméthylfurfural. Les réactions sont réalisées en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport molaire catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM

Le chromatogramme HPLC à 440 nm (Figure 64) montre que les produits élués à partir de 47 min (Massif H) absorbent à cette longueur d'onde et semblent être responsables de la coloration jaune de la solution, à 54 jours.

L'analyse LC/MS effectuée sur les pics n'apporte aucune réponse quant à la masse de ces composés. Ils ne sont pas ionisables ni en mode négatif (conditions dans lesquelles nous travaillons habituellement), ni en mode positif.

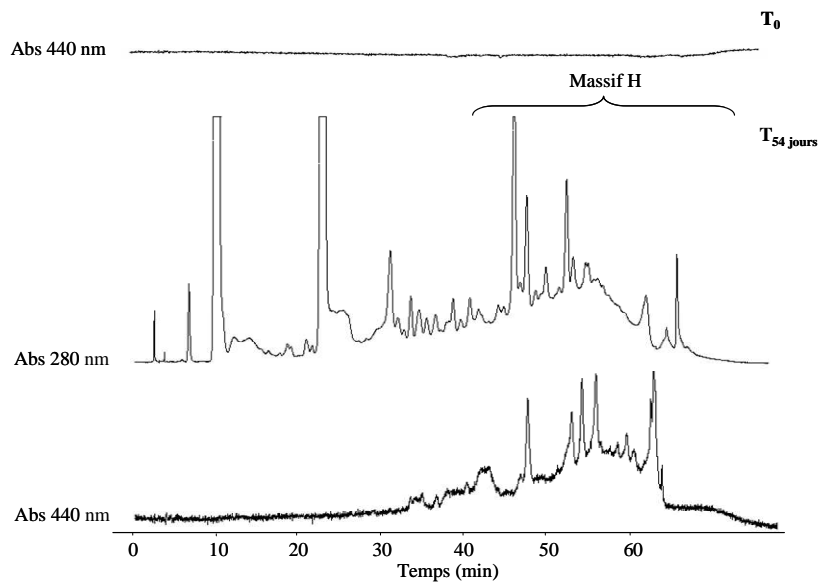


Figure 64 : Chromatogramme HPLC (dans le cas de l'HMF) à 280 nm et 440 nm

II.2.2. Cas du méthyl-5-furfuraldéhyde (M-5-F)

Quand la (+)-catéchine est incubée en présence de M-5-F, une réaction entre les deux réactifs se développe avec la formation de composés oligomériques (Figure 65).

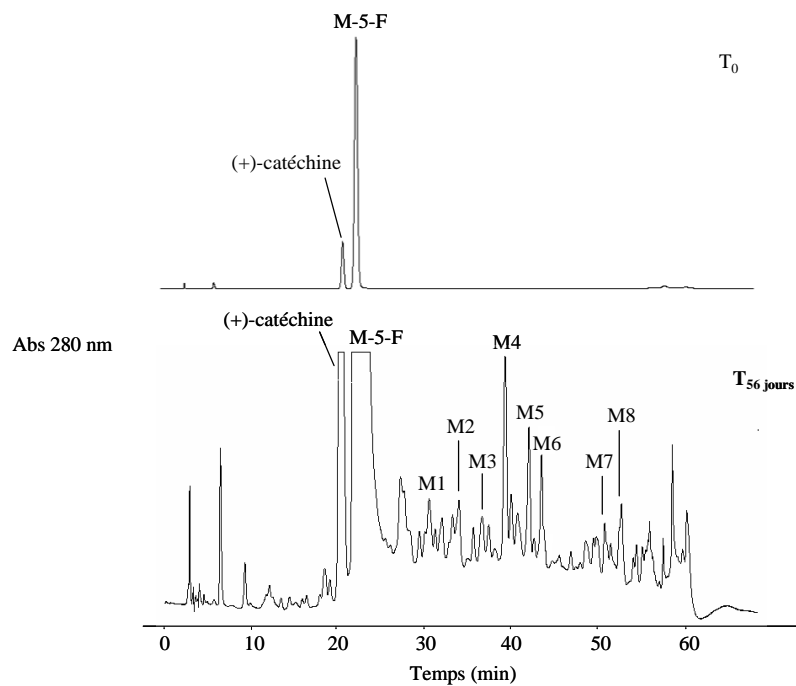


Figure 65 : Chromatogramme HPLC durant la réaction avec le M-5-F réalisée dans une solution hydroalcoolique à pH=3,5. Le rapport molaire catéchine/aldéhyde est de 1,65/3,14 mM

Après 70 jours de réaction, aucun précipité n'est observé dans le fond du récipient à pH 3 ; donc la polymérisation est plus difficile ou plus lente.

- **Caractérisation des produits formés par LC/MS**

Les traces UV enregistrées à 280 nm à 20 jours de réaction et les analyses LC/MS (en mode négatif) montrent que les composés M1, M2, M3, M4, M5, M6 ont tous un pic moléculaire (qui est également le pic de base) égal à m/z : 672 ($[M-H]^-$: 671) comme le montre le spectre de masse (Figure 66A). Leur masse moléculaire correspond exactement à une structure dans laquelle deux catéchines sont liées par un pont méthyl-5-furfuryl, ce sont des adduits dimères.

Les analyses LC/MS révèlent également des composés M7, M8 ayant tous les deux une masse moléculaire égale à 1054 ($[M-H]^-$: 1053) (Figure 66B) et correspondant à des adduits trimères : structure où trois unités « catéchine » sont liées par deux ponts méthyl-5-furfuryl [catéchine-méthyl-5-furfuryl-catéchine-méthyl-5-furfuryl-catéchine].

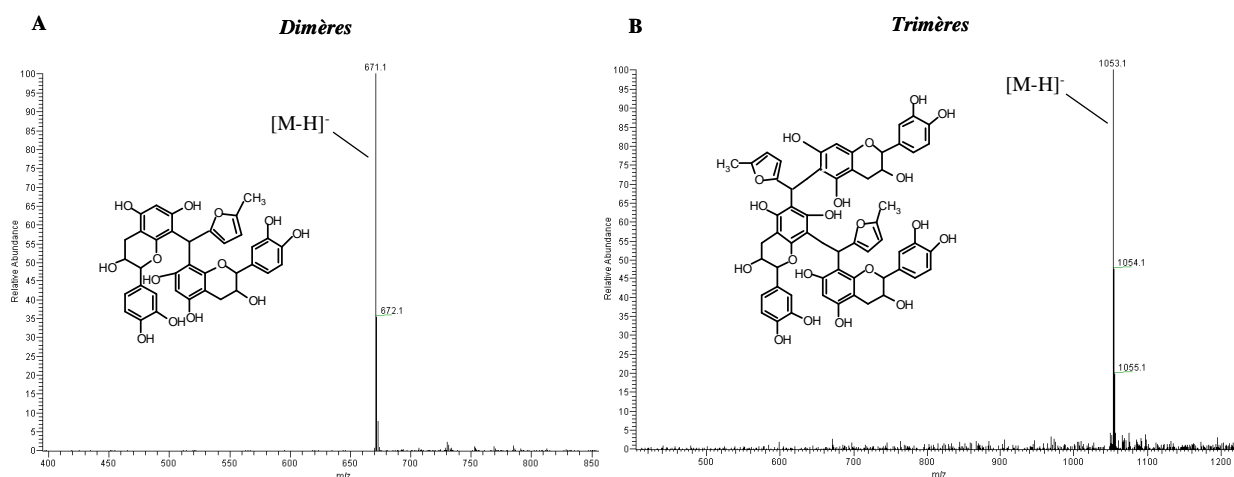


Figure 66 : Spectres de masse des dimères, trimères obtenus durant la réaction avec le méthyl-5-furfuraldéhyde comme aldéhyde

Nous avons fait des analyses complémentaires en mode SIM en sélectionnant l'ion 1053, correspondant au trimère. Le chromatogramme correspondant et le TIC à 20 jours de réaction sont présentés sur la Figure 67. Le mode SIM nous permet de détecter un troisième adduit trimère : M9 et confirment que les composés M7, M8 sont des adduits trimères.

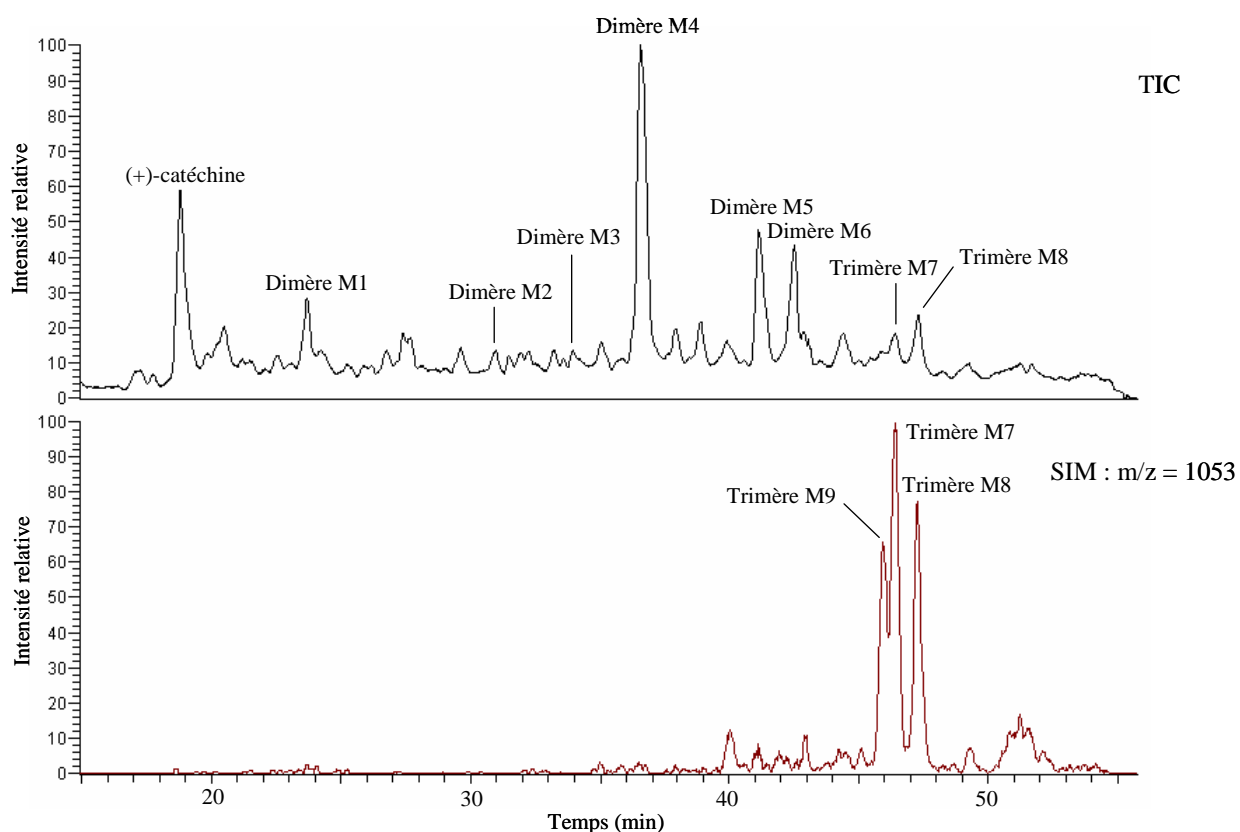


Figure 67 : Chromatogrammes TIC et en mode SIM (ion de masse 1053 sélectionné) durant la réaction avec le M-5-F réalisée dans une solution hydroalcoolique à pH=3,5. Le rapport molaire catéchine/aldéhyde est de 1,65/3,14 mM

- *Etude cinétique de la réaction*

La figure 68 présente l'évolution des produits formés au cours du temps. Les dimères et trimères se forment en plus faible quantité que dans les cas du furfuraldéhyde et de l'HMF. Leur consommation au profit d'oligomères et polymères est quasiment nulle au cours du temps. Une très faible quantité de polymères se forme à partir de 55 jours, pour atteindre de faibles valeurs à 80 jours.

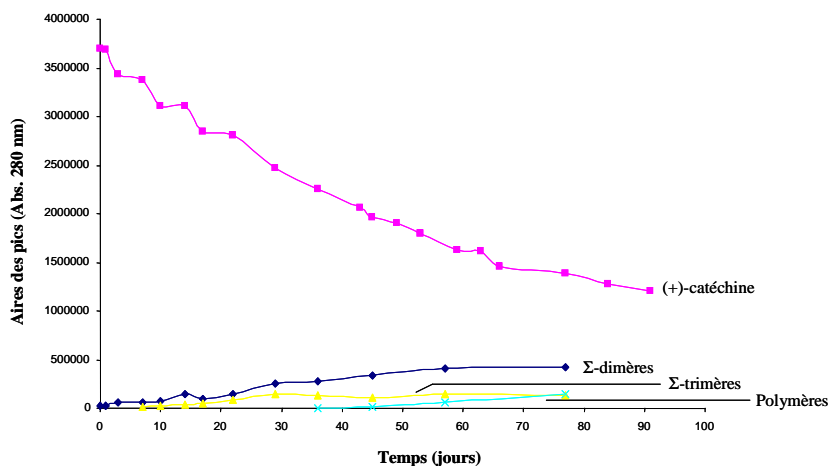


Figure 68 : Evolution des produits formés durant la réaction (+)-catéchine/M-5-F conduite en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM

- *Evolution de la couleur de la solution au cours du temps*

La Figure 72 montre que la coloration de la solution dans le cas du M-5-F est moins marquée qu'avec le HMF et la syringaldéhyde. Les spectres visibles obtenus par spectrophotométrie sont présentés Figure 69. L'absorbance de la solution augmente au cours du temps mais les valeurs à 66 jours de réaction sont deux fois plus faibles que celles obtenues pour les réactions d'addition catéchine/furfuraldéhyde et catéchine/HMF. La solution absorbe donc deux fois moins à 440 nm que les deux précédentes (effet hypochrome). Ce qui est en accord avec les résultats de la Figure 72.

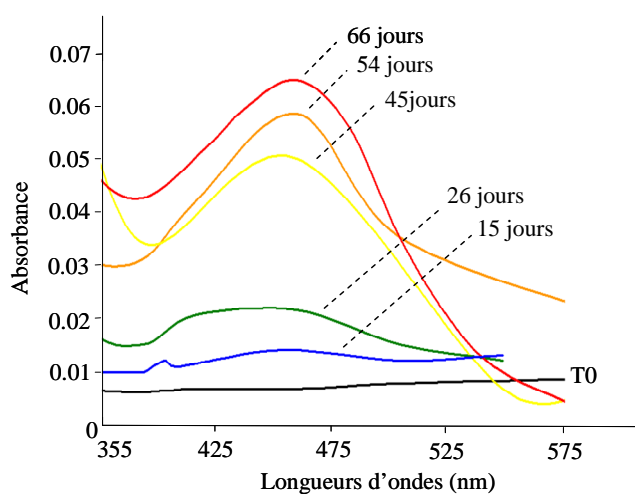


Figure 69 : Spectres visibles (355-600 nm) de la solution durant la réaction entre catéchine-méthyl-5-furfuraldéhyde. Les réactions sont réalisées en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport molaire catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM

Le chromatogramme HPLC à 440 nm (Figure 70) montre que le produit M5 absorbe à cette longueur d'onde et à 54 jours de réaction, il est le produit majoritaire responsable de la couleur jaune de la solution.

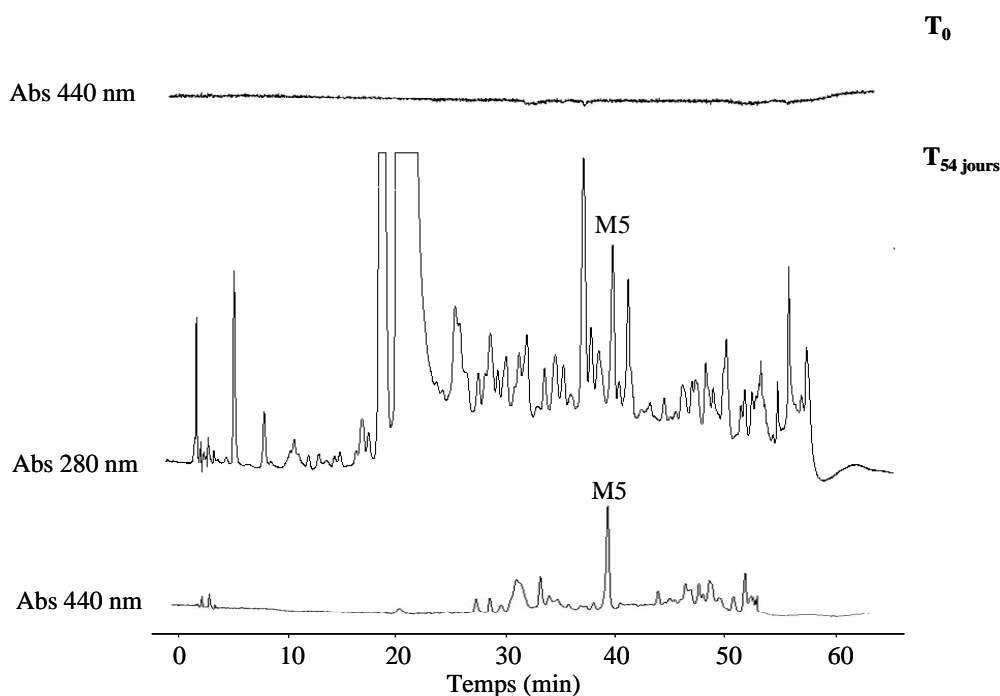


Figure 70 : Chromatogramme HPLC (dans le cas du M-5-F) à 280 nm et 440 nm

Bilan sur les réactions entre (+)-catéchine et aldéhydes furaniques :

La comparaison de ces résultats obtenus montre que la réaction est plus rapide avec l'hydroxyméthylfurfuraldéhyde qu'avec le furfuraldéhyde, comme le montre la figure 71, qui montre clairement qu'avec le temps, la (+)-catéchine diminuent plus rapidement avec le HMF qu'avec le furfuraldéhyde. Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par Es-Safi *et al.*¹⁵⁸ Ces auteurs montrent que la diminution de la (+)-catéchine est plus rapide avec le furfuraldéhyde qu'avec le HMF. Mais, il est très important de noter que nous travaillons avec des valeurs de pH moins acides que ces auteurs. Ils travaillent à pH 2,2, tandis que nous avons adapté la valeur du pH autour de 3-3,5 dans le but d'être plus proche de la valeur moyenne du pH du vin. Les cinétiques de consommation de la (+)-catéchine ont des courbes de tendance avec une allure polynomiale d'ordre 2 ($R^2 > 0.986$) ; le flavanol diminue plus rapidement au début de la réaction. Dans le cas du furfuraldéhyde, la consommation de la (+)-catéchine est plus rapide à pH acide.

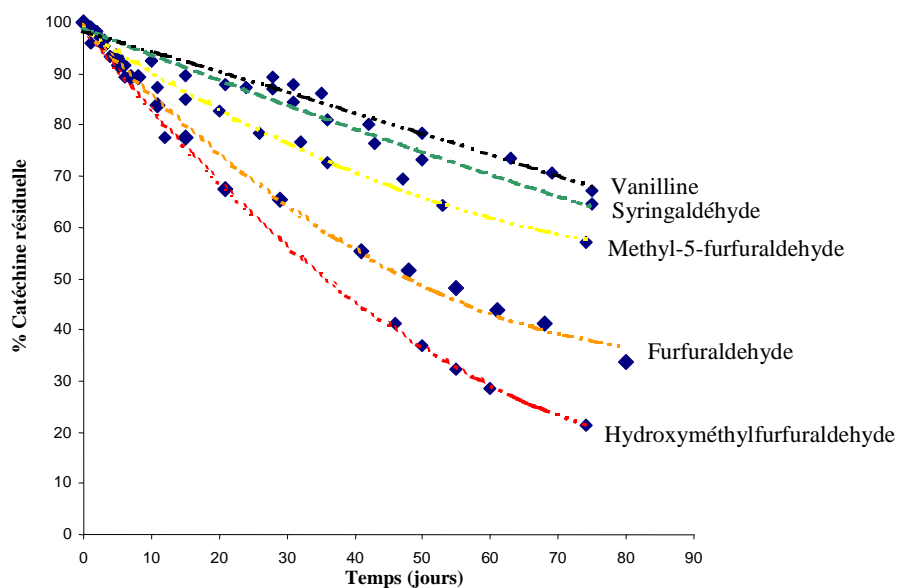


Figure 71 : Evolution de la vitesse de réaction pour différents aldéhydes du bois de chêne et la catéchine. Les réactions sont conduites en solution hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport catéchine/aldéhyde égal à 1,65/3,15 mM. La réaction est suivie par HPLC en phase inverse.

La coloration de la solution (Figure 72) est elle-même moins affectée par la réaction faisant intervenir le HMF ou M-5-F qu'avec le furfuraldéhyde.

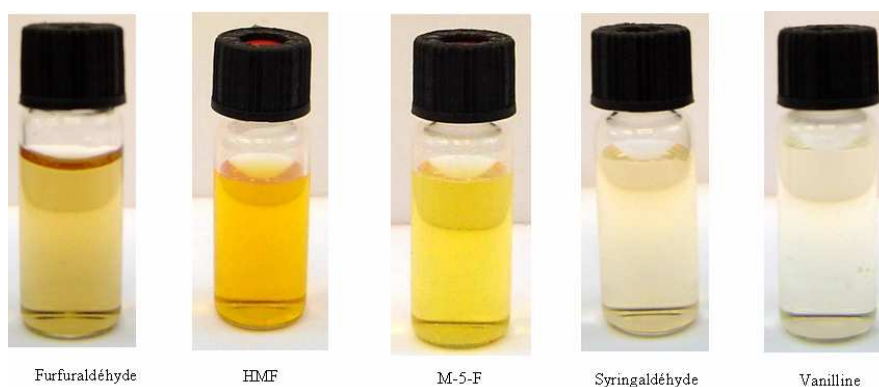


Figure 72 : Comparaison de la couleur obtenue avec différents aldéhydes et la (+)-catéchine. La réaction est stoppée à 53 jours dans une solution hydroalcoolique à pH=3,5. Le rapport molaire catéchine/aldéhyde est égal à 1,65/3,14 mM.

III. Réactions avec les aldéhydes phénoliques

III.1. La syringaldéhyde

Les techniques RMN ^1H et HPLC (Figure 73) permettent de suivre la réaction entre la (+)-catéchine et la syringaldéhyde.

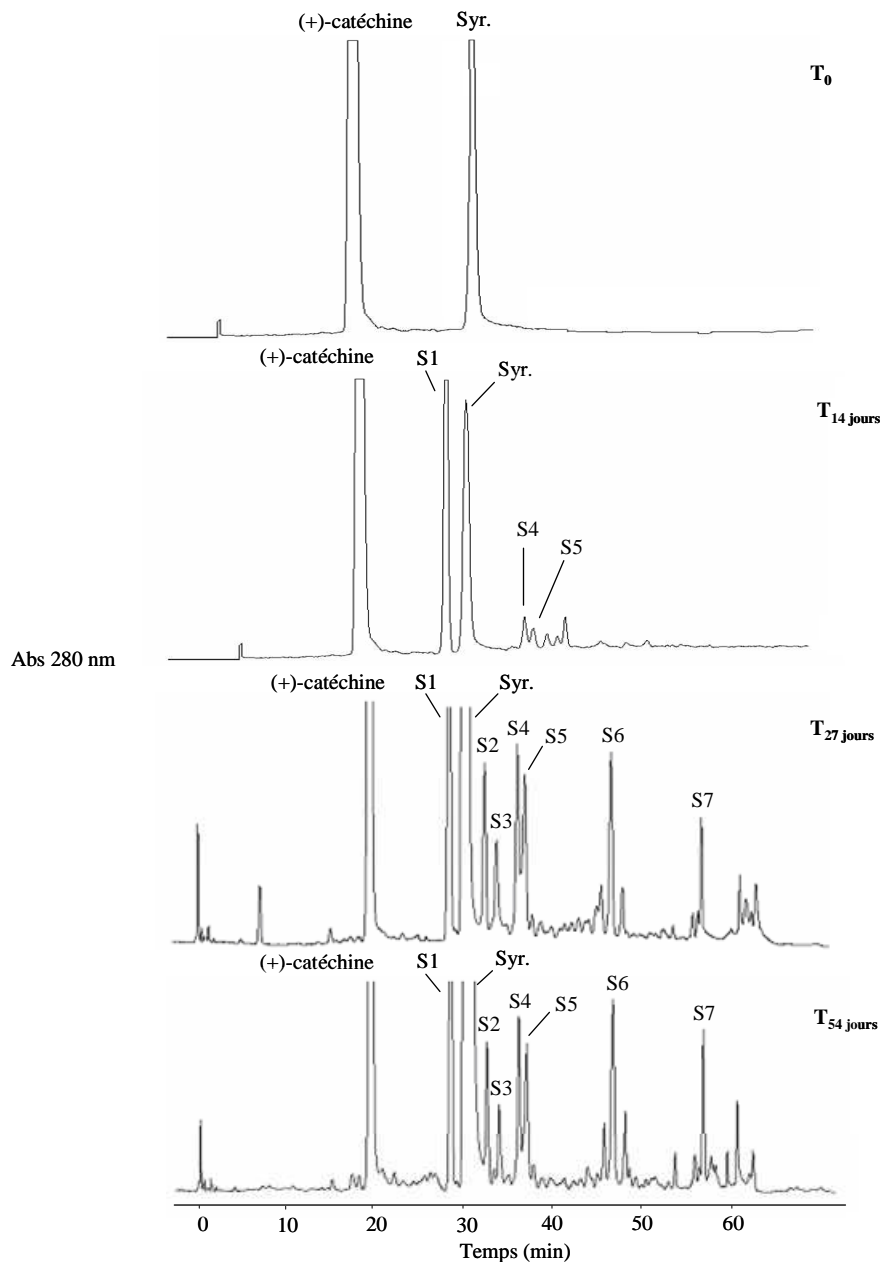


Figure 73 : Chromatogramme HPLC durant la réaction avec le syringaldéhyde réalisée dans une solution hydroalcoolique à $\text{pH}=3,5$. Le rapport molaire catéchine/aldéhyde est de 1,65/3,14 mM

Une décroissance générale de la concentration en (+)-catéchine (Figures 71 et 77) et l'apparition de nombreux produits, initialement absents dans le mélange, sont observées (Figures 73 et 76). La figure 74 montre une diminution des signaux des protons correspondant à la fonction aldéhydique de le syringaldéhydeet des protons des sites C6/C8 de la (+)-catéchine durant la réaction. Ces sites sont effectivement impliqués dans la réaction. Comme dans le cas des aldéhydes furaniques, la Figure 74 montre une diminution plus rapide pour le site C8 que pour le site C6, et une augmentation continue du signal correspondant aux protons de l'eau (en accord avec le schéma réactionnel). La Figure 74 montre que les signaux correspondant au proton de la fonction carbonyle de le syringaldéhyde diminuent plus faiblement que dans le cas où la (+)-catéchine est incubée avec le furfuraldéhyde. Effectivement, le syringaldéhydeest moins polaire que le furfuraldéhyde, donc la molécule est plus difficile à protoner. Au même pH, cette molécule forme moins facilement un carbocation que le furfuraldéhyde ; l'étape initiale de la réaction de condensation est donc lente. En conséquence, au même moment, il restera en solution davantage de molécules de catéchine présentant des sites réactifs libres, et davantage de molécules de syringaldéhyde (celles-ci ne pouvant réagir sans avoir été « activées »).

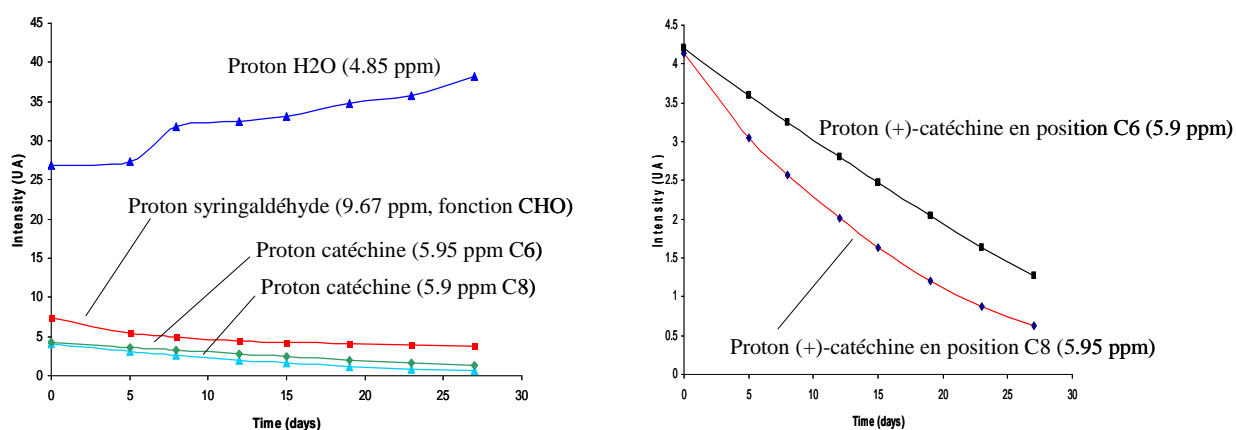


Figure 74 : Comparaison par suivi cinétique (RMN ^1H) des sites C6 et C8 de la (+)-catéchine durant la réaction de polymérisation avec la syringaldéhyde

- *Caractérisation des produits formés par LC/MS*

Les traces UV enregistrées à 280 nm à 31 jours de réaction entre la (+)-catéchine et le syringaldéhydeet les analyses LC/MS (en mode négatif), montrent que les composés S1, S4, et S5 ont tous un pic moléculaire égal à m/z : 744 ($[\text{M-H}]^-$: 743) (Figure 75A). Leur masse moléculaire

correspond exactement à une structure dans laquelle deux unités « catéchine » sont liées par un pont syringaldéhyde.

Les analyses LC/MS révèlent également la présence d'adduits trimères $[M-H]^-$: 1197 (composés S2, S3) (Figure 75B). Leur masse moléculaire (m/z 1198) correspond exactement à trois unités « catéchine » liées par deux ponts syringaldéhyde : [catéchine-syringaldéhyde-catéchine-syringaldéhyde-catéchine].

Les composés nommés S6 et S7 ne s'ionisent pas dans le mode dans lequel nous travaillons (à savoir dans le mode négatif). Nous avons tenté une ionisation en mode positif, mais ces composés ne sont pas ionisables. Donc, il apparaît difficile de caractériser les composés S6 et S7 par LC/MS.

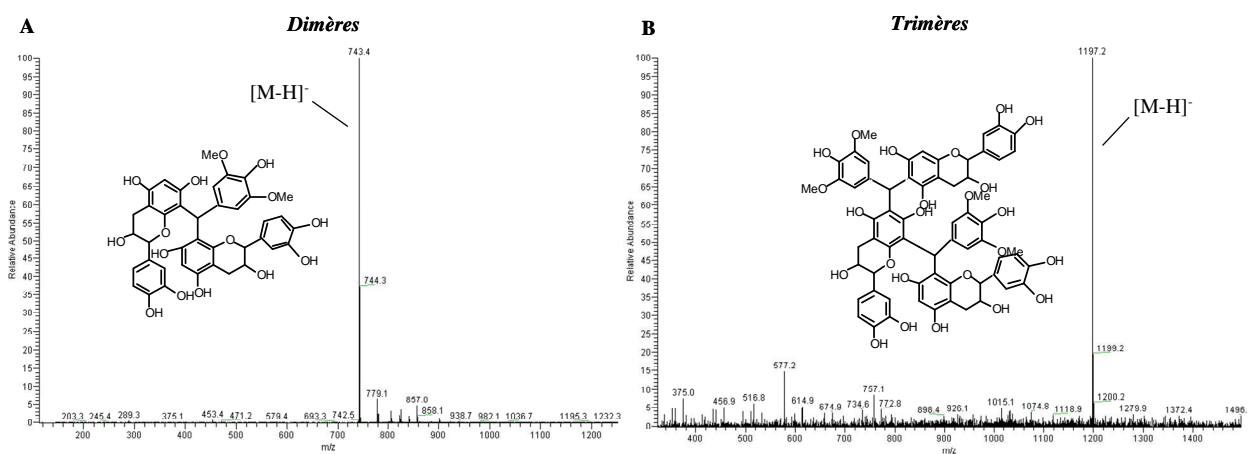


Figure 75 : Spectres de masse des dimères, trimères obtenus durant la réaction avec le syringaldéhyde comme aldéhyde

Nous avons fait des analyses complémentaires en mode SIM en sélectionnant les ions 743 et 1197, correspondant respectivement au dimère et au trimère. Les chromatogrammes correspondants et le TIC à 27 jours de réaction sont présentés sur la Figure 76. Le mode SIM nous permet de détecter un dimère supplémentaire S9 qui s'ajoute aux trois dimères déjà caractérisés : S1, S4 et S5 ; de même par cette technique quatre trimères supplémentaires non observables en LC/DAD : S'5, S8, S10 et S11 s'ajoutent aux trimères préalablement caractérisés à savoir : S2 et S3.

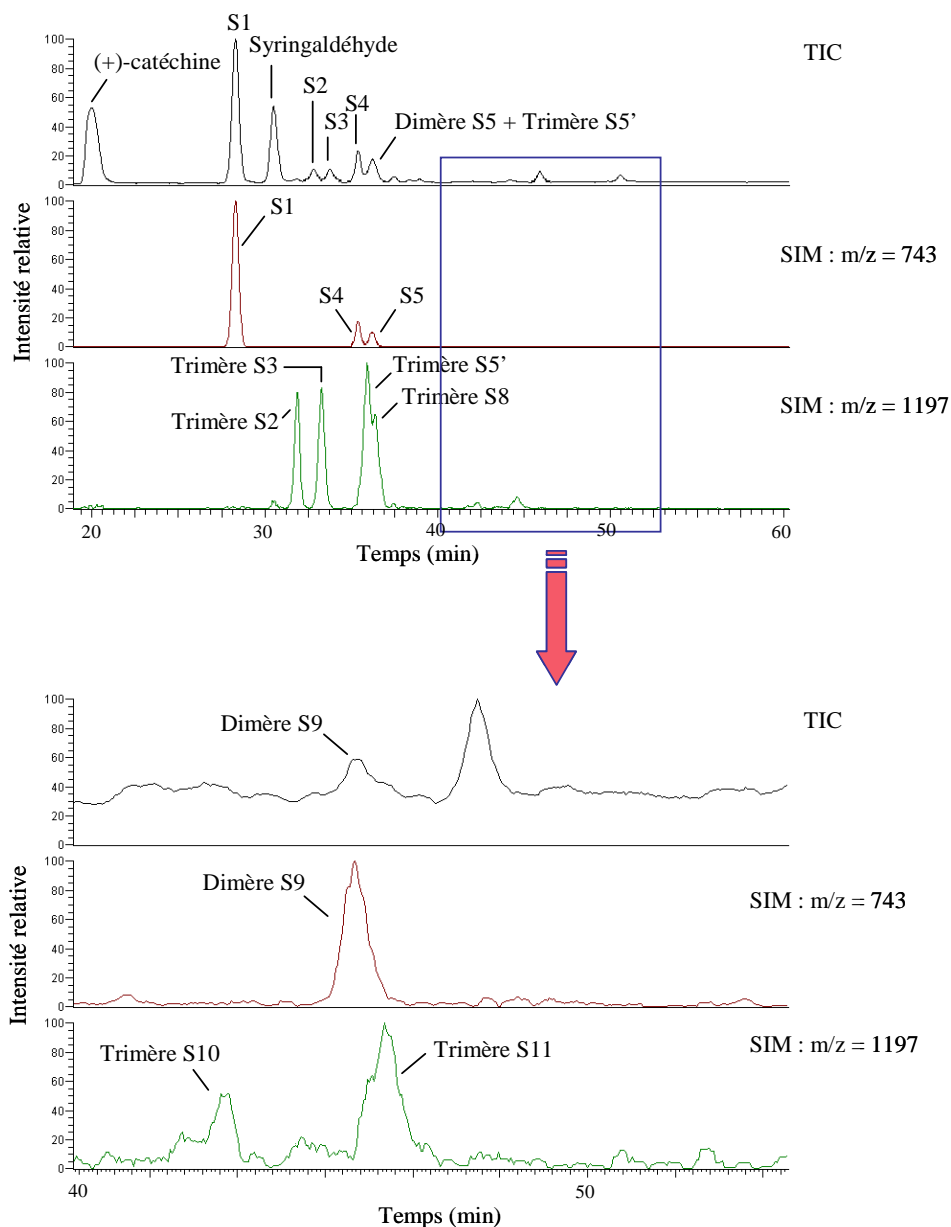


Figure 76 : Chromatogrammes TIC et en mode SIM (ions de masse 743 et 1197 sélectionnés) durant la réaction avec le syringaldéhyde réalisée dans une solution hydroalcoolique à pH=3,5. Le rapport molaire catéchine/aldéhyde est de 1,65/3,14 mM

- *Etude cinétique de la réaction*

L'évolution de la (+)-catéchine suit une courbe de tendance linéaire (coefficient de corrélation $R^2 > 0,985$) (Figure 78). La consommation du flavanol est constante durant 80 jours de réaction à pH 3,5. A pH 3, elle semble être plus faible.

L'évolution des produits (Figure 77) montre que la diminution des produits formés, qui commencent à 25 jours dans le cas du furfuraldéhyde, et n'a pas encore commencé à 80 jours dans le cas de la syringaldéhyde. Ces produits sont formés plus lentement que dans le cas du furfuraldéhyde, mais dans des quantités plus importantes : ils s'accumulent, donc il est difficile d'obtenir une réaction de polymérisation avec cette famille d'aldéhydes.

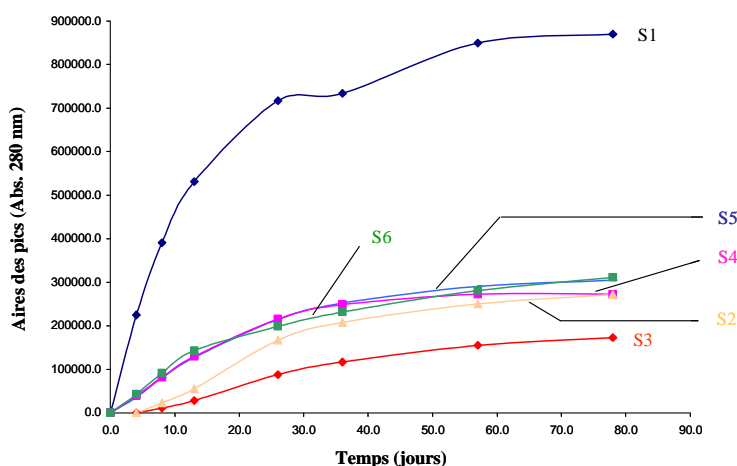


Figure 77 : Evolution des composés S1, S2, S3, S4, S5, S6 et S7 formés durant la réaction catéchine-syringaldéhyde conduite en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM

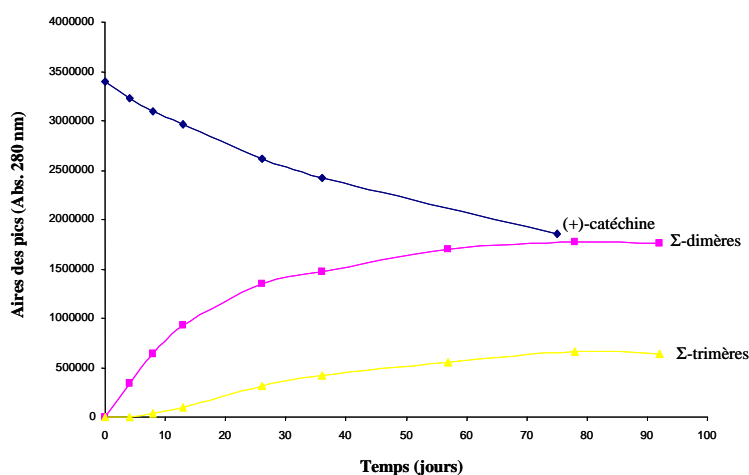


Figure 78 : Evolution des produits formés durant la réaction (+)-catéchine-syringaldéhyde conduite en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM

- *Evolution de la couleur de la solution au cours du temps*

La Figure 79 montre une augmentation progressive de l'absorbance dans le jaune-orangé, avec une tendance dans le rose à 71 jours de réaction (longueur d'onde autour de 520 nm). Quelque soit la longueur d'onde, l'absorbance reste néanmoins inférieure à celle observée dans le cas du furfuraldéhyde ou de l'hydroxyméthylfurfuraldéhyde (Figures 57-63).

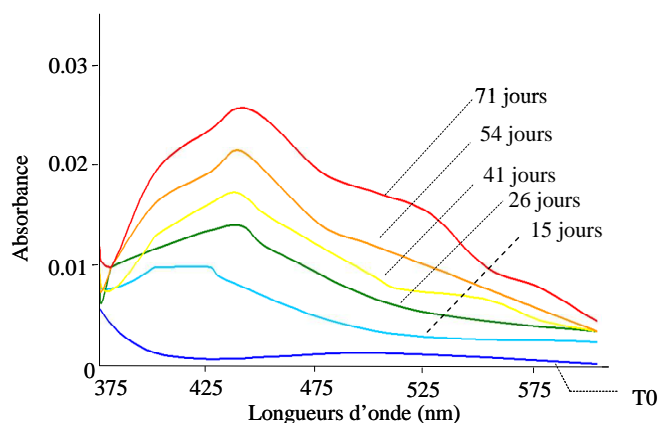


Figure 79 : Spectres visibles (375-600 nm) de la solution durant la réaction entre catéchine-syringaldéhyde. Les réactions sont réalisées en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport molaire catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM

Le chromatogramme HPLC à 440 nm (Figure 80) montre que les produits nommés S6 et S7 sont les molécules majeures responsables de la couleur jaune de la solution.

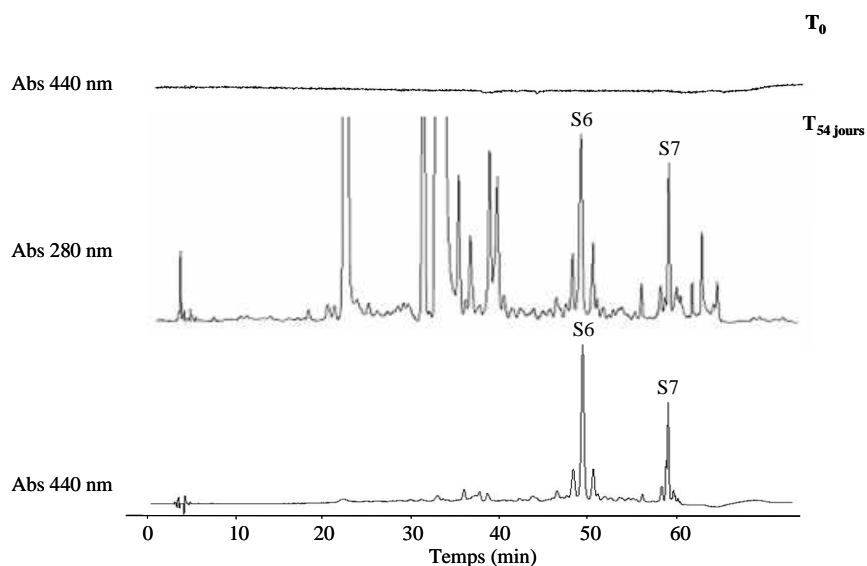


Figure 80 : Chromatogramme HPLC (dans le cas de la syringaldéhyde) à 280 nm et 440 nm

Le produit S6 a été caractérisé par LC/MS : il s'agit d'un dimère catéchine-syringyl-catéchine. Par contre, le composé S7 n'est pas ionisable, ni en mode négatif, ni en mode positif.

III.2. Comparaison avec d'autres aldéhydes phénoliques

La Figure 81 présente les chromatogrammes HPLC à T0, T22 et T31 jours dans le cas de la vanilline comme aldéhyde.

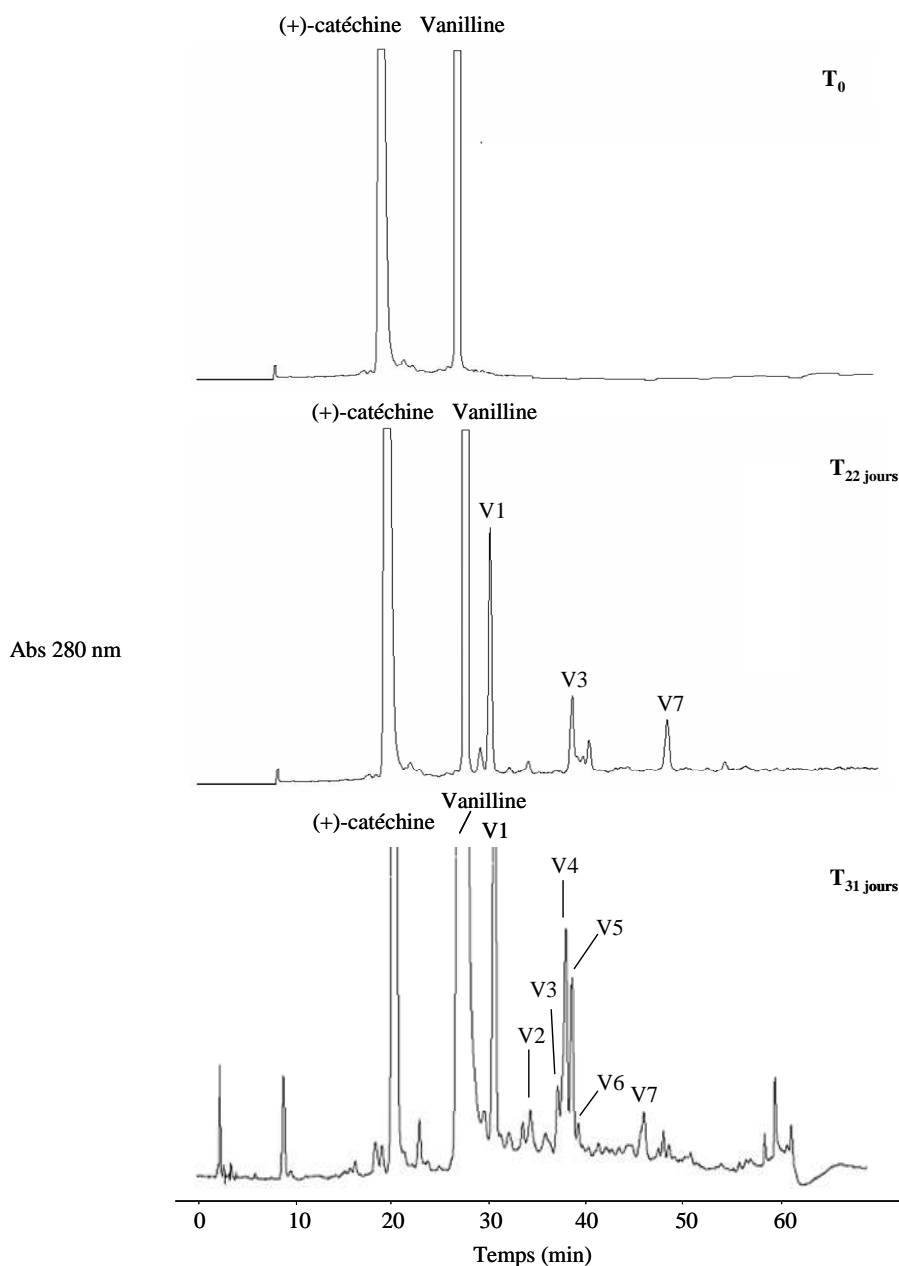


Figure 81 : Chromatogramme HPLC durant la réaction avec la vanilline réalisée dans une solution hydroalcoolique à pH=3,5. Le rapport molaire catéchine/aldéhyde est de 1,65/3,14 mM

En présence de vanilline comme autres aldéhydes phénoliques, la diminution de la (+)-catéchine est plus faible que dans le cas de le syringaldéhyde (Figure 71). La vitesse de disparition du flavanol est constante entre T0 et 80 jours ($R^2=0,996$ avec une courbe de tendance linéaire).

- Caractérisation des produits formés par LC/MS

Les traces UV (Figure 61) enregistrées à 280 nm à 31 jours de réaction entre la (+)-catéchine et la vanilline et les analyses LC/MS (en mode négatif), révèlent la présence de trois adduits dimères $[M-H]^-$: 713 (composés V1, V4, V5) (Figure 82A). Leur masse moléculaire (714 amu) correspond exactement à une structure dans laquelle deux unités « catéchine » sont liées par un pont vanillyl.

Les analyses LC/MS révèlent aussi la présence de quatre adduits trimères $[M-H]^-$: 1137 (composés V2, V3, V6, V7) (Figure 82B). Leur masse moléculaire (m/z 1138) correspond exactement à une structure dans laquelle trois unités « catéchine » sont liées à deux ponts vanillyl : [catéchine-vanillyl-catéchine-vanillyl-catéchine].

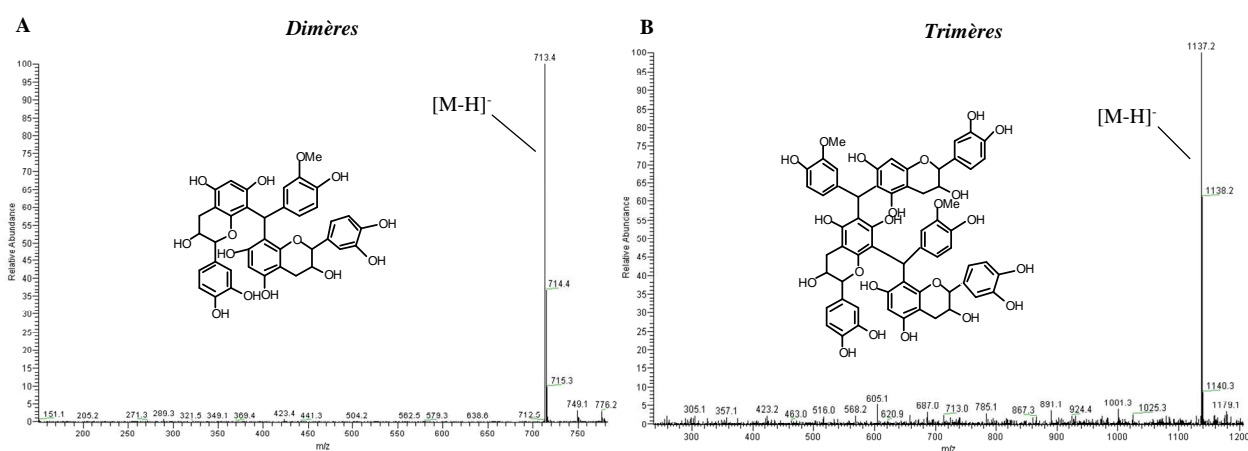


Figure 82 : Spectres de masse des dimères, trimères de réaction avec la vanilline comme aldéhyde

Nous avons fait des analyses complémentaires en mode SIM en sélectionnant les ions 713 et 1138, correspondant respectivement au dimère et au trimère. Les chromatogrammes correspondants et le TIC à 31 jours de réaction sont présentés sur la Figure 83. Le mode SIM nous permet de confirmer la présence des dimères V1, V4 et V5 ; de même par cette technique un

trimère supplémentaire non observable en LC/DAD : V8 s'ajoute aux trimères préalablement caractérisés à savoir : V2, V3, V6 et V7.

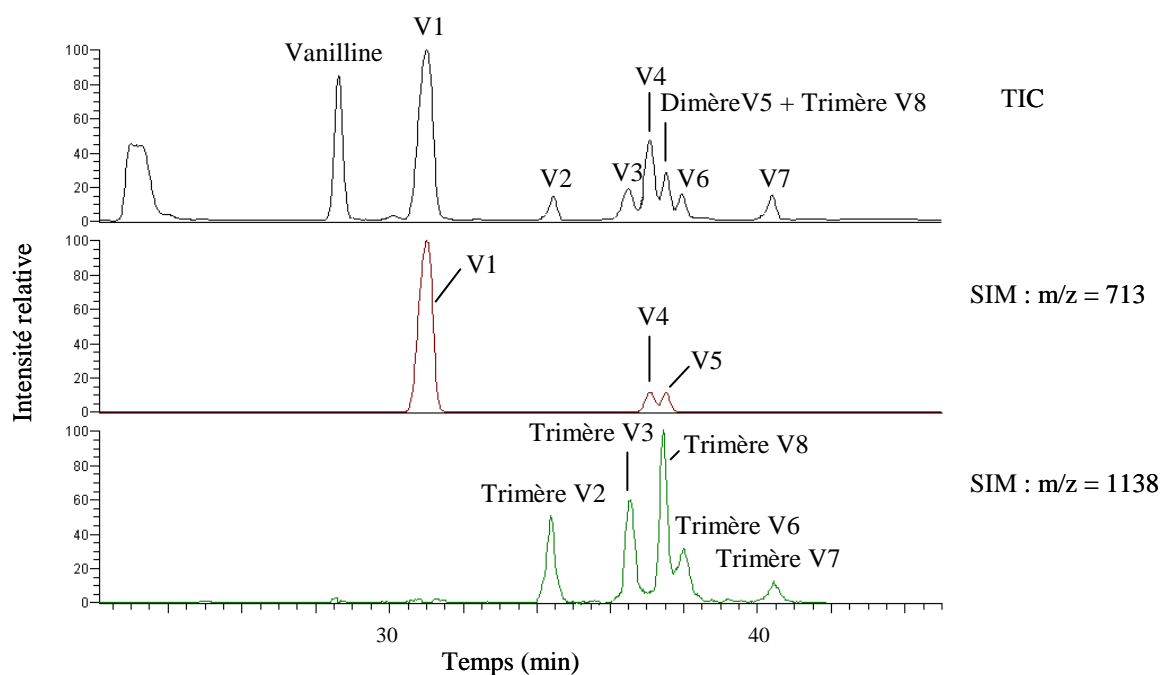


Figure 83 : Chromatogrammes TIC et en mode SIM (ions de masse 713 et 1138 sélectionnés) durant la réaction avec la vanilline réalisée dans une solution hydroalcoolique à pH=3,5. Le rapport molaire catéchine/aldéhyde est de 1,65/3,14 mM

- *Etude cinétique de la réaction*

Le nombre de produits formés en présence de vanilline dans le milieu réactionnel est inférieur au nombre de produits formés en présence de syringaldéhyde. V1, V4, V5 sont trois dimères catéchine-vanillyl-catéchine. Ces composés se forment plus lentement que dans le cas du syringaldéhyde mais dans des proportions identiques (Figures 84 et 85). Par contre, on n'observe pas de massif à la fin du chromatogramme, ce qui laisse à supposer qu'il n'y a pas de phénomène de polymérisation notable, contrairement aux aldéhydes furaniques.

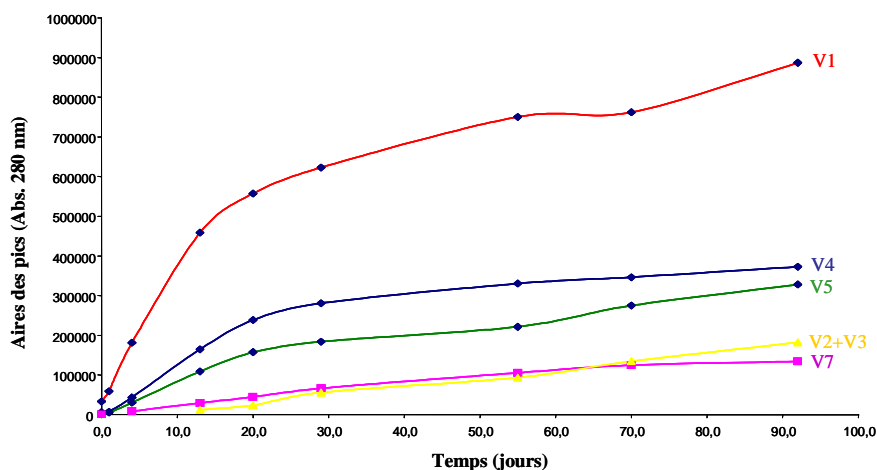


Figure 84 : Evolution des composés V1, V2, V3, V4, V5, V6 et V7 formés durant la réaction (+)-catéchine-vanilline conduite en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM

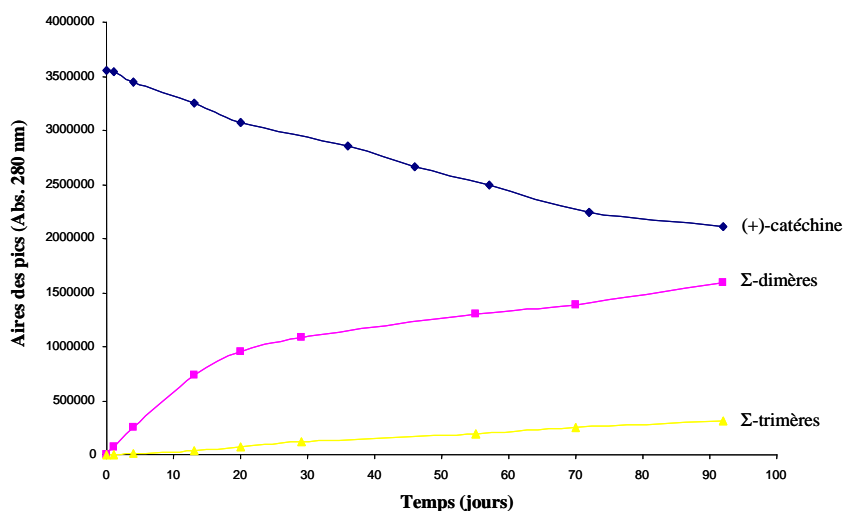


Figure 85 : Evolution des produits formés la réaction conduite en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM

- *Evolution de la couleur de la solution au cours du temps*

La figure 86 montre une augmentation progressive de l'absorbance dans le jaune-orangé. L'absorbance est inférieure, quelque soit la longueur d'onde, à celle observée dans le cas du syringaldéhyde. La figure 72 confirme ce résultat. A 53 jours de réaction, la solution contenant la (+)-catéchine et le syringaldéhyde paraît légèrement colorée (jaune pâle) par rapport au témoin

alors que la couleur de la solution contenant la (+)-catéchine et la vanilline est très peu différente de celle du témoin.

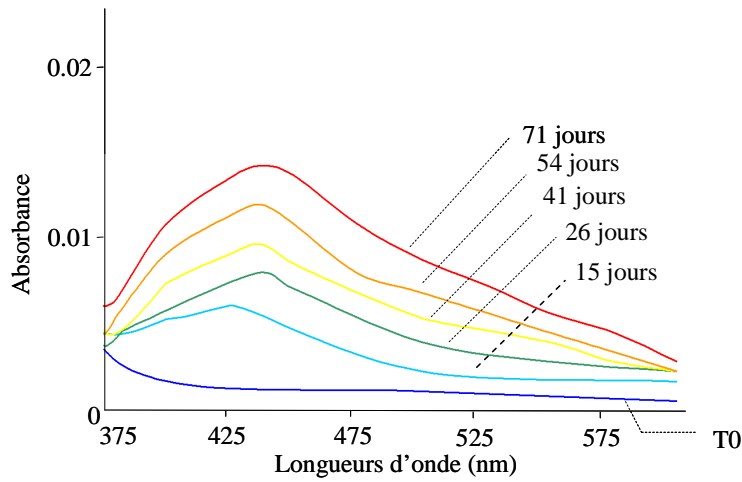


Figure 86 : Spectres visibles (375-600 nm) de la solution durant la réaction entre catéchine-vanilline. Les réactions sont réalisées en milieu hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport molaire catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM

Le chromatogramme HPLC à 440 nm (Figure 87) montre significativement qu'aucun des composés observés à 280 nm n'absorbent à 440 nm. Donc aucun des produits formés durant la réaction (+)-catéchine-vanilline (identifiés en LC/UV) ne peuvent donner une coloration jaune à la solution.

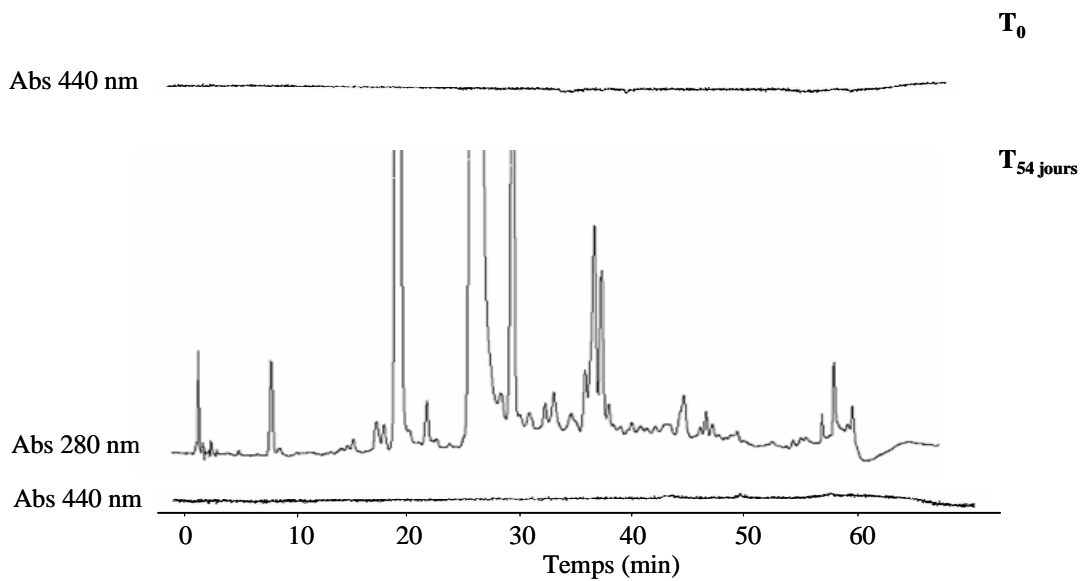


Figure 87 : Chromatogramme HPLC (dans le cas de la vanilline) à 280 nm et 440 nm

Conclusion :

Nous montrons ainsi dans cette première partie de chapitre que ce type de réaction suggère une polymérisation en chaîne par empilement successif d'un flavanol et d'un aldéhyde permettant l'augmentation de la masse moléculaire jusqu'à épuisement des substrats. Nous mettons également en évidence une différence de réactivité entre les deux types d'aldéhydes : furaniques et phénoliques. Dans la Figure 71, nous avons comparé l'évolution de la (+)-catéchine incubée séparément avec cinq aldéhydes différents et ainsi nous pouvons les classer selon leur réactivité. Premièrement, nous notons que les aldéhydes furaniques sont plus réactifs que les aldéhydes phénoliques. L'HMF est le plus réactif parmi les cinq, puis le furfuraldéhyde, puis le méthyl-5-furfuraldéhyde, le syringaldéhyde et la vanilline.

Quelque soit l'aldéhyde (furanique ou phénolique), les produits formés avec la (+)-catéchine sont de même nature : dimères (catéchine-aldéhyde-catéchine), ou trimères, voire tétramères pour certains ; la formation de composés très polymérisés n'apparaît seulement qu'en présence d'aldéhydes furaniques.

Les solutions catéchine/aldéhydes absorbent toutes dans le visible quelque soit la nature de l'aldéhyde. Dans le cas du furfuraldéhyde, la solution est jaune-marron ; dans le cas de l'HMF, la couleur de la solution est jaune épais ; dans le cas du M-5-F, la solution est jaune brillant ; dans le cas de la syringaldéhyde, la solution est jaune léger ; dans le cas de la vanilline, la solution est légèrement jaune.

Le tableau 22 présente les principaux produits de condensation entre la (+)-catéchine et les différents aldéhydes du bois de chêne et leurs fragmentations caractéristiques.

Tableau 22 : Principaux produits de condensation (+)-catéchine/aldéhydes du bois de chêne et leurs fragmentations caractéristiques

Aldéhydes	Produits [Kt-aldéhyde-Kt] _n	[M-H] ⁻		Principaux ions (70 eV), m/z (intensité relative)		
		Calculé	Expérimental			
Furfuraldéhyde	n=1	657.2	657.4	657 (100)		
	n=2	1025.3	1025.4	1025 (100)		
	n=3	1393.3	1393.1	1393 (14)	1105 (12)	1025 (100)
Hydroxyméthylfurfuraldéhyde	n=1	687.2	687.3	687 (100)		
	n=2	1085.2	1085.2	1085 (42)	669 (100)	
Méthyl-5-furfuraldéhyde	n=1	671.1	671.1	671(100)		
	n=2	1053.2	1053.1	1053 (100)		
Syringaldéhyde	n=1	743.2	743.4	743 (100)		
	n=2	1197.3	1197.2	1197 (100)		
Vanilline	n=1	713.2	713.4	713 (100)		
	n=2	1137.3	1137.2	1137 (100)		

IV. Impact du SO₂ sur ces réactions de condensation en milieu modèle

Il est bien connu que le SO₂ est très réactif avec les aldéhydes et particulièrement l'acétaldéhyde pour former une combinaison sulfite-aldéhydes. Nous avons étudié l'effet du SO₂ sur les réactions de condensation entre flavanols et aldéhydes du bois de chêne. Nous avons comparé l'effet du SO₂ avec un aldéhyde furanique : le HMF et un aldéhyde phénolique : la vanilline, en présence de (+)-catéchine durant 80 jours.

Les figures 88 et 89 nous montrent qu'à temps de réaction égal, le chromatogramme, correspondant à la réaction avec SO₂ dans le cas de l'HMF et de la vanilline, présente des pics supplémentaires par rapport au chromatogramme de la réaction sans SO₂.

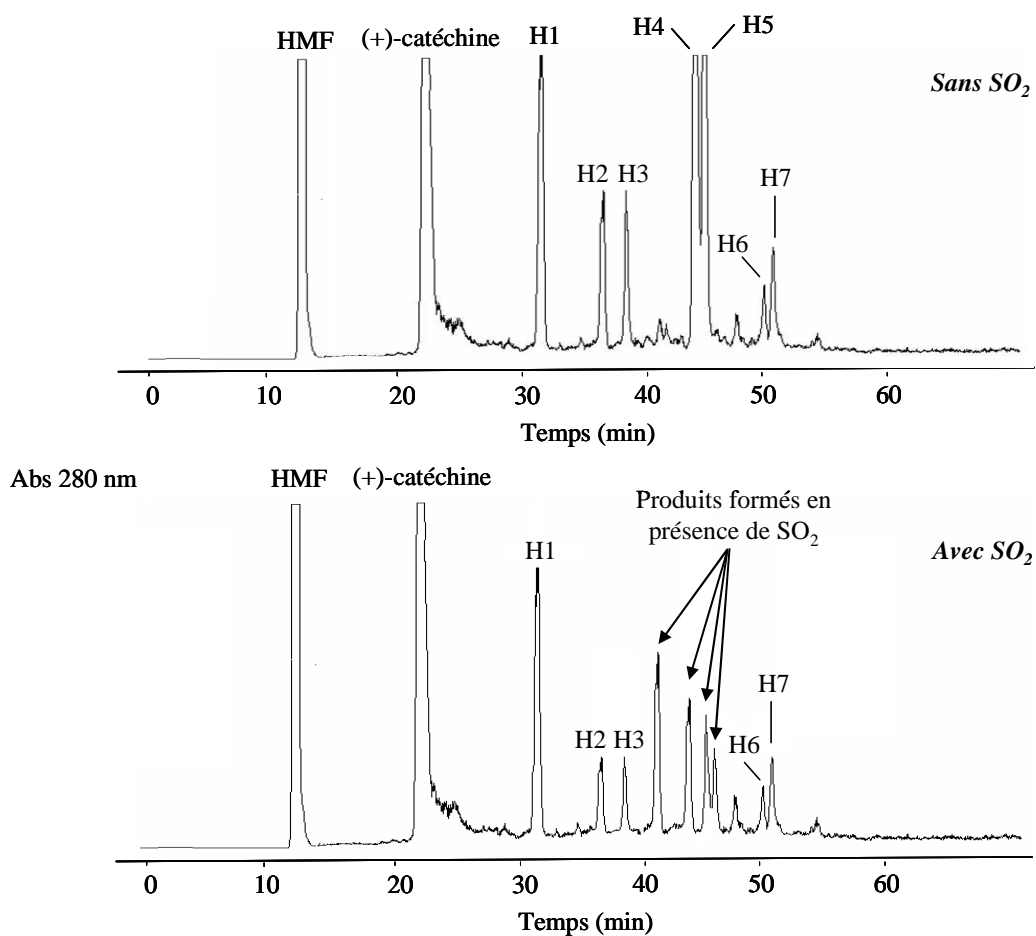


Figure 88 : Chromatogrammes HPLC de la réaction catéchine-HMF à 20 jours de réaction. Les réactions sont réalisées dans une solution hydroalcoolique à pH=3 pour un rapport molaire catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM en présence de 0 puis 30 mg/l de SO₂.

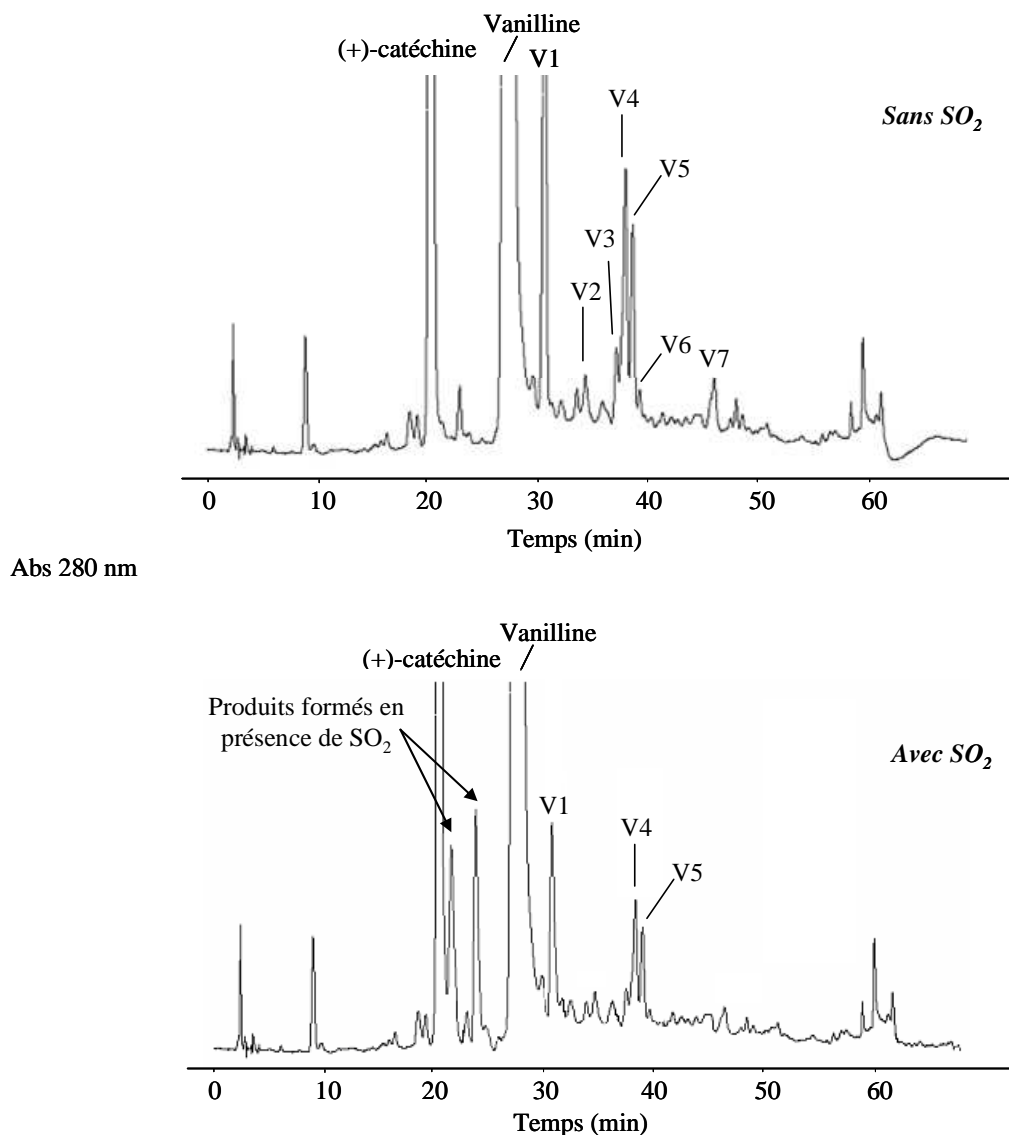


Figure 89 : Chromatogrammes HPLC de la réaction catéchine-vanilline à 31 jours de réaction. Les réactions sont réalisées dans une solution hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport molaire catéchine/aldéhyde : 1,65/3,14 mM en présence de 0 puis 30 mg/l de SO₂.

Le soufre intervient dans ces réactions de condensation pour former de nouveaux composés : dans le cas où l'aldéhyde est l'HMF, quatre nouveaux pics apparaissent et dans le cas de la vanilline deux pics supplémentaires apparaissent dans le chromatogramme.

Dans le cas des aldéhydes furaniques et phénoliques en présence de SO₂, des réactions similaires peuvent donc exister limitant la formation d'adduits catéchine/aldéhydes.

- Caractérisation des produits formés par LC/MS

Les solutions ont été analysées par LC/MS pour caractériser les produits formés.

Dans le cas de la réaction avec l'HMF, nous constatons la présence des dimères H1, H2, H3 et des trimères H6, H7, observés dans la solution sans SO₂, mais aussi l'apparition de quatre nouveaux composés. Ces composés présentent le même spectre de masse avec un pic moléculaire égal à m/z : 751 ([M-H]⁻) (Figure 90). Leur masse moléculaire (m/z 752) correspond à un dimère [catéchine-HMF-catéchine] sur lequel s'est greffée une molécule de soufre.

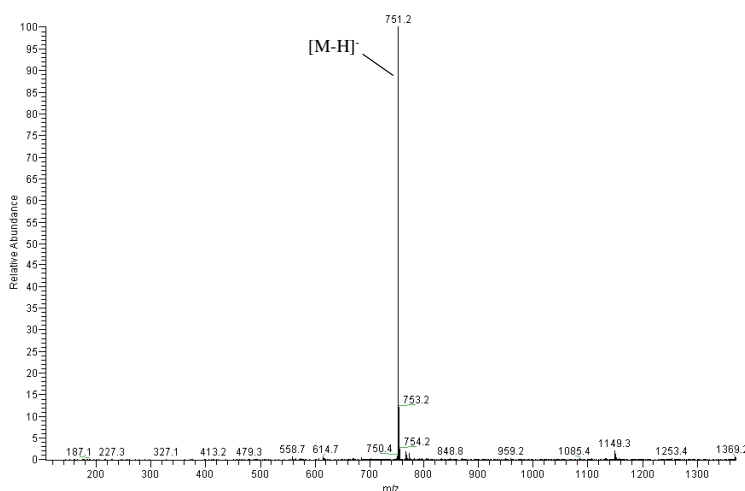


Figure 90 : Spectre de masse des composés formés durant la réaction entre le HMF et la (+)-catéchine en présence de SO₂ à 20 jours de réaction.

Dans le cas de la réaction avec la vanilline, les dimères V1, V4, V5 observés dans la solution sans SO₂, sont également présents dans la solution avec SO₂ mais deux nouveaux composés apparaissent en présence de SO₂. Ces composés présentent le même spectre de masse avec un pic moléculaire égal à m/z : 505 ([M-H]⁻) (Figure 91). Leur masse moléculaire (m/z 506) correspond à une structure du type : catéchine-vanilline+SO₂. La molécule SO₂ se serait greffée sur un intermédiaire de réaction avant la formation des dimères [catéchine-vanillyl-catéchine].

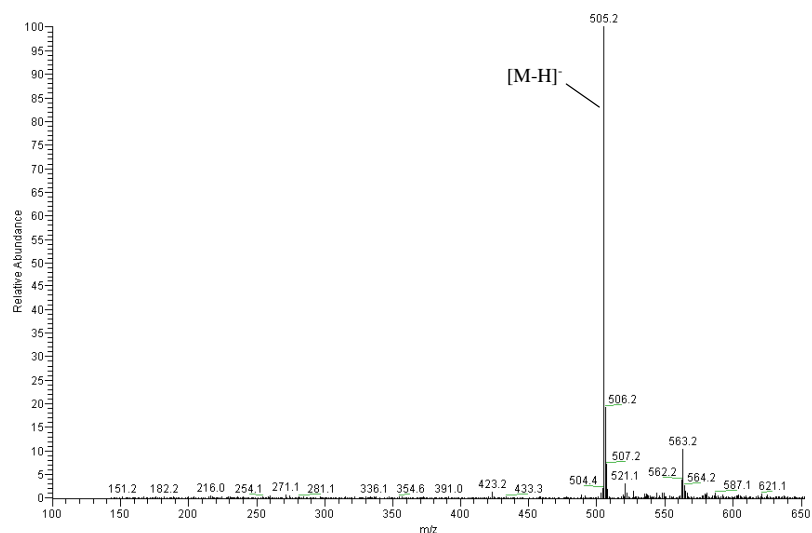


Figure 91 : Spectre de masse des composés formés durant la réaction entre la vanilline et la (+)-catéchine en présence de SO₂ à 31 jours de réaction.

- *Etude cinétique de la réaction*

Les cinétiques de disparition de la catéchine et des aldéhydes montrent que les réactions avec SO₂ évoluent plus lentement que celle sans soufre donc le SO₂ ralentit les réactions de condensation. Les figures 92 A et B résument ces résultats. Une partie du SO₂ se combine avec les aldéhydes par conséquent la quantité d'aldéhydes libres est moins importante que dans des réactions sans SO₂, donc la réaction de polymérisation est ralentie.

La vanilline réagit moins vite que l'HMF, ces observations confirment les résultats présentés dans l'étude ci-dessus.

Dans le cas de la solution modèle, le SO₂ (SO₂ libre) affecte la cinétique de réaction mais seulement de 5 à 10%. L'effet du SO₂ est donc limité.

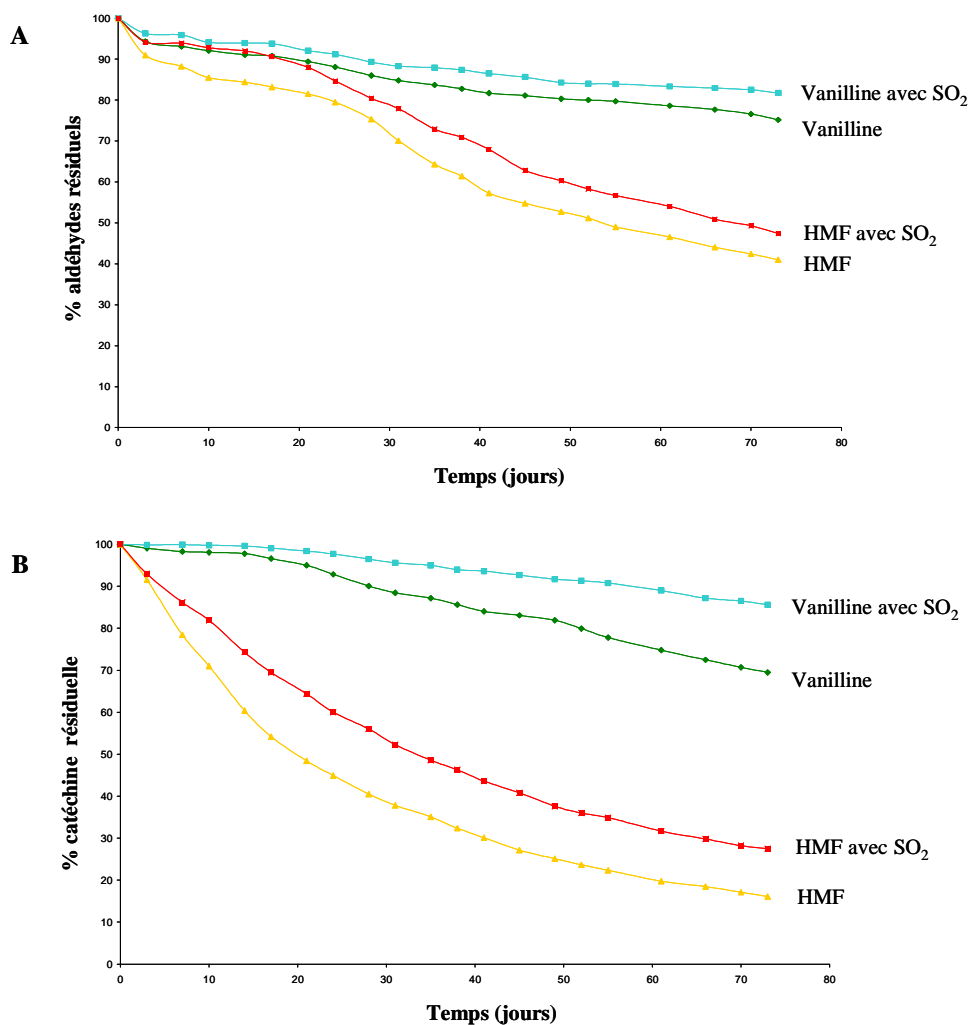


Figure 92 : Evolution de la vitesse de réaction (A : % d'aldéhydes résiduels et B : % de catéchine résiduelle) dans le cas de réactions entre (+)-catéchine et vanilline et entre (+)-catéchine et HMF. Les réactions sont conduites en solution hydroalcoolique à pH=3,5 pour un rapport catéchine/aldéhyde égal à 1,65/3,15 mM. La réaction est suivie par HPLC en phase inverse.

- *Evolution de la couleur de la solution au cours du temps*

L'évolution des solutions sans ajout de SO₂ au cours du temps a été étudiée et présentée précédemment (Figures 63 et 86). Quant aux solutions avec ajout de SO₂, leur couleur évolue différemment au cours du temps.

Dans le cas de l'HMF, à 70 jours de réaction, la solution avec SO₂ présente une absorbance à 440 nm. Sans SO₂ dans le milieu, au même temps de réaction, cette absorbance à

une valeur supérieure (Figure 93). Donc, nous constatons que la réaction est ralentie avec le SO_2 mais pas inhibée.

La solution avec SO_2 à 70 jours de réaction, dans le cas de la vanilline, présente une légère absorbance à 440 nm par contre cette absorbance est plus importante dans le cas de la solution sans SO_2 (Figure 94). La réaction est ralentie dans le cas des aldéhydes phénoliques en présence de SO_2 comme dans le cas des aldéhydes furaniques.

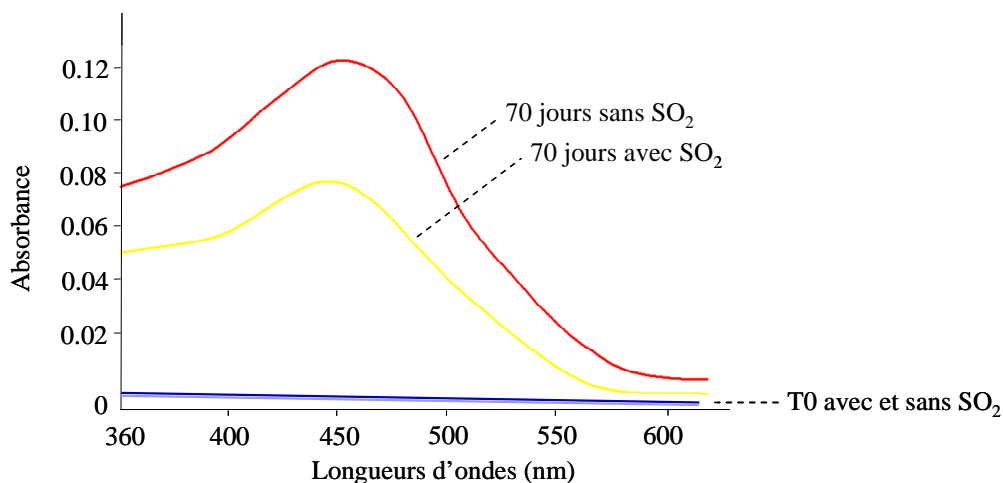


Figure 93 : Spectres visibles (360-600 nm) de la solution catéchine-HMF à 70 jours de réaction. Les réactions sont réalisées en milieu hydroalcoolique à $\text{pH}=3,5$ pour un rapport molaire catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM avec et sans SO_2

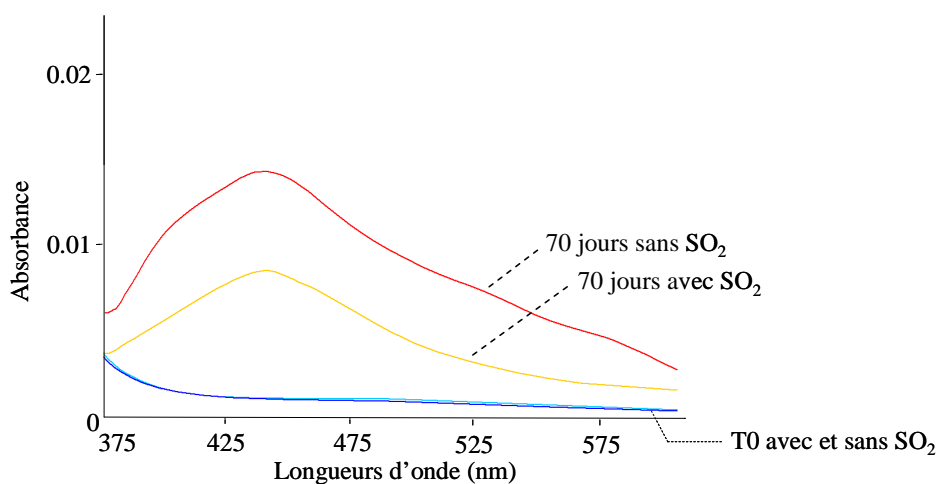


Figure 94 : Spectres visibles (375-600 nm) de la solution catéchine-Vanilline à 70 jours de réaction. Les réactions sont réalisées en milieu hydroalcoolique à $\text{pH}=3,5$ pour un rapport molaire catéchine/aldéhydes : 1,65/3,14 mM avec et sans SO_2

Mais notons que les produits formés en présence de SO₂ ont une couleur jaune (absorbances à 440 nm).

V. Conclusion

Nous montrons ainsi que les réactions flavanols-aldéhydes du bois de chêne sont des réactions de condensation (polymérisation en chaîne par empilement successif d'un flavanol et d'un aldéhyde). Néanmoins, la formation de composés très polymérisés n'apparaît seulement qu'en présence d'aldéhydes furaniques.

Nous mettons également en évidence une différence de réactivité entre les deux types d'aldéhydes présents dans le bois de chêne : furaniques et phénoliques. Les aldéhydes furaniques sont plus réactifs que les aldéhydes phénoliques. Les solutions catéchine/aldéhydes absorbent toutes dans le visible quelque soit la nature de l'aldéhyde. C'est pourquoi, nous allons dans la partie V-C de ce chapitre centrer notre étude sur l'impact de ces adduits sur la couleur des vins blancs élevés en fûts de chêne.

L'effet du SO₂ sur les réactions de condensation entre flavanols et aldéhydes du bois de chêne n'est pas à négliger. Les cinétiques de disparition de la catéchine et des aldéhydes montrent que les réactions avec SO₂ évoluent plus lentement que celle sans soufre donc le SO₂ ralentit les réactions de condensation. Le SO₂ (SO₂ libre) affecte la cinétique de réaction de 5 à 10% seulement. L'effet du SO₂ est donc limité.

Les solutions catéchine/aldéhydes absorbent toutes dans le visible quelque soit la nature de l'aldéhyde. C'est pourquoi, nous allons dans la partie V-C de ce chapitre centrer notre étude sur l'impact de ces adduits sur la couleur des vins blancs élevés en fûts de chêne.

Partie expérimentale du chapitre V-A

I. Réactions

La solution modèle de vin utilisée est une solution à 12% d'éthanol et pH 3,5 (5 g/l d'acide tartrique, NaOH 1 N jusqu'à atteindre pH 3,5. Les valeurs de pH variant de 3 à 3,5 sont obtenues par addition d'acide ou de base dans le milieu décrit au-dessus et ajustées à l'aide d'un pH-mètre.

La (+)-catéchine (1,65 mM) est préparée dans chaque milieu ainsi obtenu (50 ml). Les dérivés aldéhydiques (acétaldéhyde, furfuraldéhyde, 5-(hydroxyméthylfurfuraldéhyde, 5-méthylfurfuraldéhyde, vanilline, syringaldéhyde) sont ajoutés à la concentration de 3,14 mM. Les solutions préparées sont incubées à 20°C, à l'obscurité, en absence d'oxygène et les réactions sont périodiquement analysées par chromatographie liquide (LC) couplée à un détecteur UV et à un spectromètre de masse (ESI-MS) durant une période variant selon la nature de l'aldéhyde. La quantification de la (+)-catéchine résiduelle et de tous les composés formés est réalisée sur la base des aires des pics à 280 nm. L'identification des produits formés est réalisée sur la base de leurs spectres UV-Visible et de leurs spectres de masse, et par comparaison avec des standards.

Les mêmes expériences ont été menées en présence de SO₂ : 30 mg/l de HNaSO₃ (37.5%) sont ajoutés dans les solutions modèles précédentes de (+)-catéchine/HMF et (+)-catéchine/vanilline.

II. Analyses HPLC/UV-Visible

Les analyses HPLV/UV-Visible sont obtenues grâce à un système de séparation Waters, un détecteur UV-Visible Waters, et un logiciel de chromatography Millenium32.

Les conditions d'analyses chromatographiques par HPLC sont les suivantes :

- Colonne séparative phase inverse : Interchrom C18 (250 mm x 4,6 mm x 10 µm) protégée par une colonne de garde composé du même matériel.

- Programmation gradient : 5 à 30% de B en 40 min, augmentation du pourcentage de B jusqu'à 40% en 10 min et finalement jusqu'à 100% de B en 5 min, suivi d'un lavage et d'un re-équilibrage de la colonne pendant 15 min.
- Solvant A : H₂O/acide formique (98 :2, v/v)
- Solvant B : Acétonitrile/H₂O/acide formique (80 :18 :2, v/v/v)
- Débit constant de 1 ml/min
- Volume d'injection : 20 µl

Les spectres UV-Visible sont enregistrés à 280 nm et 440 nm.

III. Analyses LC/ESI-MS

Les mesures de masse sont obtenues à l'aide d'un quadropole LCQ Thermo™ et d'une source d'ionisation électrospray, en mode négatif avec une tension de cône de 4,5 KV. La température du capillaire est de 275°C.

Les conditions d'analyses HPLC sont identiques à celles décrites au-dessus.

IV. Spectres d'absorption

Les mesures spectrophotométriques et les spectres UV-Visible des solutions sont enregistrés grâce à un spectrophotomètre Anthelie Secomam™ équipé d'une cellule en quartz de 1 cm de trajet optique. Les échantillons sont dilués (1/20).

V. Analyses RMN

Les expériences RMN 1D sont réalisées à l'aide d'un spectromètre équipé d'une sonde inverse de 5 mm à 300 MHz pour ¹H. Tous les spectres sont enregistrés en utilisant 3 mg de produit dissout dans 0.5 ml de méthanol deutéré dans un tube de 5 mm. Le pH des expériences RMN est ajusté à pH 3 : nous avons ajouté 7,5 µl d'une solution de DCl (dilué à 1/1000) à 0,5 ml de méthanol deutéré.

Les déplacements chimiques des protons sont donnés en ppm par rapport à une référence TMS. Les spectres du proton sont enregistrés avec une largeur de bande de 6200 Hz et une largeur de pulsation de 80 μ s. Le nombre de scans est de 128.

B- Etude structurale des produits de condensation

I. Etude structurale par RMN

Quand la catéchine et le furfural sont incubés ensemble avec un rapport molaire (2 :1 ; soit 0,017 mol de catéchine et 0,0086 mol de furfuraldéhyde) durant 14 jours à l'obscurité dans une solution modèle de vin (pH 3,5, H₂O :EtOH 88 :12), quatre composés majoritaires se forment (Figure 47), mais seulement trois sont séparés et collectés par chromatographie basse pression (Figure 95 ; pics 1, 2 et 3).¹⁷⁴

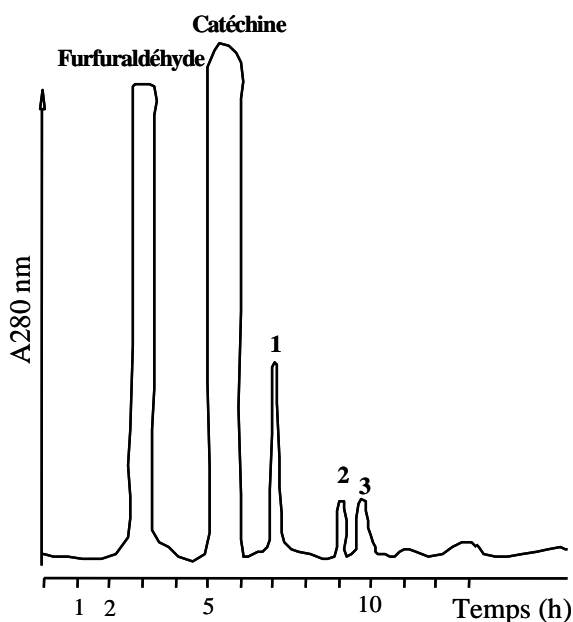


Figure 95 : Chromatogramme basse pression obtenu après deux semaines de réaction dans le noir entre la catéchine et le furfuraldéhyde (rapport molaire catéchine/furfuraldéhyde égal à 2/1). **1**, **2** et **3** sont les trois dimères séparés puis analysés par la suite en RMN.

Comme il a été démontré dans des travaux précédents en utilisant l'acétaldéhyde^{145,146,169} une réaction de condensation intervient entre le carbone 6 ou 8 du cycle A de la partie phloroglucinol de la catéchine et la fonction aldéhyde, aboutissant à la formation de quatre

¹⁷⁴ Nonier, M.F., Pianet, I., Laguerre, M., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Fouquet, E. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 226847, 76-83

isomères différents où les deux molécules de catéchine sont liées par un pont formé avec le squelette de l'aldéhyde. Une telle réaction de condensation donne accès à quatre régioisomères possibles : catéchine-8-furfuryl-8-catéchine, catéchine-6-furfuryl-6-catéchine, et deux catéchine-6-furfuryl-8-catéchine. Dans ce dernier cas, le carbone impliqué dans la liaison devient asymétrique aboutissant à deux diastéréoisomères distincts (Figure 45). Les trois composés élués : 1, 2 et 3 sont obtenus en quantité suffisante pour obtenir des spectres RMN : leurs spectres protons respectifs sont présentés sur la Figure 96.

La détermination de la structure exacte de ces composés est réalisée en utilisant les techniques classiques d'études structurales en RMN bi-dimensionnelle et en utilisant la stratégie générale pour caractériser les procyanidines par RMN.¹⁷⁵

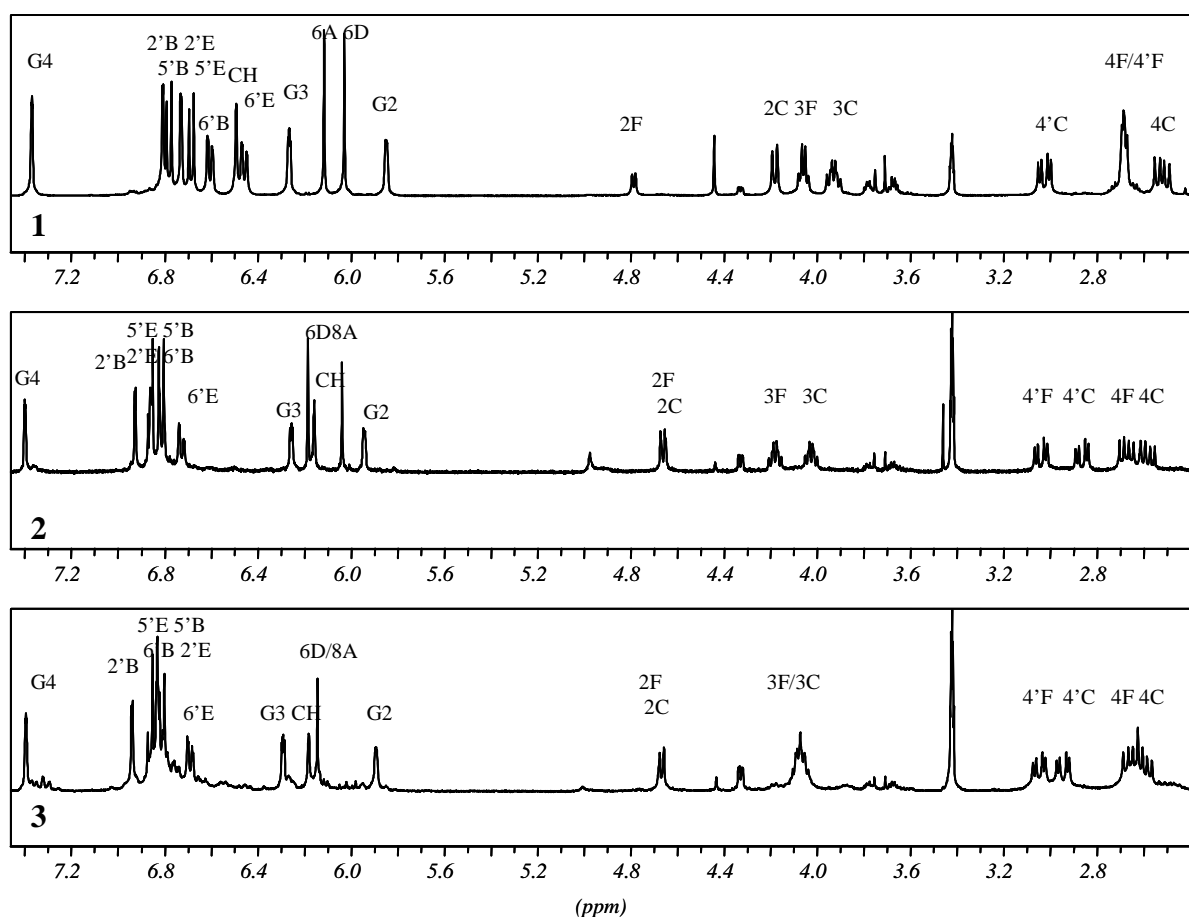


Figure 96 : Spectres RMN ^1H des composés **1**, **2**, et **3** (400 MHz)

L'existence du pont « furfuryl » lié à deux unités « catéchine » est mis en évidence par la présence d'un singulet déblindé (résonnant autour de 6 ppm, Figure 96) attribué au proton du

pont CH-furfuryl et corrélé à des carbones blindés observés dans les spectres HMQC (29,8 ; 30,6 et 30,6 ppm pour les isomères 1, 2 et 3 respectivement, tableau 23) : de tels déplacements chimiques en proton et en ^{13}C sont caractéristiques de ce type de liaison.

Ceci est confirmé par les spectres TOCSY enregistrés pour chaque isomère reflétant l'existence d'un système de spins correspondant aux trois protons du groupe furfuryl et du proton du -CH. La figure 97 présente, à titre d'exemple, le spectre TOCSY de l'isomère 1 : H2G à 5,85 ppm, H3G à 6,27 ppm, H4G à 7,38 ppm et le proton du -CH à 6,5 ppm.

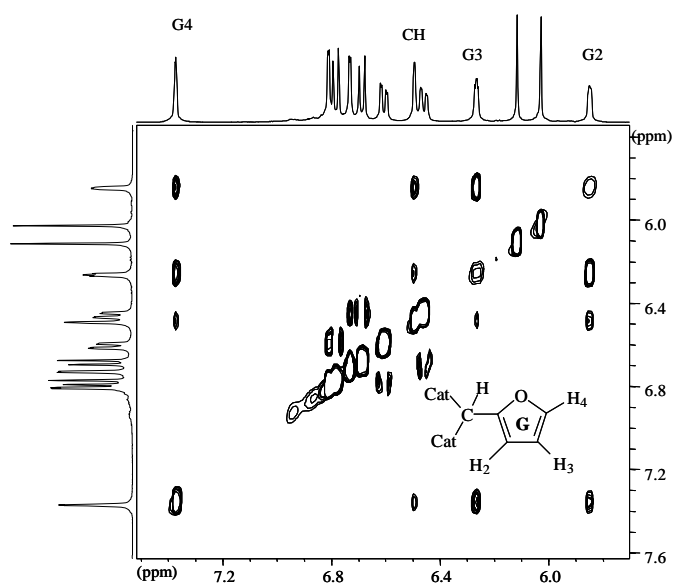


Figure 97 : Zone du spectre TOCSY de l'isomère **1** mettant en évidence le pont furfuryl permettant de visualiser les systèmes de spins relatifs aux protons du groupe furfuryl et du proton du -CH

L'attribution des résonances du proton et du ^{13}C étant réalisée, la principale difficulté réside dans la position de la liaison, pour cela il est important de distinguer les carbones C5, C7 et C8a des cycles A et D : ces 6 carbones résonnent entre 152,7 et 155,2 ppm.

Il est indispensable de différencier ces carbones car une corrélation entre le proton H4C et le carbone C5D caractérise une régiochimie 4-6 alors qu'une corrélation entre H4C et C8aD caractérise une régiochimie 4-8.

¹⁷⁵ Tarascou, I. Synthèse et caractérisation des procyanidines oligomères pour l'identification de tanins du raisin et du vin. Thèse Université Bordeaux I, France, **2005**

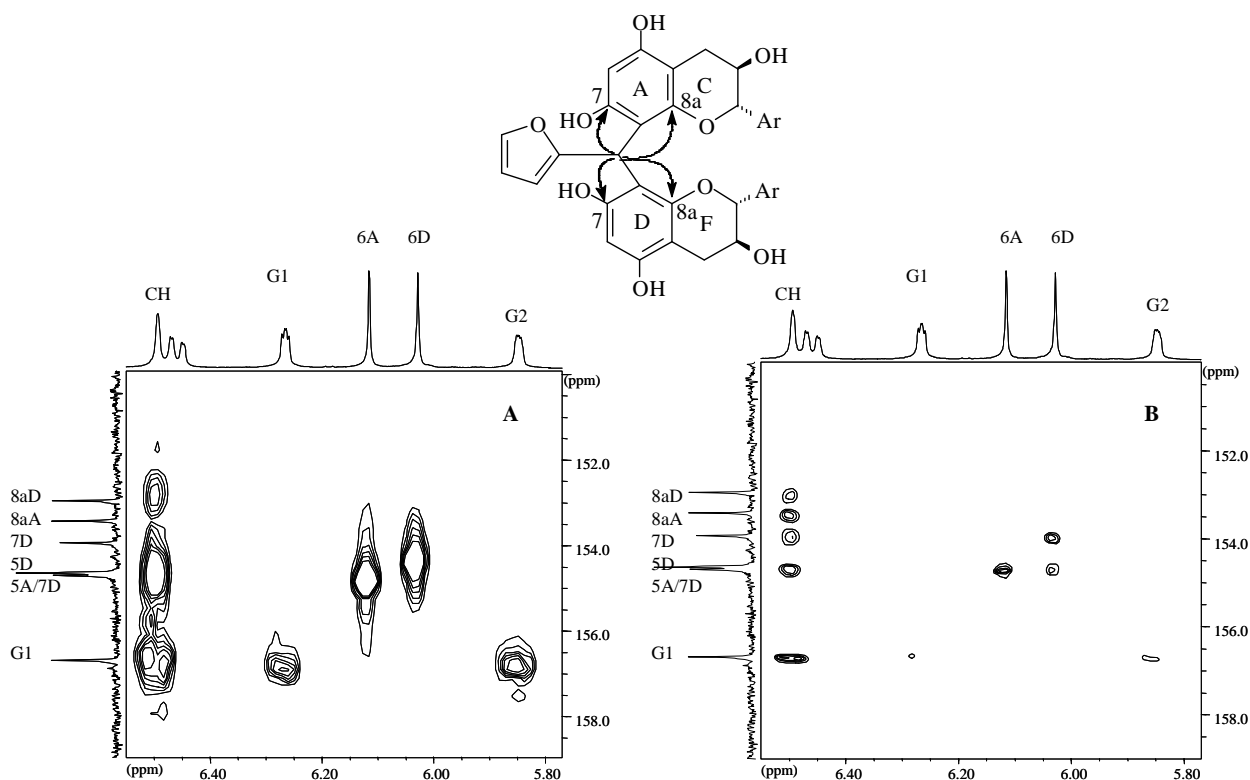


Figure 99 : Différentes corrélations ^1H - ^{13}C observées sur les spectres HMBC (A) et HMBC sélective (B) (région 150-160 ppm ^{13}C). Pour l'isomère 1, une liaison 8-8 est clairement mise en évidence grâce aux pics de corrélation observés entre -CH et 8aA et 8aD.

Cette carte nous permet d'observer l'ensemble des corrélations entre le proton du -CH et les quatre carbones dans cette zone du spectre 8aA, 8aD, 7D, 7A : sur l'HMBC sélective, ces quatre corrélations sont bien distinctes contrairement à ce que l'on peut voir sur le spectre HMBC classique.

Au vu du spectre HMBC présenté sur la Figure 99B, l'isomère 1 peut sans ambiguïté être attribué à la catéchine-8 (furfuryl) 8-catéchine : le pont -CH présente clairement une corrélation ^3J avec les deux carbones 8aA et 8aD. Comme le montre le chromatogramme enregistré (Figure 95), l'isomère 1 apparaît être le premier composé élué et le plus abondant.

Ce résultat, bien qu'attendu d'un point de vue purement chimique, est surprenant au regard des importantes différences de déplacement chimique entre les protons similaires des deux unités catéchines, particulièrement avec les protons 2 et 4 des hétérocycles C et F (tableau 22) : H2C à 4,08 ppm, H2F à 4,79 ppm, H4C/4'C à 2,7/3,3 ppm, H4F/4F' à 2,66/2,69 ppm.

Concernant les isomères 2 et 3, les mêmes expériences RMN ont été réalisées et permettent d'obtenir leur attribution respective. Le composé 2 présente une corrélation longue distance HMBC entre le proton -CH du furfuryl et le carbone 8aD (152,7 ppm) mais aucune corrélation est observée avec C5D (155,02 ppm) ; les déplacements chimiques trop proches des carbones 5A (154,09 ppm), 7A et 8aA (154,00 ppm) ne permettent d'attribuer la position de la liaison furfuryl-catéchine. Mais en prenant en compte la corrélation entre le -CH et un C8a d'une part, et, le fait que l'isomère 1 soit sans ambiguïté attribué à l'isomère 8-8, d'autre part, nous déduisons que le composé 2 est obligatoirement attribué à l'isomère 6-8. Concernant le composé 3, le spectre sélectif HMBC met clairement en évidence, d'une part une corrélation entre le proton du -CH et C8aD (152,4 ppm) mais aucune corrélation avec C8aA (154,0 ppm) et, d'autre part, une corrélation avec le carbone 5A (155,22 ppm). Les corrélations avec les carbones C7A, C5D et C7D ne sont pas identifiables à cause de leurs résonances voisines (autour de 154,3 ppm). Au vue des corrélations HMBC observées, il apparaît clairement que ces composés correspondent tous les deux aux dimères avec un pont furfuryl prenant place entre le carbone 6 d'une unité catéchine (C6A, nommé « unité supérieure ») et le carbone 8 de l'autre unité catéchine (C8D, nommé « unité inférieure »). Cela suggère que chacun sont des diastéréoisomères. Mais à ce stade-là, cela n'est pas toujours possible d'attribuer leur stéréochimie respective.

L'ensemble des attributions des différents isomères est reporté dans le tableau 23.

Tableau 23 : Déplacements chimiques ^1H et ^{13}C (ppm) des composés **1**, **2 (R)**, et **3 (S)**. Les atomes numérotés et la dénomination des cycles utilisée sont ceux communément utilisés pour les tanins condensés. Les numérotations sont présentées sur le composé **1** pour plus de clarté.

N°	$\delta^1\text{H}$ (1)	$\delta^{13}\text{C}$ (1)	$\delta^1\text{H}$ (2)	$\delta^{13}\text{C}$ (2)	$\delta^1\text{H}$ (3)	$\delta^{13}\text{C}$ (3)
2C	4,08	81,6	4,66	82,7	4,67	81,6
3C	3,93	67,9	4,03	67,7	4,08	67,8
4C/4'C	2,7/3,3	28,5	2,58/2,86	27,6	2,59/2,94	27,8
4aA	-	100,5	-	101,2	-	101,0
5A	-	154,66	-	154,09	-	155,22
6A	6,12	95,9	-	107,6	-	106,7
7A	-	154,71	-	154,00	-	154,3
8A	-	106,6	6,03	95,3	6,14	96,5
8aA	-	153,4	-	154,0	-	154,0
1'B	-	131,0	-	129,7	-	129,7
2'B	6,81	114,2	6,93	114,1	6,941	114,1
3'B	-	144,8	-	144,9	-	145,1
4'B	-	144,7	-	145,1	-	145,1
5'B	6,78	114,7	6,82	114,9	6,818	114,7
6'B	6,61	119,2	6,81	118,9	6,836	118,9
2F	4,79	81,1	4,66	81,6	4,67	82,6
3F	4,06	67,3	4,18	67,0	4,06	67,3
4F/4'F	2,66/2,69	25,8	2,67/3,04	27,8	2,65/3,04	28,0
4aD	-	99,7	-	100,8	-	100,4
5D	-	154,66	-	155,02	-	154,3
6D	6,03	95,8	6,19	96,2	6,14	96,5
7D	-	154,0	-	154,0	-	154,3
8D	-	107,0	-	106,3	-	106,7
8aD	-	153,0	-	152,7	-	152,4
1'E	-	131,3	-	131,1	-	131,1
2'E	6,73	113,6	6,86	114,5	6,633	114,9
3'E	-	144,8	-	145,0	-	144,9
4'E	-	144,9	-	145,3	-	145,3
5'E	6,68	115,1	6,86	114,9	6,864	114,9
6'E	6,46	118,2	6,73	119,3	6,693	119,3
CH	6,50	29,8	6,16	30,6	6,18	30,6
1G	-	156,7	-	154,96	-	154,9
2G	5,85	105,1	5,95	105,7	5,89	105,5
3G	6,27	109,7	6,26	109,7	6,29	109,8
4G	7,38	140,6	7,40	140,8	7,40	140,6

II. Etude conformationnelle

La mécanique moléculaire est utilisée pour effectuer l'analyse conformationnelle des molécules. Elle considère les molécules comme des sphères reliées par des ressorts. Les atomes sont définis par des rayons de sphère et les liaisons entre les atomes, par des constantes de force. La distribution des électrons est quant à elle implicite, elle est représentée par la distribution des charges sur les atomes de chaque molécule.

Une fonction d'énergie potentielle, nommée champ de force, permet de simuler les propriétés structurales et énergétiques des molécules et de décrire les interactions entre les atomes liés et non liés. Les interactions entre atomes liés correspondent à des énergies de déformation de liaisons et d'angles de valence et à des énergies de torsion. Les interactions entre atomes non liés correspondent quant à elles aux énergies électrostatiques, de Van der Waals et des liaisons hydrogènes.

Une distance de troncature appelée « cut-off » permet de limiter le temps de calcul. Elle correspond à une distance limite au delà de laquelle les interactions entre atomes non liés sont ignorées car elles apparaissent négligeables. Pour l'analyse conformationnelle, les molécules peuvent être minimisées par la méthode TNCG (Truncated Newton Conjugate Gradient). La recherche des conformations de plus basse énergie peut être ensuite effectuée par la méthode Monte Carlo.

Méthode de Monte Carlo

La technique de recherche conformationnelle Monte Carlo, disponible dans MacroModel permet d'obtenir un ensemble représentatif des conformations les plus stables. La première étape consiste à choisir une structure initiale raisonnable et déjà minimisée. Un intervalle de variation de l'énergie est ensuite déterminé pour chaque variable (en général les angles de torsion) qui définit les conformations de la molécule étudiée.

Après avoir déterminé le nombre de degrés de liberté (noté N), un nombre de degrés de liberté (angles de torsion) compris entre 1 et $N-1$ est tiré au hasard. La valeur de chaque angle est ensuite modifiée aléatoirement entre 0 et 180°. La conformation est alors minimisée.

1000 itérations sont réalisées pour chaque molécule ; le calcul est fini lorsque chaque conformation a été trouvée au moins trois fois.

L'ensemble des conformations retenues est soumis à une clustérisation avec le logiciel Xcluster, c'est-à-dire que les conformations retenues sont classées par famille, chaque famille étant caractérisée par un conformère de plus basse énergie nommé « leader ».

Les résultats obtenus sont (Eq/Eq correspondant à des conformères dans lesquels les unités catéchines adoptent une orientation équatoriale, Ax/Eq ou Eq/Ax correspondant aux conformères dans lesquels une des catéchines adopte une orientation axiale et l'autre une orientation équatoriale) :

* Dérivé 6-6 : 217 conformères et 3 clusters : leaders 1 (n=159, Eq/Eq), 63 (n=33, Ax/Eq) et 87 (n=25, Eq/Ax)

* Dérivé diastéréoisomère 6-8 : 256 conformères et 3 clusters : leaders 1 (n=182, Eq/Eq), 20 (n=36, Ax/Eq) et 29 (n=38, Ax/Eq)

* Dérivé diastéréoisomère 6-8 : 112 conformères et 3 clusters : leaders 1 (n=95, Eq/Eq), 33 (n=10, Eq/Ax) et 56 (n=7, Ax/Eq)

* Dérivé 8-8 : 71 conformères et 2 clusters : leaders 1 (n=68, Eq/Eq) et 5 (n=3, Ax/Eq)

La modélisation moléculaire est réalisée sur les quatre isomères attendus et la structure de plus basse énergie trouvée est présentée Figure 100 pour chacun des isomères.

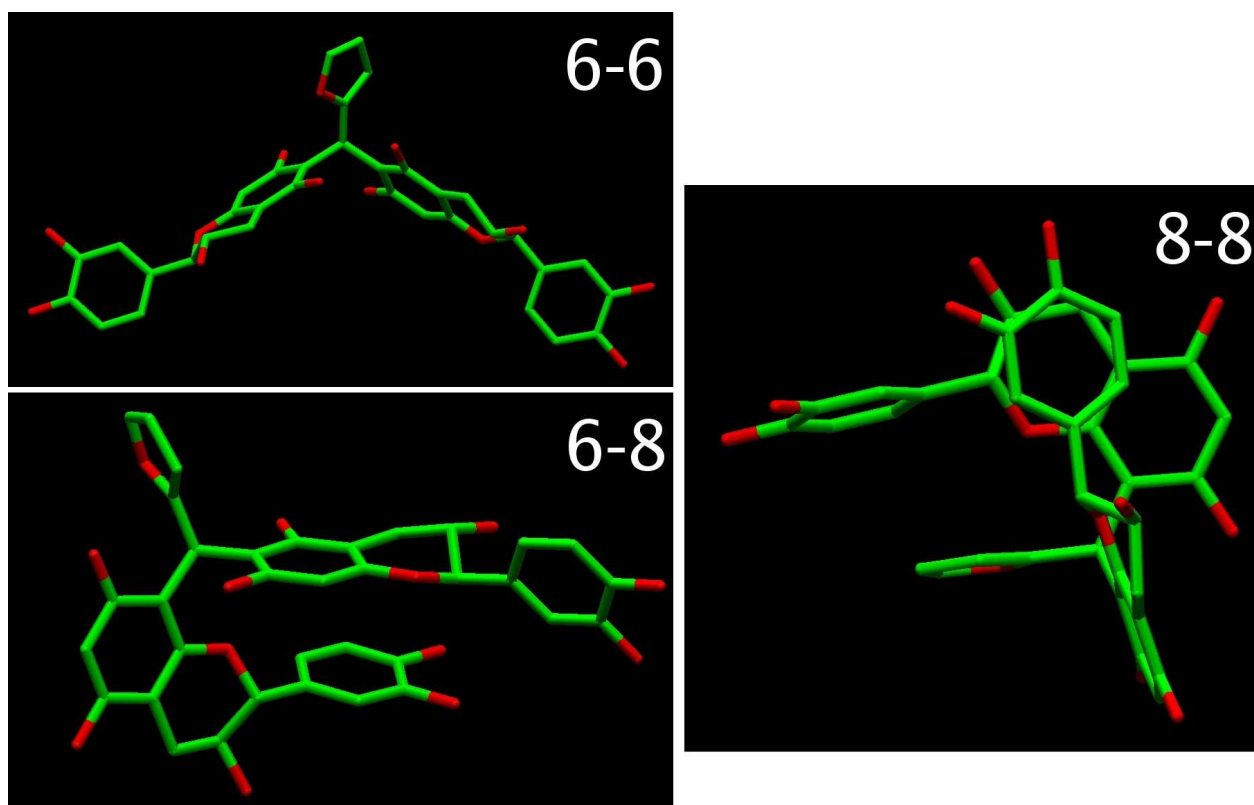


Figure 100 : Structures minimisées 3D obtenues par modélisation moléculaire (en utilisant le logiciel Macromodel et le champ de force MM3*)

La structure 3D de l'isomère 6-6 ressemble à deux ailes de papillon où un plan symétrique apparaît clairement au travers du pont furfuryl. Cela peut probablement donner un spectre du proton simplifié sur lequel les deux unités catéchine résonnent comme une seule unité.

Au regard de la structure 3D minimisée de l'isomère 8-8 (1), les mêmes hypothèses ne peuvent pas être appliquées dans ce cas : pas de symétrie discernable car le stacking intervient systématiquement entre la chaîne furfuryl et un cycle catéchol (B ou E) quelque soit la structure minimisée obtenue (Figure 100). Ce comportement particulier peut expliquer les différences importantes de déplacements chimiques observées entre des protons et carbones similaires des deux unités catéchine : la présence du phénomène de stacking pourrait créer un carbone prochiral au niveau de la liaison furfuryl. Cette structure minimisée est confrontée aux résultats expérimentaux des expériences NOE effectuées par RMN (tableau 24, partie supérieure en noir).

Tableau 24 : Effets NOE observés et évalués par ROESY pour les composés 1, 2, et 3. Les intensités relatives sont représentées comme faible (+), moyen (++) ou fort (+++) entre chaque couple de protons. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux distances entre les protons (Å) mesurées pour la structure minimisée de plus basse énergie.

^{d,e} C	2C	3C	4C	4'C	6/8A*2'B	5'B	6'B	CH	G2	G3	G4	2F	3F	4F	4'F	6/8A*2'E	5'E	6'E	
2C	X		+		++		++	+									+	+	
3C		X	+	++	++		++												
4C	++		X	+++															
4'C	+	++	+++	X															
6/8A		++	+++		X														
2'B	++	++			X														
	++	+																	
5'B						X	++												
6'B	++	++					X	+											
	++	+																	
CH								X											
G2								+	X	++									
G3								++	++	X	++								
G4									++		X								
										++									
2F												+(4,8	X	+	+		++	++	
												- (6,5)							
3F													X	++	++		++	++	
4F														++		X	+++		
														+					
4'F														++	+++	X			
														++	+++				
6/8A ^e																	X		
2'E														++	++			X	
														++	+				
5'E																		X	++
6'E														++	++			++	X
														++	+			++	

Les effets NOE mesurés par RMN ont pu être quantifiés et comparés aux distances mesurées sur les structures de plus basses énergies obtenues par modélisation moléculaire (Tableau 23).

La présence d'un effet NOE d'intensité moyenne entre les protons 2'B/6'B de la chaîne catéchol de l'unité supérieure et le proton 2F de l'hétérocycle de l'unité inférieure (Tableau 24) confirme la structure calculée dans laquelle la distance moyenne mesurée entre le couple de protons est de 3.6 Å.

L'analyse des valeurs des constantes de couplage 3J mesurées par RMN (Tableau 25) donne aussi des informations sur la structure 3D et notamment sur la proportion Eq:Ax des orientations équatoriale et axiale des chaînes catéchol B ou E de chaque unité catéchine.

Tableau 25 : Constantes de couplage proton-proton mesurées pour les trois isomères isolés. Les valeurs (en Hz) sont prises sur les spectres du proton

$^3J[{}^1\text{H}-{}^1\text{H}]$ (Hz)	1	2	3
2C-3C	8,2	8,2	7,8
3C-4C	5,5	5,4	5
3C-4'C	8,9	7,3	7,3
2F-3F	5,7	8,2	8,4
3F-4F	6,1	5,8	5,3
3F-4'F	5,1	7,3	7,3

Ces informations peuvent être également obtenues à partir des constantes de couplage 3J théoriques dont les valeurs sont clairement dépendantes de l'orientation de la chaîne catéchol et l'unité catéchine¹⁷⁶. Ces valeurs de constantes de couplage 3J peuvent être obtenues par le calcul à l'aide du logiciel Macromodel à partir d'une structure 3D sélectionnée représentative de l'orientation axiale ou équatoriale.

Les résultats pour les trois isomères sont regroupés dans le tableau 26.

¹⁷⁶ Hemingway, R.W., Tobiason, F.L., McGraw, D.W., Steynberg, J.P. *Magn. Reson. Chem.*, **1996**, 34, 424-433

Tableau 26 : Constantes de couplage proton-proton théoriques entre les protons vicinaux de la chaîne hétérocycle (C) dans une unité catéchine (fonction de l'orientation de la chaîne catéchol B).

Ces valeurs sont calculées à l'aide du logiciel Macromodel à partir d'une structure représentative minimisée.

${}^3J[{}^1\text{H}-{}^1\text{H}]$ (Hz)	8-8		6-8	
	axial	équatorial	axial	équatorial
2-3	1,5	9	1,9	8,7
3-4	2,8	5,6	2,5	5,9
3-4'	3,4	10,7	3,8	10

La proportion Eq :Ax des deux unités catéchine sont obtenus, pour les deux isomères 8-8 et 6-8, selon la formule décrite par Steynberg¹⁷⁷ :

$$J_{\text{obs}} = {}^E J_X X + {}^A J_X (1-X)$$

Où ${}^E J$ et ${}^A J$ sont les valeurs théoriques des constantes de couplage calculées pour respectivement les conformères équatoriaux et axiaux, et reportées pour les isomères 8-8 et 6-8 dans le tableau 22; et X représente la fraction molaire du conformère équatorial.

Les résultats montrent que si l'hétérocycle C (partie supérieure) de l'isomère 8-8 adopte préférentiellement une orientation équatoriale, comme le démontrent les valeurs des constantes de couplage mesurées entre les protons vicinaux (la fraction molaire du conformère E de cette unité est estimée autour de 90%), l'hétérocycle E (partie inférieure) oscille au hasard entre les deux orientations.

Concernant les deux diastéréoisomères 6-8, l'arrangement des deux unités catéchine ne change pas, quelque soit la stéréochimie du pont -CH (Figure 101).

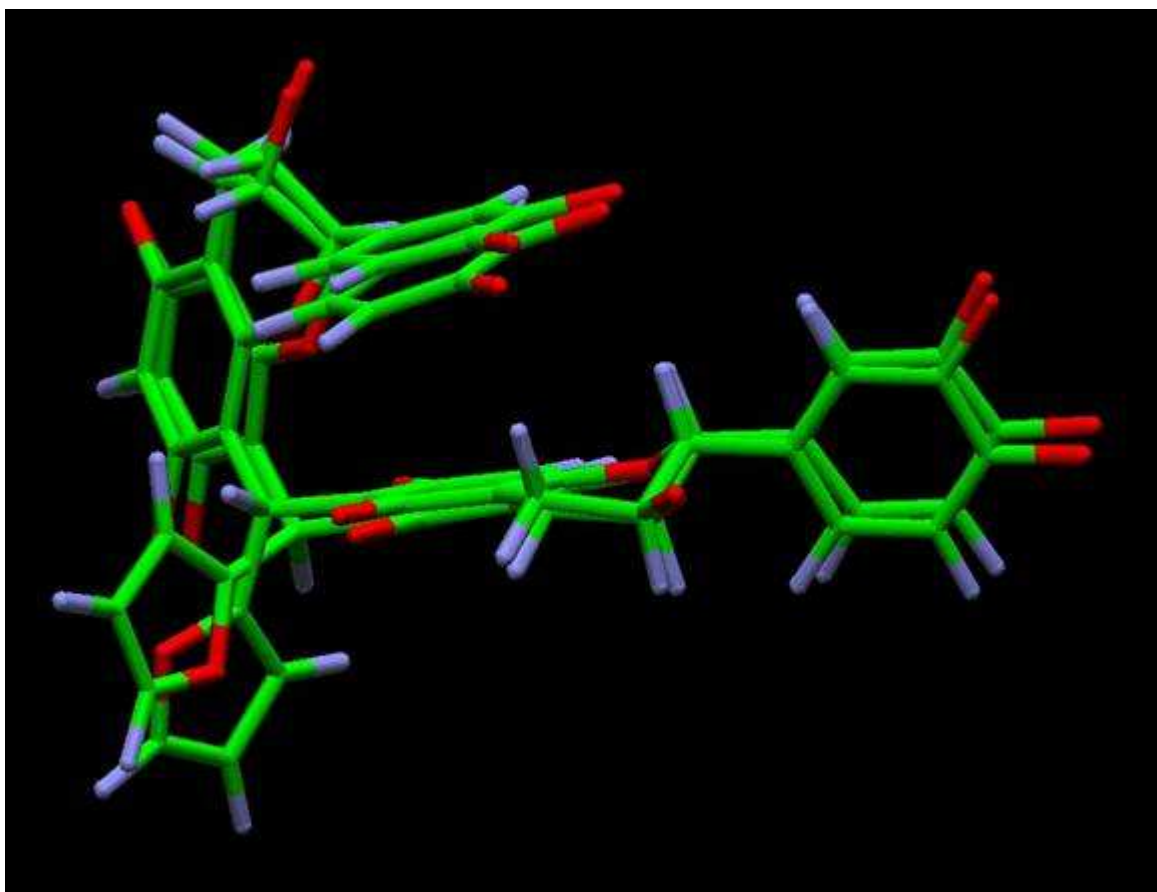


Figure 101 : Superposition 3D du conformère de plus faible énergie des deux diastéréoisomères 6-8.

La comparaison des deux structures minimisées et des effets NOE reportés dans le tableau 23 (partie la plus inférieure en vert et rouge) permet d'attribuer sans ambiguïté la stéréochimie de la liaison furfuryl grâce à une corrélation NOE observée dans le composé 2 entre le proton 2F de l'unité inférieure et le proton 4G du cycle furfuryl. Au vue de la distance mesurée entre cette paire de protons dans les deux structures minimisées des diastéréoisomères 6-8 R et S (valeurs entre parenthèses dans le tableau 24), il est clairement montré que le composé 2 correspond à l'isomère R et le composé 3 au S.

¹⁷⁷ Steynberg, J.P., Brandt, E.V., Hoffman, M.J.H., Hemingway, Ferreira, D. In : Hemingway R.W., P.E. (Eds), Planr Polyphenols, Plenum Press, New-York, **1992**, 501

III. Conclusion

Dans cette deuxième partie de chapitre, nous avons présenté une étude structurale complète des dimères formés au cours de réaction de condensation entre la (+)-catéchine et le furfuraldéhyde (un aldéhyde du bois de chêne) en solution modèle. La régio- et stéréochimie, ainsi que la structure 3D de ces composés ont été obtenues par les techniques RMN et de modélisation moléculaire.

Partie expérimentale du chapitre V-B

I. Préparation des composés 1,2 et 3

(+)-catéchine (17 mM, Sigma-Aldrich) et furfural (8,5 mM, Sigma-Aldrich) sont incubés dans une solution modèle de vin (solution avec 12% éthanol, 5 g/l d'acide tartrique, pH 3,5). Le mélange est alors laissé pendant deux semaines à l'obscurité et à température ambiante (22°C). Après incubation, la séparation est réalisée en utilisant une colonne de chromatographie de gel basse-pression TSK HW-40 (S) avec le méthanol comme éluant. Le débit est de 0,8 ml/min ; la longueur de la colonne est de 27 ± 2 cm et de diamètre égal à 2,5 cm. Les fractions collectées 1, 2 et 3 sont évaporées sous vide puis lyophilisées.

II. Expériences RMN

5 à 10 mg des composés 1, 2 et 3 sont dissous dans 0.5 ml de méthanol deutéré. Les spectres RMN sont effectués à l'aide d'un appareil DPX 400 à 300K (Bruker) équipé d'une sonde à large bande à gradient inverse de 5mm. Tous les déplacements chimiques des protons et ^{13}C sont donnés à partir d'une référence externe qui est le TMS dans le méthanol deutéré.

Les spectres 1D ^1H sont enregistrés avec une bande spectrale de 5000 Hz et une durée d'impulsion de 7,5 μs .

La TOCSY 2D est obtenue en utilisant la séquence d'impulsion MLEVPRTP du logiciel Bruker avec un temps de « spinlock » de 100 ms.

Les spectres du type HMQC sont obtenus selon la séquence de Bax et Davis¹⁷⁸ en utilisant des gradients de champ B_0 . Le spectre HMBC est enregistré en utilisant la séquence d'impulsion proposée par Bax et Summers¹⁷⁹, impliquant un J-filtre (3,8 ms) et un délai pour observer les couplages longue distance (60 ms). Deux expériences HMBC différentes sont effectuées. La première est enregistrée avec les paramètres d'acquisition de l'expérience HMQC. La seconde est

¹⁷⁸ Bax, A., Davis D.G., *J. Magn. Reson.*, **1985**, 63, 207

¹⁷⁹ Bax, A., Summers, S.F. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2093-2094

enregistrée en utilisant une impulsion sélective gaussienne couvrant la région 135-165 ppm dans le but d'augmenter la résolution dans la dimension ^{13}C (F1) (11 Hz/point). La technique ROESY est préférée à la technique NOESY au vue de la masse moléculaire des composés (658,62). Les spectres sont enregistrés dans un mode TTPI¹⁸⁰ utilisant un temps de « spinlock » de 300 ms.

III. Mécanique moléculaire

Les calculs ont été effectués sur une station SGI Octane en utilisant les logiciels Macromodel version 6.5 (Schrödinger Inc.). Les minima conformationnels ont été trouvés en utilisant les champs de forces modifiés MM3* (1991 paramètres) tels qu'ils sont dans Macromodel. Les structures construites ont été minimisées jusqu'à un RMS de gradient $\leq 0.005 \text{ KJ.A}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ via la méthode Truncated Newton Conjugate Gradient (TNCG, 1000 itérations). Les calculs sont réalisés grâce au modèle GB/SA¹⁸¹. Le solvant choisi est l'eau. Dans tous les cas, l'option « extended cut-off » a été utilisée (8 Å pour les interactions de Van der Waals, 20 Å pour les interactions électrostatiques et 4 Å pour les liaisons hydrogène). Les constantes de couplage ont été calculées en utilisant la méthode d'Altona et Hasnoot¹⁸² fournie dans Macromodel.

IV. Etude conformationnelle par la méthode de Monte Carlo

Cette méthode est prévue dans le logiciel Macromodel.^{183,184} La configuration automatique a été sélectionnée, c'est-à-dire : les liaisons simples entièrement libres, les centres chiraux préservés et tous les cycles flexibles ouverts. Afin d'assurer la convergence des résultats, 10000 essais ont été effectués par composé, dans une fenêtre énergétique de 20 KJ.mol^{-1} (conformations accessibles en solution). Chaque conformère est ensuite minimisé complètement (1000 itérations, méthode TNCG, $\text{RMS} \leq 0,005 \text{ KJ.A}^{-1}.\text{mol}^{-1}$, champ de force MM3*). Dans tous les cas, le conformère le moins souvent trouvé sert de point de départ à l'essai suivant uniquement si son énergie tombe dans la fenêtre choisie (20 KJ.mol^{-1} au-dessus du minimum

¹⁸⁰ Marion, D., Wüthrich, K. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **1983**, 113, 967-974

¹⁸¹ Still, W.C., Tempczyk, A., Hawley, R.C., Hendrikson, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 6127-6129

¹⁸² Altona, C.V., Haasnoot, C.A.G., Lew, F.A.M. *Tetrahedron*, **1980**, 36, 2783

¹⁸³ Chang, G., Guida, W.C., Still, W.C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 4379-4386

¹⁸⁴ Saunders, M., Houk, K.N., Wu, Y.D., Still, W.C., Lipton, M., Chang, G., Guida, W.C. *Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 1419-1427

actuel). Les calculs sont convergents quand chaque conformère a été retrouvé au moins trois fois. Selon la méthode de Monte Carlo, une analyse du cluster est effectuée avec Xcluster 1.1¹⁸⁵, utilisant les angles dièdres H-C-C-H correspondant aux constantes de couplage ³J. Cette approche amène à une série de clusters, chacun d'entre eux étant une famille de conformères.

¹⁸⁵ Shenkin, P.S. D.Q.J. McDonald, *Comput. Chem.* 15, **1994**, 899

C- Impact sur la couleur des vins blancs

I. Pouvoir colorant des adduits (+)-catéchine-aldéhydes du bois de chêne

Afin d'étudier l'effet des adduits catéchine-aldéhydes sur la couleur des vins élevés en fûts de chêne, nous avons mesuré leur pouvoir colorant à 420 nm : $E_{1\%}^{420}$. Pour cela, nous avons mesuré l'absorbance à 420 nm des molécules purifiées par basse pression (mode opératoire décrit dans le chapitre V- Partie B).

Les résultats sont présentés dans le tableau 27 et sont comparés à une molécule de référence dans la chimie du bois : la quercétine, fortement connue pour sa couleur jaune.

Tableau 27 : Pouvoirs colorants : $E_{1\%}^{420}$ pour les dimères précédemment étudiés et pour quelques oligomères.

	pH=2	pH=3,5	pH=4	pH=5
Quercétine	3,28	3,74	5,38	6,87
Catéchine	0,72	0,36	0,61	0,25
Dimère C-F	2,34	2,54	2,82	2,8
Dimère C-HMF	12,4	12,5	12,75	12,6
Dimère C-M-5-F	14,35	14,22	14,74	13,64
Dimère C-S	3,28	2,84	2,69	2,65
Dimère C-V	1,44	1,36	1,6	1,09
Oligomère C-F	9,85	10,45	11	10,8
Oligomère C-HMF	–	12,5	–	–
Oligomère C-V	1,91	2,43	2,61	1,86

C-F : Catéchine-Fufural

C-HMF : Catéchine-HMF

C-M-5-F : Catéchine-M-5-F

C-S : Catéchine-Syringaldéhyde

C-V : Catéchine-Vanilline

Les adduits catéchine/aldéhydes ont une couleur jaune plus soutenue que la catéchine. Tous les indices sont au moins de l'ordre de grandeur de la quercétine. Nous pouvons donc en déduire que toutes les molécules étudiées ont un impact sur la couleur jaune des vins blancs élevés en barriques neuves.

Les dimères formés avec le furfuraldéhyde et le syringaldéhyde présentent une couleur proche de la valeur de la quercétine ($E_{1\%}^{420}$ respectivement égal à 2,54 ; 2,84 ; 3,74). Les dimères catéchine-M-5-F-catéchine et catéchine-HMF-catéchine ($E_{1\%}^{420} = 14,2$) ont un pouvoir colorant quatre fois supérieur à la quercétine et le dimère catéchine-M-5-F-catéchine est le dimère le plus coloré ; le dimère catéchine-vanilline-catéchine est le moins coloré.

Les oligomères (mélange de trimères et tétramères) formés à partir du furfuraldéhyde ont un pouvoir colorant deux fois supérieur (intensité supérieure à 10). Les oligomères formés à partir d'aldéhydes furaniques ont un pouvoir colorant plus important que ceux formés à partir d'aldéhydes phénoliques. Les oligomères ont un impact plus important que les dimères. Tout ceci est en parfait accord avec les résultats de la partie A de ce chapitre : les dimères ou oligomères avec des ponts furaniques colorent plus que ceux avec des ponts phénoliques.

Mais durant la réaction, les dimères et trimères sont rapidement consommés au profit d'adduits de masses plus élevées, dans le cas notamment d'aldéhydes furaniques. Comme le montre la figure 102, la couleur de la solution après 54 jours de réaction est due à la présence d'oligomères et de polymères solubles, caractérisés par un temps de rétention plus important. Ces composés sont moins polaires que les dimères et sont non-ionisables par électrospray (mode négatif ou positif) (conférer partie A - 3.1).

Néanmoins, ces formes colorées ont un spectre visible spécifique et présentent des absorbances dans le visible (Figure 103). Le maximum d'intensité est compris entre 420 et 455 nm dans la région du « jaune ».

Les adduits avec le syringaldéhyde présentent un épaulement supplémentaire autour de 500-520 nm dans la région du « rouge ».

La large majorité des composés formés présente une couleur brillante jaune (λ_{\max} : 400-430 nm) et une couleur jaune-marron (λ_{\max} : 430-460 nm).

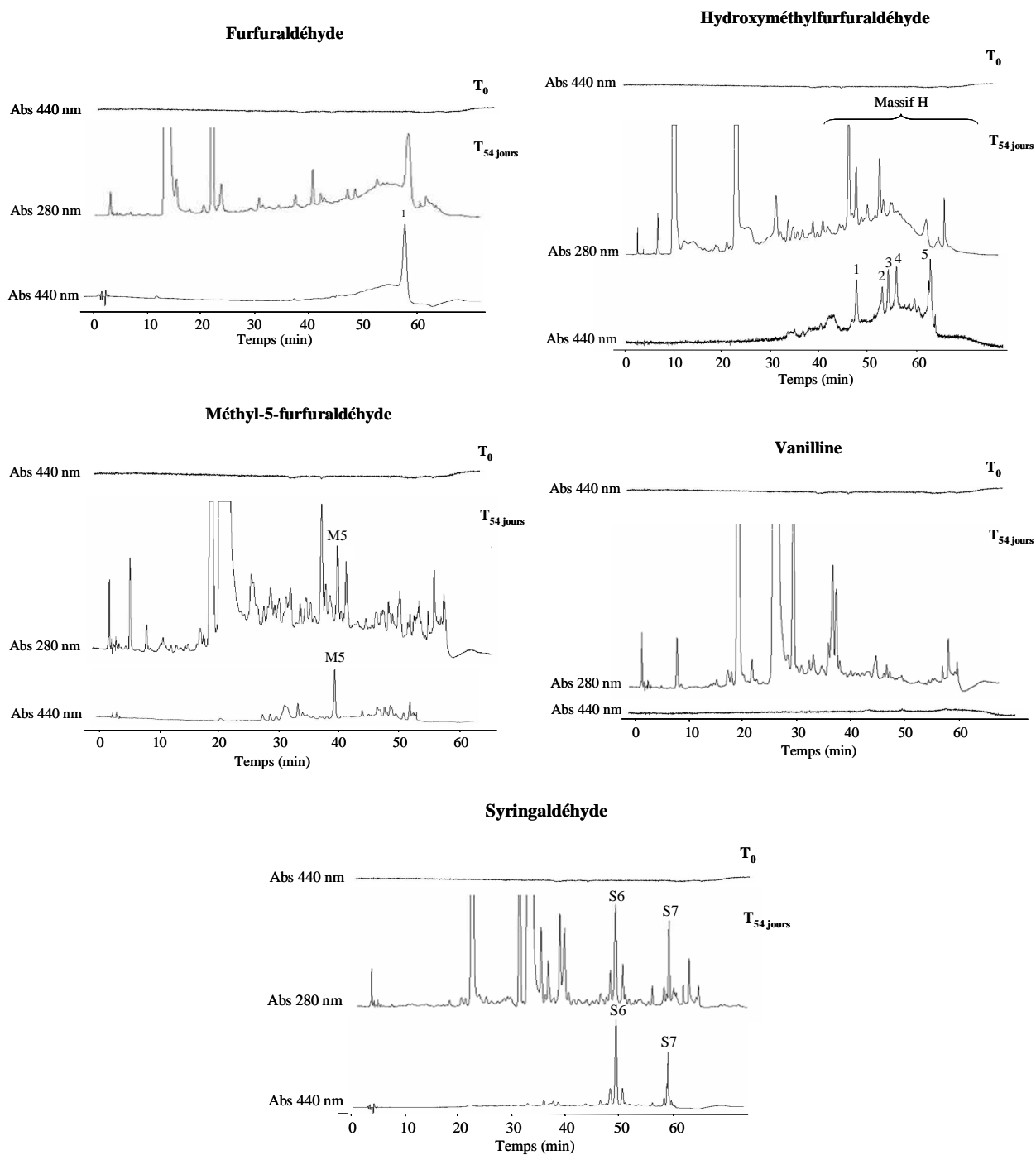


Figure 102 : Chromatogrammes après 54 jours de réaction (+)-catéchine-aldéhydes. Identification des produits colorés formés à 440 nm.

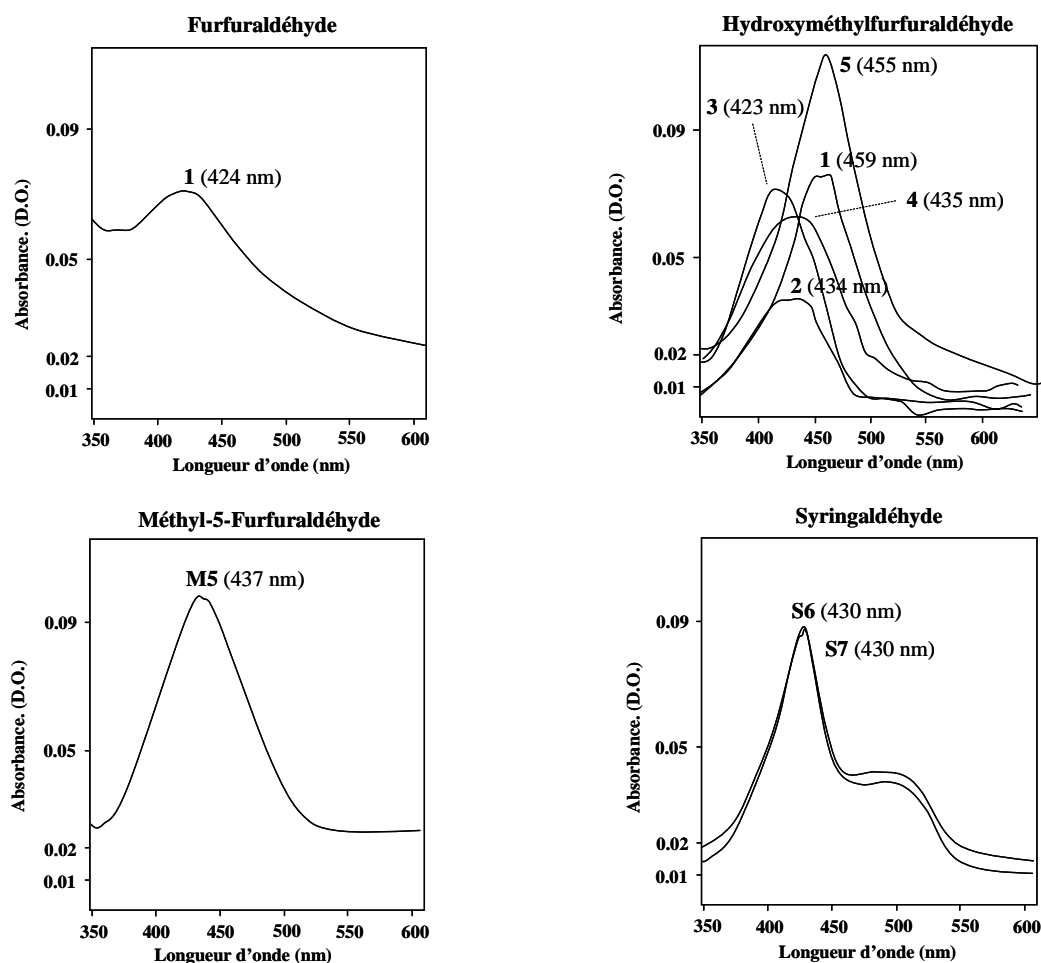


Figure 103 : Spectres visibles (350-600 nm) des principaux composés colorés identifiés dans la Figure 102

II. Réactions de condensation flavanols-aldéhydes du bois dans les vins blancs

En milieu acide, les aldéhydes réagissent facilement entre les flavan-3-ols et les proanthocyanidols. Les composés formés modifient la couleur des solutions principalement le jaune. Ces réactions sont particulièrement bien connues dans le cas des vins.

Des vins élevés dans des barriques neuves présentent après un certain temps différentes couleurs, arômes et goûts que le même vin élevé dans des cuves inox.^{43,161,186,187} Ceci est du à l'extraction des composés du bois (comme les polyphénols).

¹⁸⁶ Sefton, M.A., Francis, I.L., Williams, P.J. Volatile flavour components of oakwood. *Proceeding of seventh Australian Wine Industry Technical Conference*, **1989**, 107-112

¹⁸⁷ Cerdan-Garde, T., Ancin-Azpilicueta, C. *L.W.T.*, **2006**, 39, 199-205

Dans le bois de chêne, le furfuraldéhyde, la vanilline, le syringaldéhyde sont les principaux aldéhydes.¹⁸⁸ Dans le bois frais, la concentration est limitée à moins de 1 mg mais durant la phase de toasting dans les ateliers de fabrication des tonnelleres, la concentration augmente significativement à plus de plusieurs mg.¹⁸⁹ Les sources de production sont les réactions de pyrolyse des polysaccharides et lignines (Chapitre II).¹⁷⁴

Nous avons étudié un vin blanc jeune, ayant une couleur claire et n'ayant pas suivi d'élége en contact avec du bois de chêne.

Nous avons ajouté séparément cinq aldéhydes du bois de chêne :

- Solution 1 : vin blanc + 22 mg/l d'HMF
- Solution 2 : vin blanc + 40 mg/l de furfuraldéhyde
- Solution 3 : vin blanc + 12 mg/l de syringaldéhyde
- Solution 4 : vin blanc + 16 mg/l de vanilline
- Solution 5 : vin blanc + 6 mg/l de méthyl-5-furfuraldéhyde
- Solution 6 : vin blanc témoin

Après 56 jours de réaction, nous avons extrait chaque solution à l'aide d'acétate d'éthyle (conférer la partie Matériels et Méthodes) puis étudié les profils chromatographiques des solutions 1, 2, 3, 6. Les profils présentent peu de différence (Figure 104), outre les pics représentant les aldéhydes ajoutés en excès. La zone la plus intéressante est celle renfermant les composés les plus polymérisés à partir de 56 min. Un zoom à 280 nm de cette partie apporte peu d'informations mais à 440 nm, nous constatons que le vin supplémenté en HMF absorbe plus que celui supplémenté en furfuraldéhyde ou en syringaldéhyde et que le vin témoin. Donc les produits polymérisés contenus dans cette enveloppe apportent une couleur jaune au vin plus soutenue dans le cas où le vin est supplémenté en HMF.

¹⁸⁸ Puech, J.L., Leaute, R., Clot, G., Nomdedeu, L., Mondies, H. *Sc. Aliments*, **1984**, 4, 65-80

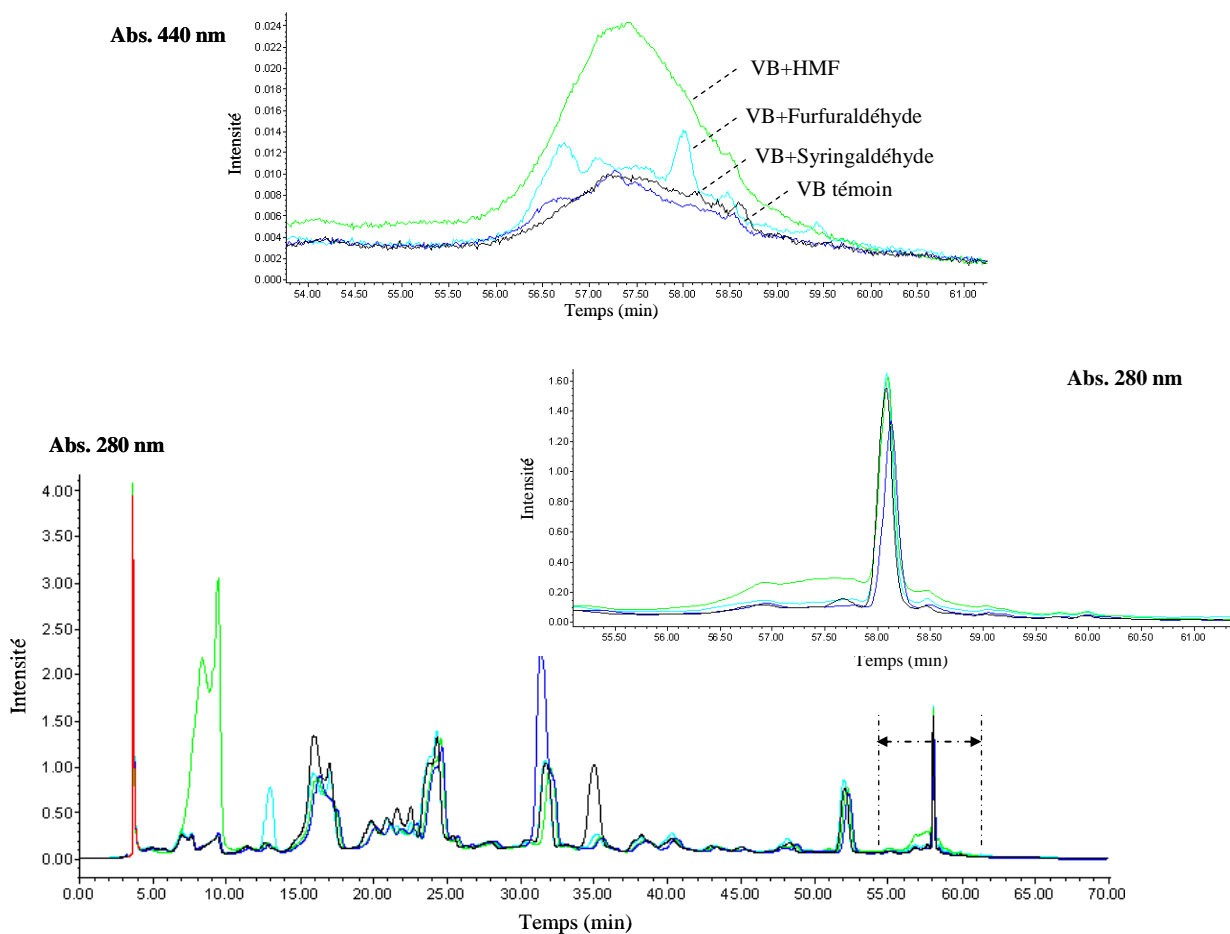


Figure 104 : Chromatogramme HPLC d'un vin blanc supplémenté en aldéhydes du bois : HMF, furfuraldéhyde et syringaldéhyde après 56 jours de réaction.

La couleur est une perception visuelle subjective liée à la sensibilité de chacun et à sa propre impression des couleurs. De nombreuses méthodes ont été développées pour quantifier la couleur à partir des données spectrales. Nous utilisons la méthode proposée par la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE), et décrite dans le Chapitre III. Le système de mesure de la couleur proposé utilise trois valeurs et notées $L^*a^*b^*$. Par des modèles mathématiques connus, il est possible de passer des mesures spectrophotométriques aux coordonnées $L^*a^*b^*$ pour des solutions limpides.

¹⁸⁹ Cadahia, E., Fernandez de Simon, B., Jalocha, J. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 5923-5932

Durant l'expérience (à l'obscurité et à température ambiante), nous avons ainsi suivi l'évolution de la couleur de chaque vin (solutions 1 à 6) par la méthode $L^*a^*b^*$. Les mesures ont été effectuées au début de l'expérience et à 56 jours.

Sur la figure 105, nous présentons les résultats $L^*a^*b^*$ au début (0) et à la fin de l'expérience (t=56 jours).

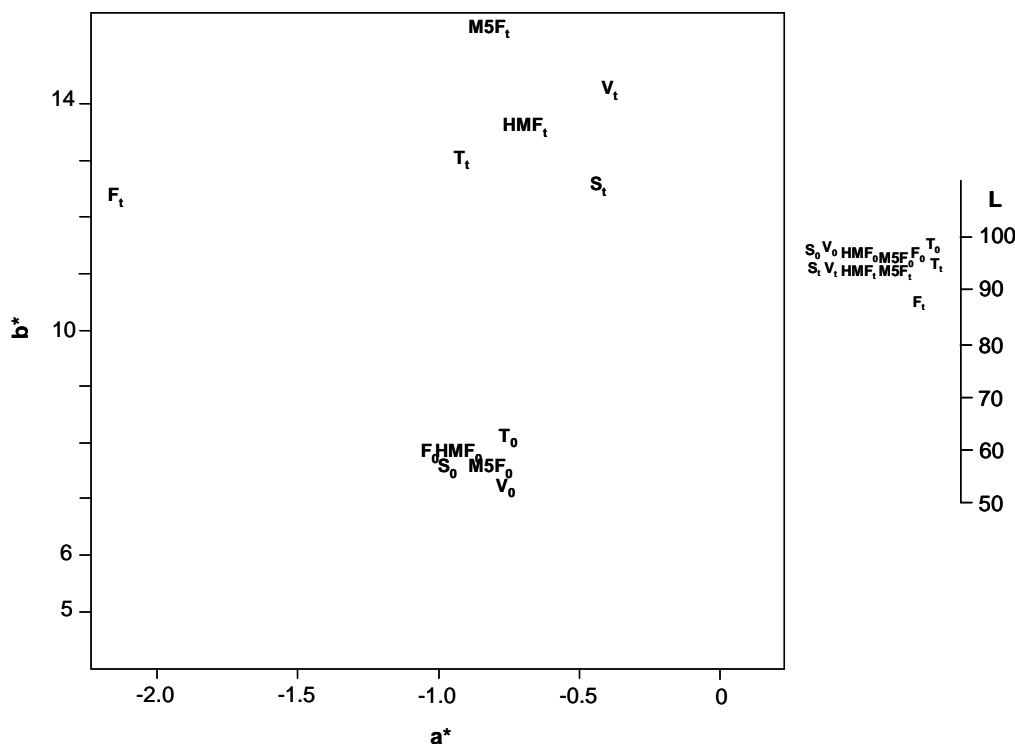


Figure 105 : Représentation $L^*a^*b^*$ de la couleur d'un vin blanc témoin et supplémenté avec différents aldéhydes avant (0) et après 56 jours de réaction (t). T : témoin ; F : furfuraldéhyde ; M5F : méthyl-5-furfuraldéhyde ; HMF : hydroxyméthylfurfuraldéhyde ; V : vanilline ; S : syringaldéhyde.

Nous avons noté une modification importante du paramètre b^* par rapport au témoin. Des différences importantes sont observées pour le l'hydrométhylfufurladéhyde, le furfuraldéhyde, le méthyl-5-furfuraldéhyde, la vanilline, le syringaldéhyde.

Le chromatogramme (Figure 104) présente après 56 jours les formes oligomériques et polymériques avec des absorbances élevées dans la zone 400-455 nm, également observées dans le cas de solutions modèles (conférer Chapitre V – Partie A).

Donc les réactions de condensation décrites en solutions modèles dans la partie A de ce chapitre ont également lieu dans le vin et conduisent à des formes similaires possédant des couleurs spécifiques. Compte tenu de la concentration initiale des précurseurs et considérant le pouvoir colorant des produits formés lors de ces réactions, il est possible de trouver suffisamment de composés polymérisés pour modifier la couleur des vins, même si le SO₂ limite légèrement le mécanisme de ces réactions autour de 5 à 10% (Figure 106).

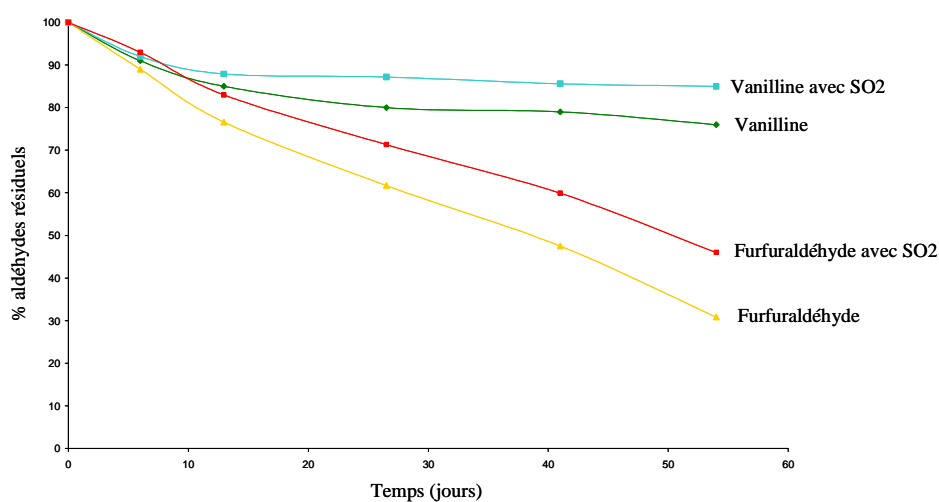


Figure 106 : Evolution de la vitesse de réaction (% d'aldéhydes résiduels) dans le cas d'un vin supplémenté en aldéhydes du bois (vanilline et furfuraldéhyde). La réaction est suivie par HPLC en phase inverse.

III. Conclusion

Dans cette étude, nous suggérons la possibilité de réactions entre flavanols, proanthocyanidols et aldéhydes du bois de chêne. Ces réactions affectent la couleur des vins blancs en contact avec du bois de chêne et modifient définitivement la qualité olfactive et visuelle du vin. En fait, dans les vins, nous avons suffisamment de flavanols¹²⁴ pour produire, *via* ces réactions, une quantité de produits colorés capables de contribuer à l'évolution de la couleur des vins.

Partie expérimentale du chapitre V-C

I. Purification d'adduits (+)-catéchine-aldéhydes du bois

(+)-catéchine (17 mM, Sigma-Aldrich) et furfuraldéhyde (8,5 mM, Sigma-Aldrich) sont incubés dans une solution modèle de vin (solution avec 12% éthanol, 5 g/l d'acide tartrique, pH 3,5). Le mélange est alors laissé pendant deux semaines à l'obscurité et à température ambiante (22°C). Après incubation, la séparation est réalisée en utilisant une colonne de chromatographie de gel basse-pression TSK HW-40 (S) avec le méthanol comme éluant. Le débit est de 0,8 ml/min ; la longueur de la colonne est de 27 ± 2 cm et de diamètre égal à 2,5 cm. Les fractions collectées 1, 2 et 3 sont évaporées sous vide puis lyophilisées.

Les fractions ainsi obtenues par basse pression sont purifiées et représentent les adduits dimères (caractérisés par RMN dans la partie B de ce chapitre).

Les mêmes expériences sont conduites avec l'hydroxyméthylfurfuraldéhyde, le méthyl-5-furfuraldéhyde, la vanilline et la syringadéhyde.

II. Spectres d'absorption

Les solutions à 1% (1g d'échantillons pour 100 ml d'eau) sont préparées à partir des adduits purifiés par basse pression (3.1) pour le calcul du pouvoir colorant : $E_{1\%}^{420}$.

Les mesures spectrophotométriques des solutions à 420 nm sont obtenues grâce à un spectrophotomètre équipé d'une cellule en quartz de 1 cm de trajet optique.

Les solutions sont conservées à l'abri de la lumière et sous argon afin d'éviter tout phénomène d'oxydation des composés durant les mesures.

III. Application dans les vins blancs

Nous avons étudié un vin blanc jeune, ayant une couleur claire et n'ayant pas subi un élevage en contact avec du bois de chêne.

Dans 10 ml d'un vin blanc, à pH=3,25, nous avons ajouté séparément quatre aldéhydes du bois de chêne :

- solution 1 : 10 ml vin blanc + 22 mg/l d'HMF
- solution 2 : 10 ml vin blanc + 40 mg/l de furfuraldéhyde
- solution 3 : 10 ml vin blanc + 12 mg/l de syringaldéhyde
- solution 4 : 10 ml vin blanc + 16 mg/l de vanilline
- solution 5 : 10 ml vin blanc + 6 mg/l de méthyl-5-furfuraldéhyde
- solution 6 : 10 ml vin blanc témoin

Les six solutions sont conservées à l'abri de la lumière et sous argon pendant 56 jours.

Les mesures spectrophotométriques des solutions à 450 nm, 520 nm, 570 nm, et 630 nm (système L*a*b*) sont mesurées grâce à un spectrophotomètre équipé d'une cellule en quartz de 1 cm de trajet optique. Les valeurs L*, a* et b* sont ensuite calculées selon la méthode d'Adams-Nickerson.

Chaque solution est extraite par 3x5 ml d'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont séchées à l'aide de sulfate de sodium anhydre, puis filtrées et évaporées au rotavapor. Chaque extrait sec obtenu est repris dans 100 µl d'acétonitrile puis injecté en HPLC. Les conditions d'analyses HPLC sont identiques à celles décrites dans la partie A (5.2) de ce chapitre.

Les mêmes expériences ont été menées en présence de SO₂ : 30 mg/l de HNaSO₃ (37.5%) sont ajoutés dans les solutions 2 et 4 précédentes.

Conclusion générale

Une nouvelle méthode de fractionnement des principaux groupes de macromolécules du bois de cœur de chêne a été mise au point par précipitations sélectives. Ainsi les fractions lignines, polysaccharides et ellagitanins peuvent être séparées, purifiées puis caractérisées par différentes techniques complémentaires.

Ce travail permet également de connaître la composition du bois de chêne et de savoir différencier quatre espèces de chênes (*Q. guarryana*, *Q. accutissima*, *Q. alba* et *Q. petraea*) par pyrolyse/GC/MS. Il permet de mettre en évidence les caractéristiques aromatiques des produits de pyrolyse pouvant avoir un impact sur les qualités olfactives et gustatives des vins élevés en fûts de chêne. Il ressort que les lignines représentent un des polymères majeurs du bois de chêne. C'est un précurseur important d'arômes pour les vins et eaux-de-vie élevés en barriques. Une large variété de composés odorants a été mise en évidence par la technique de pyrolyse/GC/MS des lignines. Les lignines ont donc un grand impact sur l'arôme des vins élevés en fûts de chêne.

Nous avons étudié la formation et les conditions de formation de formes polymériques des ellagitanins provenant du bois de cœur des chênes de type *Quercus robur* et *Q. petraea*. Nous observons une accumulation des formes polymériques des ellagitanins durant le vieillissement du bois de chêne.

Nos résultats, dans les conditions *in vitro*, montrent que la formation de ellagitanins polymériques solubles requiert une réaction d'oxydation par voie radicalaire (réaction de Fenton).

Nous présentons une étude structurale complète des lignines et lignanes extraits du bois de coeur de *Quercus robur* et *Q. petraea*. La RMN ^1H et ^{13}C homo- et hétéronucléaire a été employée, et particulièrement les techniques TOCSY et HMQC.

La présence de tâches sur des douelles s'explique d'une part par le fait qu'elles contiennent des ellagitanins très polymérisés. Ces chromophores augmentent la teneur en phénols totaux et accentuent notablement la couleur jaune sur les parties tâchées des douelles. Et d'autre part, la couleur du bois de chêne *Q. petraea* est étroitement liée à la teneur en lignanes et notamment en lyonirésinol. Ils sont solubles en milieu hydroalcoolique et nous pouvons émettre l'hypothèse que nous pouvons les retrouver dans les vins rouges élevés en barriques.

Enfin nous suggérons la possibilité de réactions de polymérisation entre flavanols et aldéhydes du bois de chêne.

Nous avons montré que ce type de réaction suggère une polymérisation en chaîne par empilement successif d'un flavanol et d'un aldéhyde permettant l'augmentation de la masse moléculaire jusqu'à épuisement des substrats. Nous mettons également en évidence une différence de réactivité entre les deux types d'aldéhydes : furaniques et phénoliques. L'hydroxyméthylfurfuraldéhyde est le plus réactif parmi les cinq, puis le furfuraldéhyde, puis le méthyl-5-furfuraldéhyde, le syringaldéhyde et la vanilline.

Quelque soit la nature de l'aldéhyde, les produits formés avec la (+)-catéchine sont de même nature : dimères (catéchine-aldéhyde-catéchine), ou trimères, voire tétramères pour certains ; la formation de composés très polymérisés n'apparaît seulement qu'en présence d'aldéhydes furaniques.

Les solutions catéchine/aldéhydes absorbent toutes dans le visible quelque soit la nature de l'aldéhyde.

Ces réactions affectent la couleur des vins blancs en contact avec du bois de chêne et modifient définitivement la qualité olfactive et visuelle du vin. En fait, dans les vins, nous avons suffisamment de flavanols pour produire, *via* ces réactions, une quantité de produits colorés capables de contribuer à l'évolution de la couleur des vins

Nous avons présenté une étude structurale complète des dimères formés au cours de réaction de condensation entre la (+)-catéchine et le furfuraldéhyde (un aldéhyde du bois de chêne) en solution modèle. La régio- et stéréochimie, ainsi que la structure 3D de ces composés ont été obtenues par les techniques RMN et de modélisation moléculaire.

Les débouchés de ces travaux nous permettent d'envisager sous un angle nouveau la couleur des vins blancs et des vins rouges mis en contact avec du bois de chêne.

Nous étudions actuellement les additions nucléophiles avec le propénal (les bactéries lactiques dans certaines conditions provoquent dans les vins une altération, appelée la maladie de l'amertume, causée par le métabolisme du glycérol du vin, aboutissant à l'accumulation d'acroléine (propénal)). Il semble être un aldéhyde très réactif et reste très peu de temps sous forme libre dans les vins, expliquant alors les concentrations retrouvées (1 à 2 mg/L). Nous avons émis l'hypothèse que l'amertume développée à pour origine la formation de complexes proanthocyanidols-propénal. Les produits sont en cours de purification et subiront des analyses gustatives pour fixer leurs seuils de perception.

Nous avons vu lors de nos travaux que les lignines d'extraction présentaient souvent des contaminants polysaccharidiques. D'autre part, dans la matrice bois ces polymères sont intimement imbriqués pour former des couches pariétales cohérentes. En s'inspirant des travaux sur les pontages lignines-polysaccharides dans les graminés, nous avons formulé l'hypothèse de ponts formés par des acides phénols dimères ou trimères. Nos premiers travaux nous ont montré que ce n'étaient pas des formes connues de déhydrodiférulate et de déhydrodicoumarate. Nous allons extraire, purifier et analyser par RMN les éléments de pontage entre lignine et polysaccharide du bois de chêne.

Les résultats présentés dans ma thèse ont fait l'objet de publications

Nonier, M.F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Absalon, C., Vitry, C., Fouquet, E. Global fractionation of oak heartwood extractable polymers (lignins, polysaccharides and ellagitanins) by selective precipitations. *J. Sci. Food Agric.*, 2005, 85, 343-353.

Nonier, M.F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Absalon, C., Soulié, Ph., Fouquet, E. Pyrolysis-gaz chromatography/mass spectrometry of *Quercus* sp. wood. Application to structural elucidation of macromolecules and aromatic profiles of different species. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 2006, 75, 181-193.

Nonier, M.F., Pianet, I., Laguerre, M., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Fouquet, E. Condensation products derived from flavan-3-ol oak wood aldehydes reaction. 1. Structural investigation. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 226847, 76-83.

Nonier, M.F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Pianet, I., Fouquet, E. A kinetic study of the reaction of (+)-catechin with aldehydes derived from toasted oak. *J. Sci. Food Agric.*, 2007, 87, 2081-2091.

Nonier, M.F., Vivas, N., Absalon, C., Vitry, C., Fouquet, E., Vivas de Gaulejac, N. Structural diversity of nucleophilic adducts from flavanols and oak wood aldehydes, *Food Chemistry*, soumis.

Nonier, M.F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Fouquet, E. Elucidation of discoloration origin in oak wood for barrel making, *Annals of Forest Science*, soumis.

Bibliographie

- Altona, C.V., Haasnoot, C.A.G., Lew, F.A.M. *Tetrahedron*, **1980**, 36, 2783
- Atanasova, V., Fulcrand, H., Le Guernevé, C., Cheynier, V., Moutounet, M. *Tet. Lett.*, **2002**, 43, 6151-6153
- Ayres, D., Loike, J.D. Chemistry and pharmacology of natural products. Lignans : chemical, biological and clinical properties, Cambridge University Press, Cambridge, **1990**
- Bannwart, C., Adlercreutz, H., Wähälä, K., Brunow, G., Hase, T. *Clin. Chim. Acta*, **1989**, 180, 293-302
- Barbe, J.C, Da Silva Ferreira, A.C, Bertrand, A. *J. Sci. Tech. Tonnellerie*, **1998**, 4, 107-113
- Bardet, M., Foray, M.F., Robert, D. *Makromol. Chem.*, **1985**, 86, 1495-1504
- Barnoud, F. In "Les polymères végétaux: Polymères pariétaux et alimentaires non azotés", B. Monties, Bordas, Paris, **1980**, 66
- Bate-Smith, E.C. *Phytochemistry*, **1972**, 11, 1153-1156
- Bax, A., Davis D.G., *J. Magn. Reson.*, **1985**, 63, 207
- Bax, A., Summers, S.F. *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, 108, 2093-2094
- Bendz, G., Marttensson, O., Nilsson, E. *Ark. Kemi*, **1967**, 27, 67-77
- Boidron, J.N., Chatonnet, P., Pons, M. *Connaissance Vigne Vin*, **1988**, 22, 275-294
- Browning, B.L., Isenberge, I.H. In "wood chemistry", Wise E.; Jahn, E.C. (eds.), Academic press, New York, **1952**
- Cadahia,E., Fernandez de Simon, B., Jalocha, J. *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 5923-5932
- Catesson, A.M.. Les tissus végétaux. Ultrastructure, biogenèse. In "Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaire non azotés", Monties, B. (Ed.), Gauthier-Villars, Paris, **1980**, 1-29
- Cerdan-Garde, T., Ancin-Azpilicueta, C. *L.W.T.*, **2006**, 39, 199-205
- Chang,G., Guida, W.C., Still, W.C. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 4379-4386
- Charlton, J.L. *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 1447-1451
- Chatonnet, P., Boidron, J.N., Pons, M. *Connaissance Vigne Vin*, **1989**, 23, 223-250

Chatonnet, P. Incidences du bois de chêne sur la composition chimique et les qualités organoleptiques des vins. Applications technologiques. Diplômes d'études et de recherches, Bordeaux II, France, **1991**

Chatonnet, P. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **1993**, numéro spécial, 39-49

Chatonnet, P., Boidron, J.N., Dubourdieu, D., Pons, M. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **1994**, 28, 337-357

Chatonnet, P. Influence des procédés de tonnellerie et des conditions d'élevage sur la composition et la qualité des vins élevés en fûts de chêne. Thèse doct. ès Sciences, Université Bordeaux II, France, **1995**

Collier, W.E., Schultz, T.P., Kalasinsk, V.F. *Holzforschung*, **1992**, 46, 523-528

Conner, J.M., Paterson, A., Pigott, J.R. *J. Sci. Food Agric.*, **1992**, 60, 349-353

Conner, J.M., Paterson, A., Pigott, J.R. *J. Sci. Food Agric.*, **1993**, 62, 169-174

Davis, M.F., Schroeder, H.R., Maciel, G.E. *Holzforschung*, **1994**, 48, 99-105

De Groot, W.F., Pan, W.P., Rahman, M.D., Richards, G.N. *Am. Chem. Soc., Fuel Chemistry*, **1987**, 32, 30-43

Dubois, P. *Rev. Fr. Oenol.*, **1989**, 120, 19-24

Dubois, P. *Rev. Fr. Oenol.*, **1994**, 144, p. 28-36; 145, p. 27-39; 146, 46-58

Dubourdieu, D. Vinification des vins blancs secs en barriques. In "Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie", Guimberteau, G. (Ed.), Vigne et vin publications internationales, Martillac, **1992**, 137-143

Ede, R.M., Brunow, G., Somola, L.K., Lemmeityinen, J. *Holzforschung*, **1990**, 44, 95-101

Es-Safi, N.-E, Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 74, 2088-2095

Es safi, N.-E, Fulcrand, H., Cheynier, V., Moutounet, M. *J. Agric. Food Chem.*, **1999**, 47, 2096-2102

Es-Safi, N.-E, Cheynier, V., Moutounet, M. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 5946- 5954

Es-Safi, N.-E, Cheynier, V., Moutounet, M. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 5571-5585

Ekman, R. *Holzforschung*, **1976**, 30, 79-85

Escribano-Baillon,T., Dangles, O., Brouillard, R. *Phytochemistry*, **1996**, 41, 1583-1592

Faix, O. *Holzforschung*, **1991**, 45, 21-27

Fengel, D., Wegener, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reaction. De Gruyter, Berlin, **1984**

Fernandez, N., Mörck, R., Johnsrud, C.J., Kringstad, K. *Holzforschung*, **1990**, 44, 35-38

Fernandez de Simon, B., Cadahia, E., Conde, E., Garcia-Vallejo, M.C. *J Coop Sci Technol.*, **1998**, 4, 91-98

Fernandez de Simon, B., Cadahia, E., Conde, E., Garcia-Vallejo, M.C. *J Agric Food Chem.*, **1999**, 47, 1687-1694

Feuillat, F. Etude de caractère exploratoire sur quelques aspects de la qualité du chêne de tonnellerie en relation avec la qualité des vins. Mémoire DEA, Sciences du bois, Université de Nancy I, France, **1991**

Filliatre, C. Du bois au papier. In « La chimie du pin et du vin : du végétal à la table à travers les processus naturels ou les procédés industriels », Union des physiciens, **1994**, Bordeaux

Flanzy, C. Œnologie, Fondements scientifiques et technologiques, Ed. Tec & Doc, **1998**

Fukagawa, N., Meshitsuka, G., Ishizu, A. *J. Wood Chem. Technol.*, **1991**, 11, 373-396

Fulcrand, H., Docco, T., Es.Safi, N.-E., Cheynier, V., Moutounet, M. *J. Chromatogr. A.*, **1996**, 752, 85-91

Fulcrand, H., Cameira dos Santos, P.-J., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., Favre-Bonvin, J. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.*, **1996**, 735-739

Gagnaire, D., Robert, D. *C.R. JIEP*, Toulouse, **1982**, 11, 373-380

Galletti, G.C., Bocchini, P. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **1995**, 9, 815-826

Ghisalberti, E.L. *Phytomedecine*, **1997**, 4, 151-166

Glories, Y. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. Thèse Doct. ès Sciences, Université Bordeaux II, France, **1978**

Glories, Y. Les phénomènes oxydatifs liés à la conservation sous bois. In "*Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie*", Guimberteau, G (Ed.), Vigne et vin publications internationales, Martillac, **1992**, 93-102

Gomez-Miguez, M.J., Gomez-Miguez, M., Vicario, I.M., Heredia, F.J. *J. Food Engineering*, **2007**, 79, 758-764

Guerra, C. Recherches sur les interactions anthocyanes-flavanols : application à l'interprétation chimique de la couleur des vins rouges. Thèse doct. ès Sciences, Université Bordeaux II, France, **1997**

Gutteridge, C.S., Sweatman, A.J., Norris, J.R. In Analytical pyrolysis, techniques and applications, K.J. Voorhees (Ed.), Butterworths, London, **1984**, 324

- Haluk, J.P., Traope, O., Metche, M. *C.R. JIEP*, **1978**, 8, 214-240
- Haluk, J.P., Schloegel, F., Metche, M. *Holzforschung*, **1991**, 45, 437-444
- Hardell, W.E., Leary, G.J., Stoll, M., Westermarck, U. *Svensk. papperstid.* **1980**, 83, 44-49 - 83, 71-74
- Hart, J.H., Hillis, W.E. *Phytopathology*, **1972**, 62, 620-626
- Hemingway, R.W., Tobiasson, F.L., McGraw, D.W., Steynberg, J.P. *Magn. Reson. Chem.*, **1996**, 34, 424-433
- Herjavec, S., Jeromel, A., Da Silva, A., Orlic, S., Redzepovic, S. *Food Chemistry*, **2007**, 100, 124-128
- Hervé du Penhoat, C.L.M., Michon, V.M.F., Ohassan, A., Peng, S., Scalbert, A., Gage, D. *Phytochemistry*, **1991**, 30,1, 329-332
- Hervé du Penhoat, C.L.M., Michon, V.M.F., Ohassan, A., Peng, S., Viriot, C., Scalbert, A., Gage, D. *J Chem Soc Perkin Trans*, **1991**, 1, 1653-1660
- Hubresch, L.W. 4th International Symposium on Aerogels, Berkeley, **1994**
- Inquinbert, M.H. Elaboration traditionnelle d'un fût en tonnellerie. Etude de la sélection et du séchage des merrains de chênes : leur incidence sur un millésime médocain. Mémoire DNO, Université Bordeaux II, France, **1978**
- Jacquot, C., Trenard, Y., Diriol, D. Atlas d'anatomie des bois angiospermes (essences feuillues), **1973**, Tome 1-Texte, Tome II-Planches. CTBA et CNRS (Eds.), Paris
- Janin, G., Mazet, J.F., Flot, J.L., Hofmann, P. *Rev. For. Fr.*, **1990**, 52, 134-139
- Jouin, D., Tollier, M.T., Monties, B. *Cellulose Chem. Technol.*, **1988**, 22, 231-243
- Keller, R. Les chênes dans le monde. Guimberteau, G. (Ed.), Vigne et vin publications internationales, Bordeaux, **1992**, 7-28
- Klauditz, W. *Holzforschung*, **1952**, 6, 70-82
- Klauditz, W. *Holzforschung*, **1957**, 11, 110-116
- Klumpers, J., Janin G. *Holz als Roh-und Werkstoff*, **1992**, 50, 161-171
- Klumpers, J., Scalbert, A. et Janin, G. *Phytochemistry*, **1994**, 36, 1249-1252
- Kringstad, K.P., Mörck, R. *Holzforschung*, **1983**, 37, 237-244
- Lai, Y.Z., Sarakanen, K.W. In "Lignins: occurrence, formation, structure, reactions, chap. 5", Sarakanen, K.V.; Ludwig, C.H. (Eds.), **1971**
- Lapierre, C., Lallemand, J.Y., Monties, B. *Holzforschung*, **1982**, 40, 113-118

- Lapierre, C., Monties, B., Guittet, E.; Lallemand, J.Y. *Holzforschung*, **1984**, 38, 333-342
- Lapierre, C. Hétérogénéité les lignines de peuplier : mise en évidence systématique. Thèse doctorat d'état, Université Paris-Sud, **1986**
- Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C. *Holzforschung*, **1986**, 40, 47-81
- Lapierre, C., Monties, B., Rolando, C. *Holzforschung*, **1986**, 40, 113-118
- Lapierre, C., Monties, B., Vassal-Gonthier, A., Dworkin, A. *J. Appl. Polym. Sci.*, **1986**, 32, 4561-4572
- Lapierre, C., Pollet, B., Monties, B., Rolando, C. *Holzforschung*, **1991**, 45, 61-68
- Laurie, V.F., Waterhouse, A.L. *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 4668-4673
- Lavisci, P., Scalbert, A., Masson, D., Janin, G. *Holzforschung*, **1991**, 45, 291-296
- Lewis, N.G., Newman, G., Ripmeister, J. *Macromolecules*, **1987**, 20, 1752-1756
- Lundquist, K. ¹H NMR spectral studies of lignins. *Nordic Pulp Paper research J.*, **1991**, 3, 140-147
- Marché, M., Joseph, E. *Rev. Fr. Oenol.*, **1975**, 57, 1-107
- Marco, J., Artagona, J., Larrechi, M.S., Ruis, F.X. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1994**, 45, 192-200
- Marion, D., Wüthrich, K. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **1983**, 113, 967-974
- Marsal, F., Sarre, C. *Connaissance Vigne Vin*, **1987**, 21, 71-79
- Marsal, F., Sarre, C., Boidron, J.N., Dubourdieu, D. *Connaissance Vigne Vin*, **1988**, 22, 33-38
- Masson, G.; Puech, J.L.; Moutounet, M. *Phytochemistry*, **1994**, 37, 1245-1249
- Mateus, N., Silva, A.M.S., Rivas-Gonzolo, J.C., Santos Buelga, B., De Freitas, V.A.P. *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, 50, 2110-2116
- Mayer, V.W., Gabber, W., Riester, A., Koger, H. *Ann Chem*, **1967**, 707, 177-192
- Mayer, V.W., Seitz, H., Jochims, J.C., Schauerte, K., Schillinj, G. *Ann Chem*, **1971**, 751, 60-73
- Meagher, L.P., Beecher, G.R., Flanagan, V.P., Li, B.W. *J. Agric. And Food Chem.*, **1999**, 47, 3173-3180
- Meuzelaar, H.L.C., Haverkamp, J., Hileman, F.D., Elsevier (Ed.), *Appl. Sci.*, Amsterdam, **1982**
- Miyakoshi, T., Chen, C.L. *Holzforschung*, **1991**, 45, Suppl., 41-47
- Monties, B. Les lignines. In "Les polymères végétaux. Polymères pariétaux et alimentaires non azotés", (Ed.) Bordas, Paris, **1980**, 122-155

Monties, B., Lapierre, C., Gaudillère, J.P., Guittet, E., Vilhorgne, M., Lallemand, J.Y. CR JIEP, **1982**, 11, Toulouse, 388-394

Monties, B. Composition chimique des bois de chêne : composés phénoliques, relations avec quelques propriétés physiques et chimiques susceptibles d'influencer la qualité des vins et des eaux-de-vie. In "*Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie*". Guimberteau, G. (Ed.), Vigne et vin publications internationales, Bordeaux, **1992**, 59-72

Monzie, P., Pichon, M., Lombardo, G., Schwob, Y. CR JIEP, **1982**, 11, 233-257

Moutounet, M., Rabier, Ph., Puech, J.L., Verette, E., Barillere, J.M. *Sci Aliments*, **1989**, 9, 35-51

Moutounet, M., Rabier, Ph., Sarni, F., Scalbert, A. Les tanins du bois de chêne. Les conditions de leur présence dans les vins. In "*Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie*", Guimberteau, G. (Ed.), Vigne et vin publications internationales, Bordeaux, **1992**, 75- 79

Moutounet, M., Masson, G., Scalbert, A., Baumes, R., Lepoutre, J.P., et Puech, J.L. *Rev. Fr. Oenol.*, **1995**, 151, 25-31

Nabeta, K., Yonekubo, J., Miyake, E. *Mokuzai Gakkashi*, **1986**, 32, 921-927

Nabeta, K., Yonekubo, J., Miyake, E. *Mokuzai Gakkashi*, **1986**, 32, 921-927

Nimz, H. CR JIEP, **1978**, 8, Nancy, 185-206

Nimz, H.H., Robert, D., Faix, O., Nermr, M. *Holzforchung*, **1981**, 35, 16-26

Nimz, H.H., Tschirner, Stähle, M., Lehmann, R., Schlosser, M. *J. Wood Chem. Technol.*, **1984**, 4, 265-284

Nonaka GI, Ishimaru K, Azuma R, Ishimatsu M and Nishioka I, *Chem Pharma Bull*, **1989**, 37, 2071-2077

Nondedeu, L., Leauté, R., Granchamps, B., Bonnichon, C., Laurichesse, D., Trichet, P. *Progr. Agric. Vitic.*, **1988**, 105, 505-518

Nonier, M.F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Absalon, C., Vitry, C., Fouquet, E. *J. Sci. Food Agric.*, **2005**, 85, 343-353

Nonier, M.F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Absalon, C., Soulié, Ph., Fouquet, E. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **2006**, 75, 181-193

Nonier, M.F., Pianet, I., Laguerre, M., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Fouquet, E. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 226847, 76-83

Nonier, M.F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Pianet, I., Fouquet, E. A kinetic study of the reaction of (+)-catechin with aldehydes derived from toasted oak. *J. Sci. Food Agric.*, **2007**, 87, 2081-2091

- Peng, S., Scalbert, A., Monties, B. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 775-778
- Peraza-Cramas, C.P. Las maderas de roble en la fabricacion de barricas. In “*Jordanas técnicas sobre utilizacion de barrica de roble en la crianza de vinos de Rioja*”, Relondo, A.L. (Ed.), Ramondin, Logrono, **1986**, 11-42
- Pocok, K.F., Sefton, M.A., Williams, P.J. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1994**, 45, 429-434
- Pontallier, P., Salagoity-Auguste, M.H., Ribéreau-Gayon, P. *Connaissance Vigne Vin*, **1982**, 16, 45-61
- Puech, J.L. Vieillissement des eaux-de-vie en fûts de chêne. Extraction de la lignine et de ses produits de dégradation. Thèse, Université Paul Sabatier, Toulouse, **1978**
- Puech, J.L., Jouret, C., Deibner, L. *Ind. Alim. Agric.*, **1978**, 95, 13-22
- Puech, J.L. *Am J Enol Vitic*, **1981**, 32, 111-114
- Puech, J.L. *Am J Enol Vitic*, **1984**, 35, 77-81
- Puech, J.L., Leaute, R., Clot, G., Nomdedeu, L., Mondies, H. *Sc. Aliments*, **1984**, 4, 65-80
- Puech, J.L., Robert, A., Moutounet, B. *Holzforschung*, **1989**, 43, 235-238
- Puech, J.L., Maga, J. *Rev. Œnol.*, **1993**, 70, 13-16
- Puech, J.L., Rabier, Ph., Moutounet, M. Elaboration et connaissance des spiritueux : recherche de la qualité, tradition et innovation. Cantagrel (Ed.), Lavoisier, Paris, **1993**
- Rabier, Ph., Moutounet, M. Evolution d’extractibles du bois de chêne dans une eau-de-vie vieillie en fûts. In “*Les eaux-de-vie traditionnelles d’origine viticole*”, Bertrand, A. (Ed.), Lavoisier, Paris, **1991**, 220-230
- Ralph, J., Hatfield, R.D. *J. Agric. Food Chem.*, **1991**, 39, 1426-1437
- Recamales, A.F., Sayago, A., Gonzalez-Miret, M.L., Hernanz, D. *Food Research International*, **2006**, 39, 220-229
- Remy, B. *Rev. Forest. Fr.*, XLIII, **1991**, 4, 190-300
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Dubourdiou, D. *Traité d’œnologie 2. Chimie du vin*. Ed. Dunod, **1998**
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdiou, D. *Handbook of enology. The chemistry of wine stabilization and treatments* ; Wiley : New-York, **2000**, Vol. 2
- Robert, B. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrometry. In “*Methods in lignins chemistry*“ Lin, S.Y.; Dence, C.W. (eds.), Springer-Verlag, Berlin, **1992**, 250-273

- Rolando C, Monties B and Lapierre C. Thioacidolysis. In “*Methods in lignins chemistry*” Lin.S.Y., CDence C.W. (Ed.) Springer; Verlag, Berlin, **1992**, 334-349
- Rowell, R. The chemistry of solid wood. *Adv. Chem. Ser.*, **1984**, 207, 1-614
- Saiz-Jimenez, C., De Leeuw, J.W. *J. Anal. Appl. Pyrol.*, **1987**, 11, 367-376
- Saiz-Jimenez, C. *Environ. Sci. Technol.*, **1994**, 28, 1773
- Saiz-Jimenez, C. *Naturwissenschaften*, **1994**, 81, 451-453
- Saiz-Jimenez, C. *Org. Geochem.*, **1995**, 23, 81
- Salagoity-Auguste, M.H., Tricard, C., Sudraud, P. *J. Chromatogr.*, **1987**, 392, 379-387
- Sarni, F., Moutounet, M., Puech, J.L., Rabier, P. *Holzforschung*, **1990**, 44, 461-466
- Saucier, C., Bourgeois, G., Vitry, C., Roux, D., Glories, Y. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 1045-1049
- Saucier, C., Guerra, C., Pianet, I., Laguette, M., Glories, Y. *Phytochemistry*, **1997**, 46, 229-234
- Saunders, M., Houk, K.N., Wu, Y.D., Still, W.C., Lipton, M., Chang, G., Guida, W.C. *Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 1419-1427
- Scalbert, A., Monties, B., Janin, G. *J. Agric. Food Chem.*, **1989**, 37, 1324-1329
- Scalbert, A., Duval, L., Peng, S., Monties, B., Herve du Penhoat, C.L.M. *J Chromatogr.*, **1990**, 502, 107-119
- Scalbert, A. *Phytochemistry* , **1991**, 30, 3875-3883
- Scalbert, A. In: *Plant polyphenols: synthesis, properties, signifiante*; Hemingway R.W., Laks P.E., Ed.; Plenum Press, New-York, **1992**
- Sefton, M.A., Francis, I.L., Williams, P.J. Volatile flavour components of oakwood. *Proceeding of seventh Australian Wine Industry Technical Conference*, **1989**, p. 107-112
- Seihel, M.K., Hostettler, F.D., Niemann, G.J. *Phytochemistry*, **1971**, 19, 2249-2251
- Shenkin, P.S. D.Q.J. McDonald, *Comput. Chem.* 15, **1994**, 899
- Sicilia T., Niemeyer, H.B., Honig D.M., Metzler, M. *J. Agric. And Food Chem.*, **2003**, 51, 1181-1188
- Simon, C., Barathieu, K., Laguette, M., Schmitter, J.M., Fouquet, E., Pianet, I., Dufourc, E.J. *Biochemistry*, **2003**, 42, p. 10385
- Simpson, R.F. Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis*, **1982**, 21, p. 233-239

- Singleton, V.L. Some aspects of wooden container as a factor in wine maturation. In "*Chemistry of wine making*", **1974**, 137, A.D. (Ed.), 311
- Singleton, V.L. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1995**, 46, 98-115
- Steynberg, J.P., Brandt, E.V., Hoffman, M.J.H., Hemingway, Ferreira, D. In : Hemingway R.W., P.E. (Eds), *Planr Polyphenols*, Plenum Press, New-York, **1992**, 501
- Still, W.C., Tempczyk, A., Hawley, R.C., Hendrikson, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 6127-6129
- Tanaka, T., Takahashi, R., Kouno, I., Nonaka, K. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1994**, 3013-3022
- Taransaud, J. Le livre de la tonnellerie. La roue des livres (Ed.), **1976**, Paris
- Tarascou, I. Synthèse et caractérisation des procyanidines oligomères pour l'identification de tanins du raisin et du vin. Thèse Université Bordeaux I, France, **2005**
- Terashima, N., Seguchi, Y., Robert, D. *Holzforschung*, **1991**, 45, p. 35-39
- Timberlake, C.F., Bridle, P. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1976**, 27, 97-105
- Tollier, M.T., Monties, B., Lapierre, C., Hervé du Penhoat, C.L.M., Rolando, C. *Holzforschung*, **1986**, Suppl. 40, 75-79
- Towel, J.P., Waterhouse, A.L. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1996**, 47, 17-20
- Viriot, C., Scalbert, A., Lapierre, C., Moutounet, M. *J Agric Food Chem.*, **1993**, 41, 1872-1879
- Viriot, C., Scalbert, A., Herve du Penhoat, C.L.M., Moutounet, M. *Phytochemistry*, **1994**, 36, 1253-1260
- Viriot, C., Scalbert, A., Herve du Penhoat, C.L.M., Rolando, C., Moutounet, M. *Journal of Chrom. A*, **1994**, 662, p. 77-85
- Vitiello, D. Etude analytique des produits de pyrolyse et d'extraction des bois tropicaux. Thèse docteur-ingénieur, Université de Bordeaux I, France, **1982**
- Vivas, N. *J. Sci. Tech. Tonnellerie*, **1995**, 1, 17-48
- Vivas, N., Glories, Y., Donèche, B., Gueho, E. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, **1991**, 13, 11, 149-153
- Vivas, N., Chauvet, S., Sudraud, P., Glories, Y. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **1993**, 86, 919, 215-222
- Vivas, N., Laguerre, M., Glories, Y., Bourgeois, G., Vitry, C. *Phytochemistry*, **1995**, 39, 1193-1199
- Vivas, N., Bourgeois, G., Vitry, C., Freitas, V., Glories, Y. *J. Sci. Food Agric.*, **1996**, 72, 309-317
- Vivas, N., Glories, Y., Bourgeois, G., Pianet, I., Vitry, C., Barbe, B. Origine de la vescaline et de la castaline du bois de cœur de *Quercus petraea* Liebl. In: *Polyphenols communication 96*.

Vercauteren J., Cheze C., Dumon M.C., Weber J.F., Ed.; Groupe Polyphénols, Bordeaux, **1996**, 41-42

Vivas, N., Glories, Y., Bourgeois, G., Vitry, C. *J. Sci. Tech. Tonnellerie* 2, **1996**, 24-49

Vivas, N., Glories, Y. *Am. J. Enol. Vitic.*, **1996**, 47, 103-107

Vivas, N. Recherches sur la qualité du chêne français de tonnellerie (*Q. petraea* Liebl., *Q. robur* L.) et sur les mécanismes d'oxydo-réduction des vins rouges au cours de leur élevage en barriques. Thèse, Université de Bordeaux II, France, **1997**

Vivas, N., Pianet, I., Bougeois, G., Vitry, C., Servens, C., Glories, Y. *Am J Enol Vitic.*, **1998**, 49, 49-55

Vivas, N., Saint-Cricq de Gaulejac, N., Bourgeois, G., Vitry, C., Pianet I., Barbe B., Glories, Y. *J. Chim. Phys.*, **1998**, 95, 430-436

Vivas, N. Manuel de Tonnellerie, Ed. Féret, Bordeaux, France, **2002**

Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Nonier, M.F. *Bulletin O.I.V.*, **2003**, 865/866, 281-303

Wilfor, S, Hemming, J., Reunanen, M., Eckerman, C., Holmbom, B. *Holzforschung*, **2003**, 57, 27-36

Xie, Y., Robert, D., Terashima, N. *Plant Physiol. Biochem.*, **1994**, 32, p. 243-249

Yamauchi, S., Ina, T., Kirikihira, T., Masuda, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2004**, 68, 183-192