



HAL
open science

Etude de la glycosylation de flavanols dans le raisin et incidence dans les vins

Marie Zerbib

► **To cite this version:**

Marie Zerbib. Etude de la glycosylation de flavanols dans le raisin et incidence dans les vins. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTG051 . tel-01993133

HAL Id: tel-01993133

<https://theses.hal.science/tel-01993133>

Submitted on 24 Jan 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biochimie et Physicochimie alimentaires

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche : UMR Sciences Pour l'Œnologie

Etude des flavanols glycosylés : du raisin au vin

Présentée par Marie Zerbib

Le 15 Novembre 2018

Sous la direction de M. Cédric Saucier

Devant le jury composé de

Christine ENJALBAL, Professeur, Université de Montpellier

Laurence GENY-DENIS, Professeur, Université de Bordeaux

Jean-Pierre SOUCHARD, Professeur, Université de Toulouse

Christian COELHO, Maître de conférences, Université de Bourgogne

Nancy TERRIER, Chargé de recherche, INRA de Montpellier

Cédric SAUCIER, Professeur, Université de Montpellier

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examinatrice

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

A la mémoire d'Isabelle,

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Remerciements | 6 |
| Valorisation des travaux de recherches | 10 |
| Abréviations | 11 |
| Introduction générale | 13 |
| Chapitre 1 – Bibliographie | 17 |
| 1. La baie de raisin au cours de sa maturation | 18 |
| 1.1. Morphologie..... | 18 |
| 1.2. Développement | 19 |
| 2. Les polyphénols du raisin | 22 |
| 2.1. La famille des non-flavonoïdes | 22 |
| 2.2. La famille des flavonoïdes..... | 24 |
| 2.2.1. Les flavanols | 25 |
| 2.2.2. Les anthocyanes | 26 |
| 2.2.3. Les flavan-3-ols | 28 |
| 3. Biosynthèse des flavanols | 32 |
| 3.1. Enzymes impliquées dans les voies de biosynthèses des flavanols et des tanins. 32 | |
| 3.2. Polymérisation des flavanols et intermédiaires potentiels | 34 |
| 4. Flavanols glycosylés des plantes : Structures, fonctions, synthèses multiples..... | 38 |
| 4.1. Présence de flavanols glycosylés dans la nature : structure et fonctions | 38 |
| 4.1.1. Les flavanols glycosylés dans les plantes..... | 38 |
| 4.1.2. Fonctions et propriétés | 41 |
| 4.2. Obtention de standards de flavanols glycosylés | 42 |
| 4.2.1. Hémisynthèse par voie enzymatique | 42 |
| 4.2.2. Hémisynthèse par voie chimique | 46 |
| 5. Problématiques et objectifs globaux de la thèse | 49 |

| | |
|---|----|
| Chapitre 2 – Flavan-3-ols glycosylés présents dans le raisin et dans le vin | 50 |
| 1. Extraction et purification des flavanols glycosylés sur vin issu de cépage tannat..... | 52 |
| 1.2. Matériels et méthodes..... | 52 |
| 1.2.1. Préparation des échantillons | 52 |
| 1.2.2. Méthode de purification par extraction liquide-liquide | 52 |
| 1.2.3. Méthode de purification sur disque de SDB | 52 |
| 1.2.5. Purification sur gel 40S..... | 53 |
| 1.2.6. Chromatographie semi-préparative..... | 54 |
| 1.2.7. UPLC-DAD-ESI-IT-MS | 54 |
| 1.3. Résultats et discussions | 54 |
| 1.3.1. Composition en flavanols glycosylés des fractions de l'extraction liquide et celle sur disque SDB..... | 54 |
| 1.3.2. Purification des dimères de flavanols glycosylés par chromatographie..... | 56 |
| 1.4. Conclusion et perspectives | 59 |
| 2. Hémissynthèses à partir de glycosyltransférases, UGT72L1et UGT71A15 | 60 |
| 2.1 Matériels et Méthodes | 60 |
| 2.1.1. Production de l'enzyme UGT72L1 | 60 |
| 2.1.2. Production de l'enzyme UGT71A15 | 61 |
| 2.1.3. Dosage des protéines par réactif de Bradford | 62 |
| 2.1.4. Hémissynthèse flavan-3-ols glucosylés par action de l'UGT72L1 (Pang, Peel et al., 2008)..... | 63 |
| 2.1.5. Hémissynthèse flavan-3-ols glucosylés par action de l'UGT71A15 | 63 |
| 2.2 Résultats et discussions | 63 |
| 2.2.1. Hémissynthèse par l'UGT72L1 | 63 |
| 2.2.2. Hémissynthèse flavan-3-ols glucosylés par action de l'UGT71A15 | 64 |
| 2.3 Conclusion et perspectives | 64 |
| 3. Nouveaux flavan-3-ols détectés dans le raisin et dans le vin | 66 |

| | |
|---|------------|
| Chapitre 3 – Evolution de la teneur en flavanols glycosylés au cours de la maturation du raisin | 75 |
| 1. Développement d’une méthode d’analyse pour l’identification et la quantification des flavanols glycosylés..... | 77 |
| 2. Quantification des flavanols glycosylés au cours du développement de la baie | 81 |
| Chapitre 4 – Suivi de l’évolution de flavanols glycosylés au cours de l’élaboration de vins rouges..... | 97 |
| Conclusion générale | 114 |
| Bilan des résultats de thèse | 115 |
| Perspectives globales | 117 |
| Liste des figures..... | 119 |
| Liste des tableaux..... | 121 |
| Annexes | 122 |
| Chapitre 2- Flavan-3-ols glycosylés présents dans le raisin et dans le vin | 122 |
| Chapitre 3 - Evolution de la teneur en flavanols glycosylés au cours de la maturation du raisin..... | 134 |
| Chapitre 4 - Suivi de l’évolution des flavanols glycosylés au cours de l’élaboration du vin rouge | 135 |
| Références..... | 138 |

Remerciements

Ces travaux de recherches n'auraient jamais été fructueux sans ces personnes qui m'ont entourée et aidée à leur manière au quotidien, et que j'aimerai remercier dans les quelques lignes suivantes.

Ces remerciements s'adressent premièrement à mon directeur de thèse, Cédric Saucier pour ses idées, ses encouragements, son calme durant ces trois années. Merci pour ta confiance et ta motivation qui m'ont permis de réaliser au mieux cette thèse.

Je remercie chaleureusement Nancy Terrier pour son encadrement, son dynamisme, son franc-parler ainsi que d'avoir accepté d'être examinatrice de ce manuscrit de thèse. L'initiation aux manipulations et à la compréhension de la biologie moléculaire n'aurait pas été pareille sans tes compétences scientifiques et ta rigueur. Un grand merci aussi pour m'avoir soutenue et surtout comprise lors des moments difficiles. Tu as été un moteur pour moi durant cette période.

Je remercie les membres du jury, Mme Gény Denis et M. Souchard ainsi que Mme Enjalbal et M. Coelho pour avoir accepté de lire et corriger ces travaux de thèse ainsi que pour leur participation à la soutenance.

Je tiens à remercier tout particulièrement Véronique Cheynier pour l'intérêt et le regard critique portés sur cette thèse. Ta vision de la recherche et tes conseils scientifiques avisés ont donné de la rigueur à sa réalisation. Je te suis sincèrement reconnaissante d'avoir accepté de jouer ce rôle.

Je remercie M. Bernd Nidetzky pour son accueil dans l'Université de technologie de Graz, en Autriche ainsi que Alexander Lepak pour son encadrement, sa passion et sa détermination.

Je ne peux oublier de remercier sincèrement Jean-Paul, qui m'a été d'une aide précieuse et nécessaire tout au long de ces travaux de thèse. Merci pour ta vision technique et juste de la chromatographie. Nos discussions passionnées sur des sujets divers et variés (allant de la cuisine du monde aux débats politiques très franco-français) ont rythmé mes

journées au laboratoire. Tu resteras pour moi l'une des personnes les plus importantes de ces trois années de dur labeur.

Mes remerciements vont bien sûr à Emmanuelle qui m'a ouvert les portes de la connaissance de ce merveilleux outil qu'est la spectrométrie de masse. Ton analyse et tes conseils judicieux ont été primordiaux face à mon entêtement à comprendre la fragmentation des flavanols glycosylés. Merci pour ton calme et ta joie de vivre. Je tiens également à remercier Christine Le Guernevé qui a pris le temps de m'expliquer la RMN et ses multiples utilités.

La réalisation de ces travaux n'aurait pas été possible sans l'accueil de Mme Enjalbal au sein du Laboratoire de Mesure Physique basée à l'Université Montpellier. Je ne remercierai jamais assez Guillaume qui m'a accompagné et aidé tout au long de cette longue période d'analyses, ponctuée de quelques rebondissements, on peut le dire. Merci pour ta détermination face aux problèmes rencontrés, tes explications claires et précises et surtout, pour ta disponibilité sans limite !

Je tiens à remercier chaleureusement Thérèse Marlin qui a bien voulu m'encadrer et prendre le relais sur les manipulations de « biomol ». Ta rigueur et ton efficacité face au travail imposent le respect. Les discussions autour de bons cafés resteront pour moi de très bons souvenirs.

J'en profite pour remercier également les autres actrices principales de ces pauses café du matin, Martine pour sa gentillesse et Agnès pour son dynamisme. Et pour ceux de l'après-midi, ça a été un grand plaisir de partager ces instants grâce à la bonne humeur et aux blagues de Thierry, au rire et aux aventures de Pascale, la gentillesse d'Arnaud, la sympathie de Peggy...

Un grand et sincère merci aux enseignants (et chercheurs) du DNO qui ont été, par leur présence et leur discussions, des personnes d'une importance considérable pour moi. Audrey, j'ai été enchanté d'être ta colocataire de bureau à pharma au début. Nos discussions tant professionnelles que personnelles ont permis de me remonter le moral à de nombreux moments. Merci pour ta joie de vivre et ta gentillesse. Merci à François qui a su écouter et me faire rire à chacun de ses passages à pharma. Je n'oublierai jamais la discussion effrénée au repas de Gala de MacroWine. Marythé, merci pour ta bienveillance et ta sincérité. Je tiens

également à remercier Mary pour nos discussions et pour ton aide précieux au cours de ce dernier mois de thèse. J'en profite pour remercier Cathy Peyrot Des Gachons qui nous a accompagnés au labo pendant une année. Les discussions autour de la recherche et de l'œnologie ont été passionnantes. Merci pour ta gentillesse ! J'espère que nos chemins se recroiseront un jour.

Je ne peux oublier mes camarades et amies de thèse grâce auxquels ces trois années ont été parsemées de joies, de rires et de larmes... ! Je commence bien sûr par Mélodie, ma colocataire de labo, ma camarade de gym, ma complice, mon amie. Il y a un peu plus de trois ans, tu m'accompagnais jusqu'à la porte du concours, et nous voilà aujourd'hui. Les discussions et les moments passés tant à l'intérieur qu'à l'extérieur du labo sont inoubliables. Merci pour ta présence lors d'une certaine période difficile de ma vie. Mes pensées vont aussi à Noémie (ou tout surnom mignon qui convienne bien). Que dire, à part que je ne t'oublierai jamais, et que ton arrivé au labo a été un grand bol d'air frais. Il s'en est passé des choses depuis ! On se retrouve vite autour d'une bière ou d'un café. Je vous souhaite à toutes les deux tout le meilleur dans vos jolies vies.

Cette dernière année a été ponctuée de nouvelles et merveilleuses rencontres. Je tiens particulièrement à remercier mon amie Hélène pour sa joie, son enthousiasme, sa sincérité... Un grand et chaleureux merci à Sarah. Ton arrivée a permis de dynamiser le labo par ta bonne humeur et ta motivation. Ton aide permanente en fin de thèse a été très importante pour moi et je t'en remercie. Merci aussi à Nawel pour sa présence et son aide durant cette dernière année de thèse (et bien sûr ses pâtisseries orientales très bonnes). Merci à Anaïs, pour nos discussions et sa gentillesse.

Je tiens également à remercier sincèrement les Jérômes de pharma et Thibaut qui m'ont été d'une grande aide durant cette thèse, Nadia et Cynthia pour nos discussions et les aides de tous les jours. Un grand merci à Natalia, Rafa, Stéphanie et Ana pour les bons moments passés ensemble.

Ce travail a été précieusement complété par l'aide de mes stagiaires que je remercie profondément : Chloé, Tristan et Nicolas.

Dans ces dernières lignes, mes pensées vont à mon amour, mon meilleur ami et compagnon de tous les jours, Hugo. Tu as su me comprendre, m'aider et me soutenir tout au

long de ces cinq dernières années. Je suis tellement fière de t'avoir à mes côtés et tu sais à quel point tu comptes pour moi. J'ai vraiment hâte de vivre nos projets futurs.

Je terminerai par remercier les membres de ma famille et mes amis qui me sont très chers. Merci particulièrement à mon père et à mon frère pour votre présence, soutien et tout simplement pour être vous. Mes pensées les plus tendres et les plus affectueuses vont à ma mère qui restera la plus belle personne que j'ai eu la chance de rencontrer.

Valorisation des travaux de recherches

PUBLICATIONS

Dans le cadre de la thèse :

Zerbib, M., Mazauric, J.-P., Meudec, E., Le Guernevé, C., Lepak, A., Nidetzky, B., Cheynier, V., Terrier, N. and Saucier, C., "New flavanol O-glycosides in grape and wine", *Food Chemistry*, Vol.266, 2018, p. 441-448.

Zerbib, M., Cazals, G., Enjalbal, C., Saucier, C., "Identification and quantification of flavanol glycosides in *Vitis Vinifera* grape seeds and skins during ripening", 2018b, *Molecules*, Vol.23, 2745.

Zerbib, M., Cazals, M.-A., Ducasse G., Enjalbal, C., Saucier, C., "Evolution of flavanols glycosides during red grape fermentation", 2018c, *Molecules*, Vol.23, 3300.

Autres publications:

Nikolantonaki, M., Coelho, C., Noret, L., Zerbib, M., Vileno, B., Champion, D. and Gougeon, R. D., "Measurement of white wines resistance against oxidation by Electron Paramagnetic Resonance spectroscopy", *Food Chemistry*, Vol.270, 2019, p. 156-161.

COMMUNICATIONS A DES CONGRES INTERNATIONAUX

Zerbib, M., Mazauric, J.-P., Meudec, E., Le Guernevé, C., Lepak, A., Nidetzky, B., Cheynier, V., Terrier, N. and Saucier, C., "New flavanol O-glycosides in grape and wine", ***In Vino Analytica Scientia Symposium, Salamanque, 17-20 Juillet 2017.*** – Présentation orale

Zerbib, M., Puech, C., Abelanet, M., Mazauric, J.-P., Meudec, E., Le Guernevé, C., Cheynier, V., Terrier, N. and Saucier, C., " Flavanol glycosides in grapes and wines as potential key intermediates in proanthocyanidin biosynthesis", **MacroWine, Nyon, 27-30 Juin 2016.**- Poster

Zerbib, M., Puech, C., Abelanet, M., Mazauric, J.-P., Meudec, E., Le Guernevé, C., Cheynier, V., Terrier, N. and Saucier, C., "New flavanol O-glycosides in grape and wine", **Wine Active Compounds, Beaune, 29-31 Mars 2017.** - Poster

Abréviations

| | |
|---------------------------------|---|
| 4CL | 4-coumarate CoA ligase |
| Ac ₂ O | Anhydride acétique |
| AHB | Acides hydroxybenzoïques |
| AHC | Acides hydroxycinnamiques |
| ANR | Anthocyanidine réductase |
| At | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| BF ₃ | Trifluorure de bore |
| C ₄ H | Cinnamate 4-hydroxylase |
| CH ₂ CL ₂ | Dichlorométhane |
| CHS | Chalcone synthase |
| CXOG | (+)-catéchine X-O-glucoside |
| C _x | Carbone X |
| DMF | Diméthylsulfure |
| DFR | Dihydroflavonol 4-réductase |
| DP _m | Degré de polymérisation moyen |
| E. coli | <i>Escherichia coli</i> |
| ESI | Ionisation par électrospray |
| EXOG | (-)-épicatéchine X-O-glucoside |
| F ₃ H | Flavonone 3-hydroxylase |
| FA | Fermentation alcoolique |
| HPLC | Chromatographie liquide haute performance |
| K ₂ CO ₃ | Carbonate de potassium |
| LAR | Leucoanthocyanidine réductase |
| LDOX | Leucoanthocyanidine dioxygénase |

| | |
|-----------------|---|
| MATE | Multidrug and toxic compound extrusion |
| MBP | Protéine liant le maltose |
| Mt | <i>Medicago truncatula</i> |
| MRM | Multiple Reaction Monitoring |
| MS | Spectrométrie de masse |
| NOESY | Spectroscopie à effet overhauser nucléaire |
| PA | Proanthocyanidines |
| PAL | Phénylalanine ammonia-lyase |
| PPO | Polyphénol oxydase |
| Q | Quadripôle |
| RMN | Résonance magnétique nucléaire |
| SO ₂ | Dioxyde de soufre |
| T.A. | Température ambiante |
| THF | Tétrahydrofurane |
| TOF | Time of flight |
| TT | Transparent testa |
| UDP-Glucose | Uridine diphosphate glucose |
| UGT | Uridine 5'-diphosphate glucosyltransferase α -D-glucose-dépendante |
| UPLC | Chromatographie liquide ultra Performance |
| UV | Ultraviolet |
| Vv | <i>Vitis Vinifera</i> |

Introduction générale

Les polyphénols constituent une famille de composés chimiques largement répandue dans la nature : on en trouve en quantités notables dans le thé (Naghma and Mukhtar, 2007), le cacao (Rimbach, *et al.*, 2009) ; (Fayeulle, *et al.*, 2018), la myrtille (Avram, *et al.*, 2017), le raisin (Antoniolli, *et al.*, 2015) et dans des produits fermentés comme le vin (Saucier, 2010), le chocolat (Allgrove and Davison, 2014) et la bière (Quifer-Rada, *et al.*, 2015). Ils possèdent des structures chimiques diversifiées et peuvent avoir des propriétés biologiques intéressantes (Quideau, *et al.*, 2011). Les composés polyphénoliques améliorent le système immunitaire de certains animaux en prévenant les risques de ballonnement chez les ruminants (Lees, 1992). Chez l'Homme, des études ont montré l'importance bénéfique de la consommation de polyphénols sur la santé grâce à leurs propriétés antioxydante et anti inflammatoire. Ils jouent, entre autres, un rôle protecteur contre des maladies cardiovasculaires (Corder, *et al.*, 2006) ; (Quiñones, *et al.*, 2013). Ces propriétés bénéfiques expliqueraient en partie le « French paradox » : une consommation régulière et modérée de vin contrebalancerait l'alimentation plutôt riche en matière grasse des français dans la prévention des risques cardiovasculaires (Biagi and Bertelli, 2015).

Outre leurs bénéfices sur la santé, les polyphénols ont un impact majeur dans le domaine de l'œnologie, depuis la culture de la vigne jusqu'à la consommation du vin. L'un des points forts pour la viticulture réside dans leurs capacités à protéger la vigne face à des stress biotiques et abiotiques. Par ailleurs, les composés polyphénoliques, apportés en majeure partie par la baie de raisin, sont très présents dans le vin et plus particulièrement, dans le vin rouge. Leur rôle est fondamental car ils lui confèrent des propriétés organoleptiques majeures. Ils sont en effet responsables de la couleur rouge du vin et des sensations tactiles en bouche telle que la sensation d'astringence.

Les tanins condensés appelés aussi proanthocyanidines (PA) sont des polymères de flavan-3-ols. Ces derniers appartiennent à la catégorie des flavonoïdes, une sous-famille des polyphénols. Il s'agit de composés polyphénoliques majoritaires dans le vin qui proviennent principalement de l'extraction de la pellicule et des pépins du raisin au cours des macérations et de la fermentation alcoolique.

La biosynthèse des quatre principales unités de flavanols du raisin que sont la catéchine, l'épicatéchine, l'épigallocatechine et l'épicatéchine gallate, communes à différentes plantes, a été décrite dans la littérature (Tanner and Kristiansen, 1993), (Xie, *et al.*, 2003). Cependant, une boîte noire subsiste au niveau des mécanismes de polymérisation des tanins condensés (Huang, *et al.*, 2012). Des chercheurs se sont donc intéressés aux mécanismes de la voie de biosynthèses des PA dans différents modèles biologiques comme *Vitis vinifera* et *Arabidopsis thaliana* (Terrier, *et al.*, 2009), (Zhao and Dixon, 2009), (Pang, *et al.*, 2008). Pang, *et al.* (2008) ont ainsi suggéré que la polymérisation des unités de flavanols passerait par des formes intermédiaires glycosylées, en particulier l'(-)-épicatéchine-3'-O- β -glucoside notée E3'OG, chez les plantes *Medicago truncatula* et *A. thaliana*. Cette glycosylation pourrait jouer un rôle dans le transport intracellulaire de ces précurseurs et/ou dans leur polymérisation (Zhao and Dixon, 2009; Pang, *et al.*, 2013). Parallèlement, des monomères de flavanols glycosylés ont été récemment mis en évidence dans les pépins de raisins et dans le vin de Merlot (Delcambre and Saucier, 2012).

L'objectif de cette thèse est de poursuivre les recherches sur les flavanols glycosylés présents dans le raisin jusqu'à l'élaboration du vin, et d'établir une relation possible avec leurs compositions tanniques.

Il est à noter que ce manuscrit a été réalisé sous forme de thèse sur publications.

Le premier chapitre de ce manuscrit expose une étude bibliographique détaillant les structures des principaux polyphénols présents dans le raisin et le vin, la biosynthèse des flavonoïdes et finalement, les caractéristiques des flavanols glycosylés dans les plantes. A la fin de cette partie, les problématiques liées à la thèse sont explicitées.

Le second chapitre présente nos travaux portant sur la détection de nouveaux flavanols glycosylés dans le raisin et dans le vin. La publication associée développe une méthode d'identification de ces composés à l'aide de schémas de fragmentations.

Le troisième chapitre traite de l'évolution de la teneur en flavanols glycosylés et en tanins au cours de la maturation du raisin. Trois cépages ont été ciblés pour ces expériences :

le Merlot, la Syrah et le Tannat. Une technique originale de quantification par MRM a été développée afin d'obtenir des évolutions précises.

Le quatrième chapitre présente l'étude de l'évolution de la composition en flavanols glycosylés dans le raisin, au cours de l'élaboration du vin.

Chapitre 1 – Bibliographie

1. LA BAIE DE RAISIN AU COURS DE SA MATURATION

1.1. Morphologie

La baie de raisin est le fruit de la vigne (*Vitis vinifera L.*), plante pérenne dont l'architecture naturelle est la liane, largement cultivée et appartenant à la famille des *Vitaceae*. Après des processus de transformation dont la fermentation, le jus de ce fruit est transformé en vin, breuvage apprécié dans le monde entier. Depuis 50 ans, de nombreuses études se sont penchées sur les caractéristiques et la composition de ce fruit et ont permis l'amélioration organoleptique du vin.

Comme illustré en **Figure 1**, le raisin est composé de trois tissus principaux : la pellicule, la pulpe et les pépins. Ils ont des propriétés et des compositions différentes. Le péricarpe est composé de la pellicule (ou exocarpe), de la pulpe (ou mésocarpe) et de l'endocarpe qui entoure les pépins (Hardie *et al.*, 1996).

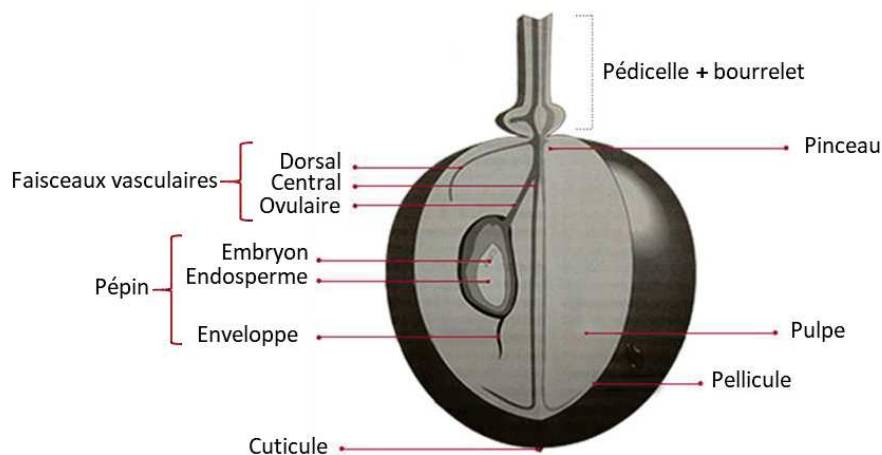


Figure 1 – Schéma de la baie de raisin

D'après (Coombe, 1987)

La pellicule est composée de trois couches successives : la cuticule, qui est un assemblage de molécules lipidiques appelées cires, l'épiderme et l'hypoderme. La surface de la baie possède de nombreux stomates. Les cellules de la pellicule contiennent des vacuoles riches en polyphénols de type non flavonoïdes comme les acides phénols et de type

flavonoïdes, comme les anthocyanes et les flavanols (Sun, *et al.*, 2006), (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006), (Sarni-Manchado and Cheynier, 2006).

La pulpe, constituée de 25 à 30 couches de cellules, représente 90 à 95 % du poids du raisin à maturité. La pression hydrostatique à l'intérieure des baies s'auto-équilibre et est maintenue grâce aux couches à l'extérieur de l'exocarpe (Diakou and Carde, 2001). Les cellules de la pulpe possèdent des vacuoles représentant 99 % de leur volume, composées majoritairement d'une solution aqueuse de sucre, de matières azotées et pectiques, d'acides organiques (malique et tartrique) et de matières minérales (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

Enfin, entourées par l'endocarpe, on retrouve dans les baies de raisin de 1 à 4 pépins. Il existe une relation de proportionnalité entre la taille de la baie et le nombre de pépins (Huglin and Schneider, 1998). A partir de la véraison, ils ont atteint leur maturité physiologique et sont composés de trois parties différentes : un embryon, un albumen qui entoure ce dernier et des téguments protecteurs. Les pépins contiennent essentiellement de l'eau, de la matière glucidique et des lipides. Ils sont aussi composés de tanins, de matière azotée et d'éléments minéraux (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

1.2. Développement

La croissance de la baie, de type double sigmoïde, se caractérise par l'évolution de son poids, de son volume et de sa composition (Coombe, 1976). Ce développement se caractérise par deux étapes évolutives, la phase herbacée et la phase de maturation (Staudt, *et al.*, 1986) séparées par une phase stationnaire (**figure 2**).

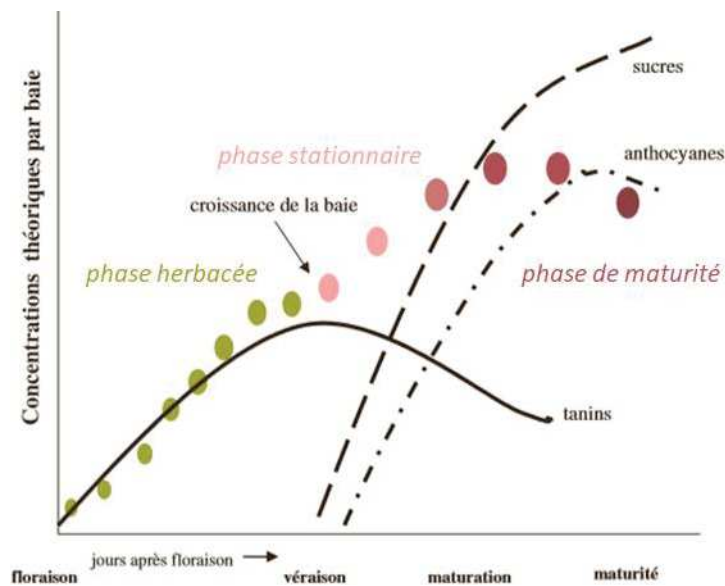


Figure 2 – Courbes théoriques montrant l'évolution de la morphologie de la baie accompagnée des concentrations en sucres, anthocyanes et tanins

D'après (Deloire, 2007)

La phase herbacée constitue la période physiologique végétative du fruit. Elle se traduit par une multiplication cellulaire rapide s'étalant sur 8 à 10 jours qui se subdivise elle-même en deux sous-étapes (Ollat, *et al.*, 2002). Tout d'abord, les ovaires se développent et sont fécondés immédiatement donnant en moyenne, à la fin de cette phase, de 1 à 4 pépins. Les vacuoles des cellules sont très riches en acides organiques (malique et tartrique) qui sont l'osmoticum principal en stade herbacé (Kliewer, 1966). L'activité photosynthétique est en marche. Ensuite, l'étape de nouaison (ovaire de la fleur transformé en fruit) est atteinte ; l'ovaire prend la forme d'une petite baie sphérique. S'en suit un gonflement des baies essentiellement dû au gonflement cellulaire qui s'arrête à peu près 40 à 50 jours après anthèse (floraison). A ce stade, le pH intra vacuolaire des cellules de la pulpe est très faible, de l'ordre de 2,5. Les tanins sont produits dans les pépins et la pellicule du raisin au début du premier stade de développement (Kennedy, *et al.*, 2008), (Kennedy, *et al.*, 2001).

Lors de la phase stationnaire, la croissance ralentit voire s'interrompt pendant environ une quinzaine de jours (durée variable). L'activité photosynthétique diminue. Le point marquant la fin de cette latence et le démarrage de la maturation du fruit se nomme la véraison.

La croissance et l'expansion cellulaire reprennent lors de la phase de maturation ; les baies se gorgent d'eau et de sucre (Huglin and Schneider, 1998). Ces phénomènes de dilatation sont permis grâce aux activités enzymatiques dans les parois cellulaires par la présence d'expansines, de pectines méthylestérase et de pectate lyase (Schlosser, *et al.*, 2008). L'augmentation du volume provoque un effet de dilution de certains composés formés durant la phase herbacée, comme l'acide tartrique et les tanins (Keller, *et al.*, 2006) ; (Downey, *et al.*, 2003a). D'autres servent de sources d'énergie comme l'acide malique métabolisé pendant cette phase de développement (Conde, *et al.*, 2007).

Ces étapes sont de durée variable selon le cépage, l'état hydrique de la plante, les nutriments azotés et le microclimat des grappes (Ollat, *et al.*, 2002).

2. LES POLYPHENOLS DU RAISIN

Les polyphénols sont généralement classés selon leur structure moléculaire en deux familles : les flavonoïdes et les non-flavonoïdes.

2.1. La famille des non-flavonoïdes

La famille des polyphénols non-flavonoïdes comporte des composés de structures moléculaires différentes comme les acides phénols et les dérivés de stilbènes.

Les acides phénoliques retrouvés dans le raisin sont principalement les acides hydroxybenzoïques (AHB) présentant un squelette carboné de type C₆-C₁ et les acides hydroxycinnamiques de type C₆-C₃ (AHC) (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

La **Figure 3.a.** présente la structure des principaux AHB : les acides *para*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, syringique et gallique. L'acide gallique est le précurseur des tanins hydrolysables provenant du bois des barriques et est extrait lors de l'élevage du vin. Sa teneur est comprise entre 10 à 100 mg par 100 g de raisin (matière sèche) selon la variété et le tissu analysé (Yilmaz and Toledo, 2004). Les principales molécules retrouvées dans le raisin sont l'acide gallique et l'acide hydroxybenzoïque ; ils peuvent être sous forme d'hétérosides ou d'esters. Des phénomènes de dégradations de molécules et d'hydrolyses peuvent survenir durant la vinification expliquant une composition majoritaire de formes libres, notamment dans le vin rouge (Chira, *et al.*, 2008).

Néanmoins, les acides prépondérants dans le vin et dans le raisin sont les AHC tels que les acides *para*-coumarique, caféique et férulique dont les structures sont présentées en **figure 3.b.** Ils sont retrouvés principalement en conformation *trans* mais les conformères *cis* existent aussi. L'acide hydroxycinnamique provient de la désamination d'un acide aminé, la phénylalanine, et ses dérivés phénoliques découlent de réactions enzymatiques ou chimiques de type hydroxylation et méthylation. Ils sont généralement stockés sous forme d'esters tartriques et s'accumulent dans la pulpe du raisin. Les esters et acides hydroxycinnamiques sont présents en quantité importante dans le vin blanc (Singleton, *et al.*, 1978) et rouge (Guadalupe and Ayestaran, 2008). Dans le moût blanc, les acides hydroxycinnamiques sont à

l'origine du phénomène de brunissement, du fait de leur forte oxydabilité (Cheynier, *et al.*, 1989) (Cheynier, *et al.*, 1989). D'autres réactivités ont été attribuées aux AHB et AHC comme, par exemple, un rôle de précurseur des acides volatils (Hernanz, *et al.*, 2009).

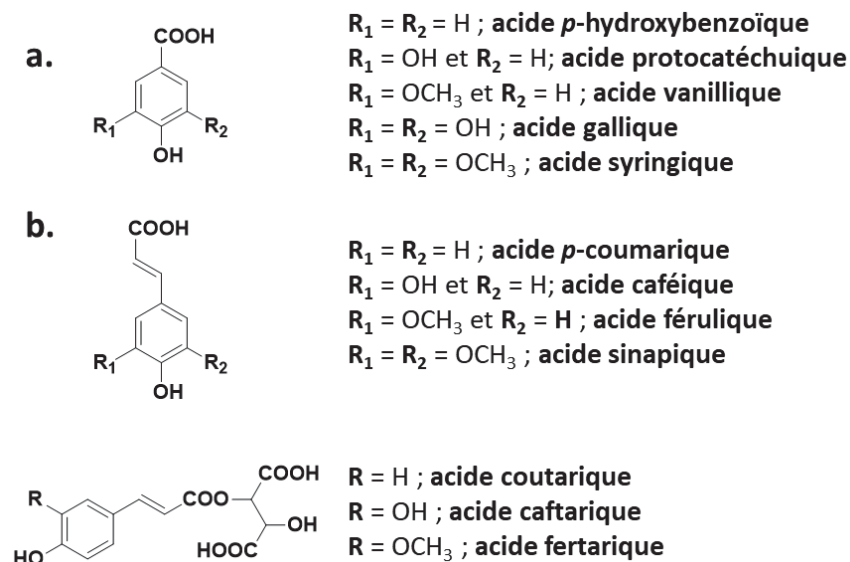


Figure 3 – Structures moléculaires des acides **a.** hydroxybenzoïques et **b.** hydroxy cinnamiques et tartriques

Les stilbènes constituent une autre sous-famille de non flavonoïdes, impactant la qualité du vin et du raisin. Ceux majoritaires dans la pellicule du raisin, la feuille de vigne et le vin sont le resvératrol ou 3,5,4'-trihydroxystilbène ainsi que son dérivé glucosylé, le picéide. Comme illustrées en **figure 4**, les structures moléculaires de ces composés correspondent à 2 cycles aromatiques liés par un pont éthylène, leurs conférant une stabilité chimique. Des travaux (Versari, *et al.*, 2001) ; (Sun, *et al.*, 2006) ont montré que les formes majoritaires dans le raisin sont le *trans*-resvératrol, le *trans*- et le *cis*-picéide, en concentrations variables selon le cépage et les tissus étudiés. Ces trois composés sont surtout accumulés dans la pellicule. Leur biosynthèse est accélérée face à des stress biotiques (pathogènes) et abiotiques (irradiations aux UV) subits par la vigne. Cette production pourrait s'expliquer par le rôle antioxydant protecteur du resvératrol (Baur and Sinclair, 2006).

Par ailleurs, des modifications chimiques interviennent dans la transformation du raisin en vin. En effet, la concentration en *trans*-resvératrol diminue au cours de la

fermentation en rouge tandis que celle de sa forme *cis* augmente. Le *trans*-picéide est retrouvé dans le vin, tandis que le forme *cis* n'est pas détecté (Sun, *et al.*, 2006). Ces résultats laissent supposer qu'il y aurait des isomérisations de ces molécules lors de la vinification. Ainsi, la concentration en stilbènes dans le vin dépend fortement des procédés de vinification, et plus précisément de la macération. C'est pour cette raison que la teneur est plus importante dans le vin rouge que dans le vin blanc (Garrido and Borges, 2013).

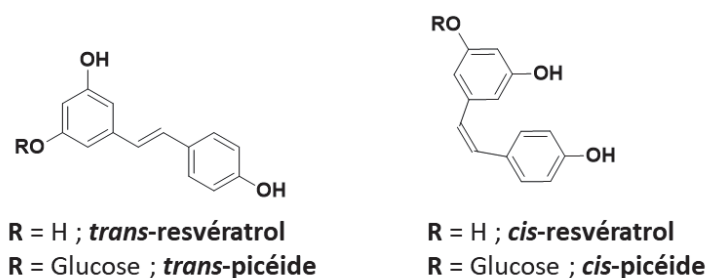


Figure 4 – Structures du resvératrol et son dérivé glucosylé

2.2. La famille des flavonoïdes

Les composés de la famille des flavonoïdes sont caractérisés par une structure de base moléculaire commune de type C₆-C₃-C₆, comportant deux cycle aromatiques, et une chaîne fermée en hétérocycle oxygéné hexagonal (**Figure 5**). Les cycles sont nommés de façon usuelle cycles A, B et C. Le cycle A est souvent substitué par deux groupements hydroxyles en position 5 et 7. Le cycle B est substitué en 4', et souvent en 3', par un groupement hydroxyle. Ce cycle est appelé noyau catéchol. Si ce cycle est substitué en 3', 5' et 4', il s'agit d'un noyau pyrogallol. Enfin, le cycle C est un pyrane comportant fréquemment un hydroxyle sur le carbone 3.

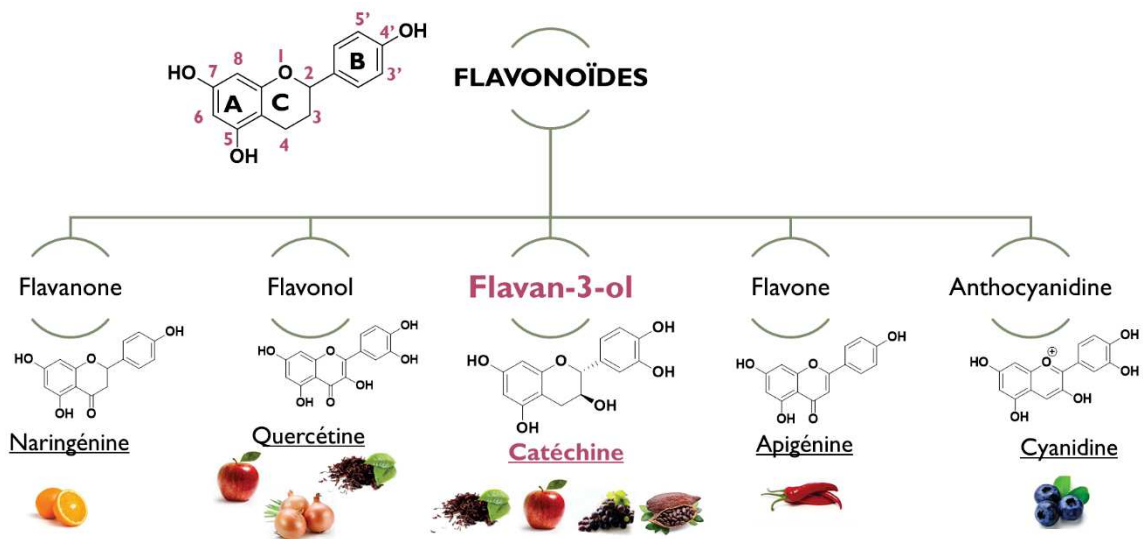


Figure 5 – Les sous-familles de flavonoïdes

Les flavonoïdes comportent plusieurs sous-familles caractérisées par la différence de degré d'oxydation du pyrane central (cycle C) : les flavanones, les flavanols, les flavonols, les flavones et les anthocyanidines. Ces métabolites secondaires sont communément retrouvés dans la nature sous forme de C- ou O-glycosides, ce qui alimente la diversité et la complexité de la famille des flavonoïdes (Cuyckens and Claeys, 2004). C'est par exemple le cas des anthocyanidines dont la nature du sucre (glucose, galactose, rhamnose, xylose ou encore arabinose) lié peut varier d'un composé à l'autre. Les condensations entre molécules, aglycones ou glycosides, sont courantes (Garrido and Borges, 2013).

Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants (Mulero, *et al.*, 2010), et jouent un rôle fondamental dans les aspects organoleptiques du vin et du raisin (Quijada-Morín, *et al.*, 2012). Dans le raisin et le vin, les principaux flavonoïdes représentés sont les flavonols, les flavanols (dont leurs polymères appelés proanthocyanidines), et les anthocyanes. Les sous-parties suivantes détaillent leurs structures et caractéristiques associées.

2.2.1. Les flavonols

La structure moléculaire des flavonols est caractérisée par la double liaison entre les carbones 2 et 3 et par la substitution par un groupement hydroxyle sur le C₃ (**Figure 6**). Ils

jouent un rôle important en œnologie de par leurs propriétés organoleptiques (teintes jaunes pâles recherchées dans les vins blancs et effets de co-pigmentation avec les anthocyanes).

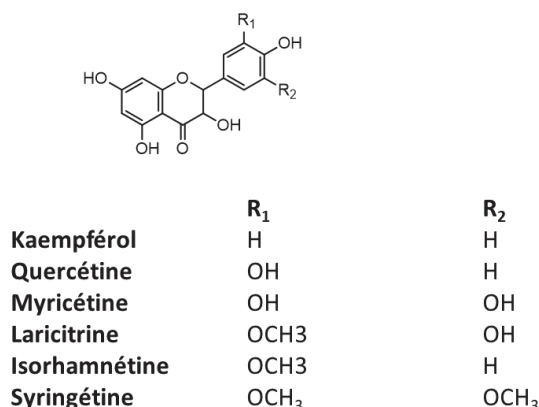


Figure 6 – Les principaux flavonols retrouvés dans le raisin

Concernant leur biosynthèse, on distingue deux pics de biosynthèse durant le développement de la baie de raisin. Le premier a lieu à la floraison tandis que le second se déroule 3 à 4 semaines après véraison, c'est-à-dire, pendant la maturation (Downey, *et al.*, 2003b). Dans le raisin, les formes glycosylées de flavonols sont prépondérantes, les composés principaux étant la quercétine-3-*O*-glucoside et la 3-*O*-glucuronide. Des traces de galactosides sont aussi détectées. La composition en flavonols dépend de la couleur du raisin. Pour le rouge, les formes aglycones (ainsi que leurs dérivés glycosylés) généralement retrouvées sont les suivantes : le kaempférol, la quercétine, l'isorhamnétine, la myricétine, la laricitrine et la syringétine (Mattivi, *et al.*, 2006). Les mêmes molécules ont été détectées dans le vin rouge (Castillo-Muñoz, *et al.*, 2009). Dans les raisins blancs, on retrouve la quercétine, le kaempférol et l'isorhamnétine (Mattivi, *et al.*, 2006).

2.2.2. Les anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments composés de deux groupes de molécules : les anthocyanidines et leurs dérivés glycosylés, les anthocyanes. Comme présenté sur la **Figure 7**, leur principale caractéristique structurale provient de l'oxydation de l'hétérocycle C en flavylum (oxygène cationique). Le cycle B peut aussi présenter diverses hydroxylations et méthylations. La glycosylation des anthocyanidines en anthocyanes induit une meilleure

stabilité à la molécule qui la rend plus soluble. Ils peuvent être composés de mono-, di- ou tri-saccharides. Souvent, les sucres sont acylés par des acides phénols de type acides hydroxycinnamiques, mais aussi par l'acide acétique (Strack and Wray, 1993). Le sucre majoritairement retrouvé dans le raisin est le glucose et le composé majoritaire formé, la malvidine 3-O-glucoside. En effet, elle représente 50 % des anthocyanes présents dans le cépage Sangiovese et jusqu'à 90 % des anthocyanes dans le raisin de type Grenache (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006). La substitution d'un hydroxyle par le sucre se produit généralement sur le C₃ dans le raisin. Physiquement, elle se traduit par un rougissement du pigment (Tanaka, *et al.*, 2008).

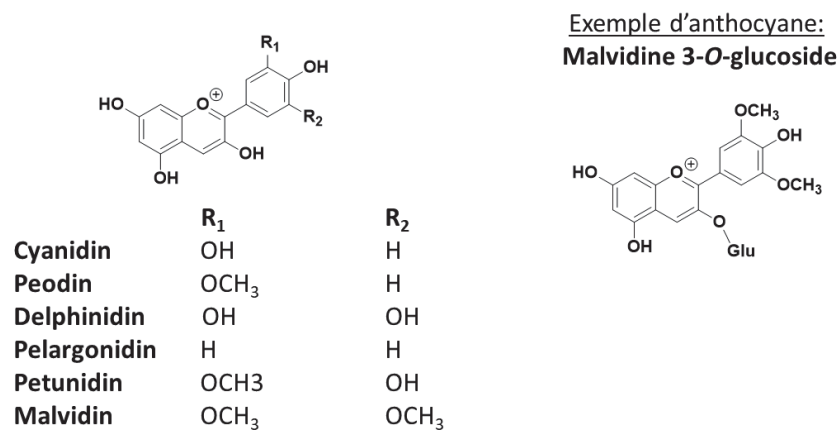


Figure 7 – Les anthocyanidines trouvés dans le raisin et la structure de la malvidine 3-O-glucoside

Les anthocyanes s'accumulent principalement dans la pellicule de la baie pendant la maturation (Jaillard, Deloire *et al.*, 2015) ; (Tanaka, Sasaki *et al.*, 2008).

Les intérêts œnologiques des anthocyanes reposent sur leur pouvoir de pigmentation diversifié : rose, rouge, noir, bleu, mauve et orange. Ils sont extraits durant la macération pré fermentaire et la fermentation alcoolique (FA). Après ces étapes, une diminution en concentration est observée jusqu'au vieillissement en bouteille. Le vin rouge en comporte de 350 à 1500 mg.L⁻¹. Leur pouvoir colorant dépend de facteurs physicochimiques tels que le pH, la concentration en SO₂, leur concentration et leur structure (Mazza and Brouillard, 1990) ; (Chira, *et al.*, 2008) ; (Saucier, 2010). La couleur du raisin et du vin est aussi due à l'interaction

avec d'autres polyphénols comme les acides phénols, les flavonols et les tanins qui peuvent provoquer des changements de couleur vers le violet (effet bathochrome) et une augmentation de l'intensité (effet hyperchrome). Ce phénomène est appelé « effet de copigmentation », qui stabilise la couleur (Brouillard, 1994) ; (Mazza and Brouillard, 1990) ; (Gordillo, *et al.*, 2018).

2.2.3. Les flavan-3-ols

Les flavan-3-ols représentent une sous-famille de polyphénols largement représentée dans le raisin. Les différents monomères se différencient par leur degré d'hydroxylation sur les cycles A et B, la présence d'un acide gallique sur le cycle C ainsi que par la stéréochimie du carbone C3 du cycle B. Le cycle A est hydroxylé en C₅ et C₇, le cycle B est hydroxylé en C_{4'} et parfois en C_{3'} et enfin, le cycle C est un pyrane saturé, hydroxylé en C₃ (**Figure 8**). Les polymères de flavan-3-ols sont aussi largement représentés dans le raisin.

Les monomères de flavanols sont synthétisés durant la phase herbacée dans la pellicule du raisin avec un maximum en concentration atteint avant véraison (Downey, *et al.*, 2003a), (Kennedy, *et al.*, 2001). Dans les pépins, leur teneur est maximale 2 semaines après la véraison (Downey, *et al.*, 2003a), (Bogs, *et al.*, 2005). La biosynthèse des PA se déroule durant les premiers stades de développement (Kennedy, *et al.*, 2001), (Kennedy, *et al.*, 2000).

Les flavan-3-ols monomères les plus abondants dans le raisin sont la (+)-catéchine, l'(-)-épicatéchine, (-)-épigallocatechine et l'(-)-épicatéchine gallate (Lorrain, *et al.*, 2013). La (+)-gallocatechine est retrouvée à l'état de traces (Chamorro, *et al.*, 2012). Enfin, les formes glycosylées de flavanols ont aussi été détectées récemment (Delcambre and Saucier, 2012), (Zerbib, *et al.*, 2018) et seront détaillées dans le partie 2 de ce chapitre.

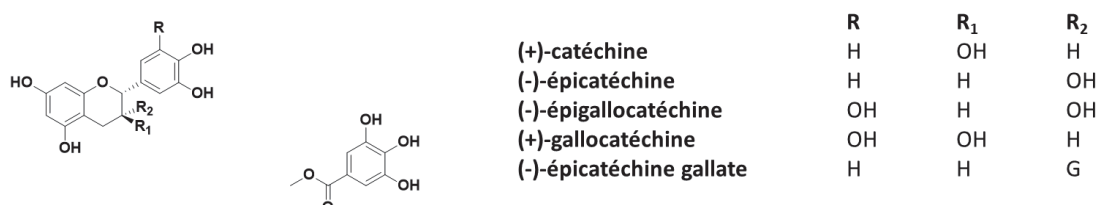


Figure 8 – Les monomères de flavan-3-ols présents dans le raisin

Les formes polymérisées des flavan-3-ols, appelées tanins condensés ou proanthocyanidines (noté PA), sont aussi prédominantes dans le raisin et bien d'autres plantes comme le thé et le cacao (Quideau, *et al.*, 2011). Les dimères et trimères ont largement été décrits dans la littérature. Différents types de tanins condensés sont distingués selon la structure de la molécule. Les polymères de type A sont caractérisés par des liaisons interflavane C₄-C₈ et par des liaisons éther C₂-O-C₇ ou C₂-O-C₅. Ceux de type B comportent des liaisons de type C₄-C₆ et sont largement majoritaires dans la nature. Quelques exemples sont représentés en **Figure 9** (Ribéreau-Gayon, *et al.*, 2006).

Coté œnologie, ils impactent grandement les propriétés organoleptiques du vin. Ils sont en effet responsables de l'astringence et de l'amertume, et favorisent la stabilité du vin. Ils interagissent avec les anthocyanes, augmentant la couleur des vin (Picariello, *et al.*, 2017). Ces composés estérifiés par l'acide gallique (galloylation), la (+)-gallocatéchine gallate et de l'(-)-épicatéchine gallate sont aussi présents dans le raisin. La galloylation modifie les interactions entre protéines et flavan-3-ols et augmenterait ainsi la sensation d'astringence (sécheresse en bouche), et serait également impliquée dans les mécanismes de défense de la vigne (Punyasiri, *et al.*, 2004), (Khater, 2011) ; (Bontpart, 2015).

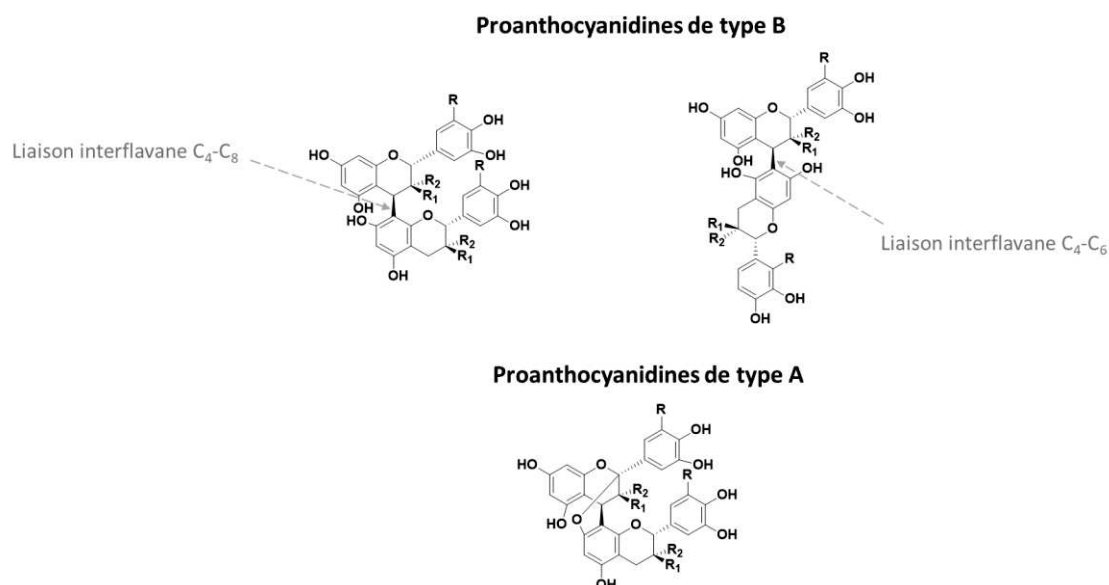


Figure 9 – Structures des dimères de flavan-3-ols de type A et B

Pour R, R₁ et R₂, voir **figure 8**.

La distribution et la concentration en flavanols et en PA sont différentes selon la matrice étudiée (**Tableau 1**). Les pépins sont en général les parties qui en sont les plus riches, leurs concentrations en tanin pouvant s'élever à plusieurs milligrammes par kilogramme. La pellicule, moins concentrée, contient environ une centaine de mg de tanins par kilogramme de pellicule. La pulpe est pauvre en ces composés (Mané, *et al.*, 2007).

Il a été mesuré une concentration de 1165 mg.kg⁻¹ de raisin en monomère de flavanols, (+)-catéchine et (-)-épicatéchine, pour le Pinot Noir, tandis que le Carignan en comporte moins d'une centaine de mg.kg⁻¹ de raisin (Chira, *et al.*, 2008). Dépendant aussi du cépage considéré, les teneurs en PA sont moins intenses dans la Syrah que dans le Mourvèdre et le Cabernet-Sauvignon (Busse-Valverde, *et al.*, 2010). Dans les vins, les concentrations dépendent du cépage et des pratiques œnologiques (macération, température) *et al.*, 2010), (Revilla, *et al.*, 1997).

La nature des monomères dépend elle aussi du tissu biologique étudié. En effet, dans les raisins, la (+) catéchine, l'(-)-épicatéchine, l'(-)-épicatéchine gallate et l'(-)-épigallocatechine sont présentes. Ce dernier composé, au contraire des autres, n'est pas retrouvé dans les pépins et il est présent en faible quantité dans la pulpe de la baie (Di Lecce, *et al.*, 2014). Concernant les tanins, la première différence notable entre pépins et pellicules se fait au niveau des degrés de polymérisation. La mesure caractéristique est le degré de polymérisation moyen, noté DPm. Dans les pépins, les tanins présentent un DPm compris entre 3 et 16 (Prieur, *et al.*, 1994), tandis qu'il se trouve entre 10 et 40 pour la pellicule (Downey, *et al.*, 2003a) ; (Peyrot des Gachons and Kennedy, 2003) même si d'autres valeurs plus élevées (DPm supérieur à 100) ont été trouvées (Monagas, *et al.*, 2003), (Huang, *et al.*, 2012).

Des recherches ont montré que les perceptions de l'amertume et de l'astringence des composés augmentaient avec le degré de polymérisation (Vidal, *et al.*, 2004) et de galloylation (Rinaldi, *et al.*, 2014). Cependant dans le cas du raisin, il a été observé que ce sont les tanins des pépins qui sont plus astringents que ceux des pellicules (Mirabel and Glories, 2000). Ce phénomène est appelé le paradoxe des tanins de raisin (Saucier, 2014). Il a été rapporté que

les PA de pellicules sont bien moins galloylés que ceux des pépins (Cheynier, *et al.*, 1997), ce qui pourrait expliquer en partie ce paradoxe (Rinaldi, *et al.*, 2014).

| | Pulpe | Raisins Pépins (mg/kg) | Pellicules | Vins rouges (mg/L) | Vins blancs (mg/L) |
|------------------|-------------|------------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|
| Catéchine | Traces à 60 | 50 à 1100 | 10 à 70 | 8 à 400 | 1 à 46 |
| Tanins | Traces | 1000 à 6000 | 100 à 500 | 1000 à 4000 | 100 à 300 |

Tableau 1 – Teneurs en (épi) catéchine et tanins retrouvées par kg de tissus du raisin et dans le vin blanc et rouge. D’après (Chira, 2009) ; (Revilla, *et al.*, 1997) ; (Bourzeix, *et al.*, 1986)

En conclusion, les polyphénols, composés majeurs de la baie de raisin, présentent une grande diversité structurale et une répartition hétérogène au sein des différentes structures de la baie. Ils confèrent au raisin et aux produits dérivés tel que le vin, des propriétés spécifiques notamment leur couleur et leur sensation en bouche.

Nous allons dans la partie suivante décrire la voie de biosynthèse des flavanols telle qu’elle est reportée dans la littérature.

3. BIOSYNTHESE DES FLAVANOLS

La biosynthèse des flavanols (monomères et polymères) dans la plante découle d'une succession de réactions catalysées par différentes enzymes du raisin.

3.1. Enzymes impliquées dans les voies de biosynthèses des flavanols et des tanins

La voie de biosynthèse commune aux flavonoïdes est présentée en **figure 10**. La phénylalanine est l'acide aminé source qui subit une cascade de réactions enzymatiques spécifiques à chaque classe de molécules.

Lors d'une première étape, la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) (Koukol and Conn, 1961), la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) (Russell and Conn, 1967) et la 4-coumarate CoA ligase (4CL) (Heller and Forkmann, 1988) agissent successivement afin de former le 4-coumaroyl-CoA et le 3 Malonyl-CoA. A partir de ces composés, la chalcone synthase (CHS) catalyse la formation de dihydroflavonols qui sont à leur tour converties par différentes enzymes. La flavonol synthase (FLS) est à l'origine de la biosynthèse des flavonols et la dihydroflavonol 4-réductase (DFR) catalyse la formation des leucoanthocyanidines (ou flavan-3,4-diols) telles que la leucocyanidine et la leucodelphinidine ; ces deux composés sont convertis en anthocyanidines (aglycone) par l'action de la leucoanthocyanidine dioxygénase (LDOX) (Abrahams, Lee *et al.*, 2003). La leucoanthocyanidine réductase (LAR) et l'anthocyanidine réductase (ANR), découvertes plus récemment, impactent l'accumulation des monomères de flavanols dans la plante. Elles sont impliquées respectivement dans la biosynthèse de la (+)-catéchine, de la (+) gallocatéchine, d'une part, et de l'(-)-épicatéchine et de l'(-)-épigallocatéchine d'autre part (Xie, *et al.*, 2003) ; (Tanner and Kristiansen, 1993).

La LAR et l'ANR sont localisées dans le cytosol de la cellule. La LAR a été purifiée pour la première fois de la légumineuse *Desmodium uncinatum* (Tanner, *et al.*, 2003). La caractérisation fonctionnelle de l'ANR a été élucidée chez un mutant d'*Arabidopsis thaliana*, nommé BAN, l'enzyme est codée par le gène *BANYULS* (Devic, *et al.*, 1999). Elle a ensuite été retrouvée chez *Medicago truncatula* (Xie, *et al.*, 2003).

Le génome de *Vitis vinifera* contient un gène codant pour une ANR et deux gènes pour LAR, nommés *LAR1* et *LAR2*. L'expression *VvANR* associée est maximale au début du stade de développement de la baie de raisin, dans les pépins et la pellicule (Bogs, *et al.*, 2005). Les deux facteurs de transcription *VvLAR1* et *VvLAR2* sont quant à eux exprimés dans les pépins immatures. Aussi, un pic d'expression de *VvLAR2* a été détecté dans la pellicule à véraison (Bogs, *et al.*, 2005).

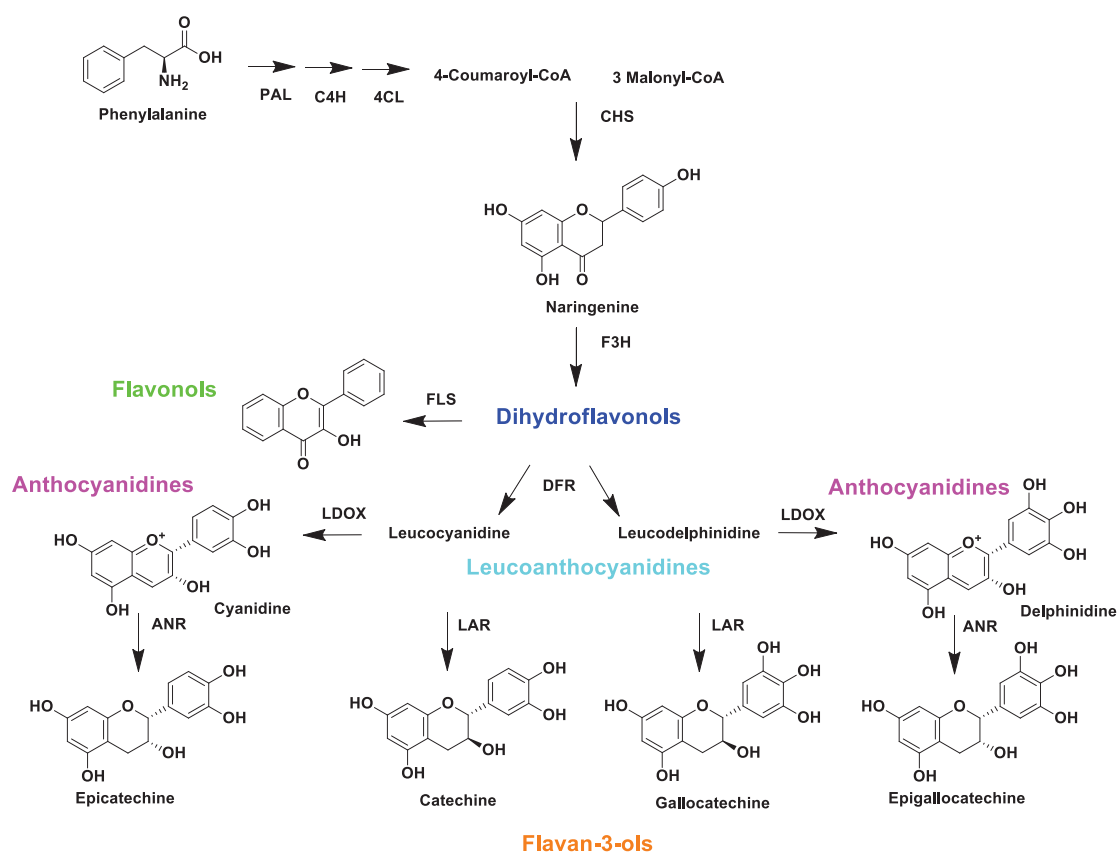


Figure 10 - La biosynthèse des principaux flavonoïdes

D'après (Huang, *et al.*, 2012)

PAL : phénylalanine ammonia-lyase ; C4H : cinnamate 4-hydroxylase ; 4CL : 4-coumarate CoA ligase ; CHS : chalcone synthase ; F3H : flavonone 3-hydroxylase ; DFR : dihydroflavonol 4-réductase ; LDOX : leucoanthocyanidine dioxygénase ; LAR : leucoanthocyanidine réductase ; ANR : anthocyanidine réductase.

3.2. Polymérisation des flavanols et intermédiaires potentiels

L'accumulation des PA dans la pellicule et dans les pépins se déroule avant la véraison, en parallèle de la biosynthèse des unités monomériques (Fujita, *et al.*, 2005). La compréhension de ces mécanismes de polymérisation constitue encore un enjeu de recherche actuelle. En effet, les hypothèses de la nature chimique ou enzymatique (ou des 2 parallèlement) sont retrouvées dans la littérature (Dixon, *et al.*, 2005). Cependant, le même type de mécanisme réactionnel serait mis en jeu, tel que présenté Figure 11. Les flavan-3-ols interviennent comme

nucléophile (C4 ou C8) et réagissent avec un composé électrophile type flavan-3,4-diol formé par l'activité de la dihydroflavonol réductase (DFR), ou avec des dérivés sous forme de carbocation et de quinone méthide.

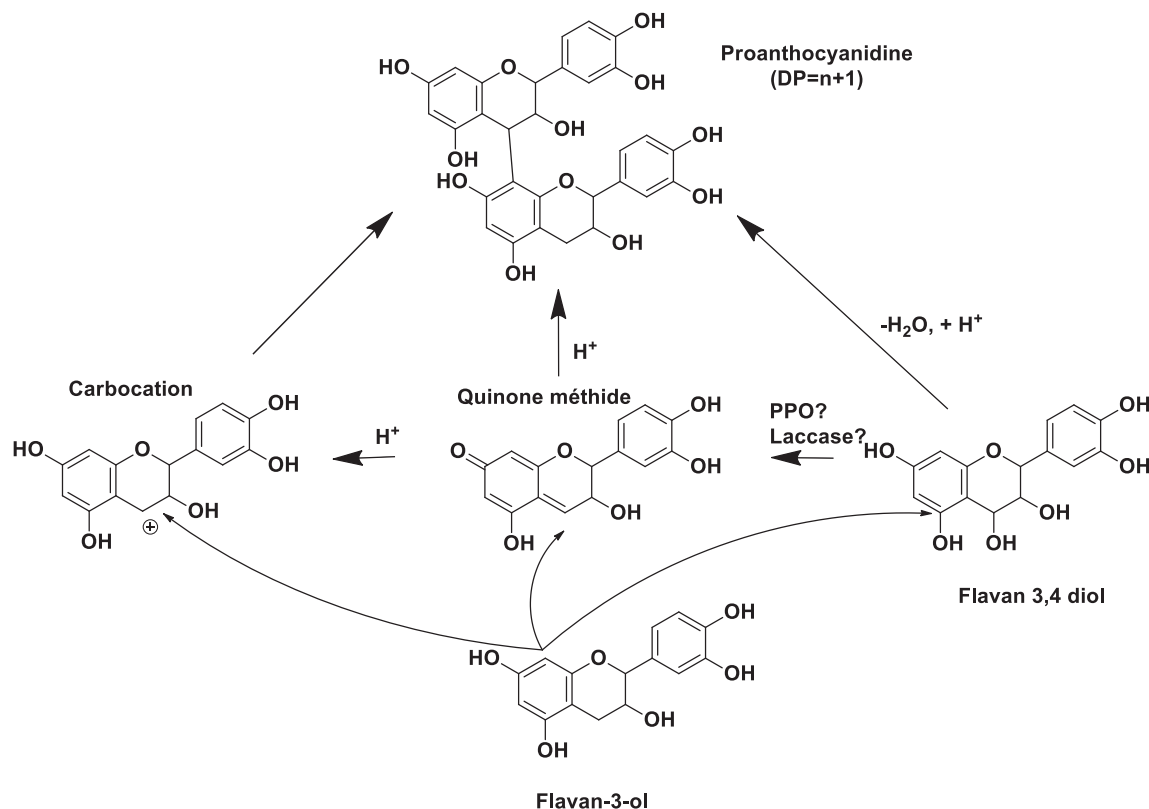


Figure 11 – Proposition de mécanismes de polymérisation des flavan-3-ols en proanthocyanidines

D'après (Terrier, et al., 2009)

Des réactions chimiques faisant intervenir ces précurseurs de PA sont décrites dans la littérature. La condensation *in vitro* de la catéchine ou de l'épicatéchine avec des dérivés de leucocyanidines (flavan-3,4-diols) en est un premier exemple (Creasy and Swain, 1965). Des proanthocyanidines méthylées ont été synthétisées par réaction spontanée de la tétraméthyl-3',4', 5, 7 flavan-3, 4 diol avec la (+)-catéchine dans un milieu acidifié (Geissman and Yoshimura, 1966). Aussi, les flavan-3-ols tels que la (+)-catéchine et l'(-)-épicatéchine réagissent sur des flavan-3,4-diol résultant de la réduction de la (+)-taxifoline (ou 2R,3S dihydroquercétine) formant les dimères de flavanols B3 et B4 (Delcour, et al., 1983).

Par analogie avec la biosynthèse de la lignine, Dixon *et al.* (2005) ont émis l'hypothèse que des enzymes de type polyphénol-oxydases (PPO) et laccases auraient un rôle dans l'activation de flavan-3,4-diols par formation de composés de type quinone méthide (Dixon, *et al.*, 2005) illustré en **Figure 11**. Les carbocations précurseurs pourraient aussi provenir de la rupture par catalyse acide des liaisons interflavaniques des procyanidines ; des réactions d'addition sur ces molécules ont été décrites dans la littérature (Haslam, 1980), et ont aussi été observées en solution modèle de vin (Vidal, *et al.*, 2002). La réaction de tautomérie de la 2R, 3S quinone méthide est à l'origine de la formation de flav-3-èn-3-ols qui se révèlent être un précurseur probable des PA (Hemingway and Laks, 1985).

D'autres molécules ont été étudiées comme intermédiaires potentiels dans la biosynthèse des proanthocyanidines, comme par exemple des composés de la famille des anthocyanidines et de ses dérivés glycosylés, les anthocyanes. Des interactions flavanols - anthocyanes, comme la malvidine 3,5-diglucoside (Bishop and Nagel, 1984) et la malvidine 3-glucoside (Remy-Tanneau, *et al.*, 2003), forment des adduits de flavènes qui se réarrangent en dimère de type A.

Des recherches réalisées par l'équipe de Dixon ont été menées en particulier sur la biosynthèse de l'(-)-épicatéchine dans la plante modèle *Medicago truncatula*. La surexpression de l'enzyme LAR qui est responsable de la formation de la (+)-catéchine (Pang, *et al.*, 2007) s'accompagne d'une augmentation en (-)-épicatéchine (Liu, *et al.*, 2013). La LAR serait capable de convertir la 4 β -(S-cystéinyl)-épicatéchine en épicatéchine régulant ainsi l'unité de base des PA et donc leur degré de polymérisation (Liu, *et al.*, 2016). Pour le moment, ces observations n'ont pas été démontrées pour d'autres plantes.

D'autres précurseurs potentiels de la biosynthèse des procyanidines ont également été étudiés par l'équipe de Dixon (Pang, *et al.*, 2008), et seraient des monomères de flavanols glycosylés. Grâce à l'expression d'une uridine 5'-diphosphate glucosyltransferase α -D-glucose-dépendante (UGT), appelée UGT72L1, l'(-)-épicatéchine formée dans le cytoplasme serait convertie en un intermédiaire glucosylé l'épicatéchine 3'-O- β -glucoside, avant de se polymériser dans la vacuole de la cellule (**Figure 12**). Il a été montré qu'une surexpression de l'UGT72L1, enzyme responsable de la glycosylation de l'épicatéchine chez *Medicago*

truncatula (Pang, Peel *et al.*, 2008), entraîne une accumulation de PA (Pang, *et al.*, 2013), appuyant le possible rôle des intermédiaires glycosylés dans la synthèse de PA. Ces recherches ont permis de montrer que l'épicatéchine 3'-O- β -glucoside, plutôt que sa forme libre, est le substrat préférentiel des transporteurs MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*, localisés sur le tonoplaste) nommés MATE1 chez *M. truncatula* et TT12 chez *A. thaliana*. Ces enzymes sont impliquées dans la biosynthèse des PA (Zhao and Dixon, 2009).

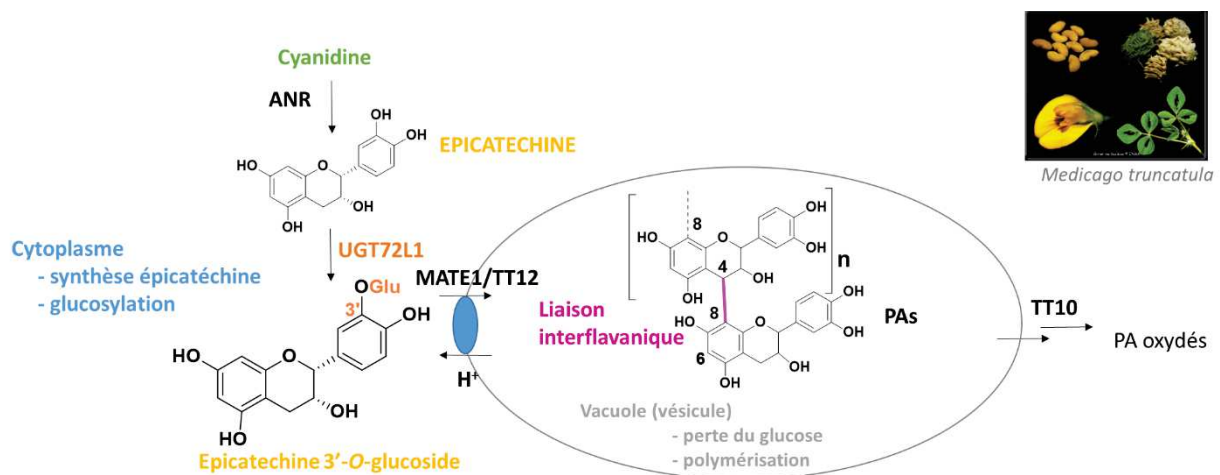


Figure 12 - Rôle possible de l'épicatéchine 3'-O-glucoside dans la biosynthèse des PA par la glucosyltransferase UGT72L1 D'après (Pang, *et al.*, 2013)

Afin d'étayer cette dernière hypothèse, nous avons étudié dans la littérature des travaux attestant de la présence de flavan-3-ols glycosylés dans les plantes.

4. FLAVANOLS GLYCOSYLES DES PLANTES : STRUCTURES, FONCTIONS, SYNTHÈSES MULTIPLES

Les différents polyphénols cités précédemment sont parfois retrouvés sous forme de glycosides. Les anthocyanidines, par exemple, sont plus solubles et plus stables sous forme glycosylée. Dans la nature, des molécules appartenant à la famille des stilbènes ainsi qu'à celle des flavan-3-ols sont aussi retrouvés sous leur forme glycosylée. L'objectif de cette partie est d'effectuer une synthèse des données obtenues sur les flavanols glycosylés découverts dans diverses plantes, en détaillant leurs fonctions, structures et méthodes d'obtention.

4.1. Présence de flavanols glycosylés dans la nature : structure et fonctions

4.1.1. Les flavanols glycosylés dans les plantes

Les glycosides sont des molécules issues de la condensation d'un composé non glucidique, appelé aglycone (ici les flavan-3-ols) et d'un sucre. Les structures moléculaires de ces composés (monomères, dimères, trimères...) peuvent être diverses, selon la nature du sucre, sa position sur la molécule (sur les groupements hydroxyle) et sa stéréochimie. Nous nous intéresserons ici principalement aux formes monomères et dimères de flavanols O-hexosides (glucosides, galactosides...) bien que les flavanols C-glycosides existent aussi (Kashiwada, *et al.*, 1986). La **Figure 13** illustre les dix structures possibles de ces composés.

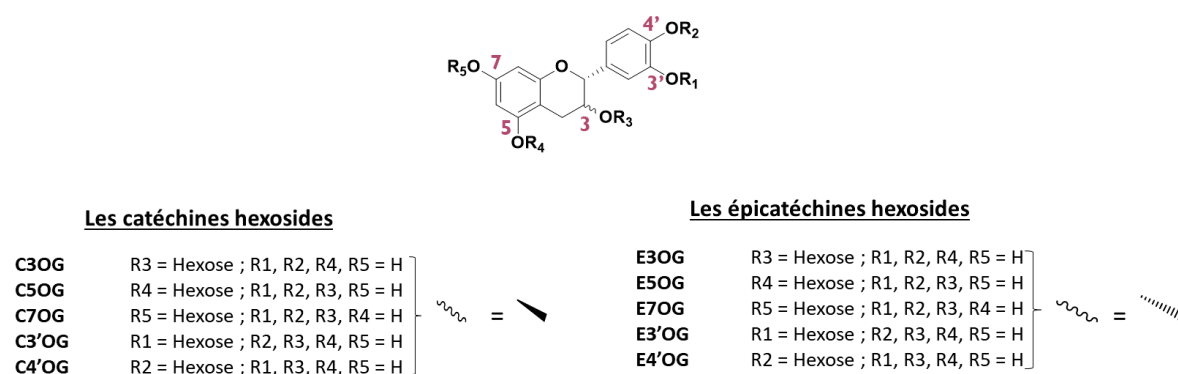


Figure 13 – Les différentes structures d' (épi) catéchine hexosides

La catéchine-7-*O*- β -glucoside est le flavanol glycosylé le plus fréquemment reporté dans la littérature. On le trouve notamment dans l'orme (Kim, *et al.*, 2004), le sarrasin (Smaali, *et al.*, 2007), (Watanabe, 1998), les pépins de niébé (Ojwang, *et al.*, 2013), (Cui, *et al.*, 2012), l'orge et le malt (Friedrich and Galensa, 2002). Les (+)-catéchines 5-*O*-, 7-*O*-, 3'-*O*-, et 4'-*O*- β -glucosides ont été détectées dans la pivoine chinoise (Tanaka, *et al.*, 2000), les catéchines 7-*O*- β - et 4'-*O*- β -glucosides dans les écorces de sapin de Douglas (Foo and Karchesy, 1989), les (+)-catéchine 5-*O*- β -glucoside et (-)-catéchine 7-*O*- β -glucoside dans la rhubarbe (Nonaka, *et al.*, 1983), (Kashiwada, *et al.*, 1986), dans les écorces de Rhamphiolépis du Japon (Nonaka, *et al.*, 1983) et de bouleau (Lee, *et al.*, 1992). La catéchine 3-*O*- β -*D*-glucoside est aussi un composé naturel retrouvé dans les écorces de chêne du Maryland (Pan and Lundgren, 1996). Des stéréoisomères tels que l'épicatéchine 7-*O*- β -*D*-glucopyranoside ont été détectés dans les écorces de sapin de Douglas (Foo and Karchesy, 1989) et, comme énoncé dans la partie biosynthèse, l'épicatéchine 3'-*O*- β -glucoside a été identifiée chez *M. truncatula* (Zhao and Dixon, 2009).

Finalement, 14 isomères de flavanols glycosylés ont été partiellement identifiés dans les pépins de raisin à maturité et le vin de Merlot (Delcambre and Saucier, 2012). Ils n'ont pas été trouvés dans la pellicule de raisin à maturité. Il s'agit de dérivés hexosylés de la (+)-catéchine, l'(-)-épicatéchine, l'(-)-épigallocatechine et l'(-)-épicatéchine gallate. La méthode d'analyse a été développée en HPLC-ESI-Q-TOF ce qui a permis de lister les fragments MS2 caractéristiques de ces composés. L'identification des analogues de flavanols glycosylés a été réalisée, cependant, la caractérisation exacte de leur structure avec notamment la position du sucre n'a pu être possible. En effet, deux isomères distincts peuvent se fragmenter de la même façon et des études complémentaires par RMN seraient nécessaires pour étudier les structures de ces composés.

Les flavanols glycosylés peuvent aussi se retrouver sous forme de dimères. De par les différentes positions du sucre et la stéréochimie des carbones asymétriques, les structures possibles d'isomères sont nombreuses. On distinguera les isomères selon 5 positions du sucre : sur l'unité du haut cycle A, sur l'unité du haut cycle B, sur l'unité du bas cycle A, sur l'unité du bas cycle B et en substitution de l'hydroxyle en position 3 (**Figure 14**).

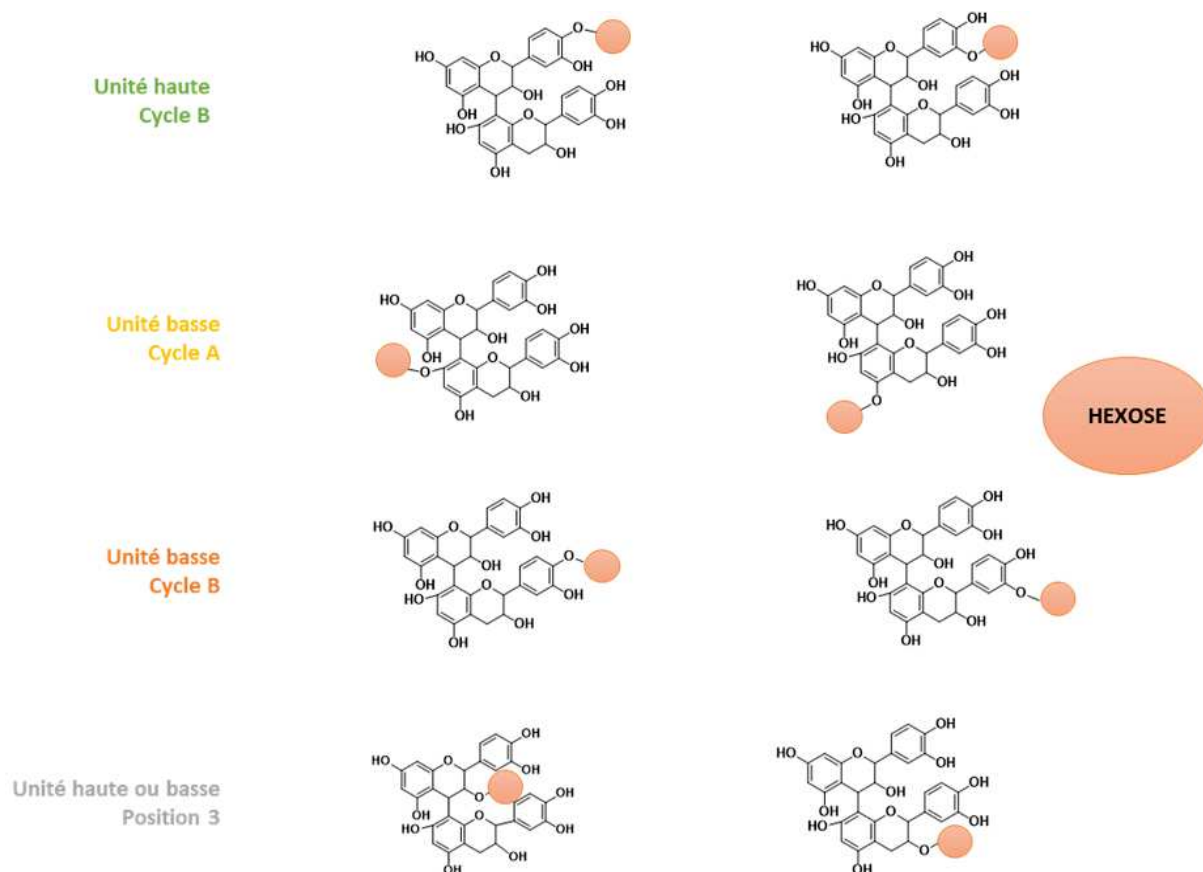


Figure 14 – Structures de dimères de flavanols glycosylés en fonction des différentes positions de l'hexose

Peu de dimères de flavanols hexosylés ont été décrits dans la littérature : la 3-O- β -catéchine-(4 α 8)-catéchine-D-glucoside comportant un glucose positionné sur l'unité du haut du dimère a été identifiée dans le bois de blackjack (Bae, *et al.*, 1994).

4.1.2. Fonctions et propriétés

Les polyphénols sous formes glycosylées présentent des propriétés intéressantes comme une meilleure stabilité dans des milieux complexes (estomac, vin), et de par leur structure, une meilleure biodisponibilité. Un exemple classique de polyphénol glycosylé est la quercétine glycoside, (flavonol glycosylé) retrouvée chez les plantes et qui constitue un antioxydant puissant (Kampkötter, *et al.*, 2008). Cette molécule est plus stable et assimilable par l'organisme que sa forme aglycone (Manach, *et al.*, 2005).

Les flavan-3-ols représentent un groupe de composés bioactifs ayant des propriétés bénéfiques sur la santé (Kuhnle, 2018), (Aron and Kennedy, 2008). Ces composés sont généralement assimilés dans le plasma lorsqu'ils sont conjugués à des groupements méthyl, glucuronate ou sulfate (Manach and Donovan, 2004). La catéchine, quant à elle, est très rapidement éliminée. De ces faits, et par analogie avec la quercétine, il est possible que les flavanols glycosylés soient plus stables et permettent une libération de l'aglycone sous une forme assimilable. Une étude *in vivo* sur des rats a ainsi montré la forte déglycosylation des catéchines C3'OG et C5OG dans leur intestin, et que la C3'OG montre une bonne capacité d'absorption par l'organisme (Raab, Barron *et al.*, 2010). Il a aussi été prouvé que les groupements glycosyles permettent d'améliorer la stabilité et la biodisponibilité des flavanols dans des milieux biologiques (Kitao, *et al.*, 1993).

La compréhension des fonctions de ces flavanols glycosides dans le métabolisme des plantes reste à ce jour encore partielle. Précédemment dans la partie 3.2., leur rôle potentiel dans le transport des unités de PA vers la vacuole (lieu de stockage) et/ou dans leur mécanisme de polymérisation a été évoqué. Au travers de ses travaux, Dixon *et al.* ont tenté de découvrir la (ou les) nature(s) des intermédiaires impliqués dans la polymérisation des flavanols. Au sein de la cellule végétale de ces plantes, la présence d'un sucre permet le transfert des flavanols du cytoplasme vers la vacuole *via* les transporteurs de type MATE : TT12 chez *A. thaliana* (Marinova, *et al.*, 2007), (Debeaujon, *et al.*, 2001) et MATE1 chez *M. truncatula* (Zhao and Dixon, 2009). Il a ainsi été montré chez *M. truncatula* et *A. thaliana* que les flavanols glycosylés, et en particulier l'épicatéchine 3'-O-glucoside, seraient de bons candidats comme précurseurs des proanthocyanidines. A ce jour, les mécanismes

biochimiques de glycosylation de l'épicatéchine sont inconnus. L'épicatéchine et les dérivés de polymères n'ont pas été détectés dans la vacuole des pépins d'*A. thaliana* (Kerhoas, *et al.*, 2006) suggérant la présence de glycosidases dans la vacuole.

4.2. Obtention de standards de flavanols glycosylés

Une compréhension plus aboutie des fonctions et propriétés des flavanols glycosylés passe par l'analyse de ces composés. Pour cela, il est nécessaire d'avoir des standards de référence permettant leur suivi, leur identification et leur quantification. Les stratégies d'obtention sont multiples : synthèse par voies enzymatique. La purification de ces composés sur plante n'est pas abordée ici due à l'absence de bibliographie sur le sujet. Cependant, elle a constitué une stratégie considérable lorsqu'ils ont été détectés. Cette partie détaille les résultats des recherches liées à ces méthodes, ainsi que leurs avantages et inconvénients.

4.2.1. Hémisynthèse par voie enzymatique

La première voie de synthèse présentée est l'hémisynthèse enzymatique, c'est-à-dire, la synthèse de composés chimiques à partir de molécules issues de substances naturelles constitutives en partie de la structure du produit souhaité et permise par la catalyse de protéines appelées enzymes. En chimie, elles sont utilisées pour former des produits de façon rapide et efficace. Les avantages de ce type de réactions résident dans le fait qu'elles sont rapides avec généralement de bons rendements en une étape. Les inconvénients sont que ces enzymes sont spécifiques et que peu d'enzymes sont disponibles dans le commerce ou via des collègues (purifiées ou produites par voie hétérologue). Le choix est donc limité. L'optimisation des conditions réactionnelles se révèle également être un processus long.

Les hémisynthèses enzymatiques étudiées reposent sur l'utilisation de flavanols (extraits de plantes) et d'enzymes de deux types : des glycosyltransférases (GTs) permettant de glycosyler des molécules. Il en existe de nombreuses qui sont actives sur les composés phénoliques en général comme les flavonols (Ono, *et al.*, 2010) ou les anthocyanidines (Ford, *et al.*, 1998). La seconde enzyme est la glucosidase, dont la fonction initiale est de couper la liaison entre une molécule et son sucre mais que l'on peut utiliser en mode inversé.

Les travaux de l'équipe de Williamson *et al.* (2010) ont permis la préparation de quelques isomères de catéchines mono glucosylés (Raab, *et al.*, 2010). Les enzymes utilisées proviennent d'extraits de lentilles et d'orge possédant des activités glucosyltransferase. L'enveloppe des lentilles comporte en effet une fraction phénolique riche en C3OG (Dueñas, *et al.*, 2003). Les extraits enzymatiques sont obtenus par purification des graines d'orge et de lentilles. Les extraits enzymatiques concentrés de lentilles et d'orge sont ensuite mis en contact avec de la catéchine, de l'UDP-Glucose (Uridine diphosphate), un donneur de glucose. Les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 2**. La C7OG a été purifiée après réaction avec de l'extrait enzymatique d'orge (Friedrich and Galensa, 2002). Les enzymes contenues dans les extraits de lentilles ont été utilisées pour la glucosylation de la catéchine en position 3' et 4'. Des analyses RMN type NOESY, ont permis d'identifier la C3'OG et la C4'OG comme produits formés. La caractérisation structurale de ces molécules a été vérifiée par UPLC-MS/MS et ¹³C- et ¹H-RMN (Raab, *et al.*, 2010), (Friedrich and Galensa, 2002). Ainsi, les extraits enzymatiques d'orge et de lentilles testés présentent une activité glucosyltransferase intéressante.

Une autre voie enzymatique est décrite dans la littérature utilisant une glucosyltransferase, l'UGT72L1, exprimée dans l'enveloppe des graines de la plante *Medicago truncatula*. L'ADNc correspondant à l'ARNm codant pour cette protéine a été cloné dans un vecteur permettant la production de cette enzyme dans *E. coli* en tant que une protéine de fusion avec la protéine MBP (Maltose Binding Protein), ayant la propriété de se lier au maltose. Les analyses ont montré que l'enzyme recombinante UGT72L1-MBP avait une forte activité de glucosylation de l'(-)-épicatéchine, avec l'UDP-Glucose comme donneur de sucre, une activité satisfaisante pour l'(-)-épigallocatechine et une faible activité pour la (+)-catéchine et la cyanidine. Les tests avec les proanthocyanidines B1 et B2 n'ont présenté aucune activité. Finalement, l'E3'OG a pu être formée à partir de l'(-)-épicatéchine ; les données RMN sont accessibles en informations supplémentaires de la publication (Pang, *et al.*, 2008).

L'équipe de M. Nidetzky de Graz en Autriche participant au projet européen SuSy (*Sucrose Synthase as Effective Mediator of Glycosylation*) a mis en évidence l'activité d'une glucosyltransférase, l'UGT71A15, provenant de la pomme, sur des flavonoïdes (Lepak, *et al.*,

2015). La glucosylation est effective sur les phénols des stilbènes et du picéide en présence d'UDP-Glucose, avec des rendements allant jusqu'à 90 % de conversion. Des essais préliminaires non publiés ont montré que l'enzyme est active en présence de flavanol (épicatéchine). Cette étude visait à améliorer la solubilité du resvératrol et de son dérivé glycosylé dans l'eau. Les résultats obtenus montrent que l'ajout d'un glucose sur le resvératrol permet d'augmenter modérément la solubilité de ce dernier, et qu'une double glucosylation sur la molécule augmente considérablement sa solubilité dans l'eau.

Finalement, une voie de synthèse de glucosides, distincte des deux premières, peut être possible par réaction de glucosidase inverse. L'enzyme de type glucosidase a pour rôle de lyser les liaisons entre un glucose et son aglycone ; cette réaction permettant l'obtention de ce dernier, schématisée **Figure 15**. Cependant, l'enzyme est réversible, sous certaines conditions physicochimiques afin d'éliminer les compétitions avec son activité d'hydrolyse. Pour cela, il est nécessaire que le milieu réactionnel contienne peu d'eau et du glucose en excès (Krisch, *et al.*, 2010). Une étude (Vic, *et al.*, 1994) a permis de découvrir des glycosylations fonctionnelles par hydrolyse inverse.

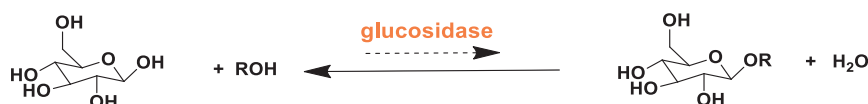


Figure 15 – Réaction de transglucosylation par une enzyme de type glucosidase.

La réactivité de différents alcools (substrats) avec le D-glucose a été testée en présence de β -D-glucosidase d'amande dans un mélange acétonitrile/eau (9:1, v:v). La réaction est régiosélective et stéréosélective. Les résultats d'activité ont montré que l'enzyme avait une forte affinité pour les molécules portant un groupement phényle, comme les alcools hydroxybenzyliques et les alcools phényléthyliques avec des rendements de 5 à 10 %.

| METHODES | SUBSTRATS | | COMPOSES OBTENUS | REF. |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------|---|--------------|
| | OU | DONNEUR SUCRE | | |
| | MATIERE PREMIERES | | | |
| Enzymatiques | | | | |
| ➤ Extraits lentilles | (+)-catéchine | UDP-Glucose | C3'OG - C4'OG | ¹ |
| ➤ Extraits orge | | | | |
| ➤ UGT72L1 | (+)-catéchine | Idem | C7OG | ¹ |
| (<i>Medicago truncatula</i>) | (-)-épicatechine | Idem | E3'OG | ² |
| ➤ UGT71A15 (pomme) | Resvératrol | Idem | Resv <i>O</i> - β -glucoside | ³ |
| | Picéide | | Resv 3,5- <i>O</i> - β -diglucoside | |
| ➤ B-glucosidase (amande) | | idem | | |
| | Phényl/benzyl alcool | | Phényl/benzyl <i>O</i> - β -glucoside | ⁴ |
| Chimiques | | | | |
| ➤ En trois étapes | (+)-catéchine | Glucose activé (9) | C3OG | ¹ |
| ➤ En quatre étapes | (+)-catéchine | idem | C5OG - C3'OG | |
| Purification | | | | |
| | Pépins Merlot | - | Epicatechines, catéchines glycosides | ⁵ |
| | Vin Merlot | - | | |

¹ (Raab, *et al.*, 2010); ² (Pang, *et al.*, 2008); ³ (Lepak, *et al.*, 2015); ⁴ (Vic, *et al.*, 1994); ⁵ (Delcambre and Saucier, 2012)

Tableau 2 – Stratégies d'obtention de composés glycosylés

4.2.2. Hémisynthèse par voie chimique

Une autre voie possible pour la formation de flavanol glycosylés est la synthèse organique en partant de flavanols commerciaux notifiée dans le **Tableau 2**. Raab *et al.* (2010) rapportent également deux stratégies de synthèses chimiques alternatives des (+)-catéchines *O*- β -glycosides suivantes : les C3'OG, C5OG et C3OG.

La première étape commune aux deux voies de synthèse consiste en la formation d'un glucose activé ; elle est présentée ci-dessous en **Figure 16**. Lors de cette étape, l'imine **1** est formée par réaction entre l'acide trifluoroacétique et l'aniline. Ensuite, le glucose subit une acétalisation sélective et est mis en contact avec le produit **1** pour obtenir le produit **2**.

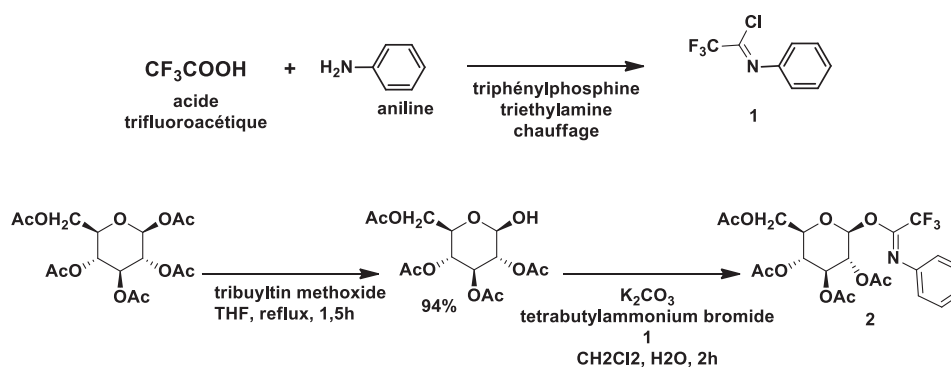


Figure 16 – Préparation du glucose activé pour la glucosylation

D'après (Raab, et al., 2010)

La première voie en quatre étapes consiste en l'acétalisation totale de la catéchine par la pyridine en présence d'anhydride acétique. Ceci a été possible par l'utilisation de l'imidazole et du thiophénol (**Figure 17**). Cette méthode n'est pas sélective en déprotégeant aléatoirement les hydroxyles en positions 5, 3' et 4'. Dans une troisième étape, le glucose activé **2** est mis en contact avec le milieu réactionnel et se lie au groupement hydroxyle libre. Les déprotections de la catéchine et du glucose sont ensuite réalisées en milieu basique. La C3'OG et la C5OG sont obtenues avec un rendement respectif de 67 % et 21 %.

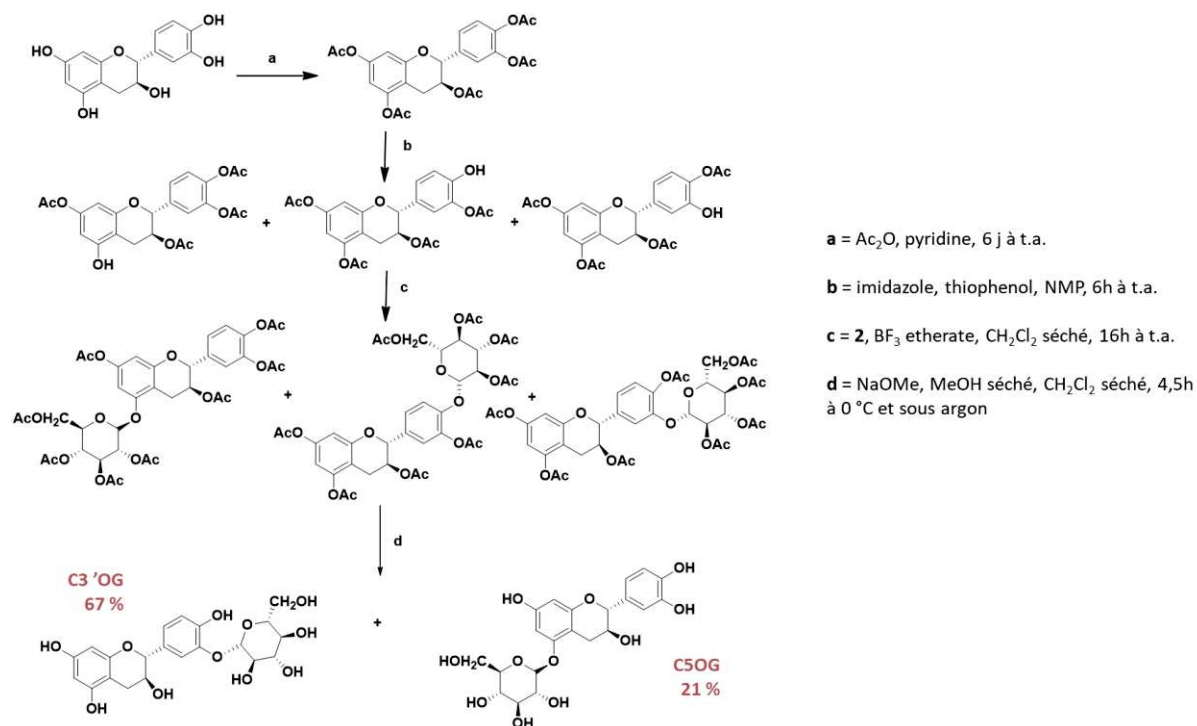


Figure 17 - Première voie d'hémisynthèse chimique de la C3'OG et de la C5OG

D'après (Raab, et al., 2010)

La seconde stratégie (en trois étapes), décrite sur la **Figure 18**, débute par l'acétalisation de la catéchine avec le chlorure d'acétyle en présence de triacétylamine. Ici, l'objectif est de protéger tous les hydroxyles des noyaux phénols et d'avoir seulement le groupement hydroxyle de l'hétérocycle libre pour permettre une glycosylation unique et sélective. Le glucose activé **2** réagit ensuite avec l'hydroxyle libre en position 3 de la catéchine acétylée, suivi par la glycosylation en présence de **9**, BF₃ et d'éthérate, et finalisé par une déprotection en milieu basique.

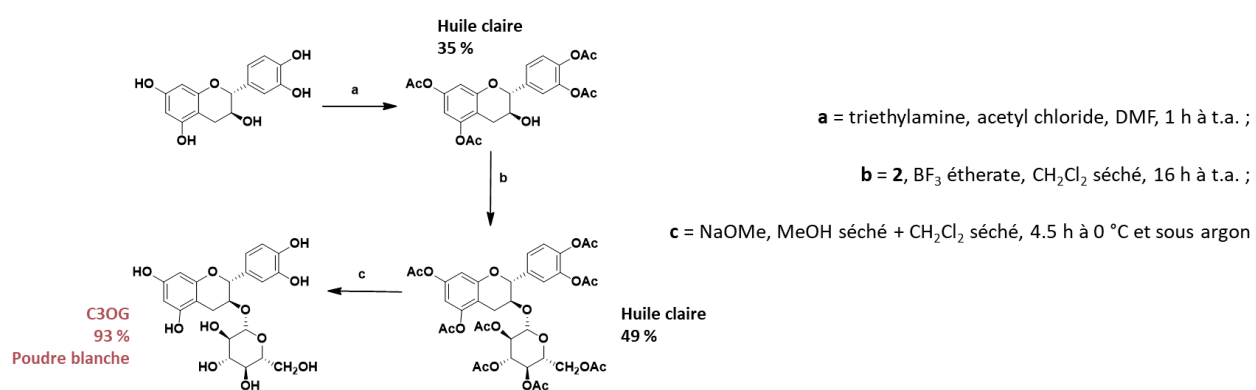


Figure 18 – Seconde voie d'hémisynthèse chimique de la C3OG.

D'après (Raab, et al., 2010)

5. PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS GLOBAUX DE LA THESE

Cette étude bibliographique a permis d'effectuer un état des lieux des connaissances sur les polyphénols, et en particulier, sur les flavan-3-ols (monomères et polymères) ; au niveau de leur structure, leur biosynthèse et leur évolution au cours de la maturation du raisin. Nous avons pu comprendre que des étapes clés dans la polymérisation de ces composés n'ont actuellement pas été élucidées. La dernière partie s'est focalisée sur les flavan-3-ols glycosylés, leurs structures, leurs propriétés et leur potentiel rôle en tant que précurseurs de PA.

En effet, de nombreuses problématiques, énumérées ci-après, gravitent autour de ces molécules. Les objectifs de ce mémoire de thèse visent à répondre aux questions suivantes:

Les monomères et oligomères de flavanols sont-ils présents dans différents cépages (raisins et vin) ? Y-a-t-il un effet cépages et tissus ?

Combien d'isomères sont présents ?

Quelles sont leurs évolutions au cours de la maturation du raisin et de la vinification ?

*Chapitre 2 – Flavan-3-ols glycosylés
présents dans le raisin et dans le vin*

Les premiers objectifs de ces travaux ont été d'étudier les principaux flavan-3-ols glycosylés présents dans le raisin et dans le vin. Pour cela, il a été nécessaire d'établir des voies d'obtention de ces composés. Deux stratégies ont été principalement testées lors de nos travaux : l'extraction suivie de la purification à partir de raisin et de vin et l'hémisynthèse enzymatique. La voie de synthèse chimique n'a pas été abordée par manque de temps. Nous présenterons dans ce chapitre deux des méthodes abordées dans nos recherches :

- Une voie d'obtention de dimère de flavanol glycosylé par extractions/purification, par extraction liquide-liquide et solide-liquide (disque SDB, polymère de styrène divinyl benzène)
- Une voie d'obtention d'un monomère de flavanol glycosylé par hémisynthèse enzymatique avec deux enzymes différentes.

Notre premier article ***New flavanol O-glycosides in grape and wine*** publié dans le journal *Food Chemistry* est présenté en fin de ce chapitre. Ces travaux ont permis la détection de nouveaux composés de flavanols glycosylés et l'identification d'un monomère d'(+)-catéchine glucosylé dans le vin et dans le raisin.

1. EXTRACTION ET PURIFICATION DES FLAVANOLS GLYCOSYLES SUR VIN ISSU DE CEPAGE TANNAT

1.2. Matériels et méthodes

1.2.1. Préparation des échantillons

Un échantillon de vin monocépage Tannat a été obtenu dans la région de Madiran. Le Tannat est un cépage connu pour sa forte concentration en polyphénols (et en particulier en flavan-3-ols) (Boido, *et al.*, 2011).

Dans un premier temps, 5 litres de vin ont été concentrés en évaporant l'alcool à l'évaporateur rotatif jusqu'à obtenir 2.5 L de liquide. La résine SP411 (m = 2 kg), adsorbant spécifiquement les polyphénols, est lavée par trois fois 2 L d'eau et est séchée sur Büchner. Une fois récupérée, elle est additionnée au fur et à mesure au 2.5 L de vin concentré pour une phase d'adsorption de 15 minutes. La résine est rincée par 3 fois 1 L l'eau déionisée puis est transféré sur Büchner afin d'effectuer une seconde étape de lavage par trois fois 1L. La fraction phénolique est ensuite récupérée avec de trois fois 1 L d'éthanol à 100 %. L'éluant est récupéré et son solvant évaporé à l'évaporateur rotatif. 10 g de poudre d'extrait de vin de Tannat riche en polyphénols sont ensuite obtenus par lyophilisation. Le lyophilisat récupéré est de couleur violacée, traduisant la présence d'anthocyanes. Les étapes de purification suivantes ont eu pour objectif d'obtenir des fractions riches en flavanols glycosylés.

1.2.2. Méthode de purification par extraction liquide-liquide

La première purification réalisée sur la poudre de Tannat a été l'extraction liquide-liquide. 200 mg de poudre sont resuspendus dans 20 mL d'eau distillée saturée en NaCl. Deux étapes d'extraction sont ensuite réalisées avec 3 x 200 mL d'éther suivi de 3 x 200 mL d'acétate d'éthyle. Les fractions de chaque solvant rassemblées sont ensuite évaporées et lyophilisées.

1.2.3. Méthode de purification sur disque de SDB

Un système de fractionnement liquide-solide sur disque de styrène divinyl benzène (SDB) a été choisi pour la seconde méthode de purification.

Tout d'abord, il est nécessaire d'activer les disques selon le mode d'emploi préconisé par le fournisseur. Pour cette étape, un montage Büchner avec pompe à vide est monté comportant le disque. Celui-ci est tout d'abord lavé avec 10 mL d'acétone, et séché, puis avec 10 mL d'isopropanol et séché à nouveau. Ensuite, 10 mL de MeOH sont ajoutés et le vide est fait afin d'en laisser passer 1 mL. Après 30 s, le disque est de nouveau séché. Il est lavé une dernière fois avec 10 mL d'eau distillée. Le disque est désormais prêt à emploi.

200 mg d'extrait de polyphénols provenant du vin Tannat sont dissouts dans 25 mL d'eau distillée et sont déposés sur le disque. On effectue le vide afin d'adsorber les polyphénols sur le SDB. Trois fractions successives sont ensuite obtenues avec les solvants suivants. A chaque solvant, le vide est appliqué afin de sécher le disque

- 200 mL d'eau distillée

- 200 mL d'éther

- 200 mL d'un mélange acétone/eau (70/30 : v/v). Cette étape permet de plus, de régénérer le disque.

Chaque filtrat est évaporé, congelé et lyophilisé.

1.2.5. Purification sur gel 40S

La purification a été réalisée à partir de la totalité de la fraction lyophilisée éther provenant de la méthode de purification sur disque SDB. L'échantillon (201 mg) est repris dans 20 mL d'eau distillée. Une colonne contenant du gel TOYOPEARL® HW-40S a été utilisée pour le fractionnement. La hauteur du gel est de 11,5 cm et le diamètre de la colonne de 4,5 cm. Le système est soumis à une pression sous azote d'un débit de 2,5 mL par minute. L'éluant utilisé est un mélange éthanol/eau (8/2 : v/v), et le lavage du gel est effectué avec un mélange acétone/eau (8/2 : v/v).

1.2.6. Chromatographie semi-préparative

L'appareil utilisé a été une HPLC semi préparative de type 940 LC Varian associée avec un détecteur UV. La séparation a été effectuée grâce à une colonne Microsorb C18 100-3, 100*21,4 mm (L*ID), Dynamax Agilent à une température de 35 °C. La phase mobile binaire comprenait un solvant A d'eau déionisée avec 1 % d'acide acétique et un solvant B d'un mélange acétonitrile/eau/acide acétique (80/19/1 : v/v/v). Le temps d'acquisition a été de 14 min selon le gradient suivant : 0–9 min, 16 % B; 10–11 min, 22 % B; 12–13 min, 80 % B; 13–14 min, 16 % B. Le débit a été fixé à 10 mL.min⁻¹.

1.2.7. UPLC-DAD-ESI-IT-MS

Les échantillons ont été analysés par UPLC-ESI-MS. La méthode de chromatographie UPLC ainsi que celle de détection en spectrométrie de masse sont décrites dans la partie *Materials and Methods* de la publication **New flavanol O-glycosides in grape and wine** en fin de ce chapitre. Comme dans l'article, nous avons ciblé en masse les monomères (m/z 451) et les dimères (m/z 739) de flavanols glycosylés. Les fragments permettant l'identification des deux premières familles sont résumés dans la publication en fin de ce chapitre.

1.3. Résultats et discussions

1.3.1. Composition en flavanols glycosylés des fractions de l'extraction liquide et celle sur disque SDB

Deux méthodes de purification des flavanols glycosylés sont comparées : par extraction liquide-liquide et par disque SDB. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 19**. Les différentes barres des histogrammes représentent les intensités relatives de chaque isomère. Ces intensités ont été extraites des EIC ou *Extract Ion Chromatogram*, issus des masses des ions spécifiques des monomères d' (épi) catéchine glycosylés (m/z 451, barres violettes) et des dimères d' (épi) catéchine glycosylés (m/z 739, barres bleues) dans les fractions analysées.

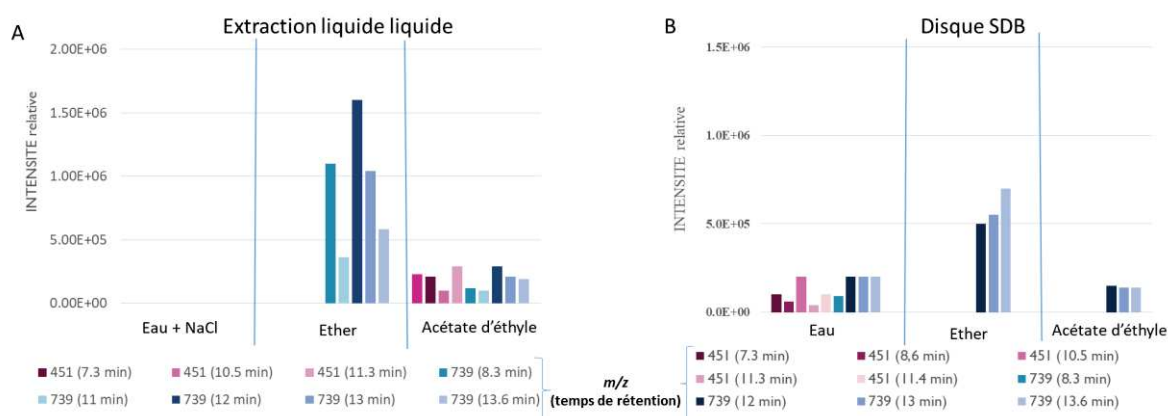


Figure 19 – Histogrammes représentant les intensités EIC des monomères d'(épi) catéchine glycosylés (m/z 451) en rose et des dimères d'(épi) catéchine glycosylés (m/z 739) dans les fractions eau, éther et acétate d'éthyle provenant des extractions liquide-liquide en **A**, et des disques SDB en **B**.

L'histogramme **A** correspond aux compositions en glycosides des fractions eau + NaCl, éther et acétate d'éthyle provenant des extractions liquide-liquide. Tout d'abord, il est à noter qu'aucun flavanols (mono et dimères) n'a été détecté dans la première fraction aqueuse. Cette première étape peut ainsi être considérée comme une étape de lavage car sur 1 g d'extrait de polyphénol, 305 mg de fraction aqueuse lyophilisée ont été récupérés. La fraction éther ainsi que celle d'acétate d'éthyle sont ainsi les plus intéressantes. Cinq isomères de dimères de flavanols glycosylés ont été détectés dans la fraction éther. Des traces de ces composés sont retrouvées dans la fraction d'acétate d'éthyle. Cette dernière contient aussi quatre isomères d' (épi) catéchine glycosylés. Cette méthode de purification permet d'isoler efficacement les dimères de flavanols glycosylés. Cependant, les étapes de purification sont longues et utilisent de grandes quantités de solvant.

L'histogramme **B** représente la composition des composés glycosylés des fractions eau, éther et acétate d'éthyle des fractionnements sur disque SDB. Comme pour la méthode d'extraction liquide-liquide, trois isomères de dimères d' (épi) catéchine glycosylés possèdent une affinité pour l'éther, dont trois en commun avec la purification précédente. Le fractionnement semble cependant moins sélectif. En effet, des traces de dimères sont à la fois retrouvées dans la première fraction à l'eau et dans la dernière à l'acétate d'éthyle. Cinq

monomères de (épi) catéchine glycoside sont retrouvés dans la fraction aqueuse mais en faibles intensités. Cette méthode a pour avantage d'être rapide et d'utiliser peu de solvant. Nous avons choisi d'utiliser la fraction éther de la méthode sur disque SDB pour entamer d'autres étapes de purification. Pour 1 litre de vin, 87 mg de fraction éther lyophilisée sont récupérés.

1.3.2. Purification des dimères de flavanols glycosylés par chromatographie

Le gel TOYOPEARL® HW-40S est généralement utilisé pour purifier des protéines par exclusion de taille. Ici, les molécules telles que les flavanols glycosylés peuvent former des liaisons faibles avec la résine, ce qui va ralentir leur migration. Plus les flavanols sont polymérisés, plus leur migration sera ralentie car la molécule possèdera une polarité supérieure. On s'attend donc à ce que les monomères possèdent un temps d'élution inférieur aux dimères. La purification sur ce gel a permis de récupérer neuf fractions dont les masses récupérées et les compositions en monomères et dimères d' (épi) catéchine glycosylés de chaque fraction sont présentées en **Figure 20**.

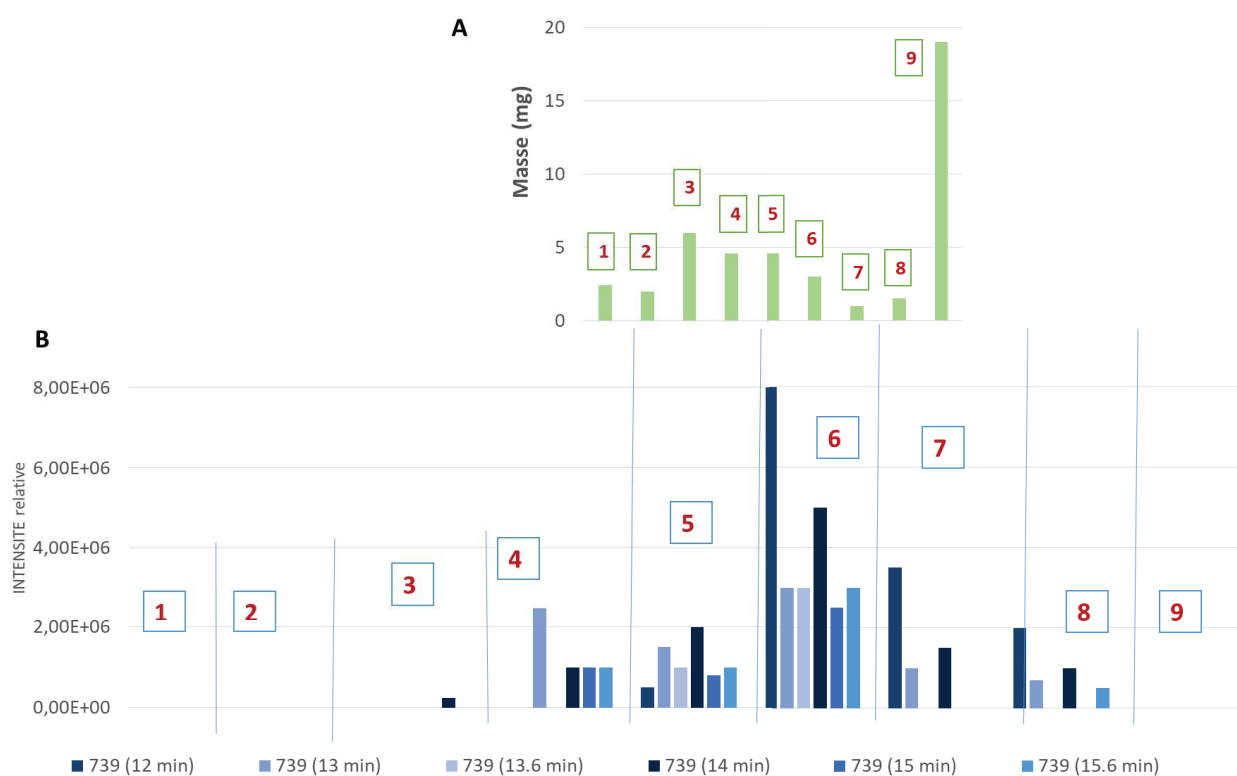


Figure 20 – Histogrammes représentant les masses de chaque fraction (A) provenant de la purification sur disque SDB ainsi que les intensités relatives en EIC des dimères d' (épi) catéchine glycosylés (m/z 739) en bleu (B).

Les différentes fractions récupérées de la colonne sont numérotées sur l'histogramme de 1 à 9. Les dimères d' (épi) catéchine glycosylés sont élués de la fraction 4 jusqu'à la fraction 8. La dernière fraction 9 correspond au lavage de la colonne, confirmé par l'absence de détection de composés d'intérêts et une masse importante correspondant à 43 % de la masse totale récupérée. Cette étape permet de laver et de régénérer la colonne des molécules de masse élevée comme les tanins de fort DP (Figure 20.A.). Par comparaison avec la fraction éther analysée précédemment (Figure 19.B.), deux nouveaux dimères glycosylés sont détectés grâce à cette deuxième étape de purification. Ce résultat peut s'expliquer par la concentration en dimères glycosylés dans les fractions récupérées. On observe en effet un gain en intensité d'un facteur 10 entre les disques SDB et la chromatographie sur colonne. Afin de séparer et de récupérer les dimères, les fractions 6, 7 et 8, correspondant à 12,5 % de la masse totale récupérée, ont été rassemblées et injectées en chromatographie semi-

préparative (chromatogramme UV à 280 nm en **Annexe 1**). Sept pics correspondant à sept fractions notées F1, F2, F4 (composition en **Annexe 2**), F6, F8, F10 et F11 sont récupérés et analysés par spectrométrie de masse. Le chromatogramme UV à 280 nm (**A**) ainsi que l'EIC à m/z 739 (**B**) et la MS^2 associée (**C**) de la fraction F4 est présentée en **Figure 21**.

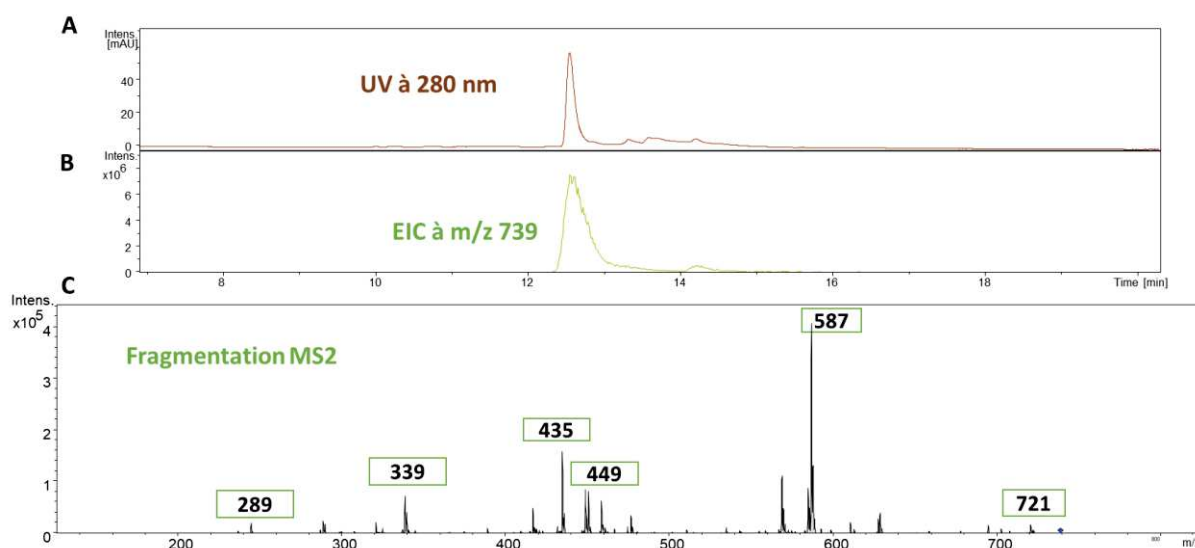


Figure 21 – Chromatogramme UV (280 nm) en **A**, EIC à m/z 739 en **B** et la MS^2/β correspondante de la fraction 4 provenant de la chromatographie semi préparative (chromatogramme UV à 280 nm en **Annexe 1**)

La longueur d'onde à 280 nm est caractéristique des flavonoïdes. Ainsi, par comparaison des temps de rétention en UV et de l'unique pic de l'EIC, on peut remarquer que la fraction analysée est concentrée en une molécule à un temps de rétention de 12 min, d'une masse de 740 et à une intensité EIC de $6 \cdot 10^6$. Les fragments MS^2/β de ce composé (Figure 22.C) avec les fragmentations correspondantes décrites précisément dans **l'article 1** sont les suivantes : 289 et 449 (rupture de la liaison inter flavanique), 435 (Retro Diels Alder Cycle C), 339 (ion 449 avec perte du cycle B d'une masse m/z de 110) et finalement, 721 (perte d'eau d'une masse de 18). Ces fragments sont spécifiques d'un dimère d'épicatéchine glycosylé. Afin de déterminer leur structure, l'échantillon a été analysé par RMN. Les résultats n'ont pas été concluants dû à une concentration en molécule ciblée trop faible.

1.4. Conclusion et perspectives

Cette méthode de purification par disque SDB suivi de chromatographie de type gel 40S et C18 nous a permis d'obtenir une fraction riche en un dimère d' (épi) catéchine glycosylé. Son identification a été possible grâce à des analyses UV et de spectrométrie de masse. Les $MS^2/3$ ont été analysés et attribués à des fragmentations spécifiques de cette molécule. L'objectif suivant de ce travail serait de répéter les étapes de purifications afin d'obtenir une plus grande quantité de molécule purifiée. Ceci nous permettrait de déterminer sa structure par RMN et d'en faire un standard pour des quantifications.

2. HEMISYNTHESES A PARTIR DE GLYCOSYLTRANSFERASES, UGT72L1 ET UGT71A15

Les hémisynthèses enzymatiques testées durant cette thèse ont mis en jeu deux types de glucosyl transferases (GTs).

Le premier objectif a été d'obtenir des bactéries contenant le gène capable d'exprimer les différentes GTs. Au laboratoire, nous disposons du clone bactérien de type *Escherichia coli* contenant le plasmide portant l'ADNc du gène codant l'UGT72L1, fourni par l'équipe de Dixon qui l'avait isolé à partir de l'enveloppe des graines de *M. truncatula* (Pang, *et al.*, 2008). La seconde GT est l'UGT71A15. Sa production a été possible grâce à la collaboration avec l'équipe de M. Bernd Nidetzky de l'*Institute of Biotechnology and Biochemical Engineering* de Graz en Autriche. Cette partie comporte le « matériel et méthode » présentant le protocole permettant la production de ces enzymes.

2.1 Matériels et Méthodes

2.1.1. Production de l'enzyme UGT72L1

Le gène UGT72L1 a été induit dans un vecteur de type pMAL permettant l'expression de la protéine de fusion UGT72L1-MBP (Maltose binding protein) dans *E. coli* BL21 (DE3).

- Induction de la synthèse de la protéine recombinante

Les cellules bactériennes sont cultivées dans du LB en présence d'ampicilline à 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, et 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glucose à 37°C. L'expression de la protéine recombinante par les cellules d'*E. coli*, est induite lorsque la culture bactérienne atteint une $\text{DO}_{600} = 0,6$, par ajout d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) à une concentration finale de 0,3 mM. La culture est poursuivie toute la nuit à 16 °C sous 225 rpm d'agitation.

- Préparation du lysat cellulaire bactérien

La culture est centrifugée à 4000 g pendant 30 minutes à 4 °C. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu avec 25 mL de tampon de colonne (Tp) constitué d'une solution de

20 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, ainsi que 0,1 % (v/v) de Triton X-10. La suspension cellulaire est placée dans un bain de glace puis broyée par ultrasonication durant 5 min dans les conditions suivantes : puissance des ultrasons de 50 Watts (output 5), période d'ultrasonication de 30 % (duty cycle 30) et diamètre de sonde de 20 microns. Le broyat est ensuite centrifugé à 20 000 g pendant 20 min.

- Purification de l'enzyme

La protéine recombinante UGT72L1-MBP est purifiée par chromatographie d'affinité sur une résine amylose (New England Biolabs). Le surnageant est déposé sur la résine d'amylose de volume V (10 mL) ayant préalablement été lavée (régénération) par successivement 3 fois son volume (3 x V) d'eau Milli-Q, 3 x V de SDS à 0,1 %, 1 x V d'eau Milli-Q, 3 x V de Tp. Après dépôt, la colonne est tout d'abord lavée par 12 x V de Tp puis, la protéine est éluée par 6 x V de tampon d'éluion (40 mL de Tp additionné de 10 mM de maltose), avec des fractions de 1/5^{ème} de V.

2.1.2. Production de l'enzyme UGT71A15

Le gène UGT71A15 (GenBank: DQ103712) a été introduit dans le vecteur pETSTRP3 pour son expression dans *E. coli* de type BL21 gold (DE3). Ce protocole est basé sur des travaux ultérieurs (Lepak, *et al.*, 2015).

- Induction de la synthèse de la protéine recombinante

Les cellules bactériennes sont cultivées dans un erlenmeyer d'un litre contenant 300 mL de milieu LB en présence de kanamycine à 50 µg.mL⁻¹ à 37°C, et agitées à 320 rpm jusqu'à atteindre une DO₆₀₀ de 0,5. Le milieu est ensuite ramené à une température de 20 °C. L'expression de la protéine est déclenchée par ajout de l'IPTG à 0,5 mM.

- Préparation du lysat cellulaire bactérien

Après 18 h, les bactéries sont récoltées et centrifugées à 5000 rpm à 4 °C pendant 30 min. Le culot bactérien est resuspendu dans de l'eau désionisée. La suspension cellulaire est

ensuite placée dans un bain de glace (- 5 °C) puis broyée par ultrasonication (10 s on, 20 s off, 3 min). Le lysat est clarifié par centrifugation à 20 000 g pendant 60 min et filtré sur 1,2 µm.

- Purification de l'enzyme

Le surnageant est déposé sur une colonne Strep-Tactin (IBA, Germany) de 3 mL et les étapes de purification sont celles recommandées par IBA. Le rééquilibrage est effectué avec 3 volumes de colonne (VCs) avec du tampon de lavage W (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). La protéine est éluée avec le tampon d'éluion E (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM desthiobiotine). Les premiers 0,5 VCs sont éliminés et le reste de l'éluion est récupéré. La colonne est régénérée par 15 VCs de tampon R (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM d'acide hydroxyazophenyl benzoïque) et finalement rééquilibrée par 10 VCs de tampon W. L'UGT71A15 purifiée est concentrée dans un centricon (3 kDa, PES). Le solvant est changé par centrifugation répétée de 14 mL d'HEPES à pH 5 dans le centricon. L'extrait contenant les protéines recombinantes libérées est stocké à -20 °C en présence de 10 % de glycérol.

2.1.3. Dosage des protéines par réactif de Bradford

Les protéines produites sont dosées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

Le réactif de Bradford est préparé comme suit : 100 mg de Brilliant Blue G sont suspendus dans 50 mL d'EtOH à 95%. 100 mL d'H₃PO₄ sont ajoutés, complétés par 850 mL d'eau milli-Q. La solution est ensuite homogénéisée par agitation et stockée à 4 °C.

On effectue un étalonnage avec une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) à 1 g.L⁻¹ (voir **Figure 22**).

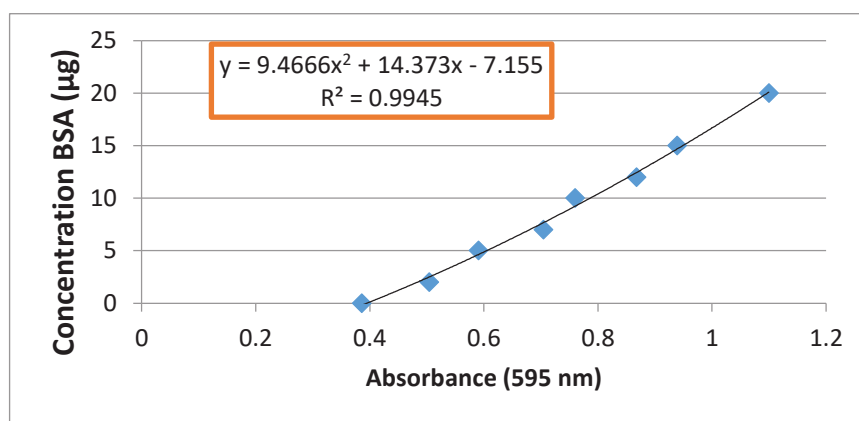


Figure 22 – Courbe d'étalonnage de BSA

2.1.4. Hémissynthèse flavan-3-ols glycosylés par action de l'UGT72L1 (Pang, Peel et al., 2008)

Dans un volume réactionnel de 100 µL, 15 µL d'UGT72L1 à une concentration de 0,863 µg.µL⁻¹ sont mis en contact avec de l'UDPG à 0,25 mM, 100 mM de Tris-HCl et différents réactifs, la (+)-catéchine, l'(-)-épicatéchine et le dimère B1 à 0,1 mM. Le milieu est incubé pendant 1 h à 30 °C. Les résultats obtenus ont été analysés par UPLC-ESI-MS d'après la méthode décrite dans l'article 1.

2.1.5. Hémissynthèse flavan-3-ols glycosylés par action de l'UGT71A15

Le protocole est décrit dans l'article 1. Les tests d'hémissynthèses ont été réalisés à partir de l'UDPG et des mêmes réactifs que ceux utilisés avec l'UGT72L1.

2.2 Résultats et discussions

2.2.1. Hémissynthèse par l'UGT72L1

Des essais catalytiques en présence de cette enzyme ont donc été effectués entre différents flavanols et le donneur de sucre, l'UDPG. Les chromatogrammes UV à 280 nm sur la Figure 23 montrent les résultats obtenus avec en (A), l'(-)-épicatéchine comme accepteur et en (B), la (+)-catéchine. Aucune activité n'est détectée vis-à-vis du dimère B1. Les résultats suivants sont similaires aux deux réactions : la conversion du flavanol n'est pas totale et un sous-produit inconnu est formé à un temps de rétention de 7,5 min. L'analyse MS de ce

dernier pic n'a donné aucun résultat probant. La réaction avec l'(-)-épicatéchine a permis la formation de deux produits à 4,7 et 5,1 min ayant une masse conforme (m/z 451) à une épicatéchine glucosylé. La purification n'a pas été effectuée dû à un rendement trop faible.

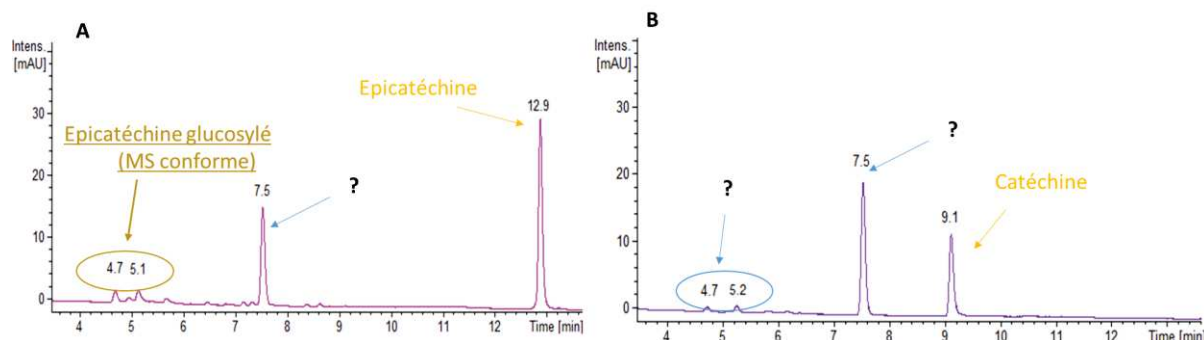


Figure 23 – Chromatogrammes UV à 280 nm de la réaction avec l'UGT72L1, l'UDPG et la (+)-catéchine (en B) ou l'(-)-épicatéchine

D'après la littérature (Pang, *et al.*, 2008), l'UGT72L1 montre très peu d'activité pour la (+)-catéchine et aucune pour le dimère B1, ce qui est en accord avec nos résultats. Cependant, nos résultats pour l'(-)-épicatéchine diffèrent de ceux de la littérature.

2.2.2. Hémissynthèse flavan-3-ols glycosylés par action de l'UGT71A15

Les résultats obtenus avec cette enzyme sont présentés dans l'article 1. En effet, l'UGT71A15 présente une forte affinité pour la (+)-catéchine en produisant majoritairement la (+)-catéchine -3'-O- β -glucoside (C3'OG) et comme produit secondaire la (+)-catéchine 7-O- β -glucoside (C7OG). Des tests enzymatiques ont parallèlement été effectués sur l'(-)-épicatéchine et le dimère B1, cependant aucun produit formé n'a pu être détecté.

2.3 Conclusion et perspectives

Pour conclure, deux glucosyl transférases, l'UGT72L1 et l'UGT71A15 ont été produites avec succès. Des hémissynthèses sur des flavanols commerciaux, la (+)-catéchine, l'(-)-épicatéchine et un dimère de flavanol de type B1, ont ainsi pu être testées. Les résultats ont été peu concluants concernant l'UGT72L1 de l'équipe de Dixon, cette enzyme ayant pour rôle la formation de E3'OG dans *M. truncatula* (Pang, *et al.*, 2008). Il est à noter que la production

de cette enzyme a été laborieuse, et que son expression et sa purification ont été obtenues au bout de nombreux essais avec un faible rendement. L'une des hypothèses serait que le plasmide ou la souche bactérienne seraient défectueux. Un re-séquençage aurait pu être effectué, pour valider cette hypothèse, mais n'aurait cependant pas permis d'obtenir une protéine active. Une autre possibilité est que les étapes de production, purification et utilisation de l'enzyme nécessitent des conditions particulières qui ne sont pas décrites précisément dans l'article (Pang, *et al.*, 2008). Contactée, le Dr Pang a confirmé que la plupart des collègues à qui elle avait fourni le clone bactérien n'avaient pas été en mesure de reproduire ces expérimentations.

Ces travaux ont permis la production de l'UGT71A15, et d'effectuer des tests probants sur les flavanols commerciaux cités précédemment. La C7OG a été formée et la C4'OG a été synthétisée et purifiée.

3. NOUVEAUX FLAVAN-3-OLS DETECTES DANS LE RAISIN ET DANS LE VIN

Les flavan-3-ols sont des composés de la famille des flavonoïdes largement étudiés de par leur présence et leurs propriétés bénéfiques dans les plantes. Dans le raisin, les molécules les plus représentées sont la (+)-catéchine, l'(-)-épicatéchine, l'(-)-épigallocatechine, l'(-)-épicatéchine gallate et les proanthocyanidines (PA). La biosynthèse de ces unités monomériques est décrite dans la littérature et a été développée dans la partie *Chapitre 1 – 3. Biosynthèse des flavanols*. Au contraire, le mécanisme de polymérisation des PA reste à ce jour inconnu. L'UGT72L1 serait impliquée dans leur biosynthèse : une surexpression de cette enzyme provoque une accumulation de PA et catalyse la formation de l'E3'OG dans le cytoplasme (Pang, *et al.*, 2013).

Nous nous sommes intéressés à la détection de *flavanols glycosylés* et de leurs évolutions dans le raisin et dans le vin. Ces composés pourraient jouer un rôle dans la biosynthèse des tanins et leur présence a été signalée dans une grande variété de plantes. Les monomères de flavanols glycosylés ont déjà été détectés dans les pépins de raisins et dans le vin de Merlot (Delcambre and Saucier, 2012). Dans cette étude, les monomères et dimères de flavanols monoglycosylés ont été analysés dans le raisin et dans le vin par une méthode d'UPLC-DAD-ESI-IT-MS. Les différentes hypothèses étudiées et confirmées durant ces travaux ont été les suivantes :

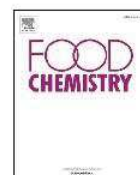
- Des isomères de monomères et de dimères d'(-)-épicatéchine et de (+)- catéchine glycosylés sont présent dans les raisins et les vins analysés.
- La composition de ces composés dépend de paramètres de type variété du raisin, tissu biologique étudié, stade de maturité.
- Certains monomères sont de la classe des β -glucosides.

Cette dernière partie a fait l'objet d'une première publication sur ces travaux de thèse dans le journal *Food Chemistry*, intitulée **New flavanol O-glycosides in grape and wine**. Elle est présentée ci-dessous.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

New flavanol O-glycosides in grape and wine

Marie Zerbib^a, Jean-Paul Mazauric^b, Emmanuelle Meudec^b, Christine Le Guernevé^b, Alexander Lepak^d, Bernd Nidetzky^d, Véronique Cheynier^b, Nancy Terrier^c, Cédric Saucier^{a,*}^a SPO, Univ Montpellier, INRA, Montpellier Supagro, Montpellier, France^b SPO, INRA, Montpellier Supagro, Univ Montpellier, Montpellier, France^c AGAP, INRA, CIRAD, Montpellier SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France^d Institute of Biotechnology and Biochemical Engineering, Graz University of Technology, Graz, Austria

ARTICLE INFO

Keywords:

Wine
Grape
Flavan-3-ol glycoside
Mass spectrometry

ABSTRACT

The presence of monomeric and dimeric flavan-3-ol monohexosides was investigated in grapes and wines. Polyphenol extracts were prepared from grape seeds and skins (Syrah, Merlot, and Cabernet-Sauvignon) sampled at three different developmental stages. Different wines (Tannat, Alicante, Syrah, Merlot, and Grenache) were also studied. The different samples obtained were analyzed by UPLC-ESI-IT-MS. Specific molecular ions corresponding to flavan-3-ol hexosides were detected by using targeted molecular ions with specific m/z values: 451 for (*epi*)catechin hexosides, and 739 for procyanidin dimer hexosides. 4'-*O*- β -glucosyl-(+)-catechin and 7-*O*- β -glucosyl-(+)-catechin were obtained by using a glucosyl transferase from apple, UGT71A15, and their structures determined by NMR. These glucosylated monomers and the dimers were identified in all analyzed grape seed and several skin extracts at the different stages and in wines made from different varieties.

1. Introduction

Flavonoids are a category of polyphenols present in a wide variety of natural products such as grape, tea, and cocoa (Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouysegu, 2011). They have health properties and are involved in organoleptic properties such as the color and the taste of wine and play a role in plant defense mechanisms (Corder et al., 2006). The common molecular backbone of these secondary metabolites is a C6-C3-C6 type. Flavan-3-ols, called flavanols here, are an important subclass of flavonoids. They are present in grape and wine as monomers or polymers called proanthocyanidins (PAs) or condensed tannins. The monomeric units are linked through C₄-C₆ or C₄-C₈ linkages (B type) with sometimes additional C2-O-C5 or C2-O-C7 bond (A type). In *Vitis vinifera* berries, four principal units of PAs are usually found: (+)-catechin, (–)-epicatechin, (–)-epigallocatechin and (–)-epicatechin gallate. They are synthesized in skins and seeds at the earlier developmental stages after flowering, and the monomer and polymer concentrations remain stable after *veraison*, the onset of ripening (Downey, Harvey, & Robinson, 2003; Terrier, Ollé, Verriès, & Cheynier, 2009).

The common flavonoid biosynthesis sequence is well described in the literature (Bogs et al., 2005; Fujita et al., 2005; Tanner & Kristiansen, 1993; Xie, Sharma, Paiva, Ferreira, & Dixon, 2003).

However, the chemical or biochemical mechanism of the polymerization steps generating PAs remains unknown. In 2008, Dixon and collaborators published a work about the expression of a glucosyltransferase, UGT72L1, in the seed coat of *Medicago truncatula*. This enzyme catalyzes the formation of epicatechin 3'-*O*-glucoside, named here E3'OG, in the cytoplasm and its over-expression results in increased accumulation of PA-like compounds in the vacuole (Pang et al., 2013). Further studies have suggested that E3'OG rather than free epicatechin is the substrate for the tonoplast-localized MATE, transporters MATE1 from *M. truncatula* and TT12 from *A. thaliana*, involved in PA biosynthesis (Zhao & Dixon, 2009). This glucosylated flavan-3-ol was postulated to be an intermediate in flavan-3-ol polymerization in *Medicago truncatula* (Pang, Peel, Sharma, Tang, & Dixon, 2008).

Polyphenols substituted with different hexoses (glucose, galactose, mannose, ...), including stilbenes (Ali & Strommer, 2003; Versari, Parpinello, Tornielli, Ferrarini, & Giulivo, 2001), phenolic acids (Monagas, Bartholomé, & Gomez-Cordovés, 2007), flavonols and flavones (Castillo-Muñoz et al., 2009; Hmamouchi, Es-Safi, Lahrichi, Fruchier, & Essassi, 1996) have been described in the literature. Also, several flavan-3-ol glucosides were found in a wide range of plants: (+)-catechin-7-*O*- β -glucoside in elm (Kim et al., 2004), buckwheat (Smaali, Maugard, Limam, Legoy, & Marzouki, 2007; Watanabe, 1998),

* Corresponding author.

E-mail addresses: marie.zerbib@umontpellier.fr (M. Zerbib), emmanuelle.meudec@inra.fr (E. Meudec), christine.le-guerneve@inra.fr (C. Le Guernevé), alexander.lepak@tugraz.at (A. Lepak), bernd.nidetzky@tugraz.at (B. Nidetzky), veronique.cheynier@inra.fr (V. Cheynier), nancy.terrier@inra.fr (N. Terrier), cedric.saucier@umontpellier.fr (C. Saucier).<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.019>

Received 22 December 2017; Received in revised form 1 June 2018; Accepted 3 June 2018

Available online 05 June 2018

0308-8146/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

cowpea seeds (Cui et al., 2016), barley and malt (Friedrich & Galensa, 2002), (+)-catechin 3-O-glucoside in lentils (Dueñas, Sun, Hernández, Estrella, & Spranger, 2003), (+)-catechin 5-O-, 7-O-, 3'-O-, and 4'-O-glucosides in Chinese peony (Tanaka, Kataoka, Tsuboi, & Kouno, 2000), (+)-catechin 7-O- β - and 4'-O- β -glucosides in Douglas-fir bark (Foo & Karchesy, 1989), (+)-catechin 5-O- β -glucoside and (-)-catechin 7-O- β -glucoside in rhubarb and *Rhaphiolepis umbellata* bark (Nonaka, Ezaki, Hayashi, & Nishioka, 1983). The characterization of flavan-3-ol hexosides was investigated in literature, and to this aim, some of these compounds were produced. In fact, different strategies have been used to obtain these standards: organic synthesis (Raab et al., 2010), enzymatic reactions (Smaali et al., 2007; Vic, Biton, Le Beller, Michel, & Thomas, 1994). Some purifications from plants or foods may be performed as well. Raab and collaborators developed the chemical synthesis of (+)-catechin 3'-O- β -D-glucopyranoside, (+)-catechin 5-O- β -D-glucopyranoside, and (+)-catechin 3-O- β -D-glucopyranoside. They also obtained (+)-catechin 4'-O- β -D-glucopyranoside and (+)-catechin 7-O- β -D-glucopyranoside by using enzyme extracts from lentil and barley (Raab et al., 2010). Another work on a glucosyl-transferase from apple called UGT71A15 has some affinity for flavonoids such as phlorizin (phloretin 2'-O-glucoside) (Lepak, Gutmann, Kulmer, & Nidetzky, 2015). In addition, unpublished preliminary assays showed that this enzyme has some activity on flavanols.

The presence of hexosylated monomers of flavanols was already reported in Merlot grape seeds and wine but not in grape skins (Delcambre & Saucier, 2012). By using an ESI/Q-TOF/MS with a targeted MS/MS strategy, 14 flavanol hexosides were detected. MS fragmentation patterns indicated that these molecules are O-hexosides of the four major monomers found in grape (Simirgiotis, Silva, Becerra, & Schmeda-Hirschmann, 2012). However, the nature and position of the hexoside substituents have not been determined and whether these compounds can be found as constitutive units of proanthocyanidins is unknown.

The main objective of the present work was to detect by mass spectrometry new flavan-3-ol hexosides compounds in grapes and wines. Also, grape tissues, grape stages of development and variety influences were investigated. Different grapes varieties at three different stages of development and wine were selected.

In this publication, we wanted to test the following hypotheses:

- Several isomers of dimeric flavanol hexosides are present in different grape varieties and wines
- The content of these compounds is influenced by the grape variety, the tissue (skin or seed) and the grape development stage
- Some of the compounds are β glucosides of flavanols

2. Materials and methods

2.1. Reagents and samples

Deionized water was purified with a Milli-Q purification system (Millipore, Molsheim, France). Acetone and diethyl ether were obtained from Analytic Lab (St Mathieu de Treviers, France). Formic acid and HPLC grade methanol were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA).

Grapes from Unité Expérimentale de Pech Rouge in Gruissan (France) were harvested at three different dates corresponding to different development stages.

Merlot: 31/07/2015 (3.4 °Brix), 14/08/2015 (20.2 °Brix), 09/09/2015 (23.1 °Brix)
 Syrah: 31/07/2015 (2.9 °Brix), 14/08/2015 (11.1 °Brix), 09/09/2015 (20.4 °Brix)
 Cabernet Sauvignon (CS): 14/08/2015 (3.2 °Brix), 09/09/2015 (15.1 °Brix), 24/09/2015 (22.9 °Brix).

The first development stage sampling point of each grape is named *phase I* (P-I), the second one, *phase II* (P-II), and the last one is at maturity, called *phase III* (P-III). The samples were stored at -80°C before analysis.

Languedoc-Roussillon red wines selected for a screening were: a Tannat press wine from cave de Crouseilles, Madiran-2016, an Alicante Bouschet from Chateau de Pinet-2015, a Merlot from Mas Pellier-2014, a Syrah from Mas de Valbrune-2013 and a Grenache from Chateau Flaugergues, Montpellier-2016. Red wines were stored at -80°C before analysis.

2.2. Preparation of grape tannin extracts

For each grape variety, seeds and skins were removed by hand on ice from 100 berries. Ten grams of each tissue were extracted using 200 mL of acetone/water 7:3, under nitrogen with mechanical agitation, overnight. Solutions were filtered on filter paper, evaporated under reduced pressure at 37°C . The residues were dissolved in deionized water and lyophilized. Tannin extract powders were stored at -20°C .

2.3. UPLC-DAD-ESI-IT-MS method

All analyses were performed on a Waters Acquity UPLC-DAD system (Milford, MA) coupled with a Bruker Daltonics Amazon (Bremen, Germany) mass spectrometer equipped with an electrospray source and an ion trap mass analyzer. Separation was achieved using a C18 column (Waters, Milford, BEH, $1.7\ \mu\text{m}$, $1 \times 150\ \text{mm}$) at temperature of 35°C . The binary mobile phase consisted of deionized water with 1% of formic acid (A) and methanol with 1% of acid formic (B). The 45-minutes-long gradient was as follows: 0–1 min, isocratic, 2% B; 1–10 min, 2–30% B; 10–12 min, isocratic, 30% B; 12–25 min, 30–75% B; 25–30 min, 75–90% B; 30–35 min, isocratic, 90% B; 35–45 min, isocratic 2% B. The flow rate was $0.08\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

For UPLC-DAD-ESI-IT-MS analysis, grape extracts were prepared in methanol/H₂O 1:1 to a final concentration of $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Red wines were all centrifuged at 13,500 rpm, during 15 min at 4°C . The supernatants were recovered and injected.

The MS instrument was operated in the negative mode with fragment ion scan mode focused on specific precursor ions at m/z 451 and 739 (end plate off set: $-500\ \text{V}$; temperature, 200°C ; nebulizer gas: 10 psi and dry gas, $5\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; capillary voltage, 4.5 kV). Collision energy for fragmentation used for MS² experiments were set at 1.

A UGT71A15 reaction kinetic study was done, as shown on Appendix 1. The proportions of (+)-catechin 4'-O- β -D-glucoside and (+)-catechin 7-O- β -D-glucoside were monitored with the assumption that they had the same UV absorption coefficient as (+)-catechin at 280 nm.

Monomeric and dimeric flavanol hexosides relative intensities were measured based on the peak height of their associated m/z Extract Ion Chromatogram (EIC). Each sample was analyzed in triplicate. Samples were analyzed in several batches within a 2-month period and the average intensities and standard deviations (error bars) calculated.

2.4. Heterologous production of UGT71A15 and enzymatic reactions

Cloning and transformation of the glucosyltransferase UGT71A15 (GenBank: DQ103712) have been described elsewhere (Gosch, Halbwirth, Schneider, Hölscher, & Stich, 2010). The heterologous expression of N-terminal Strep-tagged UGT71A15 in *E. coli* and purification by Strep-affinity chromatography were performed as described earlier (Lepak et al., 2015).

UGT71A15 was assayed in a reaction volume of 200 μL containing 50 mM HEPES pH 8.0, 50 mM KCl, 13 mM MgCl₂, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ enzyme with different acceptor reagents, (+)-catechin and (-)-epicatechin, and UDPG concentrations (1 mM, 2.5 mM and 5 mM) at 30°C . To obtain

a sufficient amount for structural characterization by NMR and MS, the reaction was scaled up to 4 mL using the same buffer conditions. (+)-catechin 4'-O- β -glucoside was then purified by preparative HPLC (940 LC Varian) using a C18 reversed phase (Microsorb C18 100-3, 100 * 21.4 mm (L * ID), Dynamax Agilent). Samples were filtered on a 0.2 μ m regenerated cellulose membrane filter and 1 mL was injected. The binary mobile phase consisted of deionized water with 1% of formic acid (A) and acetonitrile, water and acid formic (80:19:1) (B). The 16-minutes-long gradient was: 0–1 min, 10% B; 1–10 min, 16% B; 10–12 min, 80% B; 12–14 min, 10% B; 14–16 min, 10% B. The flow rate was 10 mL.min⁻¹.

2.5. NMR spectroscopy experiments

All experiments were performed on an Agilent 500 MHz DD2 NMR spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) operating at 500.05 MHz for ¹H and 125.75 MHz for ¹³C and equipped with a 5 mm indirect detection Z-gradient probe. The chemical shifts were reported to that of methanol-d₄, the organic solvent used for the experiments (3.31 ppm and 49.1 ppm for ¹H and ¹³C respectively). All data were collected at 25 °C with active sample temperature regulation.

Identification and structure characterization of products were performed using both 1D and 2D NMR, homonuclear ¹H (DOSY, COSY, TOCSY and ROESY) and heteronuclear ¹H/¹³C (HSQC and HMBC) experiments. Data were processed and analyzed using VNMRJ software.

2.5.1. (+)-Catechin-4'-O- β -glucoside (C4'OG)

¹H NMR (25 °C, MetOD, ppm) δ 4.629 (d, *J* = 7,3, C2); 3.982 (m, C3), 2.516 (dd, 7,9; 16,5, C4), 2.817 (dd, 5,5; 16,5, C4), 5.932 (d, 2,2, A6), 5.868 (d, 2,2, A8), 6.906 (d, 2,0, B2'), 7.183 (d, 8,4, B₅'), 6.831 (d, 2,0; 8,4, B6'), 4.771 (d, 7,5, Glc1), 3.492 (m, Glc2), 3.474 (m, Glc3), 3.408 (m, Glc4), 3.410 (m, Glc5), 3.716 (m, Glc6,6'), 3.895 (bd, 11,9 Hz, Glc6,6').

¹³C NMR (25 °C, MetOD) δ 82.45 (C2), 68.69 (C3), 28.35 (C4), 157.59 (A5), 96.33 (A6), 157.80 (A7), 95.45 (A8), 156.73 (A9), 100.68 (A10), 136.39 (B1'), 115.79 (B2'), 148.25 (B3'), 146.51 (B4'), 118.58 (B5'), 119.88 (B6'), 104.29 (Glc1), 74.90 (Glc2), 77.51 (Glc3), 71.32 (Glc4), 78.26 (Glc5), 62.39 (Glc6,6').

2.5.2. (+)-Catechin-7'-O- β -glucoside (C7'OG)

¹H NMR (25 °C, MetOD, ppm) δ 4.659 (d, *J* = 7,4, C2); 3.996 (m, C3), 2.537 (dd, 8,2; 16,1, C4), 2.817 (dd, 5,2; 16,5, C4), 6.201 (d, 2,4, A6), 6.157 (d, 2,4, A8), 6.829 (d, 1,8, B2'), 6.758 (d, 8,1, B₅'), 6.711 (d, 1,8; 8,1, B6'), 4.815 (d, 7,6, Glc1), 3.35–3.45 (m, Glc2, Glc3, Glc4, Glc5), 3.696 (dd, 4,5; 12,0, Glc6,6'), 3.884 (dd, 2,0; 12,0, Glc6,6').

3. Results and discussion

3.1. Detection of hexosylated flavanols by targeted UPLC-DAD-ESI-IT-MS

The presence of hexosylated flavanol monomers and dimers was investigated in analyzed wine and Merlot grape extracts. Specific molecular ions corresponding to (epi)catechin and procyanidin dimer hexosides were targeted by ion-trap LC-MS. Respectively, five and seven peaks eluted at different retention times were detected in the extracted ion chromatograms at *m/z* 451 and *m/z* 739 (Appendix 5). These isomers may correspond to different substitution positions on the flavanols (catechin or epicatechin), by different hexosides or different conformations. Indeed, the sugar can be bound on any of the flavanol hydroxyl positions or on the C6 or C8 position.

3.1.1. Theoretical MS fragmentation of flavanol monomer hexosides

Specific MS/MS fragmentations were also searched beside the molecular ions to confirm the monomeric flavanol hexosides structures. According to the hexose position, some theoretical fragmentation can be described as illustrated in Fig. 1. The different possible

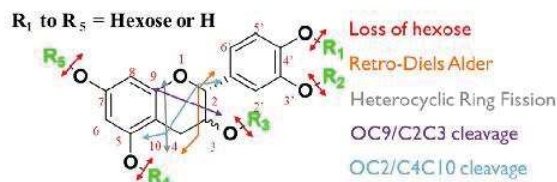


Fig. 1. Fragmentation pathways of (epi)catechin hexosides (). adapted from Delcambre and Saucier (2012)

fragmentations are then retro-diels Alder (RDA), Heterocyclic ring fission (HRF) (Gu et al., 2003) and different bond cleavages. The most common detected fragment is (epi)catechin aglycone detected at *m/z* 289, corresponding to the loss of hexose attached on a hydroxyl group (–162), represented by red arrows. This fragment ion is present for each possible hexose position. In addition, other fragments from different configurations may have the same mass and do not permit to conclude on the hexose position. For example, fragments at *m/z* 299 and 151 and *m/z* 137 and 313 obtained from RDA and OC9/C2C3 cleavage (respectively orange and purple arrows) can be detected if the hexose is bound on A, B or C ring (Delcambre & Saucier, 2012). NMR analysis and molecular standards are then necessary to confirm the nature of the hexose and its position on the molecule.

3.1.2. Theoretical MS fragmentation of flavanol dimer hexosides

Fig. 2 presents the theoretical fragmentations of a dimeric flavanol glycoside with a hexose (for instance a glucose) on the position 5 of the upper unit A ring. The loss of the glucose will yield the proanthocyanidin dimer aglycone ion (*m/z* 577) for any position of glucose. RDA fragmentation can occur twice on the C ring of the dimer upper unit and on the C' ring of the lower unit, yielding an ion fragment at *m/z* 587 and 435 or 587 and 273 with the loss of both B rings (–152 x2). This fragmentation is specific of the hexose on the A ring. HRF may also take place on the upper unit to yield a fragment ion at *m/z* of 451 and 287. The last classical presented fragmentation is the quinone methide (QM) cleavage also called interflavan cleavage. If the hexose is bound on the upper unit, like on Fig. 2, fragment ions at *m/z* of 449 Da and at 289 Da are formed. If the hexose is on the lower unit, ions at *m/z* 451 and 287 are obtained. Depending on the hexose position, other MS² fragmentations are summarized in Appendix 2. Other fragments such as *m/z* 587 and 721 are common for all flavanol dimer hexosides.

3.1.3. Characterization of flavanol dimer and monomer hexosides in grape and wine using MS fragmentation

The use of MS² fragmentation has allowed (Appendix 5) the determination of the hexose position on the upper or the lower unit of proanthocyanidin hexosides but not its exact position. In the case of monomeric flavanol hexosides, the fragment at *m/z* 289 was observed from all isomers (Fig. 3a) and did not indicate the hexose position. To better identify the monomeric flavanol hexosides structures, and for further semi-quantification studies, flavanol glucoside enzymatic hemisynthesis pathways were investigated.

Concerning observed dimer isomers, as presented in Fig. 3b, the principal fragmentation patterns detected in our samples were *m/z* 721 (–18, loss of water 18), 587, 569 (dehydration from 587), 451, 435, 417 (dehydration from 435), which are common for all dimer hexoside configurations, and also at 449, 339 and 289 which are more specific of some hexose position. Indeed, MS² fragments at *m/z* 449 and 289 would be obtained from a QM, indicating that the hexose position would be attached on the upper unit. MS³ fragment at 339 represents the loss of the B cycle (–110) from the previous pattern at 449 showing that the hexose was not on it. The other possibility was that the hexose was attached on the C ring (position 3). But fragments from dehydrations were detected and commonly occur on the C3 (Li & Deinzer, 2007), then the hexose is attached on other hydroxyl. To

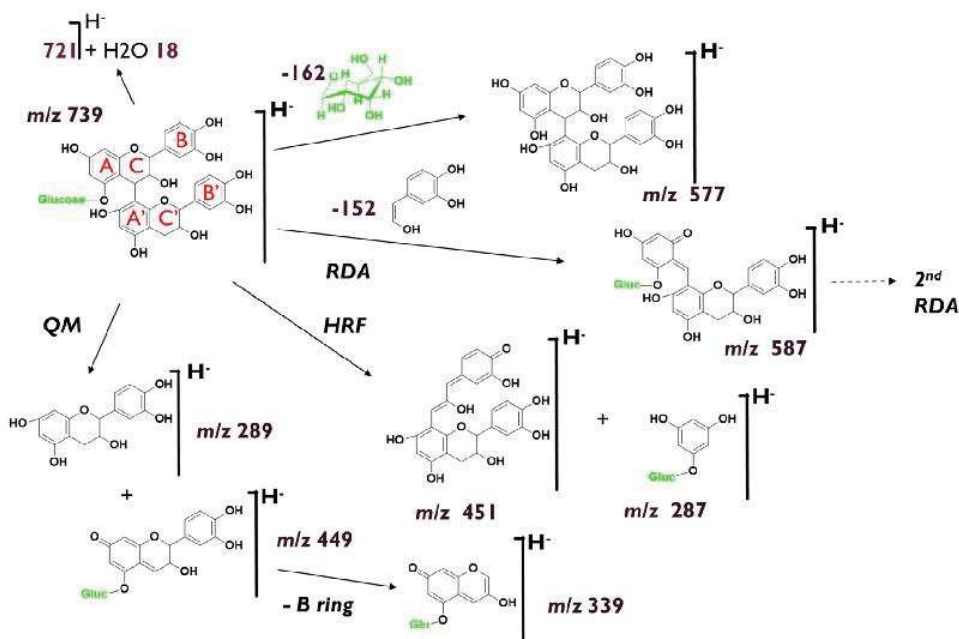


Fig. 2. Fragmentation patterns for a proanthocyanidin glucoside with the glucose attached on the A cycle of the upper unit.

conclude, the fragmentation observed is in favor of a hexose attached on the upper unit and on the A ring (position 5 or 7) as illustrated in Fig. 2.

3.2. Enzymatic production and characterization of flavan-3-ol glycosides: (+)-catechin 4'-O-β-glucoside and catechin-7-O-β-glucoside

A high-efficiency single-step hemisynthesis of C4'OG and C7'OG, catalyzed by the UGT71A15 glucosyl transferase, is depicted below (Fig. 4a). Previous work by Nidetsky and Lepak showed that the UGT71A15 (GenBank: DQ103712) from apples catalyzes site-selective 5-O-β-glucosylation of phlorizin, using UDPG as the glucose donor (Lepak et al., 2015). Similar experimental conditions were tested for glucosylation of (+)-catechin and (-)-epicatechin. Like resveratrol, (+)-catechin was an efficient acceptor substrate showing a high level of

conversion after 24 h. Two signals on the UV chromatogram at 280 nm were observed which corresponded to a molecular ion mass at m/z 451 with a m/z at 289 MS/MS fragment for the two retention times. NMR analysis, in accordance with literature (Raab et al., 2010), allowed us to determine the molecular configuration of (+)-catechin 4'-O-β-glucoside (C4'OG) and catechin-7-O-β-glucoside (C7OG) showed in Appendix 3. Chemical shifts and coupling constants were in accordance with those found in the literature (Raab et al., 2010; Vihakas, Tahtinen, Ossipov, & Salminen, 2012). Conversely, (-)-epicatechin was not converted by the enzyme to its corresponding glucoside. A kinetic study was undertaken to optimize the (+)-catechin concentration: 1 mM, 2.5 mM and 5 mM concentrations were compared (Appendix 1). The reaction with 2.5 mM reached a plateau at 24 h for C7OG but not for C4'OG. The initial concentration of 1 mM was more effective than others based on the yield obtained. In fact, the C4'OG amount represented approximately

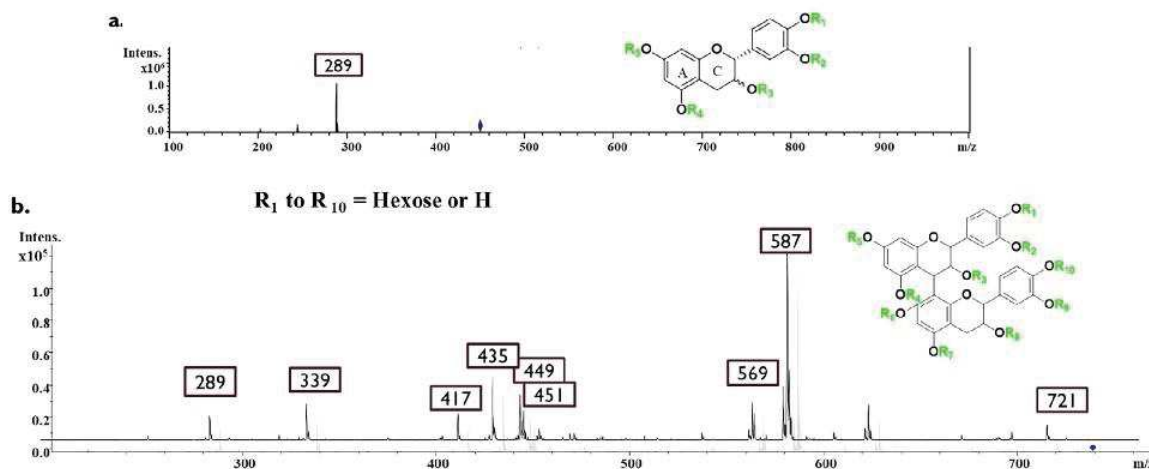


Fig. 3. Examples of flavan-3-ols hexosides MS2/3 fragmentations in merlot grape seed extract from P-III in the negative ion mode with (a). Hexoside (*epi*)catechin (from m/z 451, at 10.4 min), (b) Hexoside (*epi*)catechin dimer (from m/z 739, at 12.2 min).

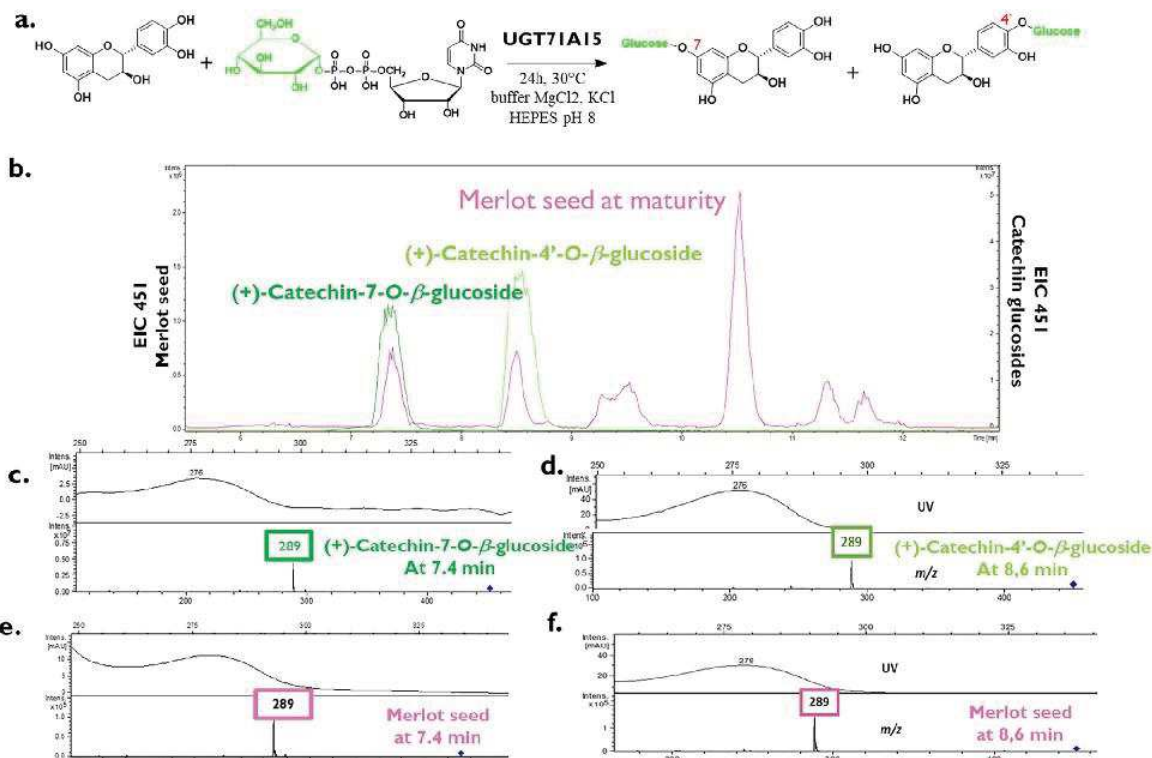


Fig. 4. (a) Enzymatic hemisynthesis of catechin 4'-O-β-glucoside (C4'OG) and catechin 7-O-β-glucoside by the glucosyltransferase UGT71A15 (b) *m/z* 451 EIC of C4'OG (light green), C7OG (dark green) and merlot seed (pink) at the end of veraison. UV chromatogram and MS² from *m/z* 451 EIC of (c) C7OG, (d) C4'OG and molecules (e) at 7.4 min and (f) at 8.6 min from merlot seed at the end of veraison. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

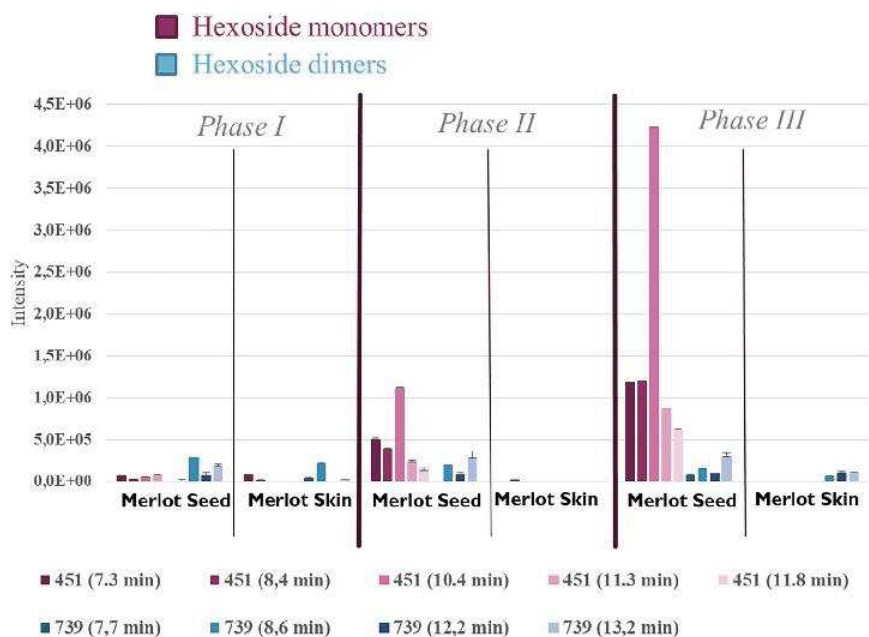


Fig. 5. EIC intensities for hexosylated monomers in purple (*m/z* 451) and dimers in blue (*m/z* 739) from grape polyphenols extracts from seed and skin of Merlot at three different stages (P-I, P-II and P-III). Error bars correspond to MS standard deviation for triplicate analyses.

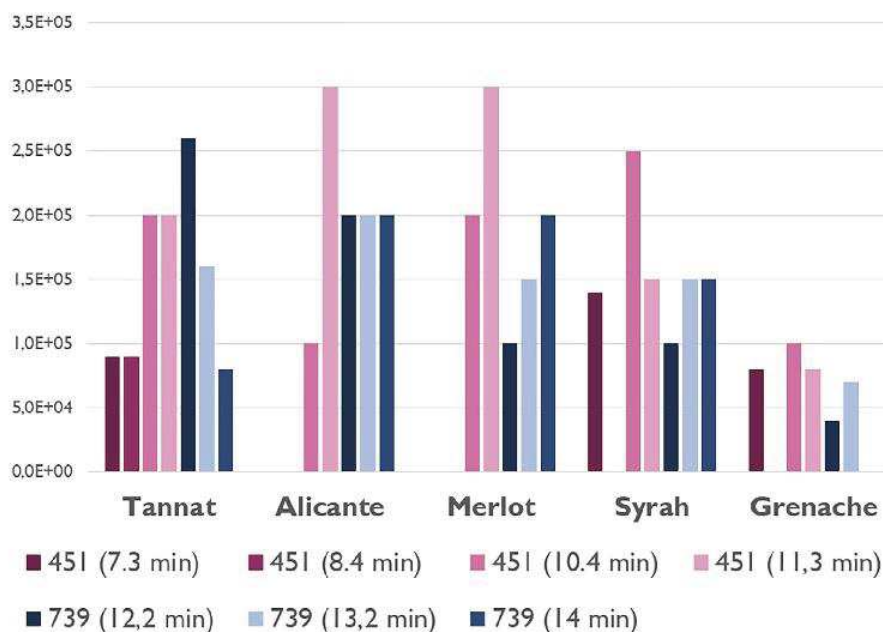


Fig. 6. EIC intensities for hexosides monomers in purple (m/z 451) and dimers hexosides in blue (m/z 739) from five red wines from different grape varieties.

40% of the initial catechin concentration in the reaction medium for 1 mM compared to 28% and 10% for respectively 2.5 mM and 5 mM catechin. The reaction containing 1 mM and 5 mM catechin reached a plateau after 24 h for C4'OG and C7'OG. The same result was observed for C7OG yield: 25% for 1 mM and 13% and 4.5% for respectively, 2.5 mM and 5 mM. The higher the reagent concentration, the lower the reaction yield. We can hypothesize an excess of (+)-catechin can inhibit the enzyme activity. A substrate concentration at 1 mM was then chosen for further synthesis. On Fig. 4b, the overlaid extracted ion chromatograms (EIC) at m/z 451 of the enzymatic solution containing C4'OG and C7OG and of the merlot seed extract in P-II were compared. Based on the retention times and mass spectrometry results, our synthesized compounds would appear to be naturally present in the seed extracts. In fact, MS² fragmentation depicted on Fig. 4c, e. and on Fig. 4d, f show similar fragmentation patterns with aglycone formation at m/z 289 for both of our compounds, even if a coelution of different isomers cannot be completely ruled out. These monomers are the most polar of flavanol hexosides and they are the major isomers. The less polar isomer could be epicatechin hexosides derivatives but unfortunately, (-)-epicatechin was not a substrate for UGT71A15.

3.3. Study of Merlot grape composition at three different stages of development

Several isomers of monomeric and dimeric flavanol hexosides were detected in the skin and seed extracts of the three grape varieties, Merlot, Cabernet-Sauvignon and Syrah. Comparison was based on the assumption that compounds showing the same retention time and MS data were identical although some isomers might co-elute. In Fig. 5 and Appendix 4, histograms represent the ion intensities of targeted flavanol hexosides in seed and skin extracts at three different stages of grape development. Since the standards for these molecules are not available, these analyses allowed qualitative comparisons between samples rather than absolute quantification.

Merlot grape seed and skin extracts were first investigated. In seed, an increase of all monomeric flavanol hexosides was observed during development; these include the compounds eluted at 7.3 and 8.4 min, tentatively attributed respectively to C4'OG and C7OG based on

retention time and MS/MS fragmentation (loss of glucose), and also those eluted at 10.4, 11.3 and 11.8 min. The EIC intensities of the five monomeric flavanol hexosides increased from 10⁴ order of magnitude in P-I, to around 10⁵–10⁶ in P-II, and reached 4.10⁶ at maturity, P-III, for the major isomer. In Merlot skins, a small amount of monomer hexosides were detected in P-I. Both isomers of monomeric flavanol hexosides at 7.3 min and 8.4 min were distinguished at the earlier stage. The isomer attributed to C4'OG (7.3 min) was still present in P-II and finally no more detected at maturity.

Four flavanol dimer hexosides were detected in Merlot seed extracts and their distribution monitored during ripening. The most abundant one, eluted at 13.2 min, accumulated in seeds until P-II and was detected in skins in P-I and in P-III. Another isomer eluted at 8.6 min was present in higher amount in the seeds in P-I. The other ones were detected in trace amounts in seeds and skins in P-I (elution times at 12.2 and 13.2 min).

In Merlot seeds, five isomers of monomer hexosides and four isomers of dimer hexosides were detected, and in Merlot skin, two monomers and three dimers in small amount. For CS seeds, five monomers and three dimers were detected and one monomer and three dimers in CS skin. Finally, five monomers and three dimers were observed in Syrah seed extracts and three dimers and no monomer in skin (Appendix 3).

All the monohexosylated flavanols were detected in the different grape varieties except the flavanol dimer hexoside eluted at 7.7 min which was only detected in our Merlot sample. To compare tissues, in seeds, an accumulation of all flavanol monomer hexosides was measured during maturation and the isomer at 10.4 min was the most abundant in all grape varieties. The isomer of monomeric flavanol hexoside at 7.3 min was the second most present in CS and Syrah seed extracts but not in merlot seed. In skin, the targeted hexosides were detected in trace amounts with a major quantity of isomers detected during the P-I in all grape varieties.

The presence of flavanol hexoside monomers in Merlot seeds in P-III was in accordance with previous studies (Delcambre & Saucier, 2012) and was also evidenced in two other grape varieties in this work. In addition, dimeric flavanol hexosides were detected in grape seed and skin for the first time in our experiments. Additionally, the presence of

(epi)gallocatechin (m/z 467) and epicatechin gallate (m/z 603) hexosides were also investigated, but, their concentrations were below their detection levels in our samples.

3.4. Study of five red wine from different grape varieties

Analysis of five red wines from Tannat, Alicante, Merlot, Syrah and Grenache grape varieties showed that they contain similar levels of flavanol hexosides as shown on Fig. 6.

Concerning flavanol monomer hexosides, the wine from the Tannat variety had the highest number of isomers eluted at 7.3, 8.4, 10.4, and 11.3 min. Three flavanol monomer hexosides were detected in Syrah and Grenache wines at 7.3, 8.4 and 10.4 min. Also, Alicante and Merlot wines included only two isomers, at 10.4 and 11.3 min. All these flavanol hexosides were detected in grape seed at different levels. The flavanol monomeric hexoside at 10.4 min was one of the most abundant in all analyzed seed grapes and wines. On the contrary, the monomer isomer at 11.3 min was one of the most abundant compounds in wine but was not the major one in our grape seed extracts. Finally, the monomer hexoside detected at 11.8 min in seed extracts from all grape varieties seems to be absent in our wine samples.

The same three flavanol dimer hexosides at 12.2, 13.2 and 14 min were detected in the wines, except for the Grenache wine in which the dimer detected at 14 min was not present. The two dimeric flavanol hexosides detected at 12.2 and 13.2 min in wine were also present in Merlot, CS and Syrah grape seeds. But, the isomer at 14 min was absent in all grape extracts. Finally, we detected mostly a dimer at 13.2 in Syrah, Merlot and CS seeds in P-III and in wines.

To conclude, our results based on similarity of retention times and MS data suggest that the majority of flavanol hexosides detected in wines have a grape origin. Other flavanol hexosides (such as the dimer detected at 14 min) are present in wine but not in grape. Other biochemical pathways (production or degradations) from microorganisms (yeasts and bacteria) are also possible. Concerning the grapes, the genetic ability to produce these compounds seems to be shared amongst the different varieties but they were detected in different proportions which might be a result of different genetic expressions of some glycosyl transferase genes.

4. Conclusion

The presence of monomeric flavanol hexosides was confirmed in grape and red wines by mass spectrometry. Proanthocyanidin dimer hexosides were successfully detected in our samples with specific MS/MS fragmentations. The flavanol monomer and dimer hexosides were present in wines from different grape varieties (Tannat, Alicante, Merlot, Syrah, and Grenache) and also in Merlot, Syrah and CS grape berries. One of the flavanol monomer hexoside was found in grapes but not in wines. All (epi)catechin hexosides concentrations increased from P-I until P-III in seeds and decreases or were absent in skin. Standards of (+)-catechin 4'-O- β -glucoside and catechin-7-O- β -glucoside were obtained through an enzymatic hemisynthesis with the use of glycosyl transferase UGT71A15. The presence of these compounds in analyzed grape seeds, skins and wines was evidenced based on HPLC–MS analysis. The mechanisms of formation of those hexosylated flavanols and their possible roles in proanthocyanidin biosynthesis in grapes remain to be elucidated.

Funding

This work was supported in part by a PhD grant (M.Z.) from the University of Montpellier (Bourse école doctorale GAIA)

References

Ali, A., & Strommer, J. (2003). A simple extraction and chromatographic system for the

- simultaneous analysis of anthocyanins and stilbenes of *Vitis* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7246–7251.
- Bogs, J., Downey, M. O., Harvey, J. S., Ashton, A. R., Tanner, G. J., & Robinson, S. P. (2005). Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. *American Society of Plant Biologists*, 139(2), 652–663.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M. V., Velders, A. H., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2009). Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* Cv. petit verdot red wine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1), 209–219.
- Corder, R., Mullen, W., Khan, N. Q., Marks, S. C., Wood, E. G., Carrier, M. J., & Crozier, A. (2006). Oenology: Red wine procyanidins and vascular health. *Nature*, 444, 566.
- Cui, E.-J., Song, N.-A., Shrestha, S., Chung, I.-S., Kim, J.-Y., Jeong, T.-S., & Baek, N.-I. (2016). Flavonoid glycosides from cowpea seeds (*Vigna sinensis* K.) inhibit LDL. *Food Science and Biotechnology*, 21(2), 619–624.
- Delcambre, A., & Saucier, C. (2012). Identification of new flavan-3-ol monoglycosides by UHPLC-ESI-Q-TOF in grapes and wine. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(6), 727–736.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., & Robinson, S. P. (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(1), 15–27.
- Dueñas, M., Sun, B., Hernández, T., Estrella, I., & Spranger, M. I. (2003). Proanthocyanidin composition in the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7999–8004.
- Foo, L. Y., & Karchesy, J. J. (1989). Polyphenolic glycosides from Douglas fir inner bark. *Phytochemistry*, 28(4), 1237–1240.
- Friedrich, W., & Galens, R. (2002). Identification of a new flavanol glucoside from barley (*Hordeum vulgare* L.) and malt. *European Food Research and Technology*, 214(5), 388–393.
- Fujita, A., Soma, N., Goto-Yamamoto, N., Shindo, H., Kakuta, T., Koizumi, T., & Hashizume, K. (2005). Anthocyanidin reductase gene expression and accumulation of flavan-3-ols in grape berry. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(4), 336–342.
- Gosch, C., Halbwirther, H., Schneider, B., Hölscher, D., & Stich, K. (2010). Cloning and heterologous expression of glycosyltransferases from *Malus × domestica* and *Pyrus communis*, which convert phloretin to phloretin 2'-O-glucoside (phloridzin). *Plant Science*, 178(3), 299–306.
- Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., & Prior, R. L. (2003). Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolic degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7513–7521.
- Hmamouchi, M., Es-Safi, N., Lahrichi, M., Fruchier, A., & Essassi, E. M. (1996). Flavones and flavonols in leaves of some Moroccan *Vitis vinifera* cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(2), 186–192.
- Kim, H.-J., Yeom, S.-H., Kim, M.-K., Shim, J.-G., Lim, H.-W., & Lee, M.-W. (2004). Nitric oxide and prostaglandin E2 synthesis inhibitory activities of flavonoids from the barks of *Ulmus macrocarpa*. *Natural Product Sciences*, 10(6), 344–346.
- Lepak, A., Gutmann, A., Kulmer, S. T., & Nidetzky, B. (2015). Creating a water-soluble resveratrol-based antioxidant by site-selective enzymatic glycosylation. *A European Journal of Chemical Biology*, 16(13), 1870–1874.
- Li, H.-J., & Deinzer, M. L. (2007). Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. *Analytical Chemistry*, 79(4), 1739–1748.
- Monagas, M., Bartholomé, B., & Gomez-Cordovés, C. (2007). Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(2), 85–118.
- Nonaka, G.-I., Ezaki, E., Hayashi, K., & Nishioka, I. (1983). Flavanol glucosides from *rhubarb* and *Rhaphiolepis umbellata*. *Phytochemistry*, 22(7), 1659–1661.
- Pang, Y., Cheng, X., Huhman, D. V., Ma, J., Peel, G. J., Yonekura-Sakakibara, K., ... Dixon, R. A. (2013). Medicago glycosyltransferase UGT72L1: Potential roles in proanthocyanidin biosynthesis. *Planta*, 238, 139–154.
- Pang, Y., Peel, G. J., Sharma, S. B., Tang, Y., & Dixon, R. A. (2008). A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glycosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula*. *PNAS*, 105(37), 14210–14215.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, I. (2011). Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *A Journal of the Gesellschaft Deutscher Chemiker*, 50(3), 586–621.
- Raab, T., Barron, D., Arce Vera, F., Crespy, V., Oliveira, M., & Williamson, G. (2010). Catechin glucosides: Occurrence, synthesis, and stability. *Food Chemistry*, 58(4), 2138–2149.
- Simirgiotis, M. J., Silva, M., Becerra, J., & Schmeda-Hirschmann, G. (2012). Direct characterisation of phenolic antioxidants in infusions from four *Mapuche* medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). *Food Chemistry*, 131(1), 318–327.
- Smaali, I., Maugard, T., Limam, F., Legoy, M.-D., & Marzouki, N. (2007). Efficient synthesis of gluco-oligosaccharides and alkyl-glucosides by. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 145–149.
- Tanaka, T., Kataoka, M., Tsuboi, N., & Kouno, I. (2000). New monoterpene glycoside esters and phenolic constituents of *Paeoniae radix*, and increase of water solubility of proanthocyanidins in the presence of paeoniflorin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(2), 201–207.
- Tanner, G. J., & Kristiansen, K. N. (1993). Synthesis of 3,4-cis-[3H]leucocyanidin and enzymatic reduction to catechin. *Analytical Biochemistry*, 209(2), 274–277.
- Terrier, N., Ollé, D., Verriès, C., & Cheynier, V. (2009). Biochemical and molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development. *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*, 365–388.
- Versari, A., Parpinello, G. P., Tornielli, G. B., Ferrarini, R., & Giulivo, C. (2001). Stilbene

- compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. corvina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5531–5536.
- Vic, G., Biton, J., Le Beller, D., Michel, J. M., & Thomas, D. (1994). Enzymatic glucosylation of hydrophobic alcohols in organic medium by the reverse hydrolysis reaction using almond- β -D-glucosidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 46(2), 109–116.
- Vihakas, M., Tahtinen, P., Ossipov, V., & Salminen, J.-P. (2012). Flavonoid metabolites in the hemolymph of European pine sawfly (*Neodiprion sertifer*) Larvae|SpringerLink. *Journal of Chemical Ecology*, 38(5), 538–546.
- Watanabe, M. (1998). Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Groats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(3), 839–845.
- Xie, D.-Y., Shamma, S. B., Paiva, N. L., Ferreira, D., & Dixon, R. A. (2003). Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. *Science*, 299(5605), 396–399.
- Zhao, J., & Dixon, R. A. (2009). MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21(8), 2323–2340.

*Chapitre 3 – Evolution de la teneur en
flavanols glycosylés au cours de la
maturation du raisin*

Les flavanols glycosylés sont des composés d'intérêt en tant que transporteurs des unités de (épi) catéchine et potentiellement en tant qu'intermédiaires dans la biosynthèse des PA (Zhao and Dixon, 2009), (Marinova, *et al.*, 2007). Le second objectif principal de cette thèse fut ainsi d'analyser leur présence au cours du développement de la baie de raisin. Les pépins et la pellicule de raisin contiennent des concentrations élevées en flavanols (Peyrot des Gachons and Kennedy, 2003), (Terrier, *et al.*, 2009). Les flavanols s'accumulent majoritairement avant véraison (Kennedy, *et al.*, 2001). Il est alors intéressant d'étudier les cinétiques des teneurs en flavanols glycosylés au cours du développement de la baie de raisin.

Ce chapitre présente dans une première partie le développement d'une méthode originale d'analyse de divers flavanols glycosylés basée sur de la détection par spectrométrie de masse. Dans une seconde partie, cette méthode d'analyse quantitative a été utilisée sur des échantillons de raisins provenant de différents cépages à plusieurs stades de développement. Les résultats associés ont donné lieu à la rédaction d'une deuxième publication (**article 2**) en cours de soumission : ***Identification and quantification of flavanol glycosides in Vitis Vinifera grape seeds and skins during ripening.***

1. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ANALYSE POUR L'IDENTIFICATION ET LA QUANTIFICATION DES FLAVANOLS GLYCOSYLES

La technique d'analyse permettant de quantifier les monomères et dimères de flavanols glycosylés utilisée a été la chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse triple quadripôle en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring).

La séparation des molécules d'intérêt dans nos échantillons a été réalisée en chromatographie liquide ultra haute performante (UHPLC). La méthode choisie est détaillée dans l'article 2.

Le développement de la méthode d'analyse et de détection des flavanols glycosylés s'est basé sur l'optimisation des deux parties du spectromètre de masse illustrées en **Figure 24** :

- la source d'ionisation
- L'analyseur de type triple quadripôle

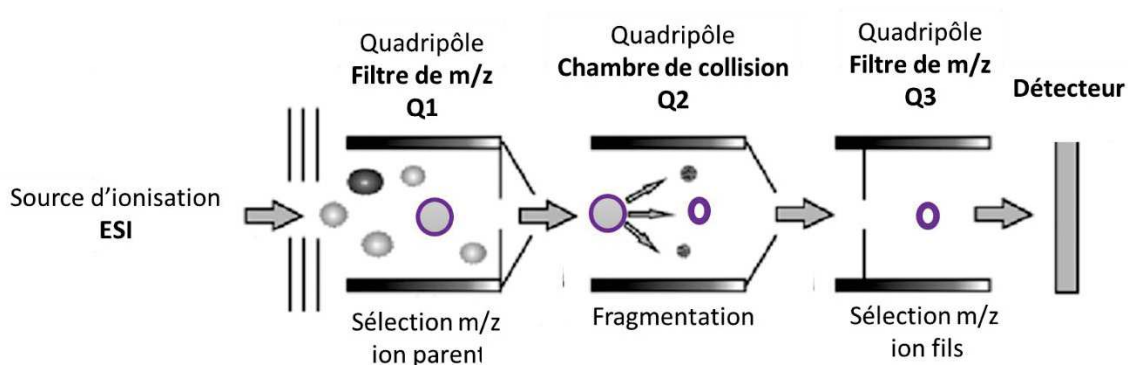


Figure 24 – Schéma d'un spectromètre de masse triple quadripôle opérant en mode MRM

Premièrement, les molécules d'intérêt doivent être ionisées pour que leurs rapports m/z puissent être mesurés par le spectromètre. La méthode d'ionisation utilisée pour nos expériences a été l'ElectroSpray Ionisation (ESI) en mode négatif. Les paramètres liés à cette source concernent l'énergie d'ionisation, les températures d'évaporation et du gaz de nébulisation, la pression du gaz ainsi que son débit. Afin d'effectuer une ionisation optimale,

les ions parents (m/z) correspondant aux flavanols mono et diglycosylés ont été ciblées. Un logiciel permettant la mise en place automatique d'un plan d'expérience a été utilisé pour tester les valeurs optimales des paramètres cités plus haut. A la fin des acquisitions, un ensemble de paramètres a été choisi.

Le développement de la méthode a consisté deuxièmement à optimiser les paramètres du triple quadripôle pour l'analyse des échantillons en mode MRM. Cette étape nécessite la détection d'ions parents et d'ions fils caractéristiques des différents flavanols glycosylés (**Tableau 3**) présents dans un échantillon. Pour cela, un mélange a été réalisé à partir de deux extraits riches en polyphénol ; un de pépin et un autre de pellicule de Tannat à maturité. Le protocole d'extraction est spécifié dans **l'article 2**. Une infusion du mélange est effectuée pendant 30 secondes. Cette étape permet l'acquisition du spectre de masse MS2 de chaque ion parent ciblé avec leur m/z correspondant listé dans le **Tableau 3**.

| Composés | m/z |
|-------------------------------|------|
| (épi) catéchine (M) | 289 |
| (épi) gallocatéchine (EGC) | 305 |
| (épi) catéchine gallate (ECG) | 441 |
| M monoglycosylé (MMG) | 451 |
| EGC MG | 467 |
| ECG MG | 603 |
| EC diglycosylé (DG) | 613 |
| EGC DG | 629 |
| ECG DG | 765 |
| dimère d'EC (D) | 577 |
| DMG | 739 |
| DDG | 901 |
| trimère d'EC (TEC) | 865 |
| TEC MG | 1027 |
| TEC DG | 1189 |
| quadrimère d'EC (QEC) | 1153 |
| QEC MG | 1315 |
| QEC DG | 1477 |

Tableau 3 – Liste des composés d'intérêt avec leur masse ionisée (mode négatif) correspondante (m/z)

Des ions fils sont alors choisis pour chaque ion parent : un pour la quantification et les autres (si détectés) pour l'identification ; deux exemples sont illustrés en **Figure 25**. Cette étape est spécifique de la quantification en mode MRM. De là, les transitions (ion parent -> ion fils) ont pu être optimisées à travers les trois paramètres du triple quadripôle notés Q1, Q2 et Q3.

Comme illustrée sur la **Figure 24**, un échantillon est injecté dans le spectromètre permettant l'ionisation des molécules par la source. Les ions produits entrent ensuite dans le premier quadripôle. L'analyse Q1 fonctionne alors en mode filtre : les différences de potentiels appliquées sur le premier quadripôle de l'analyseur permettent alors de sélectionner un ion avec un m/z spécifique (ion parent) qui sera alors le seul à pouvoir traverser cet analyseur pour arriver en Q2. Cet ion parent, entouré en violet sur la **Figure 24**, entre dans le deuxième quadripôle correspondant à la cellule de collision. Cette cellule

permet, en appliquant une énergie spécifique, la fragmentation des ions par collision avec les molécules de gaz remplissant la cellule (He). Les ions fils sont issus de cette fragmentation. Finalement, les différences de potentiels appliquées à l'analyseur quadripolaire Q3 permettent de filtrer l'ion fils sélectionné.

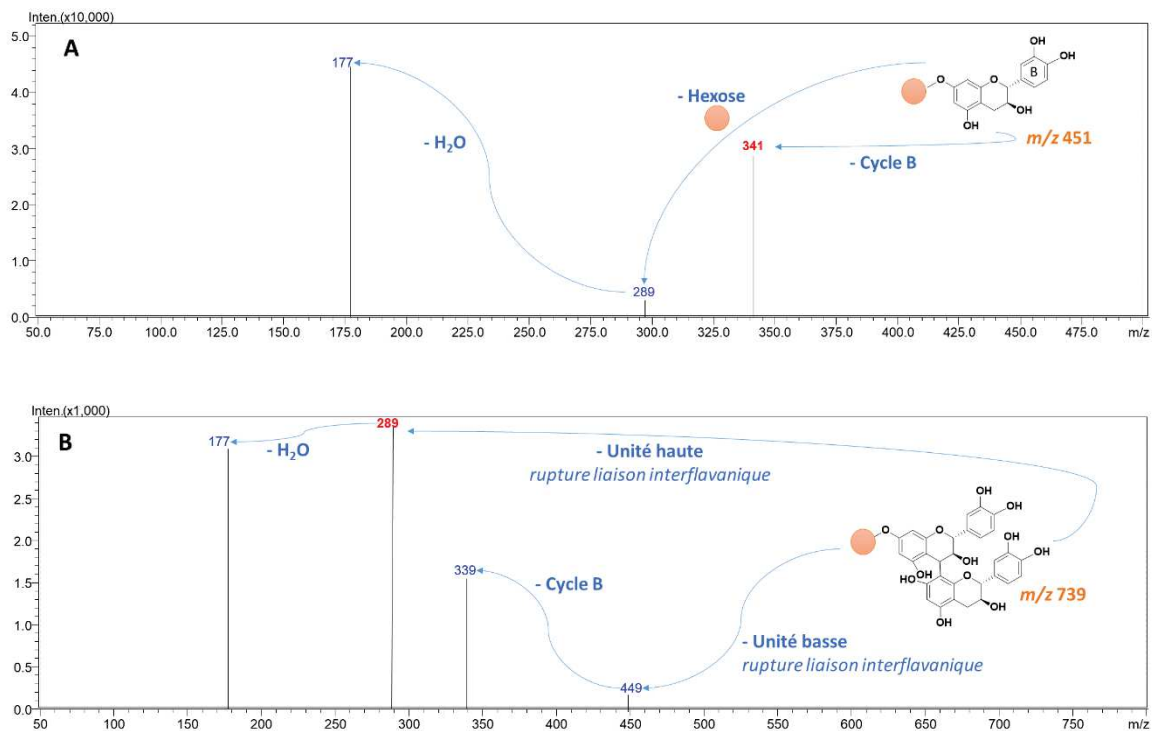


Figure 25 – Exemples de spectres de masse du second ordre avec les ions fils sélectionnés :

A. (épi) catéchine glycosylés (m/z 451) ; **B.** dimère d' (épi) catéchine glycosylé (m/z 739)

En rouge, la masse de l'ion de quantification et en noir la masse des ions de qualification

2. QUANTIFICATION DES FLAVANOLS GLYCOSYLES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DE LA BAIE

2.1. Introduction de l'article 2

L'identification et la quantification des flavanols glycosylés a été effectuée grâce à la méthode d'UHPLC-ESI-QqQ-MRM développée dans l'article ci-dessous.

Tout d'abord, il est à noter que l'analyse des EGC, des ECG et de leurs dérivés (glycosides et polymères) n'ont donné aucun résultat probant dans nos échantillons. De plus, les trimères et quadrimères d' (épi) catéchine et leurs dérivés glycosylés n'ont pas été détectés. L'absence ou la faible détection de ces composés peut s'expliquer par leur faible présence dans le raisin. La méthode de détection du spectromètre a en effet été optimisée sur les flavanols glycosylés et non glycosylés majoritaires. Une optimisation des paramètres de masse sur les composés à faibles concentrations constitue ainsi une perspective de travail.

L'article soumis n° 2 a pour titre « **Identification and quantification of flavanol glycosides in *Vitis Vinifera* grape seeds and skins during ripening** ». Il porte sur la présence de monomères et de dimères d' (épi) catéchine monoglycosylés, et diglycosylés présents dans les pellicules et les pépins de raisin. L'étude a porté sur trois variétés différentes, la Syrah, le Merlot et le Tannat récoltées à différents stades de développement. Il a ainsi été montré que :

- Les monomères et dimères d' (épi) catéchine diglycosylés ont été découverts pour la première fois et uniquement dans les pépins de raisins.
- L'évolution des teneurs en flavanols mono et diglycosylés au cours du développement du raisin a été étudiée séparément dans les pellicules et les pépins des raisins des trois variétés considérées.
- Une diminution en monomères d' (épi) catéchine monoglycosylés a été observée dans la pellicule au cours de la maturation du raisin Les dimères s'accumulent un peu après le point de véraison et ensuite diminuent lorsque la baie est à maturité.

Les monomères et dimères d' (épi) catéchine diglycosylés s'accumulent dans les pépins au cours de la maturation.

2.2. Rectifications article 2

2.2.1. Matériels et méthodes

Les raisins utilisés lors de cette étude ont été prélevés au Campus de la Gaillarde à Montpellier à quatre stades de développement différents : avant véraison, proche véraison, après véraison et à maturité pour les cépages Tannat et Syrah. Pour le Merlot, les mêmes prélèvements ont réalisés comptant un stade en plus durant la période post véraison. La **Figure 26** montre l'évolution du degré d'alcool potentiel des trois cépages étudiés en fonction du temps de développement. A noter que ce paragraphe permet de rectifier une erreur de la **figure 6** de l'**article 2** ci-après. En effet, il ne s'agit pas du degré Brix pour l'unité des ordonnées mais du degré d'alcool potentiel.

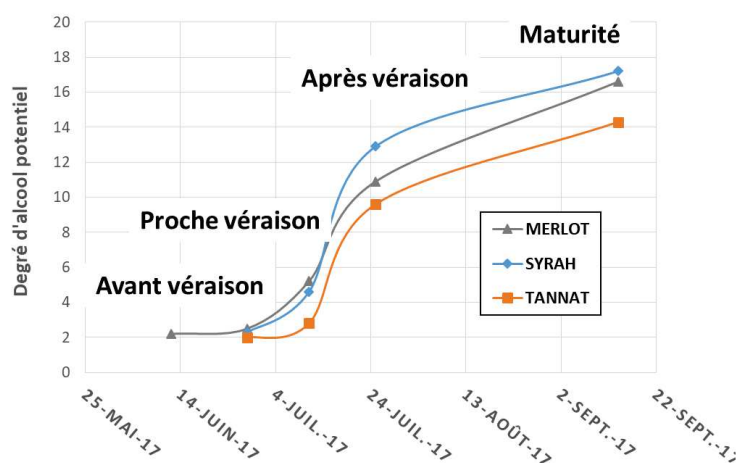


Figure 26 - Evolution du degré d'alcool potentiel des trois cépages Merlot, Syrah et Tannat au cours du temps

La concentration en flavanols glycosylés est calculée par pépins et pellicule d'une baie de raisin, sur matière fraîche, et quantifiée et semi-quantifiée par la (+)-catéchine 4'-O- β -glucoside synthétisée. Les flavanols « classiques » (monomères et dimères) ont été quantifiés et semi-quantifiés par mesure de la courbe de calibration de la (+)-catéchine commerciale.

2.2.2. Nombres d'isomères de flavanols glycosylés retrouvés dans les pellicules et pépins de raisins analysés

Les quantités d'isomères doivent être rectifiées par rapport à celles décrites dans l'article 2. Le tableau 4 regroupe les chiffres justes des différents flavanols glycosylés retrouvés dans nos échantillons.



| Noms (<i>m/z</i>) | MMG (451) | MDG (613) | DMG (739) | DDG (901) |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>Pépins</i> | 9 | 9 | 19 | 3 |
| <i>Pellicules</i> | 10 | 0 | 12 | 0 |

Tableau 4 – Nombres d'isomères de flavanols glycosylés retrouvés dans les pépins et pellicules de Merlot, Syrah et Tannat.



Article

Identification and Quantification of Flavanol Glycosides in *Vitis vinifera* Grape Seeds and Skins during Ripening

Marie Zerbib ¹, Guillaume Cazals ², Christine Enjalbal ²  and Cédric Saucier ^{1,*} 

¹ Science Pour l'œnologie Univ Montpellier, INRA, Montpellier Supagro, 34000 Montpellier, France; marie.zerbib@umontpellier.fr

² IBMM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, 34000 Montpellier, France; guillaume.cazals@umontpellier.fr (G.C.); christine.enjalbal@umontpellier.fr (C.E.)

* Correspondence: cedric.saucier@umontpellier.fr; Tel.: +33-(0)4-11-75-95-67

Received: 25 September 2018; Accepted: 19 October 2018; Published: 24 October 2018



Abstract: Monomeric and dimeric flavanol glycosides were analyzed in *Vitis vinifera* grapes and seeds during ripening. An analytical method using ultra-high performance liquid chromatography coupled with a triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS) in multiple reaction monitoring (MRM) mode was employed. Three grape varieties (Merlot, Syrah and Tannat) were chosen and grape berries were sampled at different stages of development. Ten monoglycosylated and six diglycosylated flavanol monomers were detected. Twelve monoglycosylated and three diglycosylated flavanol dimers were also detected for all three grape varieties. All glycosides were detected for the first time in *Vitis vinifera* grapes, though some of these compounds were only detected in skins or seeds. Furthermore, the evolution of all these compounds was studied, and a decrease in monomeric (epi) catechin monoglycosides was observed during ripening for Tannat, Merlot and Syrah grape skins. The dimers would appear to accumulate in skin tissues up to mid-summer (after veraison) and decrease when grape berries reached maturity.

Keywords: grape ripening; flavan-3-ol; glycoside; diglycoside; MRM; mass spectrometry

1. Introduction

Flavan-3-ols belong to the flavonoid class of phenolic compounds, otherwise known as flavanols. They may be present in plants in the form of monomers, proanthocyanidins (PA) polymers or condensed tannins. The monomeric units are usually linked in polymers through C4–C6 or C4–C8 linkages (B type dimer) and sometimes with additional C2–O–C5 or C2–O–C7 bonds (A type dimer). They are present in a wide variety of natural products [1] including chocolate and cocoa (up to 920–1220 mg/100 g), apples (up to 60 mg/100 g), grapes (up to 100 mg/100 g) and tea (up to 300 mg/infusion) [2,3]. Flavanol composition depends greatly on the biological tissue, method of cultivation, and grape variety. In *Vitis vinifera* berries, four principal units of PA are usually found: (+)-catechin, (–)-epicatechin, (–)-epigallocatechin and (–)-epicatechin gallate. Grape seeds contain greater amounts of (–)-epicatechin gallate [4] and generally of flavanols [5]. PA polymers are longer in skins than in seeds. Their average degree of polymerization (DP) ranges from three to 16 in seeds [6], whereas it varies from 10 to 40 in skins [7,8], though even higher values were measured (up to 100) [9,10].

These secondary metabolites represent a bioactive group with health properties, having a potential role in lowering the risk of cardiovascular disease and as antimicrobial and antiviral agents [2,11,12]. They are also involved in plant defense against biotic and abiotic stress [13]. In humans, improved assimilation is obtained by conjugation of the molecules with methyl, glucuronate, glucosyl or sulfate functions [4,14,15].

An *in vivo* study on rats also showed that intestinal absorption of catechin may be increased for catechin glucosides [16]. Catechin glycosylated conjugates may thus be of interest as components of natural food supplements.

The roles of glycosylated flavanols in plant metabolism are not yet fully understood; it has been suggested that they could be involved in PA biosynthesis [17]. In fact, the polymerization mechanism of flavanol constitutes the black box of the PA pathway, and consequently is an important topic in current Enology research [10]. Dixon and collaborators demonstrated that the over-expression of a glucosyltransferase, UGT72L1, in the seed coat of *Medicago truncatula* induced increased accumulation of PA-like compounds, and at the same time, catalyzed the formation of epicatechin 3'-O-glucoside [18]. Flavanol glycosides allow the PA units to transfer into the vacuole and may constitute a PA precursor during polymerization.

Monomeric flavanol glycosides have been reported in diverse plants such as elm [19], barley [20], lentils [21], cowpea [22,23] or buckwheat [24]. Fourteen glycoside isomers of (+)-catechin, (–)-epicatechin, (–)-epigallocatechin and (–)-epicatechin gallate were detected in Merlot grape seeds and wine [25]. Dimeric forms of glycosylated flavanols are also present in plants, but some have been described in the literature; for example, 3-O- β -catechin-(4- α -8)-catechin-D-glucoside was identified in blackjack oak [26]. More recently, we detected, using ion-trap UPLC-MS, dimeric and monomeric (epi) catechin glycosides in grapeberries at different development stages in Merlot, Syrah and Cabernet-Sauvignon varieties [27]. In addition, a procyanidin dimer-7-O-diglucoside was identified in cowpea [23].

In this paper we describe the development of a new quantitative analytical strategy involving ultra-high performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (UHPLC-ESI-QqQ-MS/MS) using the multiple reaction monitoring (MRM) method to quantify flavanol glycosides during grape ripening. This technique has already been used for the characterization of flavonoids in complex samples of grape extracts and wine [28,29]. MRM is a sensitive and highly specific detection method based on the analysis of a highly characteristic fragment ion of the targeted parent ion from the compounds of interest. Skin and seed compositions from three different varieties (Merlot, Syrah and Tannat) were investigated separately.

2. Results and Discussion

2.1. Identification of Flavanol Glycosides in Grape Skins and Seeds

Flavanol monoglycosides and diglycosides in polyphenol extracts of grape skins and seeds were analyzed, targeting the specific parent ion of each sample and their most characteristic daughter ion fragments. Identification was carried out by comparing retention times and both qualifier and quantifier ions. Ten flavanol monomer glycosides, 10 flavanol monomer diglycosides, 19 flavanol dimer monoglycosides, and three flavanol dimer diglycosides were detected. This is the first time these two diglycoside families in grapes have been reported in grape berries. These compounds may correspond to isomers, with sugar moieties on A, B or C rings, and R or S configuration on the asymmetric carbons producing, once ionized, very specific MS fragmentation patterns as previously described [25,27].

2.1.1. Flavanol Glycoside Monomers

The first objective of this study was to identify the flavanol glycosides isomers present in samples in Merlot, Syrah and Tannat grape skins (sk) or seeds (se), as listed in Table 1. Two types of monomers were screened: flavanol monomers comprising one (glycosides) or two hexose (diglycosides) in their structures.

Table 1. (Epi) catechin glycosides isomer peaks with their related retention time and fragmentation pattern from MS/MS analysis.

| Peaks | RT (min) | Tissues, Seeds (se), Skins (sk) | MS/MS Product Ions m/z | Compounds (Corresponding m/z) | |
|----------|----------|---------------------------------|------------------------------|--|--|
| 1 | 36.95 | se, sk | 177; 289; 341 | (epi) catechin monoglycoside (451) | |
| 2 | 38.60 | sk | 177; 341 | | |
| 3 | 45.72 | se, sk | 177; 341 | | |
| 4/5 | 52.33 | se, sk | 177; 289; 341 | | |
| 6/7 | 53.77 | se, sk | 177; 289; 341 | | |
| 8/9/10 | 55.99 | se, sk | 177; 341 | | |
| 11/12 | 23.33 | se | 577; 289 | (epi) catechin diglycoside (613) | |
| 13 | 24.15 | se | | | |
| 14 | 27.74 | se | | | |
| 15/16 | 30.57 | se | | | |
| 17/18 | 32.64 | se | | | |
| 19 | 44.17 | se | | | |
| 20/21 | 18.48 | se, sk | 177; 287; 289; 451; 577 | (epi) catechin dimer monoglycoside (739) | |
| 22 | 19.54 | se | 177; 287; 289; 451; 577 | | |
| 23/24/25 | 21.20 | se, sk | 177; 287; 289; 339; 451; 577 | | |
| 26 | 22.21 | se, sk | 177; 287; 289; 339; 451; 577 | | |
| 27/28 | 23.52 | se, sk | 177; 287; 289; 339; 451; 577 | | |
| 29/30 | 26.17 | se | 177; 287; 289; 339; 451; 577 | | |
| 31/32 | 28.04 | se | 177; 289; 451; 577 | | |
| 33 | 34.13 | se, sk | 177; 287; 289; 339; 451; 577 | | |
| 34 | 35.75 | se, sk | 177; 287; 289; 339; 451; 577 | | |
| 35/36 | 37.85 | se, sk | 177; 289; 339; 451; 577 | | |
| 37 | 48.39 | se | 287; 289; 339; 451 | | |
| 38 | 53.73 | se | 287; 289; 339; 451; 577 | | |
| 39 | 18.09 | se | 407 | | (epi) catechin dimer diglycoside (901) |
| 40 | 19.25 | se | | | |
| 41 | 21.43 | se | | | |

The principal MS/MS transition observed for flavanol monomer glycosides (m/z 451), corresponded to the fragment ion at m/z 341, which results from the loss of the B ring (-110). This was then chosen as the quantifier transition. To further target specific compounds, transitions from qualifier ions were used and are listed in Table 2, (MS/MS product ions); MS^2 fragment at m/z 177 correspond to loss of hexose and water, and the m/z 289 fragment corresponds to the loss of a glucose moiety. Given the location of glucose at one of five possible positions on A, B or C rings, in either the R or S configuration of carbon 3 on ring C, ten possibilities of mono glycosylated (epi) catechin species may be identified. The associated chromatogram extracted from Tannat seed extract of the targeted transition {451 \rightarrow 341} is presented in Figure 1a. The 10 peaks correspond to all potential isomers of monomeric (epi) catechin glycosides and are presented in Table 2.

Table 2. MRM parameters for each (epi) catechin glycosides derivatives.

| Compound | Precursor Ion | Product Ion | Q1 Prebias | Collision Energy (eV) | Q3 Prebias |
|----------|---------------|-------------|------------|-----------------------|------------|
| 1 | 451 | 341 | 22 | 18 | 25 |
| 2 | 739 | 289 | 40 | 31 | 26 |
| 3 | 613 | 577 | 30 | 12 | 22 |
| 4 | 901 | 407 | 24 | 49 | 14 |

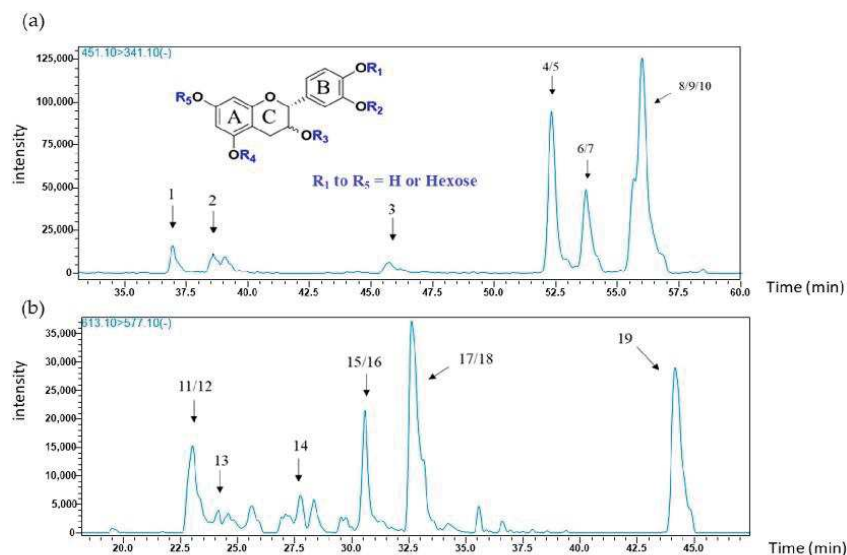


Figure 1. MRM profiles from the UHPLC-MS analysis of (a) (epi) catechin glycosides [451 → 341] and (b) (epi) catechin diglycosides [613 → 577] of a grape seed extract (Tannat, 25 July).

Using electrospray ionization quadrupole time-of flight mass spectrometry, Delcambre et al. (2012) identified eight different monomers in Merlot seeds and wine, but none were found in Merlot skins [25]. More recently, five isomers were detected in seeds of three different grape varieties (Syrah, Merlot and Cabernet-Sauvignon), and in several wines made from Tannat, Alicante, Merlot, Syrah and Grenache grapes. Between zero and two isomers were identified in skins depending on grape variety [27]. Based on retention time and characteristic transitions, the C4'OG standard was identified as one of the co-eluting peaks 8, 9 or 10. It may also be observed that all glycosylated flavanol monomers (peaks 1 to 10) were detected in skins and seeds of the three grape varieties at all stages of development, with the exception of peak 2 at 38.6 min. Previous studies showed that grape skins contain a small amount of hexoside monomers during grape ripening, whereas these compounds were not found at maturity [25,27].

In this study, monomeric (epi) catechin diglycosides in grapes are reported for the first time, although flavonoid diglycosides were already described in the literature. Flavanol diglycosides in particular were detected in plums [30,31], and anthocyanin diglycosides, such as cyanidin-3,5-*O*-diglucoside, and malvidine-3,5-*O*-diglucoside in red grape skins and red wines were also reported [32,33]. The chosen quantifier transition corresponds to (epi) catechin diglycosides fragmentation (m/z 613), producing the fragment at m/z 577 (double dehydration). The chosen qualifier fragment corresponds to the loss of the two sugar moieties producing a catechin ion (m/z 289). The superposition of MS/MS chromatograms from each grape variety (seeds and skins) showed nine common peaks with the retention times given in Table 1. An example of the associated chromatograms from the targeted transition [613 → 577] in Tannat seed extract is shown in Figure 1b. The monomeric flavanol diglycosides corresponding to peaks 11 to 19 are all present in all grape seeds.

2.1.2. Flavanol Glycoside Dimers

Two types of (epi) catechin dimers, (epi) catechin dimer monoglycosides and diglycosides were investigated in this study. The following paragraphs explain the common compounds detected in seed and skin grape samples in terms of MS/MS fragments and their related retention times.

Dimeric flavanol glycosides (m/z 739) were investigated for the second time in grapeberries [27]. The most intense transition used for quantification was the fragment at m/z 289 which yielded an ion fragment at m/z 289, corresponding to the well-known quinone methide cleavage (QM). Quantifier ions of masses of 177, 287, 339, 451, and 577, were also described in our previous study cited above [27], and as shown in Figure 2a, the chromatogram representing the targeted transition $\{739 \rightarrow 289\}$, we report here 19 flavanol dimer glycosides; their associated retention times and specific fragments are summarized in Table 2. MS² fragments at m/z 289 would be obtained from a QM without the fragment at m/z 449, indicating that the hexose position could be attached on the upper unit. MS³ fragment at 339 may arise from the loss of the B ring (-110) from the fragment at 449. MS² fragments at m/z 287 and 451 arise from two potential fragmentations: either a QM indicating that the hexose is possibly positioned on the lower unit, or of heterocyclic ring fission (HRF) with the sugar attached on the upper unit of ring A. The former hypothesis could possibly be indicated by co-elution of two different dimer structures. Previous work showed the presence of both the above compounds in grape seeds and skins, and it was observed that depending on the variety, three to four isomers were detected in seeds, and three isomers in skins [27]. In this study, seed polyphenol extracts from the three varieties contain more flavanol glycoside dimers corresponding to peaks 20 to 38 in Table 2. In skin extracts, they were also observed except peaks 22, 29, 30, 31, 32, 37 and 38 in all grape varieties.

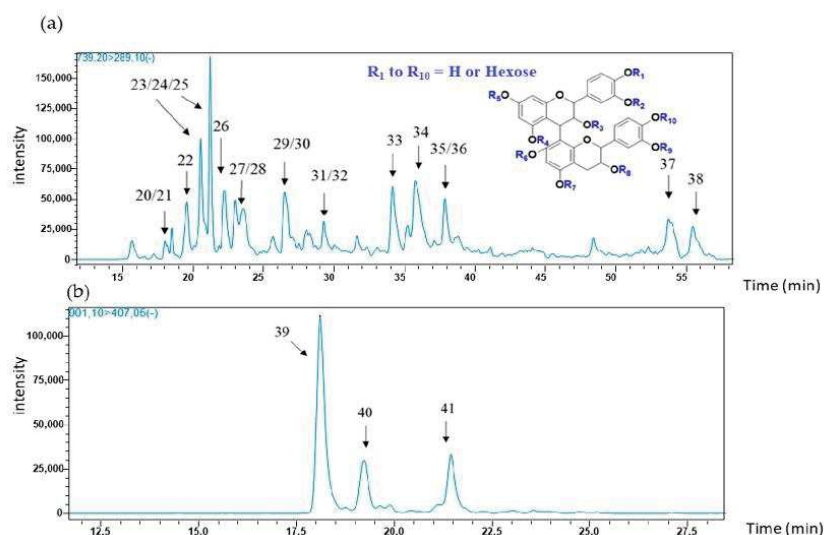


Figure 2. MRM profiles from the UHPLC-MS analysis of (a) (epi) catechin dimer glycosides $\{739 \rightarrow 289\}$ and (b) (epi) catechin dimer diglycosides $\{901 \rightarrow 407\}$ of a grape seed extract (Tannat, 25 July).

Dimeric (epi) catechin diglycosides (m/z 901) were investigated for the first time in *Vitis vinifera* grapes. In the literature, a procyanidin dimer-*O*-diglycoside was recently detected in cowpea [23]. Their fragmentation is characterized by an ion with m/z at 407 (quantifier and qualifier). This fragmentation pattern results from the loss of the two sugar moieties (-162×2) followed by a classical Retro Diels Alder fission (-152) and dehydration (-18) [34]. The MRM profile obtained for these compounds from the targeted transition $\{901 \rightarrow 407\}$ in Tannat grape seeds is presented in Figure 2b. These three isomers were found in each polyphenol seed extract from the three grape varieties, and were not detected in skin samples in any of the grape varieties.

2.2. Quantification of Flavanol Glycosides in Syrah, Tannat and Merlot Grape Skins and Seeds during Ripening

Monomers and dimers of glycosylated flavanols were quantified separately in skins and seeds of Syrah, Tannat and Merlot grapes at different stages of grape development. The ripening of Syrah and Tannat is similar, and consequently in 2017 both were sampled on 28 June, 11 and 25 July, and 14 September. Merlot, on the other hand, ripens earlier and therefore an additional sampling took place on 12 June. Concentrations were expressed in ng per skin or seeds for one berry. The aim was to follow grape ripening, regardless of water or sugar accumulation. The mono- and di-glycosides were separated into two groups (monomers or dimers) and were quantified and semi quantified by MRM using a calibration curve of C4'OG. Changes in skins and seeds were studied separately, and results are discussed in the following two sections.

2.2.1. Changes in Monomeric and Oligomeric Flavanol Glycosides in Grape Skins during Ripening

Monomeric and dimeric flavanol glycosides in grape skins from the three varieties were semi quantified, and results are presented in Figure 3a,b, respectively.

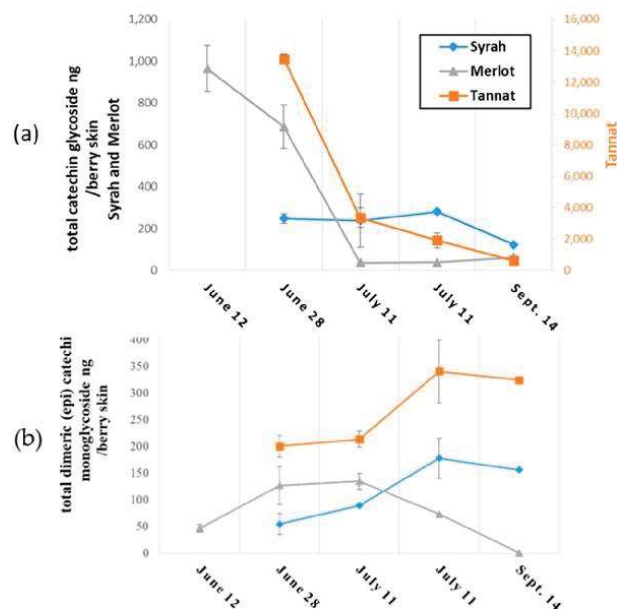


Figure 3. Evolution of (a) monomeric (epi) catechin glycosides and (b) (epi) catechin dimeric glycosides in grape skins during ripening.

Monoglycosylated (epi) catechin monomers are present in all three grape varieties as may be observed in Figure 3a. Greater amounts of the target compounds in polyphenol extracts of skins were found at the start of ripening: their concentrations in Tannat, Merlot and Syrah were approximately 14 mg, 1 mg and 250 ng, respectively. Tannat skins were 10-fold richer in monoglycosides than Merlot skins, and 50 times greater than in Syrah skins. A decrease in the concentration of the compounds was observed during berry development for all skins. Nevertheless, a small increase in monomeric (epi) catechin glycosides was observed in Merlot skins from 25 July to 14 September. These compounds in mature grape skins are reported here for the first time, which may be attributed to the greater detection sensitivity of our method. The concentrations of the glycosides described here are 10^3 to 10^4 times lower than the corresponding non-glycosylated flavanol monomers reported in the literature [35].

Changes in the concentrations of (epi) catechin dimer monoglycosides during ripening are presented in Figure 3b. The first observation was that monoglycoside composition evolved in a similar manner for both Tannat and Syrah skins. Up to 25 July, amounts increased to 180 ng per berry skin in Syrah and in Tannat, followed by a slight decrease of about 30 ng between the above date and 14 September. In Merlot skin, the concentration increased to 130 ng per berry skin until 28 June, then stabilized, decreased sharply and were no longer detected after 14 September. The amounts are on average, 100 times lower than values reported for the more widely-known non-glycosylated procyanidines (B1, B2, B3 and B4) in grape skins [36].

To summarize, Merlot, Syrah and Tannat skins were found to contain mono-glycosylated flavanol monomers and dimers; at the earlier stages of development, monomers occurred in greater concentrations than dimers in skins, whereas at maturity, concentrations of both monomer and dimer glycosides were similar. Overall, total concentrations of (epi) catechin glycosides were significantly higher in Tannat than in Syrah and Merlot grape skins at all sampling dates.

2.2.2. Evolution of Monomeric and Oligomeric Flavanol Glycosides in Grape Seeds during Ripening

The evolution of monomeric and oligomeric flavanol glycosides in grape seeds during ripening is illustrated in Figure 4.

The concentrations of monomeric (epi) catechin glycosides in grape seed samples during ripening are presented in Figure 4a where it might be observed that concentrations were higher in Tannat grape seeds (up to 80 ng per berry seeds) and their concentrations increased during development. A small variation was observed for Merlot with an increase to 30 ng per berry in 28 June, followed by a decrease to 12 ng per berry between the above date and 14 September. The quantity of (epi) catechin glycosides in Syrah seeds remained constant during ripening at approximately 7 ng per berry. These concentrations are 10^3 to 10^4 times lower than those of non-glycosylated monomeric flavanols as reported in the literature [32,36].

Higher concentrations of (epi) catechin dimer glycosides in grape seeds were generally observed in all varieties as seen in Figure 4b. As above, amounts increased during grape development, and were, at the end of ripening (14 September), 400 ng, 80 ng and 20 ng per berry in Merlot, Tannat and Syrah seeds, respectively. These amounts are approximately 10-to-100 times greater than those of procyanidines (B1, B2, B3 and B4 types) in grape seeds [36].

To summarize, both (epi) catechin monomer and dimer flavanol monoglycosides present in seeds samples would appear to increase during berry development. In addition, mature grape skins would appear to contain more (epi) catechin monomer glycosides than in mature seeds.

Finally, for the first time the evolution of (epi) catechin monomer and dimer diglycosides in grapes are described. As already stated, these compounds were only detected in grape seeds and their variation during ripening is illustrated in Figure 5.

Figure 5a represents the change in diglycosylated (epi) catechin monomers during ripening. An accumulation was observed for Merlot and Syrah seeds, with a greater increase for Syrah. From 28 June to 14 September, monomer diglycosides increased by 3 ng in the seeds of one berry for Merlot, and 6 ng per berry seeds for Syrah. From the onset to the end of ripening, the concentrations of (epi) catechin diglycosides remained stable at around 12 ng per berry seeds.

As with monomers, the amount in (epi) catechin dimer diglycosides increased during seed development for the three grape varieties represented in Figure 5b. Their concentrations increased by about 4 ng per berry seeds for Merlot and Tannat, and 2 ng per berry seeds for Syrah from the start to the end of the development. Diglycoside quantities were similar among all three varieties.

To summarize, monomeric and dimeric flavanol mono- and diglycosides were found only in grape seeds, and higher concentrations were observed for monoglycosides than for diglycosides in the three varieties studied.

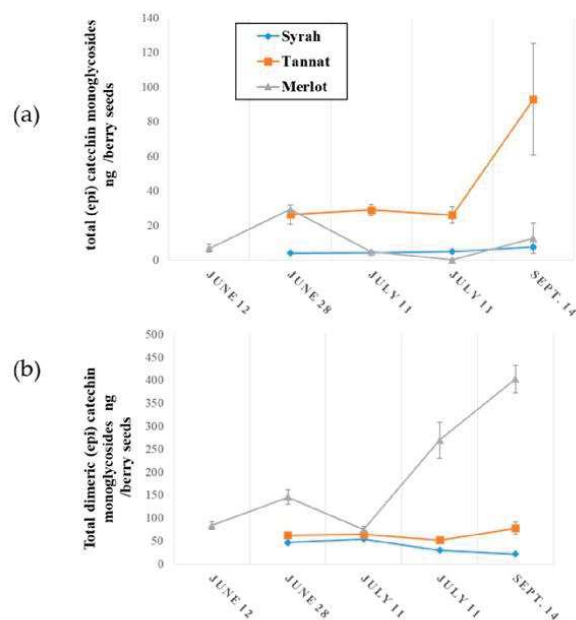


Figure 4. Evolution of (a) monomeric (epi) catechin monoglycosides and (b) dimeric (epi) catechin monoglycosides during grape seed ripening.

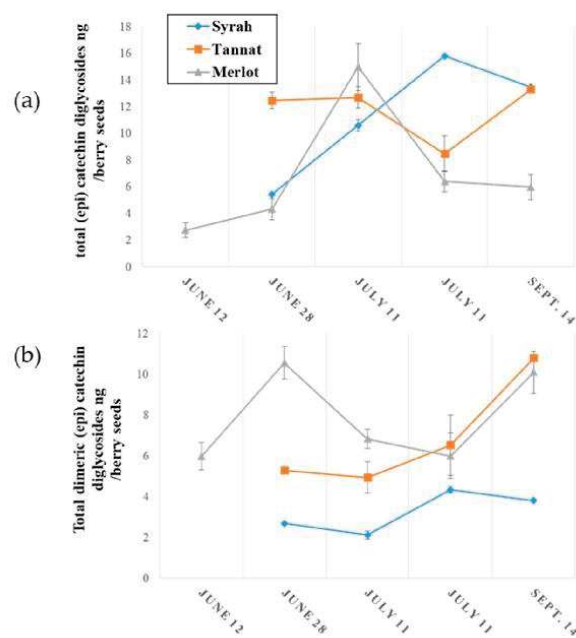


Figure 5. Evolution of (a) (epi) catechin diglycosides and (b) (epi) catechin dimer diglycosides during grape seeds ripening.

3. Materials and Methods

3.1. Reagents, Standards and Calibration

Deionized water was purified with a Milli-Q purification system (Millipore, Molsheim, France). Acetone and diethyl ether were obtained from Analytic Lab (St. Mathieu de Treviers, France). Formic acid and HPLC grade methanol were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). (+)-Catechin was purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). (+)-Catechin 4'-O- β glucoside (C4'OG) was hemi-synthesized as described previously [27].

A calibration curve of C4'OG was prepared in the ranges 0.025 to 5 mg·L⁻¹ in a mixture of methanol/water (5:5). Flavanol diglycosides (monomers, dimers) were semi-quantified by MRM with, C4'OG as standard. The limits of detection and quantification, based on the C4'OG calibration curve were respectively of 0.03 ng/L and 0.11 ng/L.

3.2. Grapes

3.2.1. Samples used for Quantification of Flavanol Glycosides in Berry Skin and Seeds

The grapes of the three *V. vinifera* varieties from the same vineyard were harvested at four different dates for Syrah and Tannat, and five dates for Merlot, corresponding to different developmental stages in May, July and September 2017. For each variety, 3 × 30 fresh berries were randomly selected and weighed. Seeds and skins were removed by hand on ice and weighed separately. Another set of 100 berries was crushed and its average sugar concentration was determined using a hand-held refractometer, and expressed as brix degrees, the evolution of which is shown in Figure 6. Evolution of berry, seed and skin weights during development are summarized in Appendix A.

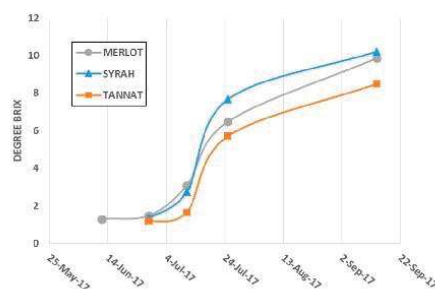


Figure 6. Degree brix evolution of Merlot, Syrah and Tannat grape during ripening.

3.2.2. Extraction of Grape Polyphenols

Grape skins and seeds were extracted separately overnight using 200 mL of acetone/water 7:3 in 1 L bottles under nitrogen with mechanical mixing. Solutions were filtered on cellulose filter paper and evaporated with a rotary evaporator to dryness under reduced pressure at 37 °C. The residues were dissolved in deionized water, frozen at -80 °C and lyophilized with a Cryotec® lyophilizer, and the resulting tannin extract powders were stored at -20 °C, until further analysis.

3.3. Optimization of a UHPLC-ESI-QQQ-MS/MS in Multiple Reaction Monitoring (MRM) Method for Quantification of Flavanol Glycosides

3.3.1. UHPLC Analysis

The chromatographic apparatus consisted of Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu, Marne la Vallée, France) equipped with a binary pump, solvent degasser, and thermostatted column compartment. Two reversed-phase columns in series were used for separation: Zorbax SB AQ (2.1 × 150 mm and

2.1 × 100 mm 1.8 µm from Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Mobile phase A and B consisted of water (0.1% formic acid) and methanol (0.1% formic acid) respectively. The 77 min linear gradient program used was 0% B for 7 min, 0–18% B over 10 min, 18–33% B over the next 40 min, followed by 40–100% B for 1 min. A plateau at 100% B for 9 min was used to wash the column, decreasing from 100–0% B in 1 min, followed by a 9-min post-run isocratic step at 0% B to re-equilibrate the column. The flow rate was constant at 0.35 mL/min at 40 °C.

3.3.2. MS/MS Detection

MS/MS experiments were carried out using the Shimadzu UHPLC system described above coupled to a Shimadzu LCMS-8050 triple quadrupole mass spectrometer using the multiple reaction monitoring (MRM) technique operating in negative ion mode. The following parameters were used for all experiments: electrospray interface voltage was 3 kV; heat block temperature of 350 °C; desolvation line temperature of 300 °C; interface temperature of 300 °C; drying gas flow gas was set at 5 L/min; and nebulizing gas flow at 3 L/min, heating gas flow rates were set at 15 L/min. Q1 and Q3 were set to unit resolution. The dwell time was set at 1 ms for each MRM transition; optimal CE values were chosen for each class of compounds to obtain the most characteristic fragments (Table 2). The followed compounds were targeted: (epi) catechin monomer glycosides, **1**; (epi) catechin dimer glycosides, **2**; (epi) catechin monomer diglycosides, **3**; (epi) catechin dimer diglycosides, **4**.

4. Conclusions

Monomeric and dimeric flavanol monoglycosides and diglycosides were shown to be present in grapes from three different *Vitis vinifera* varieties (Merlot, Syrah and Tannat). An original UHPLC-MRM method allowed the study of changes in the concentrations of these compounds during grape ripening. Grape seed extracts contained monomeric and dimeric flavanol mono- and diglycosides. With the exception of diglycosylated flavanol dimers, these compounds were also detected in grape skin extracts. The concentration of the mono and diglycosides depended largely on both grape variety and whether they occurred in grape skins or seeds. The amounts of monoglycosylated flavanols varied from 10 to 100 ng per seeds for one berry, and from 60 to 600 ng per skin for one berry at maturity. Monoglycosylated flavanol dimers quantities ranged from 20 to 400 ng per seed and 0 to 300 ng per berry skin. Seeds contained on average from five to 15 ng of monomeric flavanol diglycosides and from three to 10 ng dimeric flavanol diglycosides. The amounts of monoglycosylated flavanols in grape seeds were greater than those of diglycosylated flavanols.

Flavanol monomer monoglycosides decreased progressively during grape ripening for all grape and skin extracts. Conversely, flavanol glycoside concentrations seemed to increase before *veraison* and thereafter to decrease and depended on the grape variety. In light of the results presented in this study, the precise structures and the role of these new compounds in proanthocyanidin biosynthesis in grapes or in other plants warrant further investigation.

Author Contributions: M.Z. wrote the manuscript, M.Z. and G.C. carried out the experimental parts, C.S., G.C. and M.Z. expertized the protocol and data, C.S. designed the study, C.S. and C.E. revised the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Funding: This work was supported in part by a PhD grant (Marie Zerbib) from the University of Montpellier (Bourse école doctorale GAIA).

Acknowledgments: We thank Mary Kelly for reading and revising the English of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

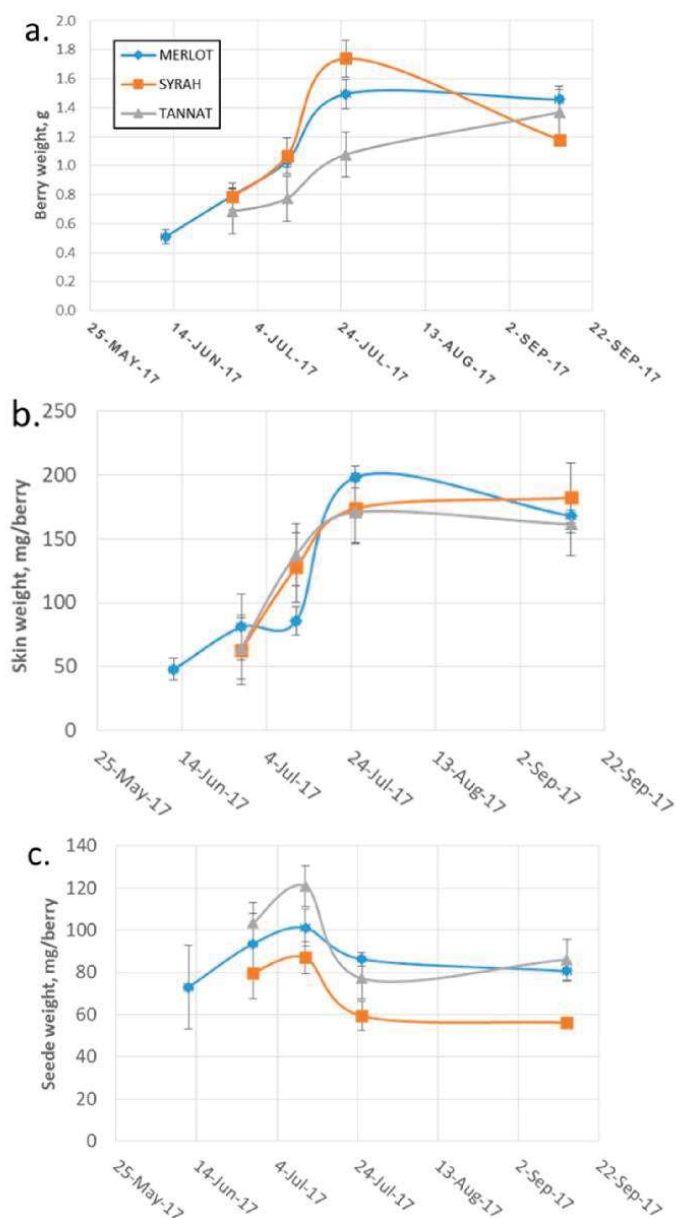


Figure A1. Evolutions of (a) berry weight (g), (b) skin weight (mg/berry) and (c) seed weight (mg/berry) during berry development.

References

1. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouysegu, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 586–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Heiss, C.; Keen, C.L.; Kelm, M. Flavanols and cardiovascular disease prevention. *Eur. Heart J.* **2010**, *31*, 2583–2592. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chira, K.; Suh, J.H.; Saucier, C.; Teissède, P.L. Les polyphénols du raisin. *Phytothérapie* **2008**, *6*, 75–82. [[CrossRef](#)]
4. Di Lecce, G.; Arranz, S.; Jáureguic, O.; Tresserra-Rimbau, A.; Quifer-Rada, P.; Lamuela-Raventós, R.M. Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chem.* **2014**, *145*, 874–882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kennedy, J.A.; Matthews, M.A.; Waterhouse, A.L. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 77–85. [[CrossRef](#)]
6. Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 781–784. [[CrossRef](#)]
7. Downey, M.O.; Harvey, J.S.; Robinson, S.P. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Aust. J. Grape Wine R.* **2003**, *9*, 15–27. [[CrossRef](#)]
8. Peyrot des Gachons, C.; Kennedy, J.A. Direct Method for Determining Seed and Skin Proanthocyanidin Extraction into Red Wine. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5877–5881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Ricardo da Silva, J.M. Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6475–6481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Huang, Y.F.; Cheynier, V.; Terrier, N. Shedding Light on the Black Boxes of the Proanthocyanidin Pathway with Grapevine. *Recent Adv. Polyphenol Res.* **2012**, *3*, 161–190.
11. Kuhnle, G.G.C. Nutrition epidemiology of flavan-3-ols: The known unknowns. *Mol. Asp. Med.* **2018**, *61*, 2–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Aron, P.M.; Kennedy, J.A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, 79–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Corder, R.; Mullen, W.; Khan, N.Q.; Marks, S.C.; Wood, E.G.; Carrier, M.J.; Crozier, A. Oenology: Red wine procyanidins and vascular health. *Nature* **2006**, *444*, 566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Manach, C.; Donovan, J.L. Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free Radic. Res.* **2004**, *38*, 771–785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Kitao, S.; Ariga, T.; Matsudo, T.; Sekine, H. The Syntheses of Catechin-glucosides by Transglycosylation with *Leuconostoc mesenteroides* Sucrose Phosphorylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 2010–2015. [[CrossRef](#)]
16. Raab, T.; Barron, D.; Arce Vera, F.; Crespy, V.; Oliveira, M.; Williamson, G. Catechin Glucosides: Occurrence, Synthesis, and Stability. *Food Chem.* **2010**, *118*, 2138–2149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Pang, Y.; Peel, G.J.; Sharma, S.B.; Tang, Y.; Dixon, R.A. A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 14210–14215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Pang, Y.; Cheng, X.; Huhman, D.V.; Ma, J.; Peel, G.J.; Yonekura-Sakakibara, K.; Saito, K.; Shen, G.; Sumner, L.; Tang, Y.; et al. *Medicago* glucosyltransferase UGT72L1: Potential roles in proanthocyanidin biosynthesis. *Planta* **2013**, *238*, 139–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Friedrich, W.; Galensa, R. Identification of a new flavanol glucoside from barley (*Hordeum vulgare* L.) and malt. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, *214*, 388–393. [[CrossRef](#)]
20. Watanabe, M. Catechins as Antioxidants from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Groats. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 839–845. [[CrossRef](#)]
21. Dueñas, M.; Sun, B.; Hernández, T.; Estrella, I.; Spranger, M.I. Proanthocyanidin Composition in the Seed Coat of Lentils (*Lens culinaris* L.). *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7999–8004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Cui, E.-J.; Song, N.-A.; Shrestha, S.; Chung, I.-S.; Kim, J.-Y.; Jeong, T.-S.; Baek, N.-I. Flavonoid glycosides from cowpea seeds (*Vigna sinensis* K.) inhibit LDL. *Food Sci. Biotechnol.* **2012**, *21*, 619–624. [[CrossRef](#)]
23. Ojwang, L.O.; Yang, L.; Dykes, L.; Awika, J. Proanthocyanidin profile of cowpea (*Vigna unguiculata*) reveals catechin-O-glucoside as the dominant compound. *Food Chem.* **2013**, *139*, 35–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Smaali, I.; Maugard, T.; Limam, F.; Legoy, M.D.; Marzouki, N. Efficient synthesis of gluco-oligosaccharides and alkyl-glucosides by. *World J. Microb. Biotechnol.* **2007**, *23*, 145–149. [CrossRef]
25. Delcambre, A.; Saucier, C. Identification of new flavan-3-ol monoglycosides by UHPLC-ESI-Q-TOF in grapes and wine. *J. Mass Spectrom.* **2012**, *47*, 727–736. [CrossRef] [PubMed]
26. Bae, Y.S.; Burger, J.F.W.; Steynberg, J.P.; Ferreira, D.; Hemingway, R.W. Flavan and procyanidin glycosides from the bark of blackjack oak. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 473–478. [CrossRef]
27. Zerbib, M.; Mazauric, J.P.; Meudec, E.; Le Guernevé, C.; Lepak, A.; Nidetzky, B.; Cheynier, V.; Terrier, N.; Saucier, C. New flavanol O-glycosides in grape and wine. *Food Chem.* **2018**, *266*, 441–448. [CrossRef]
28. Pinasseau, L.; Verbaere, A.; Roques, M.; Meudec, E.; Vallverdú-Queralt, A.; Terrier, N.; Boulet, J.C.; Cheynier, V.; Sommerer, N. A Fast and Robust UHPLC-MRM-MS Method to Characterize and Quantify Grape Skin Tannins after Chemical Depolymerization. *Molecules* **2016**, *21*, 1409. [CrossRef] [PubMed]
29. Ehrhardt, C.; Arapitsas, P.; Stefanini, M.; Flick, G.; Mattivi, F. Analysis of the phenolic composition of fungus-resistant grape varieties cultivated in Italy and Germany using UHPLC-MS/MS-Ehrhardt-2014-Journal of Mass Spectrometry-Wiley Online Library. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 860–869. [CrossRef] [PubMed]
30. Owczarek, A.; Magiera, A.; Matczak, M.; Piotrowska, D.G.; Olszewska, M.A.; Marchelak, A. Optimisation of preparative HPLC separation of four isomeric kaempferol diglycosides from *Prunus spinosa* L. by application of the response surface methodology. *Phytochem. Lett.* **2017**, *20*, 415–424. [CrossRef]
31. Garrido, J.; Borges, F. Wine and grape polyphenols—A chemical perspective. *Food Res. Int.* **2013**, *54*, 1844–1858. [CrossRef]
32. Portugal Gomes Rebello, L.; Lago-Vanzela, E.S.; Barcia Teixeira, M.; Ramos Mota, A.; Stringheta, P.C.; Da-Silva, R.; Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; Hermosín-Gutiérrez, I. Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubea × IAC 1398-21) using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Res. Int.* **2013**, *54*, 354–366. [CrossRef]
33. Bishop, P.D.; Nagel, C.W. Characterization of the condensation product of malvidin diglucoside and catechin. *J. Agric. Food Chem.* **1984**, *32*, 1022–1026. [CrossRef]
34. Guo, D.; Xu, Y.; Kang, Y.; Han, S.; Zheng, S. Synthesis of octyl-beta-D-glucopyranoside catalyzed by Thai rosewood beta-glucosidase-displaying *Pichia pastoris* in an aqueous/organic two-phase system. *Enzym. Microb. Technol.* **2016**, *85*, 90–97. [CrossRef] [PubMed]
35. Yılmaz, Y.; Toledo, R.T. Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 255–260. [CrossRef] [PubMed]
36. Chira, K. Structures moléculaire et perception tannique des raisins et des vins (Cabernet-Sauvignon, Merlot) du Bordelais. Ph.D. Thesis, Université de Bordeaux, Bordeaux, France, December 2009.

Sample Availability: Not available.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

*Chapitre 4 – Suivi de l'évolution de
flavanols glycosylés au cours de
l'élaboration de vins rouges*

Les polyphénols sont des composés essentiels du vin de par leurs propriétés organoleptiques. Durant l'élaboration du vin, ils sont extraits lors de la macération, la fermentation alcoolique (FA) et lors du vieillissement. Afin de compléter l'état de l'art sur les flavanols glycosylés, nous avons étudié leurs cinétiques d'extraction au cours de la FA et leur composition finale dans le vin rouge. Cette étude fait l'objet d'un **article 3** en cours de soumission.

Pour cela, des microvinifications sur des raisins de variété Syrah et Grenache ont été réalisées à l'Unité Expérimentale de Pech Rouge, à Gruissan. Des prélèvements tout au long du processus de FA nous ont permis d'étudier l'évolution de 22 isomères de monomères et des dimères d' (épi) catéchine mono et diglycosylés. Une analyse complémentaire a permis la quantification des mono et diglycosides dans les pépins et la pellicule des baies de raisins séparément afin d'étudier leurs origines dans le vin. L'identification et la quantification de ces composés ont été réalisées par la méthode de chromatographie et de détection par MRM décrite dans le Chapitre 3 de ce mémoire.

Les profils d'extractions des flavanols glycosylés au cours de la FA sont similaires pour les deux variétés fermentées. La quantité totale des différentes familles de composés augmente au cours de la vinification, et ensuite diminue en fin de FA. Dans les vins finaux, les concentrations sont de l'ordre du mg. Pour le Grenache, de fortes diminutions en flavanols mono et diglycosylés sont mesurées après pressurage du vin tandis que pour la Syrah, la diminution est observée un jour avant (7^e jour). Une étude plus précise de l'évolution de chaque isomère a également été réalisée. Il a été observé que certains composés étaient dégradés préférentiellement, et ce potentiellement du fait de l'activité de glycosidases du raisin et des levures.

Les teneurs en ces composés dans le raisin sont variables selon les pépins et les pellicules analysées et vont de 0,7 ng à 0,7 mg par gramme de tissu. Les pellicules présentent une plus grande teneur en monoglycosides et les pépins en diglycosides. Cette observation induit une origine multiple de flavanols glycosylés dans le vin.

Article

Evolution of Flavanol Glycosides during Red Grape Fermentation

Marie Zerbib ¹, Guillaume Cazals ², Marie-Agnès Ducasse ³, Christine Enjalbal ² and Cédric Saucier ^{1,*}

¹ SPO, Univ Montpellier, INRA, Montpellier Supagro, 34000 Montpellier, France; marie.zerbib@umontpellier.fr

² IBMM, Univ Montpellier, CNRS, ENSCM, 34000 Montpellier, France; guillaume.cazals@umontpellier.fr (G.C.); christine.enjalbal@umontpellier.fr (C.E.)

³ UMT Minicave, Institut Français de la Vigne et du Vin, 11430 Gruissan, France; Marie-Agnes.ducasse@vignevin.com

* Correspondence: cedric.saucier@umontpellier.fr

Academic Editor: Angelita Gambuti

Received: 15 November 2018; Accepted: 7 December 2018; Published: 12 December 2018

Abstract: Monomeric and dimeric flavanol glycosides were quantified by UHPLC-MRM in Syrah (SYR) and Grenache (GRE) grapes and in their corresponding wines for the first time. Quantities were extremely variable depending on grape tissue (seeds or skins) and during fermentation. Overall, 22 monomeric and dimeric mono- and diglycosides were determined with concentrations ranging from 0.7 nanograms to 0.700 micrograms per gram of grape tissue, and 0 to 60 micrograms per liter for wines. The evolution of the glycosides' composition during winemaking suggests that almost all these compounds originate in the grapes themselves and display different extraction kinetics during winemaking. One isomer of the monomeric (epi) flavanol monoglycosides seemed to be biosynthesized by yeasts during wine fermentation. The sharp decrease in concentration of some isomers at the late stages of fermentation or after pressing suggests that some grape glycosidase activities convert these compounds into non-glycosylated flavanols.

Keywords: red grape fermentation; flavan-3-ol; glycoside; diglycoside; multiple reaction monitoring (MRM); mass spectrometry

1. Introduction

Polyphenols are secondary metabolites present in a wide variety of natural products such as grapes, tea, and cocoa [1]. They have health properties such as antioxidant and anti-inflammatory activities and play a role in protecting against cardiovascular diseases [2,3]. Polyphenols are also involved in plant defense mechanisms [4,5], and have a major impact on the quality of wine organoleptic properties such as color [6,7], astringency, and bitterness [8,9].

Flavan-3-ols belong to the flavonoid class of phenolic compounds. Some studies have been carried out on how their composition impacts the organoleptic properties of different grape tissues and wines [10,11]. Flavanols found in grape skin consist of (epi) catechin, (epi) catechin gallate, and epigallocatechin monomers and their corresponding polymers (procyanidins and prodelfinidins) [12]. In seeds, the flavanol content includes (epi) catechin, epicatechin gallate, and procyanidins [13,14].

Monomeric and dimeric glycoside forms of monomeric and dimeric flavanols have been identified in different varieties of grapes and wine [15,16]. Some examples of their structures are presented in Figure 1. Studies have been reported on their *in vivo* biological properties in plants or animals. For example, experiments on rats showed that catechin glucosides increase the absorption

of the flavanols mentioned above [17]. Furthermore, it has been reported that glycosylated catechin, as opposed to its aglycone equivalent, confers greater resistance to light radiation and tyrosinase activity [18]. Dixon and collaborators found that in plants, the over-expression of glucosyltransferase UGT72L1 in the seed coat of *Medicago truncatula* increased the accumulation of proanthocyanidins (PA) and epicatechin 3'-O-glucoside, suggesting that this flavanol glycoside may be involved in the biosynthesis of PA [19].

Changes in flavanol concentration during fermentation depend on the percentage of alcohol and the duration of contact between the skins and wine (maceration). Their concentration increases to reach a maximum after about six days of fermentation and then decreases at the end of alcoholic fermentation (AF). More flavan-3-ols are extracted from grape skins than from seeds during AF [11]. The principal objective of this work was to study, for the first time, the extraction kinetics of mono- and dimeric flavanols and mono- and diglycosides in grapes and during winemaking.

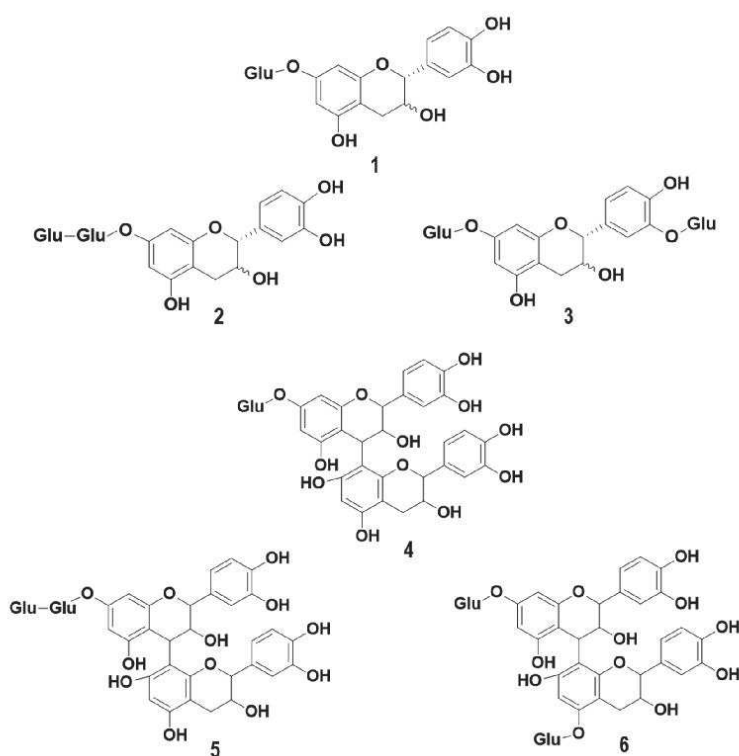
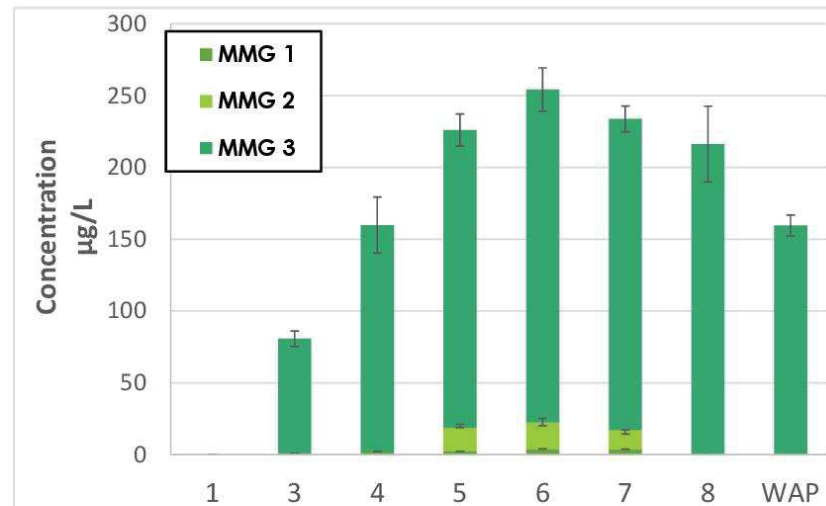


Figure 1. Examples of monomeric (epi) catechin mono glucoside (1), monomeric (epi) catechin diglycosides (2 and 3), dimeric (epi) catechin monoglycoside (4), and dimeric (epi) catechin diglycosides (5 and 6).

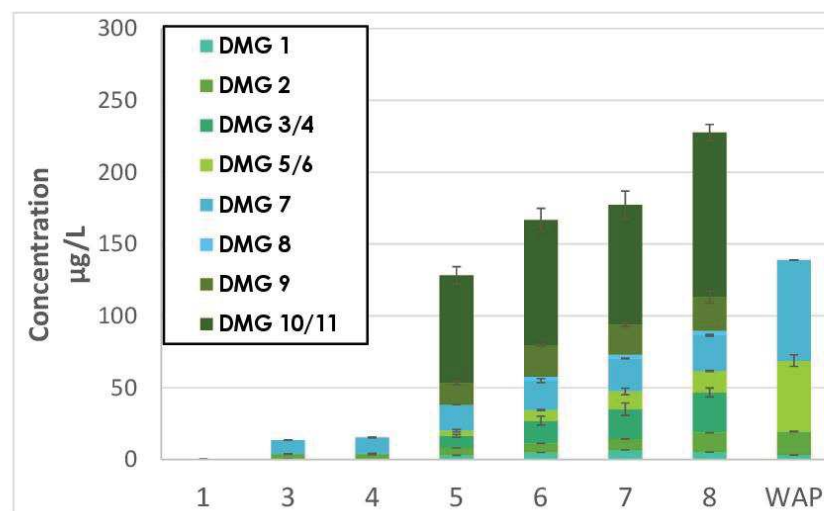
2. Results and Discussion

The extraction kinetics of mono- and diglycosylated flavanols are presented in Figures 2–4. The compounds analyzed were isomers of monomers of (epi) catechin monoglycosides (MMG), dimers

of (epi) catechin monoglycosides (DMG), monomers of (epi) catechin diglycosides (MDG), and dimers of (epi) catechin diglycosides (DDG).

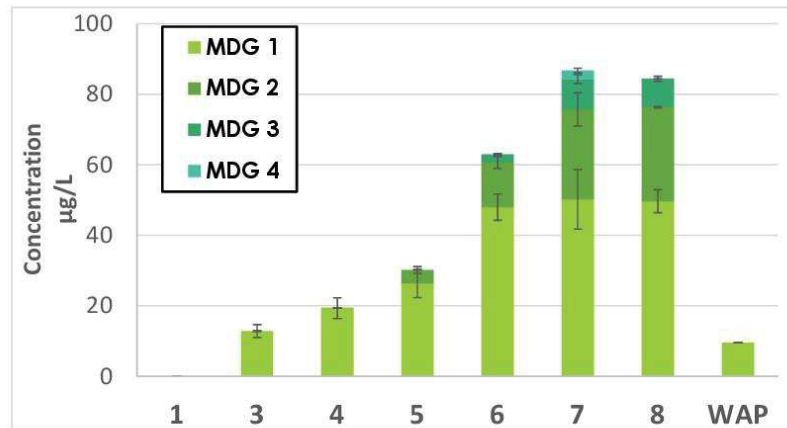


(A)

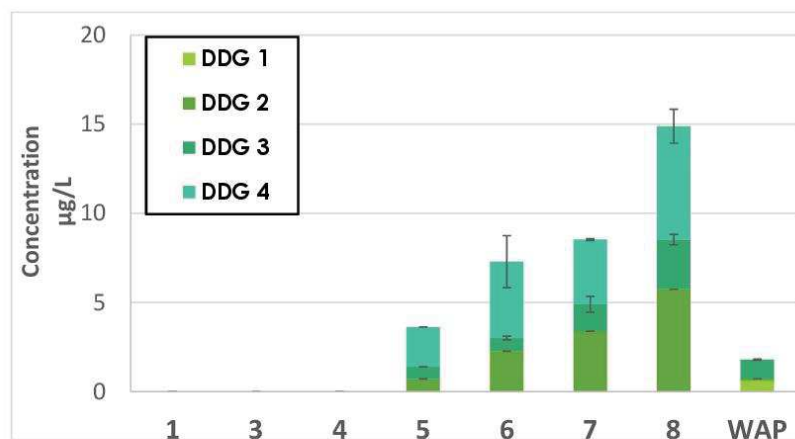


(B)

Figure 2. Evolution of (A) monomers of (epi) catechin monoglycosides (MMG) and (B) dimers of (epi) catechin monoglycosides (DMG) isomers during Grenache (GRE) fermentation. WAP = wine after pressing.



(A)



(B)

Figure 3. Evolution of (A) monomers of (epi) catechin diglycosides (MDG) and (B) dimers of (epi) catechin diglycosides (DDG) during GRE fermentation.

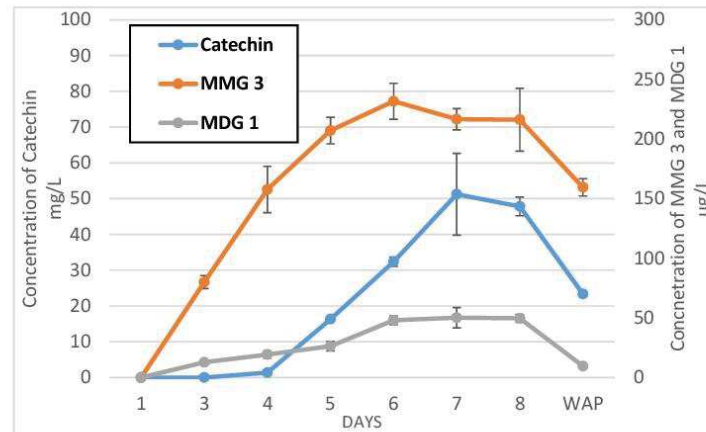


Figure 4. Evolution of catechin, MMG3, and MDG1 during GRE fermentation.

2.1. Monomers of (epi) Catechin Monoglycosides (MMG) and Dimers of (epi) Catechin Monoglycosides (DMG)

2.1.1. Extractions Kinetics of MMG and MDG during Grenache and Syrah Fermentation

The evolution kinetics of MMG concentrations during fermentation are represented in Figure 2A (Grenache) and Appendix B (Syrah). Those of DMG concentration fermentation are represented in Figure 2B (Grenache) and Appendix C (Syrah). It may be observed that the profiles of both MMG and DDG were similar for both Grenache (GRE) and Syrah (SYR) wines. The extraction of flavanol glycosides from grape solids in wine continued until day 5 for GRE and day 4 for SYR. The concentrations of monoglycosides were lower again in both wines at the end of AF, and further decreased in GRE wine after pressing. These observations confirm the findings in previous reports, that the concentration of phenolic acids, anthocyanins, and flavanols increased from the start of AF, reaching a maximum after approximately six days, followed by a reduction after pressing [10,20]. These observations were explained by further chemical interactions with other compounds, or adsorption onto grape tissues or yeasts, and has also been suggested for other varieties such as Monastrell [10]. In this study, the concentrations of monomers and dimers of (epi) catechin monoglycosides (MMG and DMG) in SYR sharply decreased after day 7 before pressing (Appendices B and C). These reductions might be explained by the presence of glycosidases in the cell walls of grape skin cells, which would produce (epi) catechin monomers and dimers.

2.1.2. Grape Origins of MMG and DMG in Wine

The concentrations of three MMG isomers present in both varieties are shown in Table 1. Values are given for grape seeds, grape skin, and during winemaking at wine fermentation day 4 (WFD4), day 7 (WFD7), and after pressing (WAP). At WFD4, 75% of the initial sugar present was converted into ethanol (Material and Methods section, Figure 5).

The results show that the distributions of each of the three isomers were in the same order of magnitude in skins, seeds, and at each of the three wine sampling dates for both varieties. It may be observed that isomer MMG3 was present at higher concentrations as compared to the other isomers in both skins, seeds, and during fermentation, where amounts were similar on WFD4 and WFD7, particularly in the case of Grenache. Table 1 also shows that isomer MMG1 was present at concentrations significantly lower than isomer MMG3 at all sampling points for both varieties. Notably, MMG2 was present at WFD4, but not in skins or seeds, indicating that this isomer may be formed during fermentation. A possible explanation for the fact that isomers 1 and 2 were no longer detectable at WFD7 and wine after pressing (WAP) is that they may be substrates for specific grape or yeast glycosidases.

Eleven DMG were determined in grapes and during fermentation (Table 2). The concentrations of the isomers were extremely variable, ranging from below the limit of detection to a maximum of 0.345 µg/g of grape skin. During winemaking, their concentrations varied from less than 10 µg to over 1 mg/L of wine. Concentrations in WAP were between less than 10 and over 100 µg/L. GRE wines contained higher concentrations of DMG than SYR wines. Isomer concentrations of DMG1, 2, 5, 6, and 7 s tended to increase at WFD4 to WAP for both varieties, whereas those of DMG3, 4, 8, 9, 10, and 11 decreased at the end of AF. These losses could be attributed, in part, to adsorption onto the solid components. However, it is more likely they were degraded by glycosidases

Table 1. Monomers of (epi) catechin monoglycoside (MMG) isomers measured in grape seed and skin, and during winemaking at wine fermentation day 4 (WFD4), day 7 (WFD7), and wine after pressing (WAP).

| MMG | Grenache | | | | | Syrah | | | | |
|-----|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | Seed ^a | Skin ^a | WFD4 ^b | WFD7 ^b | WAP ^b | Seed ^a | Skin ^a | WFD4 ^b | WFD7 ^b | WAP ^b |
| 1 | 0.002 ± 4.10 ⁻⁴ | n.d. | 2.27 ± 0.475 | n.d. | n.d. | 0.002 ± 7.10 ⁻⁴ | 0.007 ± 0.02 | 4.44 ± 0.739 | n.d. | n.d. |
| 2 | n.d. | n.d. | 16.6 ± 2.30 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 87.7 ± 2.46 | n.d. | n.d. |
| 3 | 0.205 ± 0.039 | 0.643 ± 0.102 | 207 ± 11.1 | 216 ± 26.3 | 160 ± 7.27 | 0.045 ± 0.005 | 0.307 ± 0.056 | 80.7 ± 4.40 | 62.7 ± 2.17 | 56.8 ± 1.57 |

^a μg/g of grape tissue, ^b μg/L, n.d. not detected. Results are the average of three biological replicates with the corresponding standard deviations.

Table 2. Contents of dimeric (epi) catechin monoglycoside (DMG) isomers measured in grape seed and skin, and during winemaking at WFD4, WFD7, and WAP.

| DMG | Grenache | | | | | Syrah | | | | |
|-------|-------------------|---|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | Seed ^a | Skin ^a | WFD4 ^b | WFD7 ^b | WAP ^b | Seed ^a | Skin ^a | WFD4 ^b | WFD7 ^b | WAP ^b |
| 1 | n.d. | 0.015 ± 0.006 | 2.99 ± 1.04 | 5.24 ± 2.06 | 3.17 ± 0.831 | n.d. | 0.028 ± 0.004 | 6.41 ± 0.136 | 3.79 ± 0.480 | 3.90 ± 0.378 |
| 2 | n.d. | 7.10 ⁻⁴ ± 2.10 ⁻⁴ | 5.00 ± 1.53 | 13.4 ± 6.36 | 16.3 ± 0.529 | n.d. | 0.004 ± 0 | 3.03 ± 0.390 | 8.15 ± 1.83 | 7.18 ± 1.66 |
| 3/4 | n.d. | 0.008 ± 0.003 | 8.50 ± 0.943 | 28.0 ± 3.08 | n.d. | n.d. | 0.015 ± 0.004 | 6.80 ± 2.14 | 4.86 ± 0.934 | 6.85 ± 1.09 |
| 5/6 | n.d. | 0.009 ± 0.003 | 3.62 ± 0.852 | 15.0 ± 0.395 | 49.4 ± 4.05 | n.d. | 0.015 ± 0.002 | 4.78 ± 0.317 | 15.2 ± 1.82 | 16.0 ± 0.791 |
| 7 | n.d. | 0.022 ± 0.001 | 18.1 ± 1.60 | 24.9 ± 1.2 | 70.1 ± 2.87 | n.d. | 0.027 ± 0.009 | 10.9 ± 1.05 | 21.8 ± 0.962 | 24.5 ± 0.106 |
| 8 | n.d. | 0.024 ± 0.004 | n.d. | 3.12 ± 0.569 | n.d. | n.d. | 0.078 ± 0.012 | 8.06 ± 2.37 | n.d. | n.d. |
| 9 | n.d. | 0.041 ± 0.019 | 15.0 ± 1.19 | 23.4 ± 4.09 | n.d. | n.d. | 0.031 ± 0.004 | 6.67 ± 2.08 | n.d. | n.d. |
| 10/11 | n.d. | 0.345 ± 0.114 | 75.0 ± 6.02 | 114.6 ± 5.62 | n.d. | n.d. | 0.250 ± 0.033 | 34.4 ± 3.30 | n.d. | n.d. |

^a μg/g of grape tissue, ^b μg/L, n.d. not detected. Results are the average of three biological replicates with the corresponding standard deviations.

2.2. Monomers of (epi) Catechin Diglycosides (MDG) and Dimers of (epi) Catechin Diglycosides (DDG)

2.2.1. Extractions Kinetics of MDG and DDG during GRE and SYR Fermentation

Changes in the concentrations of MDG and DDG during GRE fermentation are shown in Figure 3A,B, respectively. The results for SYR are presented in Appendices D and E, respectively.

The evolution profiles of MDG and DDG were very similar to those of MMG and DMG during the fermentation of both GRE and SYR; the amounts of MDG and DDG increased during fermentation up to WFD7 and then decreased sharply at the end of fermentation. Reductions in the concentrations of MMG and DMG were observed at WFD7 for SYR and from WFD7 to WAP for GRE. MDG values were approximately 0.07 mg/L in both wines. Also, the concentrations of DDG were lower in GRE and SYR wines at approximately 0.014 and 0.04 mg/L, respectively.

2.2.2. Grape Origins of MDG and DDG in Wines

Tables 3 and 4 show the concentrations of (epi) catechin monomeric (MDG) and dimeric diglycoside (DDG) isomers in grape seeds and skin and wines during fermentation at WFD4, WFD7, and in WAP. Measurable amounts of four MDG and DDG isomers were present in both SYR and GRE seeds. Isomer MDG1 was found at all stages of fermentation, with a reduction in its concentration after WAP. Likewise, MDG2 and 3 were found in GRE up to WFD7.

Table 3. Monomeric (epi) catechin diglycoside (MDG) isomers concentrations measured in grape seeds and skins, and during winemaking at WFD4, WFD7, and WAP.

| MDG | Grenache | | | | | Syrah | | | | |
|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | Seed ^a | Skin ^a | WFD4 ^b | WFD7 ^b | WAP ^b | Seed ^a | Skin ^a | WFD4 ^b | WFD7 ^b | WAP ^b |
| 1 | 0.172 ± 0.014 | 0.038 ± 0.014 | 26.31 ± 3.97 | 49.7 ± 3.28 | 9.55 ± 0.014 | 0.122 ± 0.009 | 0.048 ± 0.013 | 39.5 ± 4.83 | 2.66 ± 0.959 | 3.09 ± 0.016 |
| 2 | 0.243 ± 0.014 | n.d. | 3.84 ± 0.947 | 26.6 ± 0.197 | n.d. | 0.136 ± 0.007 | n.d. | 9.48 ± 0.680 | n.d. | n.d. |
| 3 | 0.342 ± 0.026 | n.d. | n.d. | 8.10 ± 0.696 | n.d. | 0.178 ± 0.018 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 4 | 0.250 ± 0.058 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 0.074 ± 0.010 | n.d. | 7.54 ± 2.77 | n.d. | n.d. |

^a µg/g of grape tissue, ^b µg/L, n.d. not detected. Results are the average of three biological replicates with the corresponding standard deviations.

DDG occurred in seeds but not in skins for both SYR and GRE varieties; the levels of isomer concentration in DDG3 and 4 increased between WFD4 and WFD7, and then decreased to negligible values for GRE. These compounds were not detected for SYR at WFD7 on in WAP.

Table 4. Dimeric (epi) catechin diglycoside (DDG) isomers measured in grape seeds and skin, and wine during fermentation at WFD4, WFD7, and WAP.

| DDG | Grenache | | | | | Syrah | | | | |
|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | Seed ^a | Skin ^a | WFD4 ^b | WFD7 ^b | WAP ^b | Seed ^a | Skin ^a | WFD4 ^b | WFD7 ^b | WAP ^b |
| 1 | 0.032 ± 0.002 | n.d. | n.d. | n.d. | 0.610 ± 0.061 | 0.015 ± 0.005 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. |
| 2 | 0.079 ± 0.006 | n.d. | 0.716 ± 0.15 | 5.74 ± 0.951 | 0.110 ± 0.018 | 0.041 ± 0.005 | n.d. | 0.926 ± 0.107 | n.d. | n.d. |
| 3 | 0.043 ± 0.003 | n.d. | 0.672 ± 0 | 2.790 ± 0.297 | 1.070 ± 0.035 | 0.029 ± 0.005 | n.d. | 0.123 ± 0 | n.d. | n.d. |
| 4 | 0.080 ± 0.018 | n.d. | 2.23 ± 0.004 | 6.350 ± 0.953 | n.d. | 0.042 ± 0.005 | n.d. | 1.300 ± 0.336 | n.d. | n.d. |

^a µg/g of grape tissue, ^b µg/L, n.d. not detected. Results are the average of three biological replicates with the corresponding standard deviations.

2.3. Evolution between Monomer and Dimer Concentrations during Fermentation

As Figures 2 and 3 and Appendices B–E illustrate, similar evolutions were observed for the extraction kinetics of the studied compounds. It is important to point out that for all monoglycosides and diglycosides, in addition to each of their 22 isomers, changes in the direction of concentration trends occurred precisely on the seventh day of fermentation for SYR and on the eighth day for Grenache.

Similar trends were observed for all the diglycosides and isomers MMG3, and DMG3/4, 9, 10/11, in that concentrations increased up to the seventh day of fermentation for SYR to the eighth day for Grenache. In both cases, levels had diminished by 50% or more by the end of fermentation. Concentrations in SYR wine after pressing remained stable. It is clearly illustrated in Figure 5 that the concentration trend for catechin is very closely mirrored by that of isomer MMG3, and to a lesser extent, MDG1.

Concentrations of the other DMG (1, 2, 5/6, 7, 8) isomers increased up to day 4 of fermentation, and remained stable up to day 7 (SYR) and day 8 (GRE) before further increasing at the end of fermentation and in wine after pressing (Appendix C).

4. Materials and Methods

4.1. Reagents, Standards and Calibration

Deionized water was purified with a Milli-Q purification system (Millipore, Molsheim, France). Formic acid and HPLC-grade methanol were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). (+)-catechin was purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). The (+)-catechin 4'-O- β -glucoside (C4'OG) was hemi-synthesized as described previously [21].

Calibration curves in the range of 0.025 to 5 mg·L⁻¹ were prepared in a mixture of methanol/water (5:5) for C4'OG. Flavanol mono- and diglycosides (monomers, dimers) were semi-quantified C4'OG by multiple reaction monitoring (MRM).

4.2. Grape and Wine Samples

4.2.1. Grape Samples

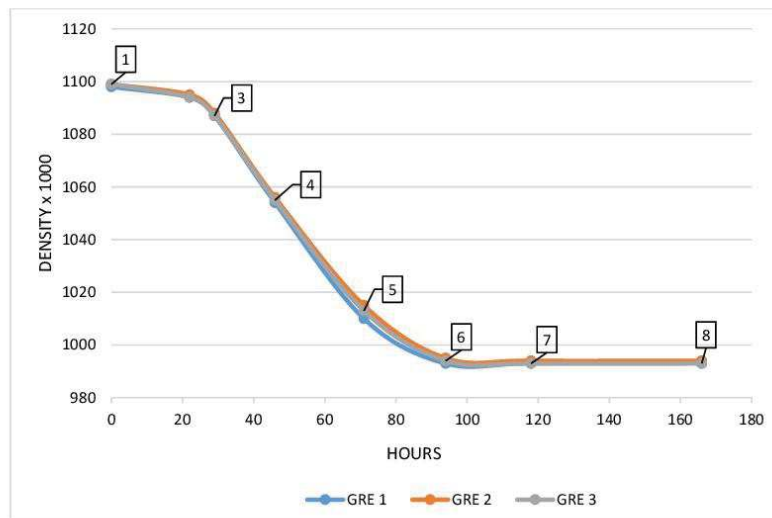
Samples of GRE and SYR grapes were harvested from Unité Expérimentale de Pech Rouge in Gruissan (France) on 13 and 28 August 2017, respectively, and were stored at -80 °C. The grapes were defrosted for 16 hours before the start of the fermentation on 16 April 2018.

The seeds and skins of 100 berries were manually removed on ice. Ten grams of each tissue were extracted with 200 mL of acetone/water (7:3) overnight under nitrogen with mechanical stirring. Solutions were filtered on filter paper (N°3 prat-dumas, Couze-St-Front, France), evaporated under reduced pressure at 37 °C with a rotary evaporator (Buchi R3, Rungis, France). The residues were dissolved in deionized water and freeze dried at -60 °C (Crios, Cryotec., St Gely du Fesc, France). The resulting tannin extract powders were stored at -20 °C. All experiments were performed in triplicate.

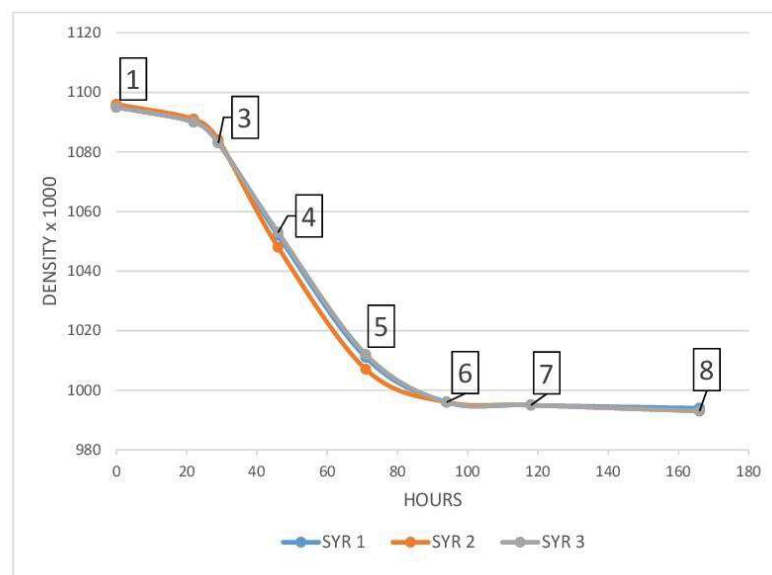
4.2.2. Winemaking and Samples

All winemaking procedures were carried out in triplicate for both grape varieties. After manual destemming and crushing, musts (characteristics in Appendix A) were inoculated with yeasts (OKAY, 20 g·hL⁻¹) and supplemented with DAP (di-ammonium phosphate, 150 mg·L⁻¹). Fermentations were performed using 1 L "French Press" coffee plungers (small-lot fermentation adapted from the Australian Wine Research Institute (AWRI) method [22]) at 22 °C over eight days. Cap management was carried out every day during AF by submerging pomace with the plunger. The density was monitored with a portable densimeter (DMA 35, Anton Paar, Les Ulis, France). At the end of AF, wine was pressed and the classical wine chemical parameters were determined (data not shown).

Seven samples were taken during fermentation (Figure 6). Five milliliters of each sample were centrifuged (5 min, 5000 rpm), frozen, and stored at -85 °C before analysis.



(A)



(B)

Figure 5. Samples during fermentation kinetics of GRE, GRE1, 2, 3 (A) and of Syrah (SYR) SYR1, 2, 3 (B).

4.3. UHPLC-MS/MS

A UHPLC Nexera X2 UHPLC system was used with two reversed-phase columns in series for separation: Zorbax SB AQ (2.1 × 150 mm and 2.1 × 100 mm 1.8 μm from Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). MS/MS experiments were carried out using the Shimadzu UHPLC system described above coupled with a Shimadzu LCMS-8050 triple quadrupole mass spectrometer using the multiple reaction monitoring (MRM) technique operating in negative ion mode. All UHPLC and MS/MS parameters were identical, as previously described [21]. The average and standard deviations of the chemical analyses were performed on Excel 2013.

5. Conclusions

This study reports the kinetics of extraction of monomeric and dimeric flavanols of mono- and diglycosides in GRE and SYR grape berries, and for the first time, in wine during fermentation. Data were obtained for a total of 22 isomers using a new UHPL-MS technique described in previous work [21].

For all monoglycosides and diglycosides, in addition to each of their 22 isomers, changes in the direction of concentration trends occurred precisely on the seventh day of fermentation for SYR and on the eighth day for GRE. Certain compounds were specific to either grape skins (as DMG isomers) or to seeds (as DDG isomers). The extraction kinetics profiles of total glycosides were similar for both grape varieties. An increase in concentration during fermentation was observed, followed by a degradation of specific compounds at the end of fermentation; the latter observations may be explained by the activity of glycosidases extracted during fermentation and pressing. MMG3 was the major isomer of glycosides in grape skin and seeds and was present during fermentation as well as in GRE and SYR WAP.

Further studies using isolation techniques or hemisynthesis are currently in progress to identify the structure of these new glycosides. Their potential roles as PA precursors and extractions skin markers during fermentation will also be investigated.

Author Contributions: M.Z. wrote the manuscript; M.Z., G.C., and M.-A.D. carried out the experimental parts; C.S., G.C., and M.Z. expertized the protocol and data; M.-A.D. and M.Z. carried out wine experimentations; C.S. designed the study; C.S. and C.E. revised the manuscript. All the authors read and approved the final manuscript.

Funding: This work was supported in part by a PhD grant (Marie Zerbib) from the University of Montpellier (Bourse école doctorale GAIA).

Acknowledgments: We thank Mary Kelly for reading, revising, and improving the English of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

Table A1. Must characteristics.

| Grape Variety | Berry Weight (g) | Brix | Sugars g.L ⁻¹ | Potential Alcohol by Volume %vol |
|---------------|------------------|------|--------------------------|----------------------------------|
| GRE 1 | 584 | 23.2 | 228.7 | 13.59 |
| GRE 2 | 586 | 23.2 | 228.7 | 13.59 |
| GRE 3 | 578 | 23.2 | 228.7 | 13.59 |
| SYR 1 | 561 | 22.0 | 214.8 | 12.76 |
| SYR 2 | 550 | 22.0 | 214.8 | 12.76 |
| SYR 3 | 536 | 22.0 | 214.8 | 12.76 |

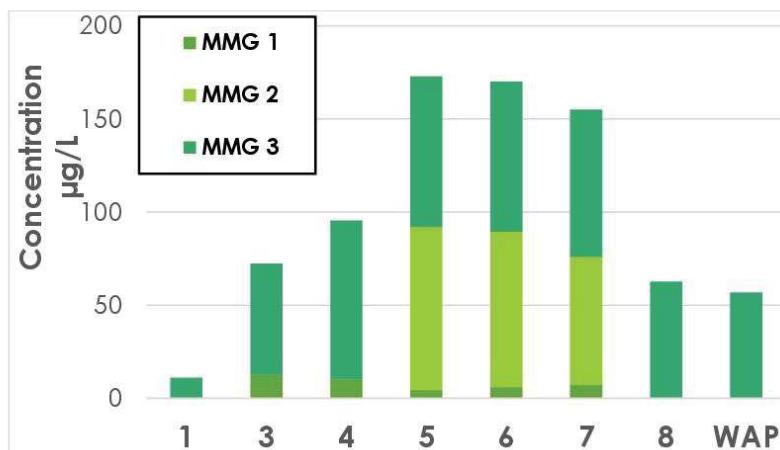


Figure A1. Evolution of MMG isomers during Syrah fermentation.

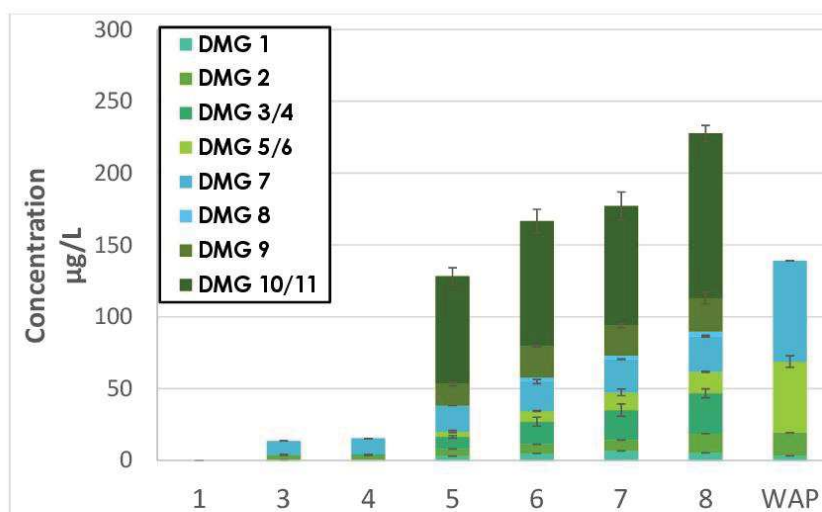


Figure A2. Evolution of DMG isomers during Syrah fermentation.

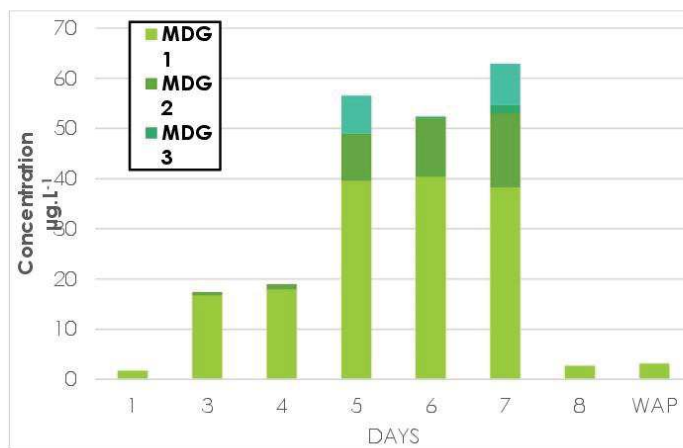


Figure A3. Evolution of MDG isomers during Syrah fermentation.

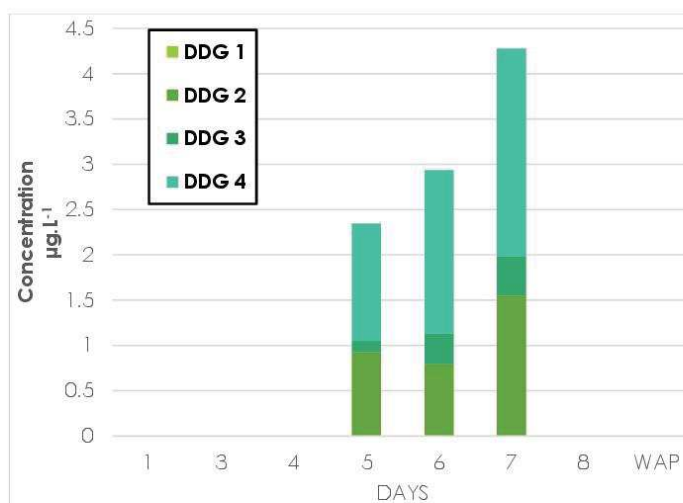


Figure A4. Evolution of DDG isomers during Syrah fermentation.

References

1. Quideau, S.; Deffieux, D.; Douat-Casassus, C.; Pouysegou, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *J. Ges. Deutscher Chem.* **2011**, *50*, 586–621, doi:10.1002/anie.20100044.
2. Quiñones, M.; Miguel, M.; Alexandre, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharm. Res.* **2013**, *68*, 125–131, doi:https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.018.
3. Corder, R.; Mullen, W.; Khan, N.Q.; Marks, S.C.; Wood, E.G.; Carrier, M.J.; Crozier, A. Oenology: Red wine procyanidins and vascular health. *Nature* **2006**, *444*, 566, doi:https://doi.org/10.1038/444566a.
4. Baur, J.A.; Sinclair, D.A. Therapeutic potential of resveratrol. *Nat. Rev. Drug Dis.* **2006**, *5*, 493–506, doi:10.1038/nrd2060.
5. Popović, B.M.; Štajner, D.; Ždero-Pavlović, R.; Tumbas-Šaponjac, V.; Čanadanović-Brunet, J.; Orlović, S. Water stress induces changes in polyphenol profile and antioxidant capacity in poplar plants (*Populus spp.*). *Plant Physiol. Biochem.* **2016**, *105*, 242–250, doi:https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.036.
6. Mazza, G.; Brouillard, R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1097–1102, doi:https://doi.org/10.1016/0031-9422(90)85411-8.
7. Brouillard, R.; Dangles, O. Anthocyanin molecular interactions: The first step in the formation of new pigments during wine aging? *Food Chem.* **1994**, *51*, 365–371, doi:https://doi.org/10.1016/0308-8146(94)90187-2.
8. Rinaldi, A.; Jourdes, M.; Teissedre, P.L.; Moio, L. A preliminary characterization of Aglianico (*Vitis vinifera L. cv.*) grape proanthocyanidins and evaluation of their reactivity towards salivary proteins. *Food Chem.* **2014**, *164*, 142–149, doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.050.
9. Vidal, S.; Cartalade, D.; Souquet, J.-M.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. Changes in proanthocyanidin chain length in winelike model solutions. *J. Agr. Food Chem.* **2002**, *50*, 2261–2266.
10. Gil-Muñoz, R.; Gómez-Plaza, E.; Martínez, A.; López-Roca, J.M. Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and post-fermentation: influence of grape temperature. *J. Food Compos. Anal.* **1999**, *12*, 259–272, doi:https://doi.org/10.1006/jfca.1999.0834.
11. González-Manzano, S.; Dueñas, M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C. Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chem.* **2009**, *114*, 649–656, doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.002.
12. Pinasseau, L.; Verbaere, A.; Roques, M.; Meudec, E.; Vallverdú-Queralt, A.; Terrier, N.; Boulet, J.C.; Cheynier, V.; Sommerer, N. A Fast and Robust UHPLC-MRM-MS method to characterize and quantify grape skin tannins after chemical depolymerization. *Molecules* **2016**, *21*, 1409, doi:10.3390/molecules21101409.
13. Kennedy, J.A.; Troup, G.J.; Pilbrow, J.R.; Hutton, D.R.; Hewitt, D.; Hunter, C.R.; Ristic, R.; Iland, P.G.; Jones, G.P. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera L. cv. Shiraz*. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2008**, *6*, 544–254, doi:10.1111/j.1755-0238.2000.tb00185.x.
14. Di Lecce, G.; Arranz, S.; Jáureguic, O.; Tresserra-Rimbau, A.; Quifer-Rada, P.; Lamuela-Raventós, R.M. Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry. *Food Chem.* **2014**, *145*, 874–882, doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.115.
15. Delcambre, A.; Saucier, C. Identification of new flavan-3-ol monoglycosides by UHPLC-ESI-Q-TOF in grapes and wine. *J. Mass Spec.* **2012**, *47*, 727–736, doi:10.1002/jms.3007.
16. Zerbib, M.; Mazaauric, J.-P.; Meudec, E.; Le Guernevé, C.; Lepak, A.; Nidetzky, B.; Cheynier, V.; Terrier, N.; Saucier, C. New flavanol O-glycosides in grape and wine. *Food Chem.* **2018**, *266*, 441–448, doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.019.
17. Raab, T.; Barron, D.; Arce Vera, F.; Crespy, V.; Oliveira, M.; Williamson, G. Catechin Glucosides: Occurrence, Synthesis, and Stability. *Food Chem.* **2010**, *58*, 2138–2149, doi:https://doi.org/10.1021/jf9034095.
18. Kitao, S.; Ariga, T.; Matsudo, T.; Sekine, H. The syntheses of catechin-glucosides by transglycosylation with leuconostoc mesenteroides sucrose phosphorylase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1993**, *57*, 2010–2015, doi:10.1271/bbb.57.2010.
19. Pang, Y.; Peel, G.J.; Sharma, S.B.; Tang, Y.; Dixon, R.A. A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula*. *PNAS* **2008**, *105*, 14210–14215, doi:10.1073/pnas.0805954105.
20. Guadalupe, Z.; Ayestaran, B. Changes in the color components and phenolic content of red wines from *Vitis vinifera L. Cv. "Tempranillo"* during vinification and aging. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *228*, 29–38, doi:10.1007/s00217-008-0902-2.

21. Zerbib, M.; Cazals, G.; Enjalbal, C.; Saucier, C. Identification and quantification of flavanol glycosides in *vitis vinifera* grape seeds and skins during ripening. *Molecules* **2018**, *23*, 2745, doi:10.3390/molecules23112745.
22. Damberg, R.G.; Sparrow, A. The "Bodum French Press": A simple, reliable small-lot red wine fermentation method. In Proceeding of 14th Australian Wine Industry Technical Conference, Adelaide, Australia, 3–8 July 2010; p. 353.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Conclusion générale

Bilan des résultats de thèse

Au terme de ce manuscrit, une conclusion générale sur les résultats et observations obtenus sur « *les flavanols glycosylés, du raisin au vin* » s'impose. Une étude bibliographique préliminaire a permis dans un premier temps de mettre en lumière les enjeux des recherches sur les flavanols glycosylés. Détectés dans de nombreuses espèces de plantes, ils pourraient être des précurseurs potentiels des proanthocyanidines, polyphénols majoritaires du raisin.

Deux voies de synthèses et de purification marquantes de flavanols glycosylés ont été détaillées dans ce manuscrit.

- ❖ Une méthode d'extraction/purification sur extrait de polyphénols provenant de vin Tannat a été testée, l'une par fractionnement sur des disques de type Styrène Divinyl Benzene (SDB), et l'autre par des étapes d'extractions liquide-liquide successives. L'utilisation des deux méthodes a permis de mettre en évidence l'affinité particulière des dimères de flavanols glycosylés pour le solvant éther diéthylique. Les flavanols glycosylés sont des composés minoritaires du vin et du raisin. Une quantité importante de matière première doit ainsi être utilisée pour les isoler. Etant plus facilement réalisable en grand volume, le fractionnement sur disques SDB a été sélectionné pour des étapes de purification supplémentaires sur colonne de type SDB. Les fractions d'intérêt ont ensuite été rassemblées et analysées par chromatographie semi préparative. Cette méthode a permis pour la première fois l'isolation d'un dimère d'(épi) catéchine glycosylé, dont l'identification a été validée par spectrométrie de masse.
- ❖ Deux glucosyltransférases, l'UGT72L1 et l'UGT71A15 ont été ciblées car décrites comme ayant des affinités pour les flavanols et produites avec succès au laboratoire. Des hémisynthèses sur des flavanols commerciaux, la (+)-catéchine, l'(-)-épicatéchine et un dimère de flavanol de type B1, ont ainsi pu être testées. Les résultats ont été peu concluants concernant l'UGT72L1 de l'équipe de Dixon. L'hémisynthèse mettant en jeu l'UGT71A15 a permis l'obtention de deux catéchines glucosylés, la C7OG et la C4'OG ; cette dernière a été isolée et sa structure a été caractérisée et validée par

spectrométrie de masse et RMN. Cette molécule a servi d'étalon interne pour les quantifications des flavanols glycosylés dans les raisins et les vins.

Au terme de ce travail, un état de l'art de la composition en flavanols glycosylés a été réalisé dans le raisin et le vin. Des différences de quantités relatives selon le cépage, le tissu (pépin ou pellicule) et le stade de maturité ont été mises en évidence. Certains monomères ont été détectés comme appartenant à la classe des β -D-glucosides, par comparaison avec le standard C4'OG.

L'évolution des flavanols glycosylés au cours de la maturation du raisin a ensuite été étudiée séparément dans les pellicules et les pépins de raisin. Une méthode de quantification basée sur l'UHPLC-ESI-QqQ-MRM a été optimisée. La C4'OG a ainsi été utilisée comme standard interne et a permis la semi quantification des isomères de flavanols mono et diglycosylés. Des monomères et dimères d' (épi) catéchine diglycosylés ont été découverts pour la première fois et uniquement dans les pépins de raisins. Une diminution en monomère d' (épi) catéchine monoglycosylés a été mesurée dans la pellicule au cours de la maturation du raisin. Les dimères s'accumulent un peu après le point de véraison et ensuite diminuent lorsque la baie est à maturité. Les monomères et dimères d' (épi) catéchine diglycosylés s'accumulent dans les pépins au cours de la maturation. Des études complémentaires sont désormais nécessaires afin d'analyser leur rôle potentiel d'intermédiaire dans la biosynthèse des tannins.

Finalement, les cinétiques d'évolution des monomères et des dimères de flavanols mono et diglycosylés ont été suivies au cours de la fermentation alcoolique (FA) de microvinifications de raisins de variété Grenache et Syrah. Les cinétiques d'extraction de ces composés sont globalement similaires avec quelques décalages dans le temps pour certains composés. Une augmentation globale de chaque famille a été mesurée jusqu'au 7^{ème} jour de fermentation, et ensuite un fort déclin en fin de FA dans le cas de l'expérimentation sur Syrah. Pour le Grenache, une diminution a été mesurée après pressurage. Certains isomères de flavanols glycosylés se dégradent tandis que d'autres spécifiques subsistent dans les vins finaux. Ceci suggère la présence de sites de glycosylation différents selon les composés qui pourraient être

potentiellement dégradés ou non par des glycosidases de raisin ou de levure pendant la fermentation.

Perspectives globales

En finalité des travaux abordés durant ces trois ans, différentes perspectives peuvent être envisagées.

Les premiers objectifs ont été de mettre en place différentes voies d'obtention de flavanols glycosylés afin d'étudier leurs structures dans le raisin et dans le vin. Dans des travaux futurs, il serait tout d'abord possible d'effectuer de nouveaux les étapes d'extraction et de purification sur des extraits de Tannat, mais en plus grande quantité. L'isomère de dimère d' (épi) catéchine monoglycosylés pourrait ainsi être caractérisé par RMN.

D'autres tests enzymatiques pourraient aussi être testés. Certaines hémisynthèses utilisant la β -glucosidase d'amande ont aussi été réalisées au laboratoire, et pourraient être optimisées dans de futurs travaux.

Des tests de polymérisation pourraient également être mis en place à partir de flavanols et flavanols glycosylés marqués par un isotope (comme le Carbone 13). L'objectif serait de synthétiser ces composés en utilisant des flavanols commerciaux marqués au ^{13}C , de les insérer dans une cellule et d'analyser ensuite les produits de condensation formés, comme illustrés en **Figure 26** afin de vérifier l'incorporation des monomères glycosylés dans des polymères.

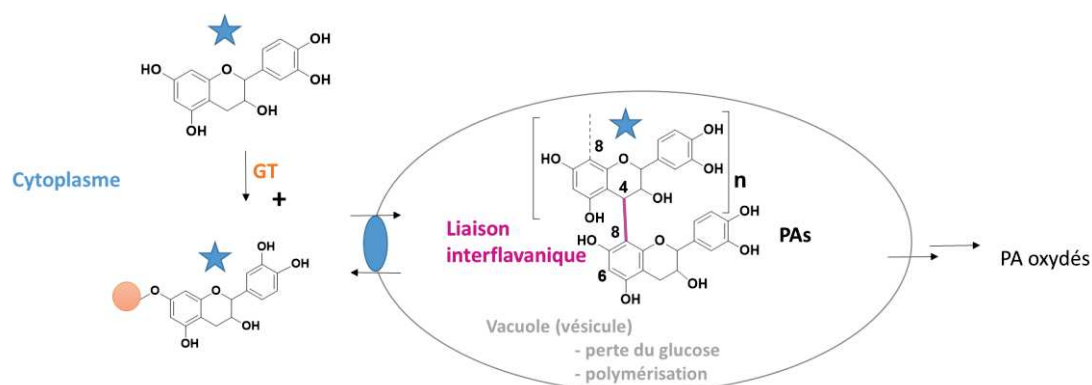


Figure 26 – Proposition de mécanismes de polymérisation des flavan-3-ols glycosylés marqués en ^{13}C (étoile bleue) en proanthocyanidines

Une autre voie de recherche possible serait d'élucider la nature de certaines GTs responsables de glycosylation des flavanols car de nombreux isomères ont été mis en évidence impliquant certainement différentes GTs.

Enfin, il serait intéressant de mieux caractériser les structures des différents isomères et leurs sensibilités aux glycosidases responsables de l'hydrolyse des flavanols glycosylés pendant la fermentation. On peut aussi imaginer leur rôle potentiel dans la polymérisation des PA avec des phases successives de glycosylation et de déglycosylation des flavanols.

Liste des figures

Figure 1 – Schéma de la baie de raisin

Figure 2 – Courbes théoriques montrant l'évolution de la morphologie de la baie accompagnée de la concentration en sucres, anthocyanes et tanins

Figure 3 – Structures moléculaires des acides a. hydroxybenzoïques et b. hydroxy cinnamiques et tartriques

Figure 4 – Structures du resvératrol et son dérivé glucosylé

Figure 5 – Les sous-familles de flavonoïdes

Figure 6 – Les principaux flavonols retrouvés dans le raisin

Figure 7 – Les anthocyanidines trouvés dans le raisin et la structure de la malvidine 3-O-glucoside

Figure 8 – Les monomères de flavan-3-ols présents dans le raisin

Figure 9 – Structures des dimères de flavan-3-ols de type A et B

Figure 10 – La biosynthèse des principaux flavonoïdes

Figure 11 – Propositions de mécanismes de polymérisation des flavan-3-ols en proanthocyanidines

Figure 12 – Rôle possible de l'épicatéchine 3'-O-glucoside dans la biosynthèse des PA par la glucosyltransferase UGT72L1

Figure 13 – Les différentes structures d' (épi) catéchine hexosides

Figure 14 – Structures de dimères de flavanols glycosylés en fonction des différentes positions de l'hexose

Figure 15 – Réaction de transglucosylation par une enzyme de type glucosidase

Figure 16 – Préparation du glucose activé pour la glucosylation

Figure 17 – Première voie d'hémisynthèse chimique de la C3'OG et de la C5OG

Figure 18 – Seconde voie d'hémisynthèse chimique de la C3OG

Figure 19 – Histogrammes représentant les intensités EIC des monomères d'(épi) catéchine glycosylés (m/z 451) en rose et des dimères d'(épi) catéchine glycosylés (m/z 739) dans les fractions eau, éther et acétate d'éthyle provenant des extractions liquide-liquide en A, et des disques SDB en B

Figure 20 – Histogrammes représentant les masses de chaque fraction (A) et les intensités relatives en EIC des dimères d' (épi) catéchine glycosylés (m/z 739) en bleu (B)

Figure 21 – Chromatogramme UV (280 nm) en A, EIC à m/z 739 en B et la MS^{2/3} correspondante de la fraction 4 provenant de la chromatographie semi préparative (chromatogramme UV à 280 nm en Annexe 1)

Figure 22 – Courbe d'étalonnage de BSA

Figure 23 – Chromatogrammes UV à 280 nm de la réaction avec l'UGT72L1, l'UDPG et la (+)-catéchine (en B) ou l'(-)-épicatéchine

Figure 24 – Schéma d'un spectromètre de masse triple quadripôle opérant en mode MRM

Figure 25 – Exemples de spectres de masse de second ordre avec les ions fils sélectionnés :

A. (épi) catéchine glycosylés (m/z 451) ; B. dimère d' (épi) catéchine glycosylé (m/z 739)

Figure 26 – Proposition de mécanismes de polymérisation des flavan-3-ols glycosylés marqués en ¹³C en proanthocyanidines

Liste des tableaux

Tableau 1 – Teneurs en (épi) catéchine et tanins retrouvées par kg de tissus du raisin et dans le vin blanc et rouge

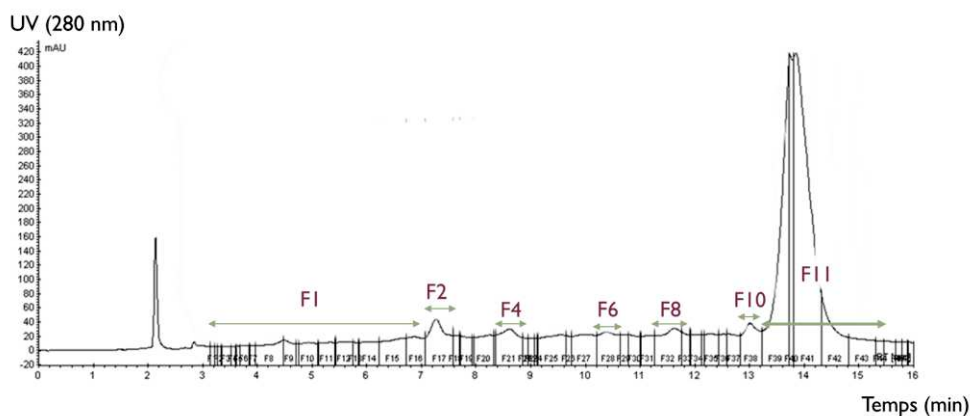
Tableau 2 – Stratégies d'obtention de composés glycosylés

Tableau 3 – Liste des composés d'intérêt avec leur masse ionisée correspondante (m/z)

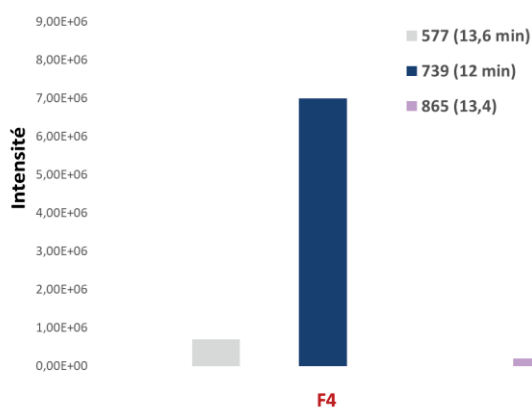
Tableau 4 – Nombres d'isomères de flavanols glycosylés retrouvés dans les pépins et pellicules de Merlot, Syrah et Tannat

Annexes

Chapitre 2- Flavan-3-ols glycosylés présents dans le raisin et dans le vin



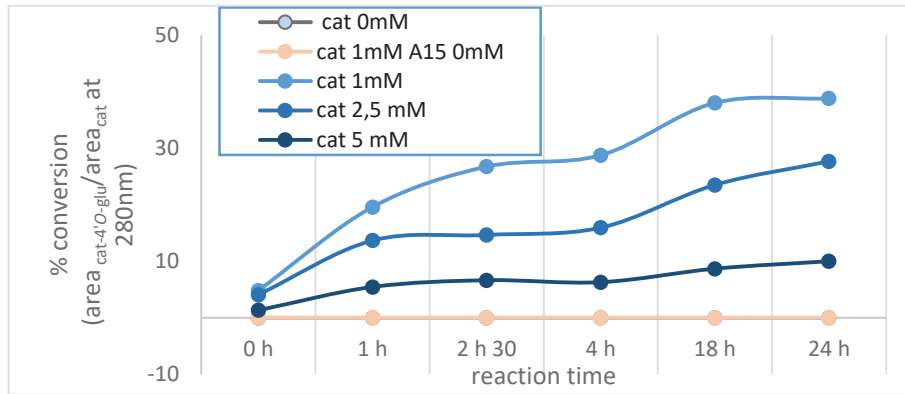
Annexe 1 – Chromatogramme UV à 280 nm des fractions du gel 40S 6, 7 et 8 injectées en chromatographie semi préparative



Annexe 2 – Histogramme représentant la composition de la fraction F4 de la chromatographie semi-préparative (Annexe 1) en intensités EIC du dimère (m/z 577, en gris) et du trimère (m/z 865, en violet) d' (épi) catéchine et du dimère d' (épi) catéchine glycosylés (m/z 739) en bleu foncé

Appendix article 1: New O-glycosides in wines and grapes

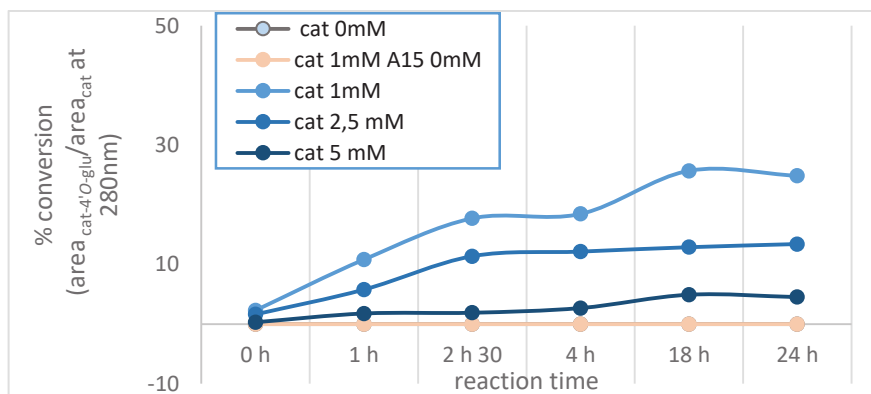
- (+)-catechin 4'-O-β-glucoside (C4'OG)



Cat : (+)-catechin

A15 : UGT71A15

- (+)-catechin 7-O-β-glucoside (C7OG)



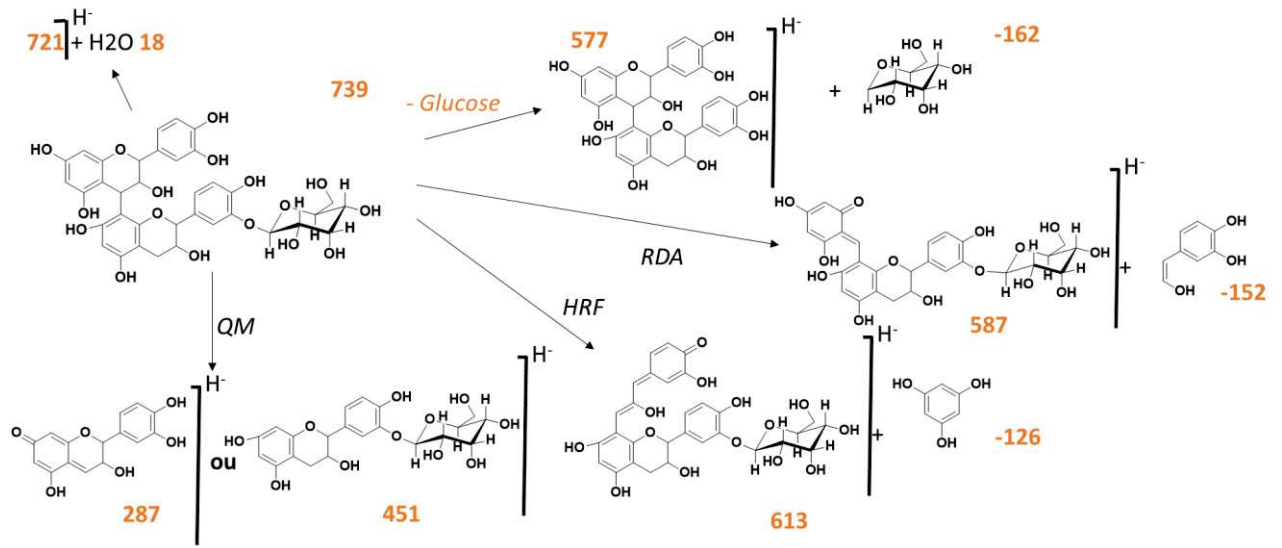
Controls cat 0 mM : reaction without (+)- catechin concentration

 cat 1 mM A15 0 mM : reaction without A15 enzyme

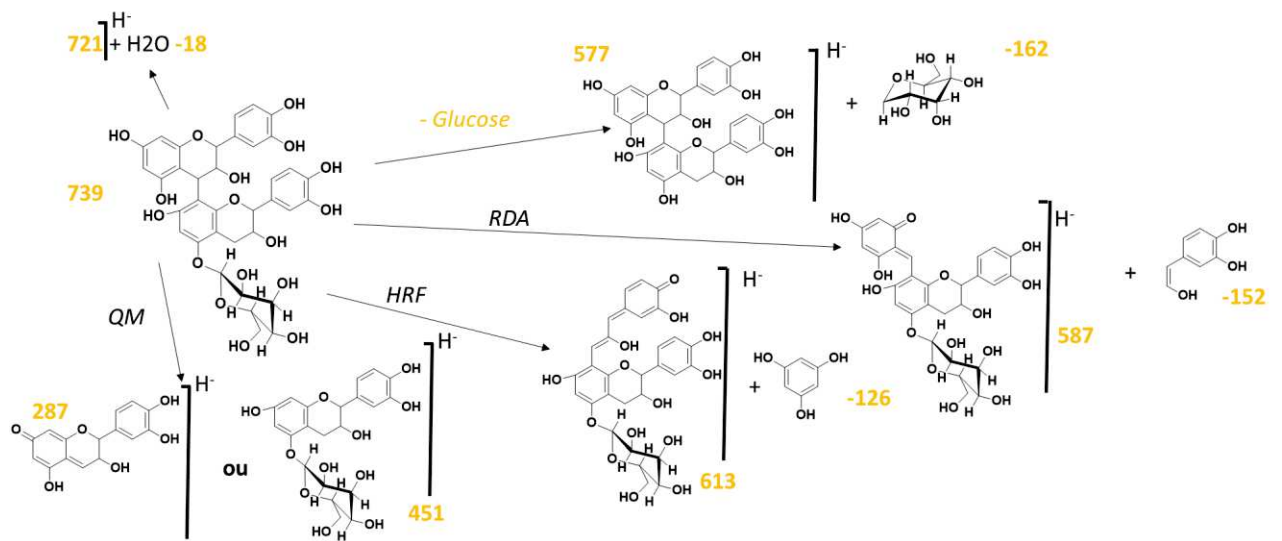
Appendix 1. Catechin conversion to glucoside: (+)-catechin 4'-O-β-glucoside (C4'OG) and (+)-catechin 7-O-β-glucoside (C7OG).

| FRAGMENTS MS ^{2/3} | LOWER UNIT | LOWER UNIT | UPPER UNIT | UPPER UNIT |
|-----------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | A-RING | A-RING | B-RING | A-RING |
| 273 | X | | X | |
| 287 | X | X | | X |
| 289 | | | X | X |
| 339 | | | | X |
| 425 | X | X | X | X |
| 435 | | X | | X |
| 449 | | | X | X |
| 451 | X | X | X | X |
| 575 | | | | X |
| 577 | X | X | X | X |
| 587 | X | X | X | X |
| 613 | X | X | X | |
| 721 | X | X | X | X |

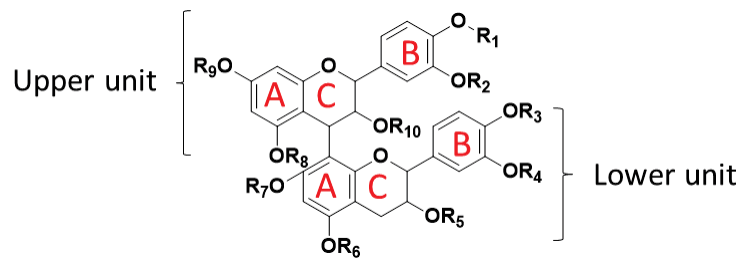
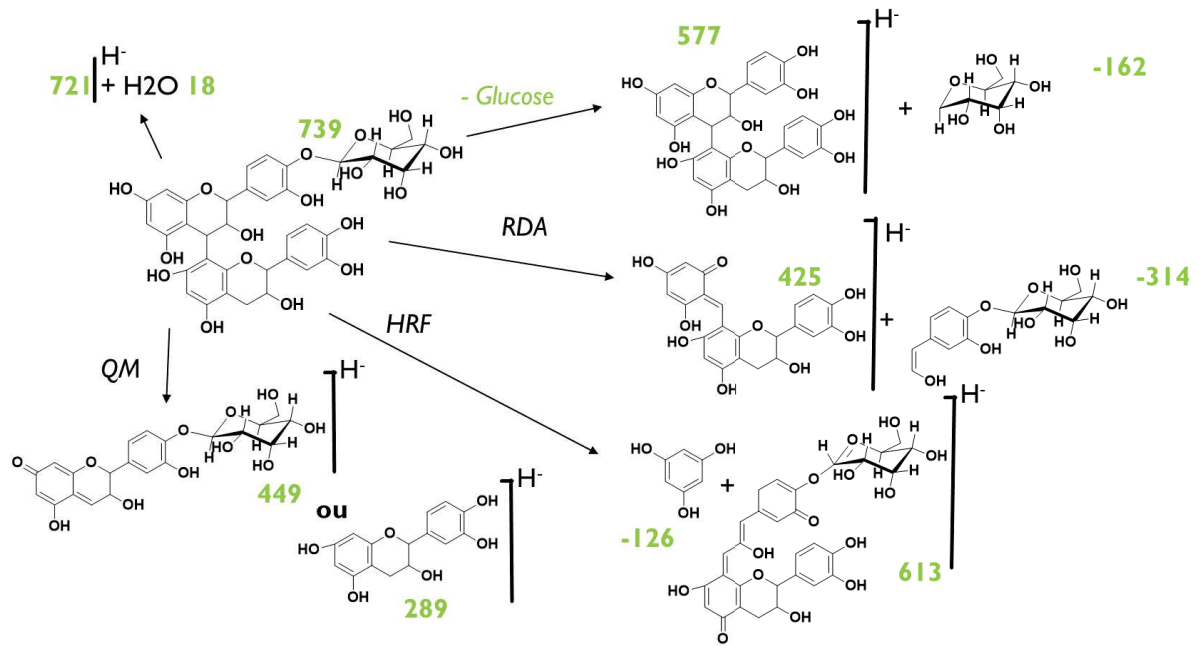
Example 1: Lower Unit, B-ring



Example 2: Lower Unit, A-ring



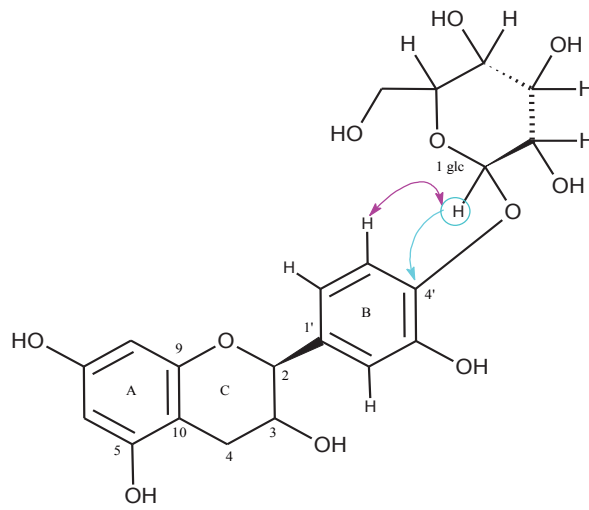
Example 3: Upper Unit, B-ring



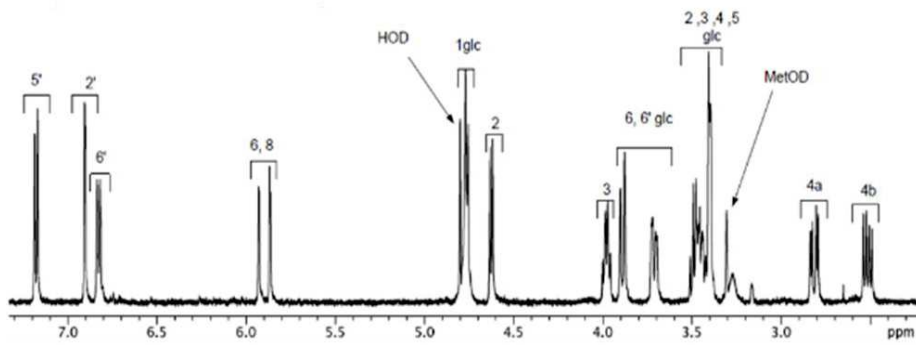
R₁ to 10 = H or Hexose

Appendix 2. Proanthocyanidin hexosides fragments depending on glucose position.

- (+)-catechin-4'-O- β -glucoside

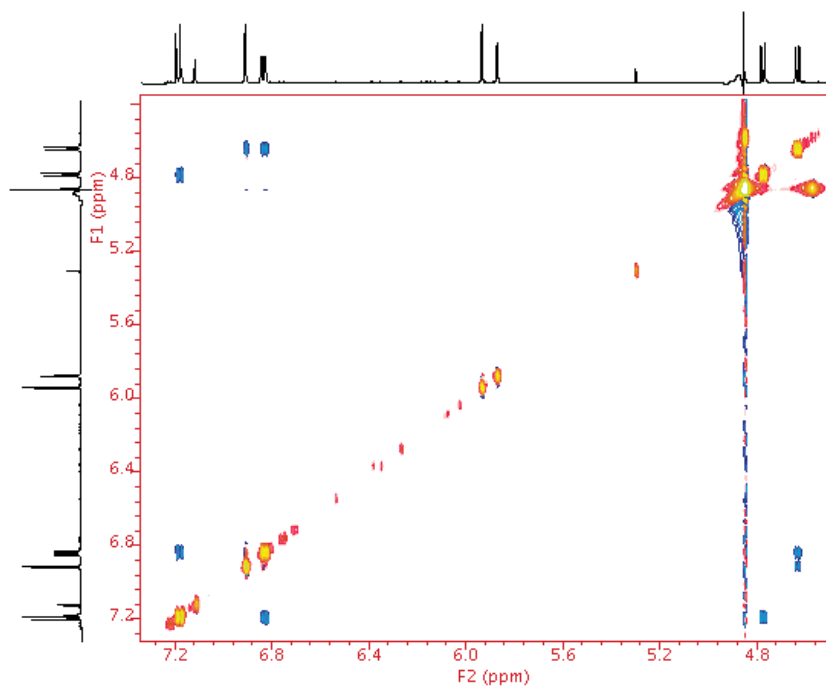


^1H NMR :



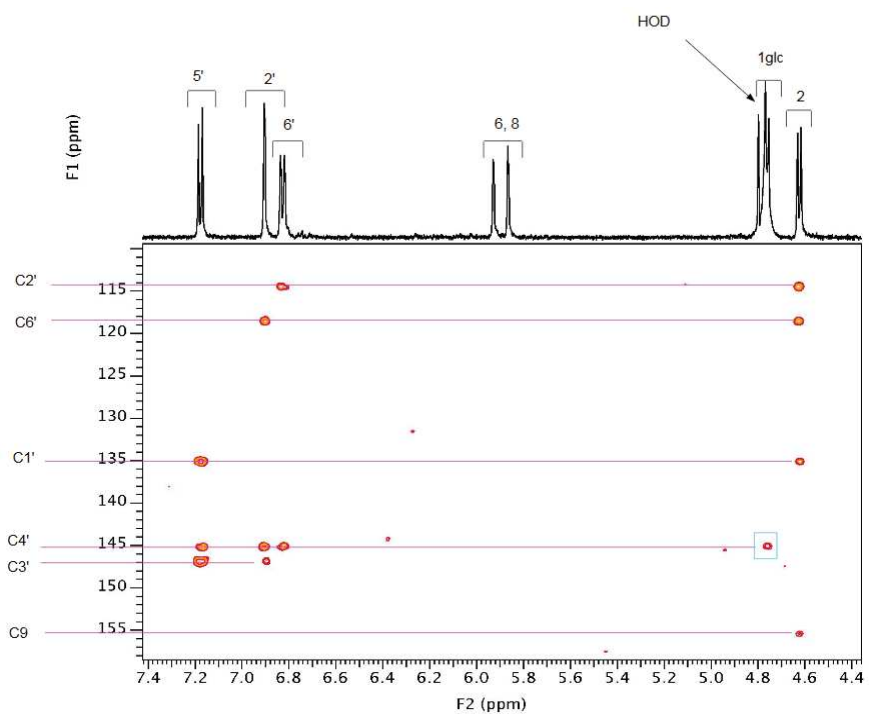
ROESY:

Showing a correlation between the anomeric glucose proton (H1glc) and the proton H5'B of the catechin adduct

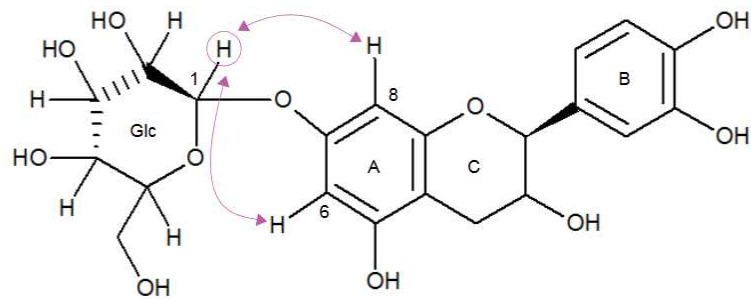


2D HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$:

Showing a correlation between the anomeric glucose proton (H1_{glc}) and the carbon $\text{C4}'_{\text{B}}$ of the catechin adduct

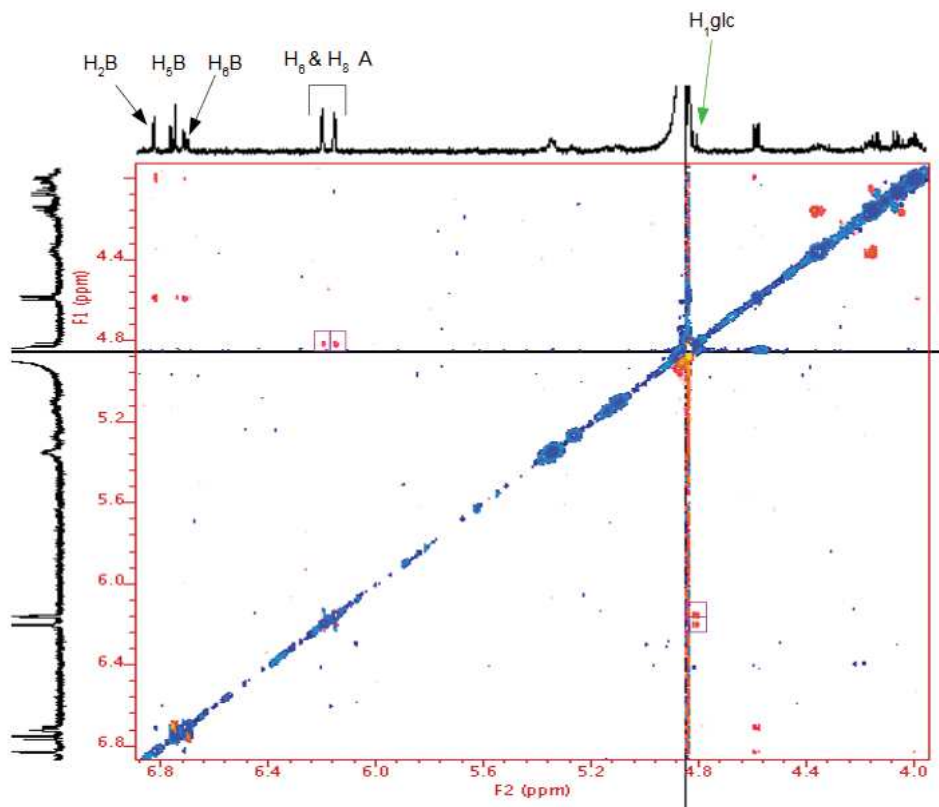


- (+)-catechin-7-O- β -glucoside



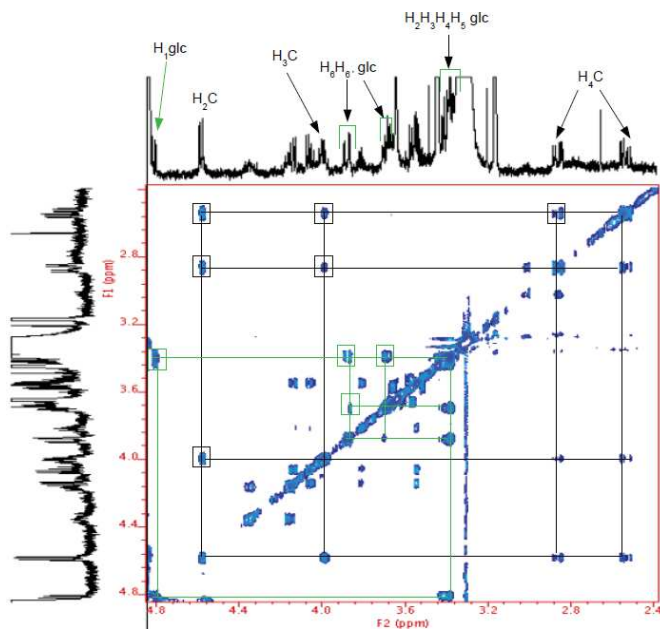
ROESY

Showing the correlations between the anomeric glucose proton (H1_{glc}) and the proton H6_A and H8_A of catechin adduct

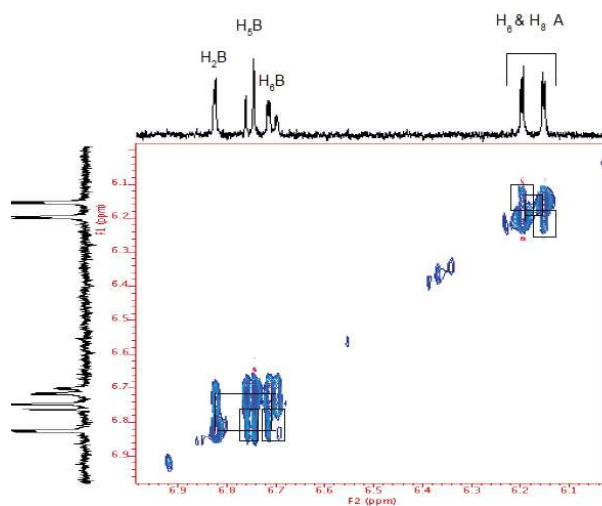


TOCSY (Top: 1D ^1H NMR spectrum):

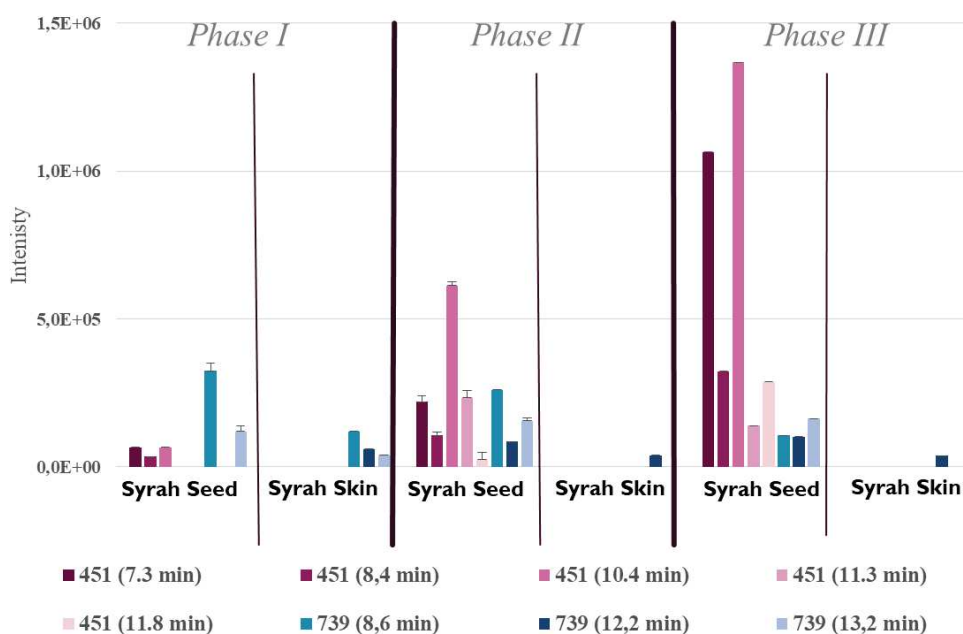
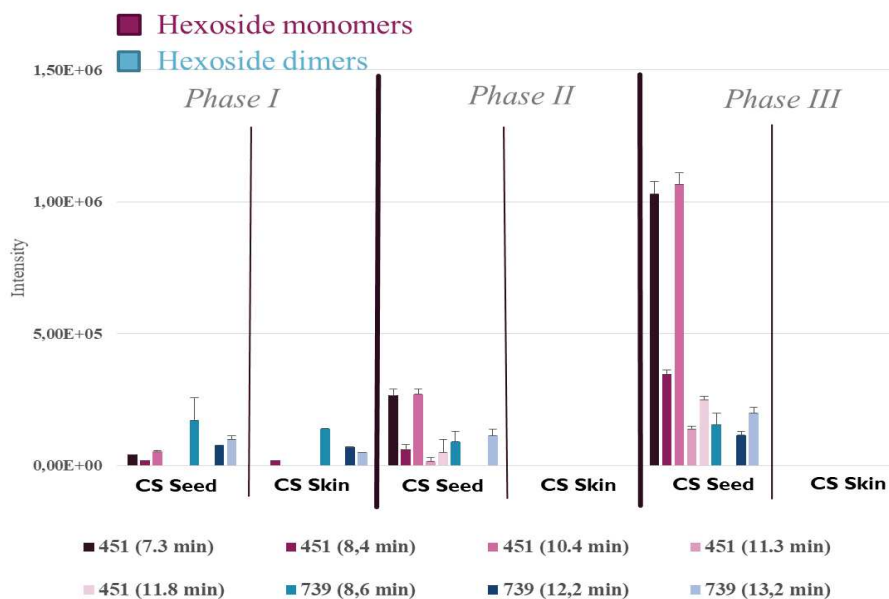
Showing correlations implying the aliphatic protons of catechin adduct (in black) and the protons of glucose moieties (in green)



Showing the correlations implying the aromatic protons of catechin adduct



Appendix 3.



Error bars correspond to MS intensity triplicate analyses.

Appendix 4. Flavanol hexosides present in Cabernet Sauvignon (CS) and Syrah in phase I (P-I), phase II (P-II) and phase III (P-III).

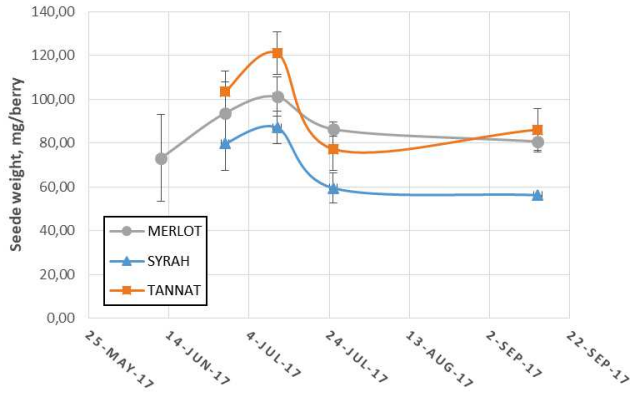
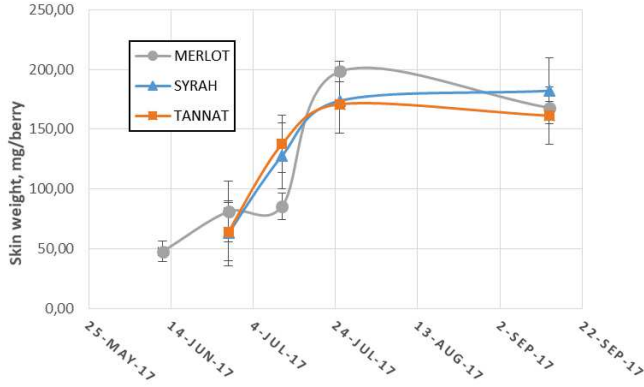
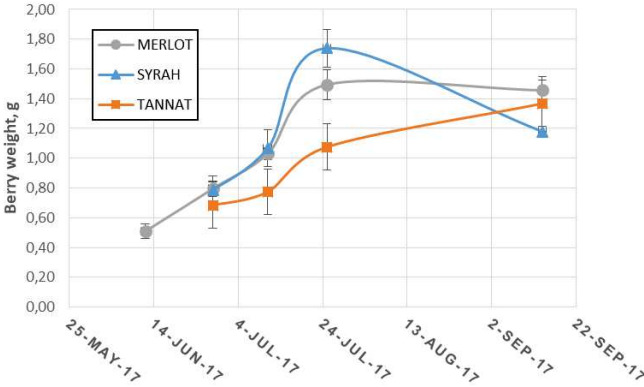
| <i>Retention time of flavanol hexoside monomers (min)</i> | <i>MS2/3 fragments</i> |
|---|------------------------|
| 7,3 | 289 |
| 8,4 | 289 |
| 10,4 | 289 |
| 11,3 | 289 |
| 11,8 | 289 |

| <i>Retention time of flavanol hexoside dimers (min)</i> | <i>MS2/3 fragments</i> | <i>Theoretical hexose position</i> |
|---|--|--|
| 7,7 | 289, 577, 587, 721 | Upper unit – B ring Upper unit - A ring |
| 8,6 | 287, 449, 451, 721 | Upper unit – A ring |
| 11,8 | 289, 451, 577, 721 | Upper unit – B ring Upper unit - A ring |
| 12,2 | 287, 289, 341, 339, 435, 449, 451, 569, 587, 721 | Upper unit – A ring |
| 13,2 | 289, 339, 417, 435, 449, 451, 577, 587, 721 | Upper unit – A ring |
| 14 | 287, 289, 271, 339, 449, 451, 587, 721 | Upper unit – A ring |

Appendix 5. *MS^{2/3} of flavanol hexoside monomers and dimers*

Chapitre 3 - Evolution de la teneur en flavanols glycosylés au cours de la maturation du raisin

Appendix de l'article 2: Identification and quantification of flavanol glycosides in Vitis Vinifera grape seeds and skins during ripening



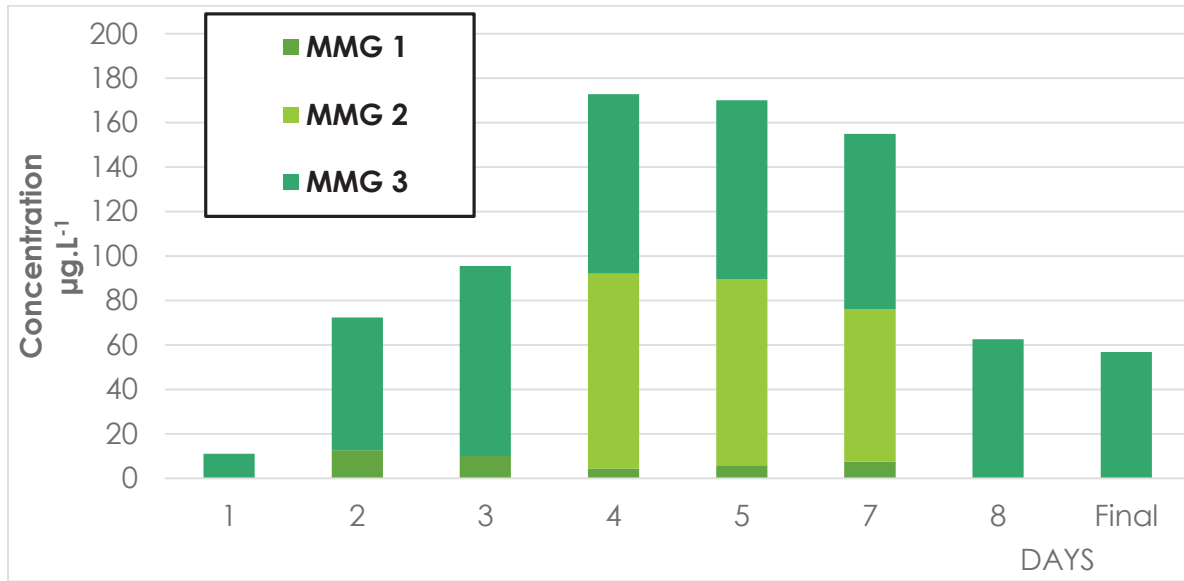
Appendix A

Chapitre 4 - Suivi de l'évolution des flavanols glycosylés au cours de l'élaboration du vin rouge

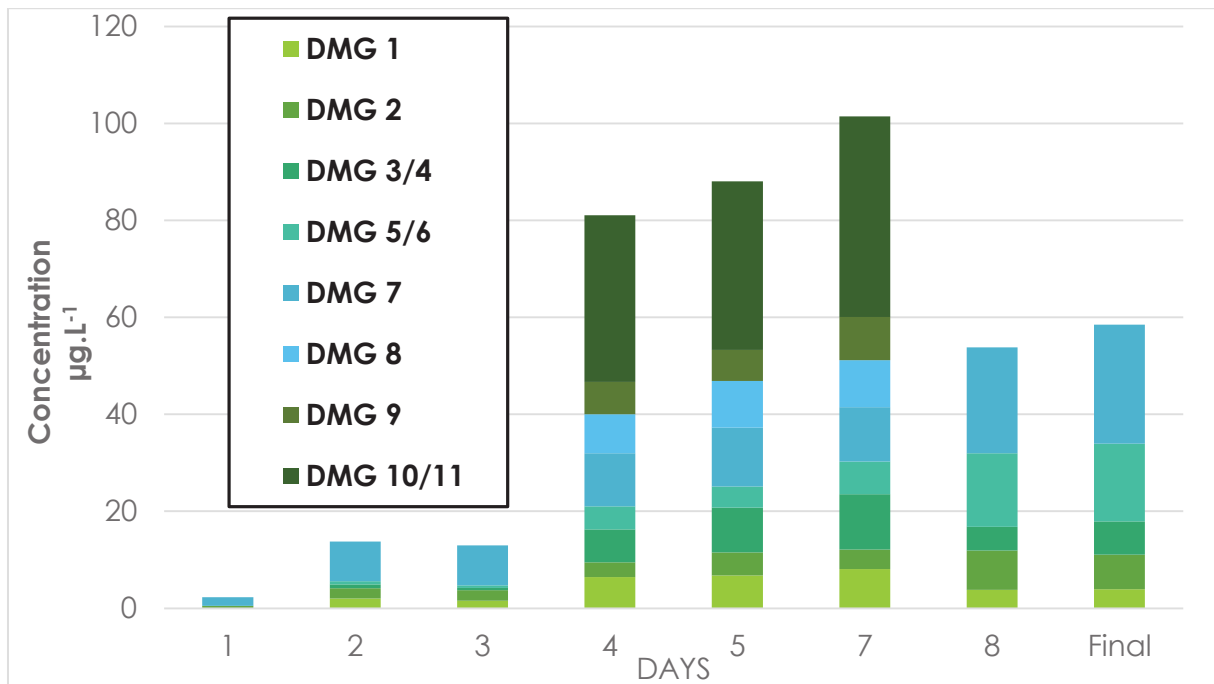
Appendix de l'article 3: *Evolution of flavanol glycosides during red grape fermentation*

| GRAPE VARIETY | BERRY WEIGHT (g) | °BRIX | SUGARS g.L⁻¹ | POTENTIAL ALCOHOL BY VOLUME %VOL |
|----------------------|-------------------------|--------------|--------------------------------|---|
| GRE 1 | 584 | 23,2 | 228,7 | 13,59 |
| GRE 2 | 586 | 23,2 | 228,7 | 13,59 |
| GRE 3 | 578 | 23,2 | 228,7 | 13,59 |
| SYR 1 | 561 | 22,0 | 214,8 | 12,76 |
| SYR 2 | 550 | 22,0 | 214,8 | 12,76 |
| SYR 3 | 536 | 22,0 | 214,8 | 12,76 |

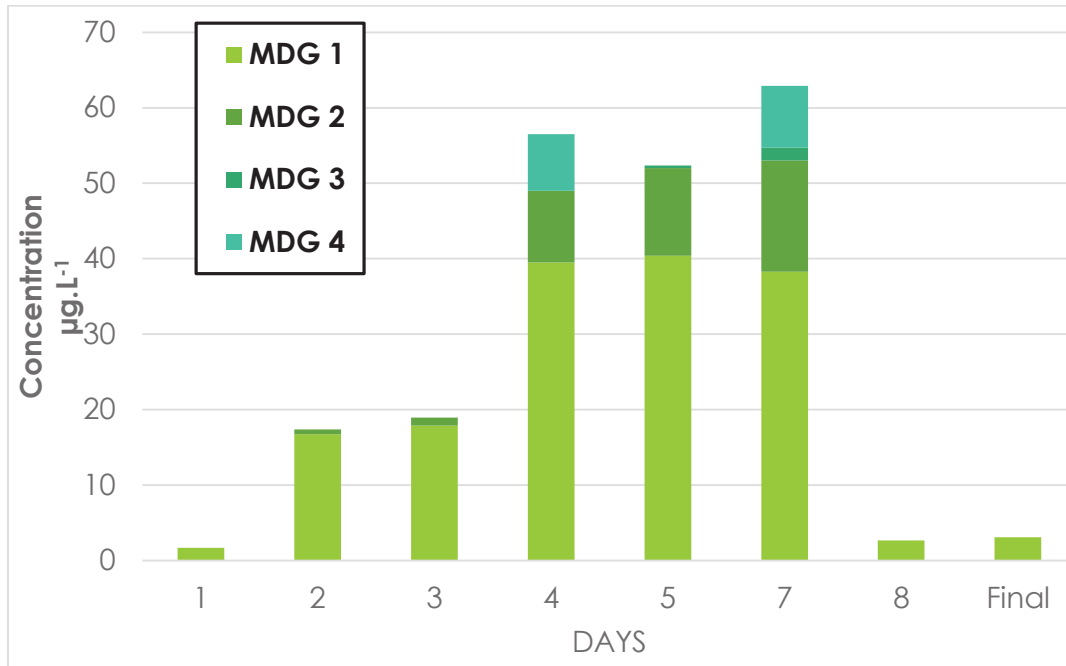
Appendix A – Must Characteristics



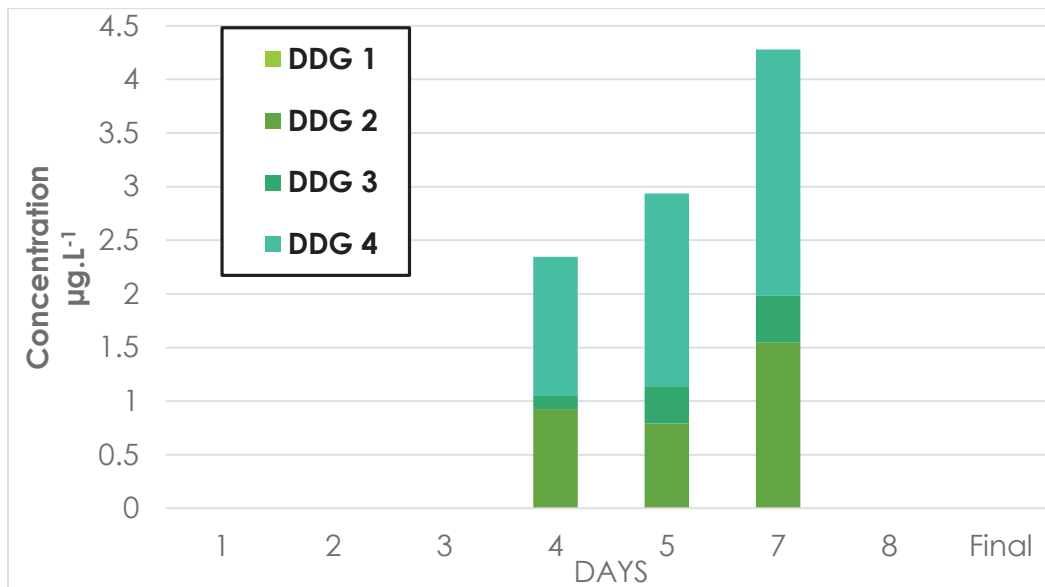
Appendix B – Evolution of MMG isomers during Syrah fermentation



Appendix C – Evolution of DMG isomers during Syrah fermentation



Appendix D – Evolution of MDG isomers during Syrah fermentation



Appendix E – Evolution of DDG isomers during Syrah fermentation

Références

- Abrahams, S., Lee, E., A.R., W., Tanner, G. J., Larkin, P. J. and Ashton, A. R. (2003), "The Arabidopsis TDS4 gene encodes leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) and is essential for proanthocyanidin synthesis and vacuole development", *The Plant Journal*, Vol.35 p. 624-636.
- Allgrove, J. and Davison, G. (2014), Chapter 19 - Dark Chocolate/Cocoa Polyphenols and Oxidative Stress, *Polyphenols in Human Health and Disease*, R. R. Watson, V. R. Preedy and S. Zibadi, San Diego, Academic Press, Vol. 1, p. 241-251.
- Antoniolli, A., Fontana, A. R., Piccoli, P. and Rubén, B. (2015), "Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec", Vol.178 p. 172–178.
- Aron, P. M. and Kennedy, J. A. (2008), "Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity", *Mol Nutr Food Res*, Vol.52 n°1, p. 79-104.
- Avram, A. M., Morin, P., Brownmiller, C., Howard, L. R., Sengupta, A. and Wickramasinghe, S. R. (2017), "Concentrations of polyphenols from blueberry pomace extract using nanofiltration", *Food and Bioproducts Processing*, Vol.106 p. 91-101.
- Bae, Y.-S., Burger, J. F. W., Steynberg, J. P., Ferreira, D. and Richard, W., H. (1994), "Flavan and procyanidin glycosides from the bark of blackjack oak", *Phytochemistry*, Vol.35 n°2, p. 473-478.
- Baur, J. A. and Sinclair, D. A. (2006), "Therapeutic potential of resveratrol: the", *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol.5 n°6, p. 493-506.
- Biagi, M. and Bertelli, A. A. E. (2015), "Wine, alcohol and pills: What future for the French paradox?", *Life Sciences*, Vol.131 p. 19-22.
- Bishop, P. D. and Nagel, C. W. (1984), "Characterization of the condensation product of malvidin diglucoside and catechin", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.32 n°5, p. 1022-1026.
- Bogs, J., Downey, M. O., Harvey, J. S., Ashton, A. R., Tanner, G. J. and Robinson, S. P. (2005), "Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and Anthocyanidin Reductase in Developing Grape Berries and Grapevine Leaves", *American Society of Plant Biologists*, Vol.139 n°2, p. 652-663.
- Boido, E., Garcia-Marino, M., Dellacassa, E., Carrau, F., Rivas-Gonzalo, J. C. and Escribano-Bailon, M. T. (2011), "Characterisation and evolution of grape polyphenol profiles of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat during ripening and vinification", *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol.17 n°3, p. 383-393.
- Bontpart, T. (2015), "Vers l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la galloylation des proanthocyanidines chez la vigne", *thèse de doctorat. INRA*, p.
- Bourzeix, M., Weyland, D., Heredia, N. and Desfieux, C. (1986), "Bulletin de l'O.I.V.", Vol.59 p. 1171-1253.

- Bradford, M. M. (1976), "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, Vol.72 n°7, p. 248-254.
- Brouillard, R., Dangles, O. (1994), "Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging?", *Food Chemistry*, Vol.51 n°4, p. 365-371.
- Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., M. López-Roca, J., Gil-Muñoz, R., Fernández-Fernández, J. I. and Bautista-Ortín, A. B. (2010), "Effect of Different Enological Practices on Skin and Seed Proanthocyanidins in Three Varietal Wines", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.58 n°21, p. 11333–11339.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M. V., Velders, A. H. and I., H.-G. (2009), "Flavonol 3-O-Glycosides Series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot Red Wine Grapes", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.57 n°1, p. 209-219.
- Chamorro, S., Viveros, A., Alvarez, I., Vega, E. and Brenes, A. (2012), "Changes in polyphenol and polysaccharide content of grape seed extract and grape pomace after enzymatic treatment", *Food Chemistry*, Vol.133 n°2, p. 308-314.
- Cheynier, V., Basire, N. and Rigaud, J. (1989), "Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.37 n°4, p. 1069-1071.
- Cheynier, V., Prieur, C., Guyot, S., Rigaud, J. and Moutounet, M. (1997), "The Structures of Tannins in Grapes and Wines and Their Interactions with Proteins", *ACS Symposium Series*, Vol.661 n°8, p. 81-93.
- Cheynier, V., Rigaud, J., Souquet, J. M., Barillère, J. M. and Moutounet, M. (1989), "Effect of Pomace Contact and Hyperoxidation on the Phenolic Composition and Quality of Grenache and Chardonnay Wines", *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol.40 n°1, p. 36-423.
- Chira, K. (2009), "Structures moléculaire et perception tannique des raisins et des vins (Cabernet-Sauvignon, Merlot) du Bordelais", *thèse de doctorat. Université de Bordeaux*, p.
- Chira, K., Suh, J.-H., Saucier, C. and Teissèdre, P.-L. (2008), "Les polyphénols du raisin", *Phytothérapie*, Vol.6 n°2, p. 75-82.
- Conde, C., Silva, P., Fontes, N., Dias, A. C. P., Tavares, R. M., Sousa, M. J., Agasse, A., Delrot, S. and Gerós, H. (2007), "Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality", *Food - Global Science Books*, Vol.1 n°1, p. 1-22.
- Coombe, B. G. (1976), "The Development of Fleshy Fruits", *Plant Physiology*, Vol.27 p. 207-228.
- Coombe, B. G. (1987), "Distribution of Solutes within the Developing Grape Berry in Relation to Its Morphology", *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol.38 n°2, p. 120-127.
- Corder, R., Mullen, W., Khan, N. Q., Marks, S. C., Wood, E. G., Carrier, M. J. and Crozier, A. (2006), "Oenology: Red wine procyanidins and vascular health", *Nature*, Vol.444 p. 566.
- Creasy, L. L. and Swain, T. (1965), "Structure of Condensed Tannins", *Nature*, Vol.208 p. 151-153.

- Cui, E.-J., Song, N.-A., Shrestha, S., Chung, I.-S., Kim, J.-Y., Jeong, T.-S. and Baek, N.-I. (2012), "Flavonoid glycosides from cowpea seeds (*Vigna sinensis* K.) inhibit LDL", *Food Science and Biotechnology*, Vol.21 n°2, p. 619-624.
- Cuyckens, F. and Claeys, M. (2004), "Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids", *Journal of Mass Spectrometry*, Vol.39 n°1, p. 1-15.
- Debeaujon, I., Peeters, A. J. M., Léon-Kloosterziel, K. M. and Koornneef, M. (2001), "The TRANSPARENT TESTA12 Gene of Arabidopsis Encodes a Multidrug Secondary Transporter-like Protein Required for Flavonoid Sequestration in Vacuoles of the Seed Coat Endothelium", *The Plant cell*, Vol.13 p. 853–87.
- Delcambre, A. and Saucier, C. (2012), "Identification of new flavan-3-ol monoglycosides by UHPLC-ESI-Q-TOF in grapes and wine", *Journal of Mass Spectrometry*, Vol.47 n°6, p. 727-736.
- Delcour, J. A., Ferreira, D. and Roux, D. G. (1983), "Synthesis of condensed tannins. Part 9. The condensation sequence of leucocyanidin with (+)-catechin and with the resultant procyanidins", *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, p. 1711-1717.
- Deloire, A. (2007), *Métabolismes secondaires - Les composés phénoliques*, Vol., p.
- Devic, M., Guilleminot, J., Debeaujon, I., Bechtold, N., Bensaude, E., Koornneef, M., Pelletier, G. and Delseny, M. (1999), "The BANYULS gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development - Devic - 1999 - The Plant Journal - Wiley Online Library", *The Plant Journal*, Vol.19 n°4, p. 387-398.
- Di Lecce, G., Arranz, S., Jáureguic, O., Tresserra-Rimbau, A., Quifer-Rada, P. and Lamuela-Raventós, R. M. (2014), "Phenolic profiling of the skin, pulp and seeds of Albariño grapes using hybrid quadrupole time-of-flight and triple-quadrupole mass spectrometry", *Food Chemistry*, Vol.145 p. 874-882.
- Diakou, P. and Carde, J.-P. (2001), "In situ fixation of grape berries", *Protoplasma*, Vol.218 n°3-4, p. 225-235.
- Dixon, R. A., Xie, D.-Y. and Sharma, S. B. (2005), "Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research?", *New Phytologist*, Vol.165 p. 9-28.
- Downey, M. O., Harvey, J. S. and Robinson, S. P. (2003a), "Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development", *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol.9 n°1, p. 15-27.
- Downey, M. O., Harvey, J. S. and Robinson, S. P. (2003b), "Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.)", *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol.9 n°2, p. 110-121.
- Dueñas, M., Sun, B., Hernández, T., Estrella, I. and Spranger, M. I. (2003), "Proanthocyanidin Composition in the Seed Coat of Lentils (*Lens culinaris* L.)", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.51 n°27, p. 7999–8004.
- Ehrhardt, C., Arapitsas, P., Stefanini, M., Flick, G. and Mattivi, F. (2014), "Analysis of the phenolic composition of fungus-resistant grape varieties cultivated in Italy and Germany using UHPLC-

- MS/MS - Ehrhardt - 2014 - Journal of Mass Spectrometry - Wiley Online Library", *Journal of mass spectrometry*, Vol.49 p. 860 – 869.
- Fayeulle, N., Vallverdu-Queralt, A., Meudec, E., Hue, C., Boulanger, R., Cheynier, V. and Sommerer, N. (2018), "Characterization of new flavan-3-ol derivatives in fermented cocoa beans", *Food Chemistry*, Vol.259 p. 207-212.
- Foo, L. Y. and Karchesy, J. J. (1989), "Polyphenolic glycosides from Douglas fir inner bark", *Phytochemistry*, Vol.28 n°4, p. 1237-1240.
- Ford, C. M., Boss, P. K. and Bordier Høj, P. (1998), "Cloning and Characterization of *Vitis vinifera* UDP-Glucose:Flavonoid 3-O-Glucosyltransferase, a Homologue of the Enzyme Encoded by the Maize Bronze-1 Locus That May Primarily Serve to Glucosylate Anthocyanidins in Vivo", *Journal of Biological Chemistry*, Vol.273 p. 9224-9233.
- Friedrich, W. and Galensa, R. (2002), "Identification of a new flavanol glucoside from barley (*Hordeum vulgare* L.) and malt", *European Food Research and Technology*, Vol.214 n°5, p. 388-393.
- Fujita, A., Soma, N., Goto-Yamamoto, N., Shindo, H., Kakuta, T., Koizumi, T. and Hashizume, K. (2005), "Anthocyanidin Reductase Gene Expression and Accumulation of Flavan-3-ols in Grape Berry", *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol.56 n°4, p. 336-342.
- Garrido, J. and Borges, F. (2013), "Wine and grape polyphenols — A chemical perspective", *Food Research International*, Vol.54 n°2, p. 1844–1858.
- Geissman, T. A. and Yoshimura, N. N. (1966), "Synthetic proanthocyanidin", *Tetrahedron*, Vol.7 n°24, p. 2669-2673.
- Gordillo, B., Sigurdson, G. T., Lao, F., Gonzales-miret, M. L., Heredia, F. J. and Giusti, M. M. (2018), "Assessment of the color modulation and stability of naturally copigmented anthocyanin-grape colorants with different levels of purification", *Food Research International*, Vol.106 p. 791-799.
- Guadalupe, Z. and Ayestaran, B. (2008), "Changes in the color components and phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. Cv. "Tempranillo" during vinification and aging", *European Food Research and Technology*, Vol.228 n°1, p. 29-38.
- Guo, D., Xu, Y., Kang, Y., Han, S. and Zheng, S. (2016), "Synthesis of octyl-beta-D-glucopyranoside catalyzed by Thai rosewood beta-glucosidase-displaying *Pichia pastoris* in an aqueous/organic two-phase system", *Enzyme and Microbial Technology*, Vol.85 p. 90-97.
- Haslam, E. (1980), "In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines", *Phytochemistry*, Vol.19 n°12, p. 2577-2582.
- Heiss, C., Keen, C. L. and Kelm, M. (2010), "Flavanols and cardiovascular disease prevention", *European Heart Journal*, Vol.31 n°21, p. 2583-2592.
- Heller, W. and Forkmann, G. (1988), *The Flavonoids - Advances in Research since 1980*.
- Hemingway, R. W. and Laks, P. E. (1985), "Condensed tannins: a proposed route to 2R,3R-(2,3-cis)-proanthocyanidins", *Journal of the Chemical Society*, n°11, p. 746-747.

- Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, A. F., Meléndez-Martínez, A. J., González-Miret, M. L. and Heredia, F. J. (2009), "Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard", *Vol.113 n°2*, p. 530-537.
- Huang, Y. F., Cheynier, V. and Terrier, N. (2012), "Shedding Light on the Black Boxes of the Proanthocyanidin Pathway with Grapevine", *Recent Advances in Polyphenol Research*, Vol.3 p. 161-190.
- Huglin, P. and Schneider, C. (1998), *Biologie et écologie de la vigne*.
- Jaillard, B., Deloire, A. and Carbonneau, A. (2015), *Traité de la Vigne - Physiologie, Terroir, Culture*.
- Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R., F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P. and Wätjen, W. (2008), "Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin", *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, Vol.149 n°2, p. 314-323.
- Kashiwada, Y., Nonaka, G.-I. and Nishioka, I. (1986), "Tannins and Related Compounds. XLV. Rhubarb. (5). : Isolation and Characterization of Flavan-3-ol and Procyanidin Glucosides", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol.34 n°8, p. 3208-3222.
- Keller, M., Smith, J. P. and Bondada, B. R. (2006), "Ripening grape berries remain hydraulically connected to the shoot", *Journal of Experimental Botany*, Vol.57 n°11, p. 2577-87.
- Kennedy, J. A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E. J. and Jones, G. P. (2001), "Composition of Grape Skin Proanthocyanidins at Different Stages of Berry Development", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.49 n°11, p.
- Kennedy, J. A., Matthews, M. A. and A.L., W. (2000), "Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening", *Phytochemistry*, Vol.55 n°1, p. 77-85.
- Kennedy, J. A., Troup, G. J., Pilbrow, J. R., Hutton, D. R., Hewitt, D., Hunter, C. R., Ristic, R., Iland, P. G. and Jones, G. P. (2008), "Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz", *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol.6 p. 544-254.
- Kerhoas, L., Aouak, D., Cingöz, A., Routaboul, J. M., Lepiniec, L., Einhorn, J. and Birlirakis, N. (2006), "Structural Characterization of the Major Flavonoid Glycosides from *Arabidopsis thaliana* Seeds", p.
- Khater, F. (2011), "Identification et validation fonctionnelle de nouveaux gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des composés phénoliques", *thèse de doctorat. INRA*, p.
- Kim, H.-J., Yeom, S.-H., Kim, M.-K., Shim, J.-G., Lim, H.-W. and Lee, M.-W. (2004), "Nitric oxide and prostaglandin E2 synthesis inhibitory activities of flavonoids from the barks of *Ulmus macrocarpa*", *Natural Product Sciences*, Vol.10 n°6, p. 344-346.
- Kitao, S., Ariga, T., Matsudo, T. and Sekine, H. (1993), "The Syntheses of Catechin-glucosides by Transglycosylation with *Leuconostoc mesenteroides* Sucrose Phosphorylase", *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, Vol.57 n°12, p. 2010-2015.
- Kliewer, W. M. (1966), "Sugars and Organic Acids of *Vitis vinifera*", *Plant Physiology*, Vol.41 p. 923-931.

- Koukol, J. and Conn, E. E. (1961), "The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*", *The journal of biological chemistry*, Vol.236 n°10, p. 2692-2698.
- Krisch, J., Takó, M., Papp, T. and Vágvölgyi, C. (2010), "Characteristics and potential use of β -glucosidases from Zygomycetes", *Current Research; Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Vol.2 p.
- Kuhnle, G. G. C. (2018), "Nutrition epidemiology of flavan-3-ols: The known unknowns", *Molecular Aspects of Medicine*, Vol.61 p. 2-11.
- Lee, M.-W., Tanaka, T., Nonaka, G.-I. and Hahn, D.-R. (1992), "Phenolic compounds on the leaves of *Betula platyphylla* var. *latifolia* | SpringerLink", *Archives of Pharmacal Research*, Vol.15 n°3, p. 211-214.
- Lees, G. L. (1992), "Condensed Tannins in Some Forage Legumes: Their Role in the Prevention of Ruminant Pasture Bloat", *Plant Polyphenols*, Vol.59 p. 915-934.
- Lepak, A., Gutmann, A., Kulmer, S. T. and Nidetzky, B. (2015), "Creating a Water-Soluble Resveratrol-Based Antioxidant by Site-Selective Enzymatic Glucosylation", *A European Journal of Chemical Biology*, Vol.16 n°13, p. 1870-1874.
- Liu, C., Wang, X., Shulaev, V. and Dixon, R. (2016), "A role for leucoanthocyanidin reductase in the extension of proanthocyanidins", *Nature Plants*, Vol.2 n°12, p.
- Liu, Y., Shi, Z., Maximova, S., Payne, M. J. and Guiltinan, M. J. (2013), "Proanthocyanidin synthesis in *Theobroma cacao*: genes encoding anthocyanidin synthase, anthocyanidin reductase, and leucoanthocyanidin reductase", *BMC Plant Biol*, Vol.13 p. 202.
- Lorrain, B., Ky, I., Pechamat, L. and Teissedre, P.-L. (2013), "Evolution of Analysis of Polyphenols from Grapes, Wines, and Extracts - Open Access Library", *Molecules*, Vol.18 p. 1076-1100.
- Manach, C. and Donovan, J. L. (2004), "Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans.", *Free radical research*, Vol.38 n°8, p. 771-785.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. and Remesy, C. (2005), "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies", *Am J Clin Nutr*, Vol.81 n°1 Suppl, p. 230-242.
- Mané, C., J.M., S., Ollé, D., Verriés, C., Véran, F., G., M., Cheynier, V. and H., F. (2007), "Optimization of Simultaneous Flavanol, Phenolic Acid, and Anthocyanin Extraction from Grapes Using an Experimental Design: Application to the Characterization of Champagne Grape Varieties", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.55 n°18, p. 7224-7233.
- Marinova, K., Pourcel, L., Weder, B., Schwarz, M., Barron, D., Routaboul, J. M., Debeaujon, I. and Klein, M. (2007), "The Arabidopsis MATE Transporter TT12 Acts as a Vacuolar Flavonoid/H⁺-Antiporter Active in Proanthocyanidin-Accumulating Cells of the Seed Coat", *The plant Cell*, Vol.19 p. 2023–2038.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M. and Velasco, R. (2006), "Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.54 n°20, p. 7692-7702.

- Mazza, G. and Brouillard, R. (1990), "The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions", *Phytochemistry*, Vol.29 n°4, p. 1097-1102.
- Mirabel, M. and Glories, Y. (2000), Caractéristiques chimiques et organoleptiques des tanins des raisins de *Vitis vinifera* var. Merlot et Cabernet Sauvignon issus de différents terroirs bordelais, <http://www.theses.fr>, Bordeaux 2, Vol., p.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O. and Ricardo da Silva, J. M. (2003), "Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.51 n°22, p. 6475-6481.
- Mulero, J., Pardo, F. and Zafrilla, P. (2010), "Antioxidant activity and phenolic composition of organic and conventional grapes and wines", *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol.23 n°6, p. 569-574.
- Naghma, K. and Mukhtar, H. (2007), "Tea polyphenols for health promotion", *Life Sciences*, Vol.81 n°7, p. 519–533.
- Nonaka, G.-I., Ezaki, E., Hayashi, K. and Nishioka, I. (1983), "Flavanol glucosides from rhubarb and *Rhaphiolepis umbellata*", *Phytochemistry*, Vol.22 n°7, p. 1659-1661.
- Ojwang, L. O., Yang, L., Dykes, L. and Awika, J. (2013), "Proanthocyanidin profile of cowpea (*Vigna unguiculata*) reveals catechin-O-glucoside as the dominant compound", *Food Chemistry*, Vol.139 n°1, p. 35-43.
- Ollat, N., Diakou-Verdin, P., Carde, J. P., Barrieu, F., Gaudillère, J. P. and Moing, A. (2002), "Grape berry development: a review", *International Journal of Vine and Wine Sciences*, Vol.36 n°3, p. 109-131.
- Ono, E., Homma, Y., Horikawa, M., Kunikane-Doi, S., Imai, H., Takahashi, S., Kawai, Y., Ishiguro, M., Fukui, Y. and Nakayama, T. (2010), "Functional Differentiation of the Glycosyltransferases That Contribute to the Chemical Diversity of Bioactive Flavonol Glycosides in Grapevines (*Vitis vinifera*)", p.
- Owczarek, A., Magiera, A., Matczak, M., Piotrowska, D. G., Olszewska, M. A. and Marchelak, A. (2017), "Optimisation of preparative HPLC separation of four isomeric kaempferol diglycosides from *Prunus spinosa* L. by application of the response surface methodology", *Phytochemistry Letters*, Vol.20 p. 415-424.
- Pan, H. and Lundgren, L. N. (1996), "Phenolics from inner bark of *Pinus sylvestris*", *Phytochemistry*, Vol.42 n°4, p. 1185-1189.
- Pang, Y., Cheng, X., Huhman, D. V., Ma, J., Peel, G. J., Yonekura-Sakakibara, K., Saito, K., Shen, G., Sumner, L., Tang, Y., Wen, J., Yun, J. and Dixon, R. A. (2013), "Medicago glucosyltransferase UGT72L1: potential roles in proanthocyanidin biosynthesis.", *Planta*, Vol.238 p. 139-154.
- Pang, Y., Peel, G. J., Sharma, S. B., Tang, Y. and Dixon, R. A. (2008), "A transcript profiling approach reveals an epicatechin-specific glucosyltransferase expressed in the seed coat of *Medicago truncatula*", *PNAS*, Vol.105 n°37, p. 14210-14215.

- Pang, Y., Peel, G. J., Wright, E., Wang, Z. and Dixon, R. A. (2007), "Early Steps in Proanthocyanidin Biosynthesis in the Model Legume *Medicago truncatula*", *Plant Physiology*, Vol.145 p. 601-615.
- Peyrot des Gachons, C. and J.A., K. (2003), "Direct Method for Determining Seed and Skin Proanthocyanidin Extraction into Red Wine", *American Chemical Society*, Vol.51 n°20, p. 5877-5881.
- Peyrot des Gachons, C. and Kennedy, J. A. (2003), "Direct Method for Determining Seed and Skin Proanthocyanidin Extraction into Red Wine", *American Chemical Society*, Vol.51 n°20, p. 5877-5881.
- Picariello, L., Gambuti, A., Picariello, B. and Moio, L. (2017), "Evolution of pigments, tannins and acetaldehyde during forced oxidation of red wine: Effect of tannins addition", *LWT - Food Science and Technology*, Vol.77 p. 370-375.
- Pinasseau, L., Verbaere, A., Roques, M., Meudec, E., Vallverdú-Queralt, A., Terrier, N., Boulet, J. C., Cheynier, V. and Sommerer, N. (2016), "A Fast and Robust UHPLC-MRM-MS Method to Characterize and Quantify Grape Skin Tannins after Chemical Depolymerization", *Molecules*, Vol.21 n°10, p. 1409.
- Portugal Gomes Rebello, L., Lago-Vanzela, E. S., Barcia Teixeira, M., Ramos Mota, A., Stringheta, P. C., Da-Silva, R., Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S. and Hermosín-Gutiérrez, I. (2013), "Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubea×IAC 1398-21) using HPLC–DAD–ESI-MS/MS", *Food Research International*, Vol.54 n°1, p. 354-366.
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V. and Moutounet, M. (1994), "Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds", *Phytochemistry*, Vol.36 n°3, p. 781-784.
- Punyasiri, P. A. N., Tanner, G. J., Abeysinghe, I. S. B., Kumar, V., Campbell, P. M. and Pradeepa, N. H. L. (2004), "Exobasidium vexans infection of *Camellia sinensis* increased 2,3-cis isomerisation and gallate esterification of proanthocyanidins", *Phytochemistry*, Vol.65 n°22, p. 2987-2994.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. and Pouysegou, L. (2011), "Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis", *A Journal of the Gesellschaft Deutscher Chemiker*, Vol.50 n°3, p. 586-621.
- Quifer-Rada, P., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huélamo, M., Chiva-Blanch, G., Jáuregui, O., Estruch, R. and Lamuela-Raventós, R. (2015), "A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS)", *Food Chemistry*, Vol.169 p. 336-343.
- Quijada-Morín, N., Regueiro, J., Simal-Gándara, J., Tomás, E., Rivas-Gonzalo, J. C. and Escribano-Bailón, M. T. (2012), "Relationship between the Sensory-Determined Astringency and the Flavanolic Composition of Red Wines", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.60 n°50, p. 12355-12361.
- Quiñones, M., Miguel, M. and Aleixandre, A. (2013), "Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease", *Pharmacological Research*, Vol.68 n°1, p. 125-131.
- Raab, T., Barron, D., Arce Vera, F., Crespy, V., Oliveira, M. and Williamson, G. (2010), "Catechin Glucosides: Occurrence, Synthesis, and Stability", *Food Chemistry*, Vol.58 n°4, p. 2138-2149.

- Remy-Tanneau, S., Le Guernevé, C., Meudec, E. and Cheynier, V. (2003), "Characterization of a Colorless Anthocyanin–Flavan-3-ol Dimer Containing Both Carbon–Carbon and Ether Interflavanoid Linkages by NMR and Mass Spectrometry", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.51 n°12, p. 3592-3597.
- Revilla, E., Alonso, E. and Kovac, V. (1997), "The Content of Catechins and Procyanidins in Grapes and Wines as Affected by Agroecological factors and technological practices", *Wine : nutritional and therapeutic benefits*, p. 69-80.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdieu, D. (2006), "Traité d'oenologie. Tome 2 - Chimie du vin - Stabilisation et traitement", p.
- Rimbach, G., Melchin, M., Moehring, J. and Wagner, A. E. (2009), Polyphenols from Cocoa and Vascular Health—A Critical Review, *Int J Mol Sci*, Vol. 10, p. 4290-309.
- Rinaldi, A., Jourdes, M., Teissedre, P. L. and Moio, L. (2014), "A preliminary characterization of Aglianico (*Vitis vinifera* L. cv.) grape proanthocyanidins and evaluation of their reactivity towards salivary proteins", *Food Chemistry*, Vol.164 p. 142-149.
- Russell, D. W. and Conn, E. E. (1967), "The cinnamic acid 4-hydraxylase of pea seedlings", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol.122 n°1, p. 256-258.
- Sarni-Manchado, P. and Cheynier, V. (2006), *Les polyphénols en agroalimentaire SARNI-MANCHADO Pascale, CHEYNIER Véronique.*
- Saucier, C. (2010), "How do wine polyphenols evolve during wine ageing?", *Cerevisia*, Vol.35 n°1, p. 11-15.
- Saucier, C. (2014), Tannins: from grape to wine, British Columbia Wine Grape Council, Vol., p.
- Schlosser, J., Olsson, N., Weis, M., Reid, K., Peng, F., Lund, S. and Bowen, P. (2008), "Cellular expansion and gene expression in the developing grape (*Vitis vinifera* L.)", *Protoplasma*, p. 232-235.
- Singleton, V. L., Timberlake, C. F. and Lea, A. G. H. (1978), "The phenolic cinnamates of white grapes and wine", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol.29 n°4, p. 403-410.
- Smaali, I., Maugard, T., Limam, F., Legoy, M.-D. and Marzouki, N. (2007), "Efficient synthesis of gluco-oligosaccharides and alkyl-glucosides by", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol.23 n°1, p. 145-149.
- Staudt, G., Schneider, W. and Leidel, J. (1986), "Phases of Berry Growth in *Vitis vinifera*", *Annals of Botany*, Vol.58 n°6, p. 789-800.
- Strack, D. and Wray, V. (1993), *The Flavonoids Advances in Research Since 1986 - The anthocyanins.*
- Sun, B., Ribes, A. M., Leandro, M. C., Belchior, A. P. and Spranger, M. I. (2006), "Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation", *Analytica Chimica Acta*, Vol.563 n°1, p. 382-390.
- Tanaka, T., Kataoka, M., Tsuboi, N. and Kouno, I. (2000), "New monoterpene glycoside esters and phenolic constituents of *Paeoniae radix*, and increase of water solubility of proanthocyanidins in the presence of paeoniflorin", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, Vol.48 n°2, p. 201-207.

- Tanaka, Y., Sasaki, N. and Ohmiya, A. (2008), "Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids", *The Plant Journal*, Vol.54 n°4, p. 733-749.
- Tanner, G. J., Francki, K. T., Abrahams, S., Watson, J. M., Larkin, P. J. and Ashton, A. R. (2003), "Proanthocyanidin Biosynthesis in Plants: Purification of legume leucoanthocyanidin reductase and molecular cloning of its cDNA", *Journal of Biological Chemistry*, Vol.278 n°34, p. 31647–31656.
- Tanner, G. J. and Kristiansen, K. N. (1993), "Synthesis of 3,4-cis-[3H]Leucocyanidin and Enzymatic Reduction to Catechin", *Analytical Biochemistry*, Vol.209 n°2, p. 274-277.
- Terrier, N., Ollé, D., Verriès, C. and Cheynier, V. (2009), "biochemical and molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development", *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*, p. 365-388.
- Versari, A., Parpinello, G. P., Tornielli, G. B., Ferrarini, R. and Giulivo, C. (2001), "Stilbene Compounds and Stilbene Synthase Expression during Ripening, Wilting, and UV Treatment in Grape cv. Corvina", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.49 n°11, p. 5531-5536.
- Vic, G., Biton, J., Le Beller, D., Michel, J. M. and Thomas, D. (1994), "Enzymatic glucosylation of hydrophobic alcohols in organic medium by the reverse hydrolysis reaction using almond- β -D-glucosidase", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.46 n°2, p. 109-116.
- Vidal, S., Cartalade, D., Souquet, J.-M., Fulcrand, H. and Cheynier, V. (2002), "Changes in Proanthocyanidin Chain Length in Winelike Model Solutions", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.50 n°8, p. 2261-2266.
- Vidal, S., F., L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V. and Waters, E. (2004), "The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium", *Food Chemistry*, Vol.85 n°4, p. 519-525.
- Watanabe, M. (1998), "Catechins as Antioxidants from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Groats", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.46 n°3, p. 839–845.
- Xie, D.-Y., Sharma, S. B., Paiva, N. L., Ferreira, D. and Dixon, R. A. (2003), "Role of Anthocyanidin Reductase, Encoded by BANYULS in Plant Flavonoid Biosynthesis", *Science*, Vol.299 n°5605, p. 396-399.
- Yilmaz, Y. and Toledo, R. T. (2004), "Major Flavonoids in Grape Seeds and Skins: Antioxidant Capacity of Catechin, Epicatechin, and Gallic Acid", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.52 n°2, p. 255-260.
- Zerbib, M., Mazauric, J.-P., Meudec, E., Le Guernevé, C., Lepak, A., Nidetzky, B., Cheynier, V., Terrier, N. and Saucier, C. (2018), "New flavanol O-glycosides in grape and wine", *Food Chemistry*, Vol.266 p. 441-448.
- Zerbib, M. ; Cazals, G. ; Enjalbal, C. and Saucier, C. (2018b), "Identification and quantification of flavanol glycosides in *Vitis Vinifera* grape seeds and skins during ripening", *Molecules*, Vol.23, 2745.
- Zerbib, M. ; Cazals, G. ; M.-A., Ducasse ; Enjalbal, C. and Saucier, C. (2018c), "Evolution of flavanols glycosides during red grape fermentation", Vol.23, 3300.

Zhao, J. and Dixon, R. A. (2009), "MATE transporters facilitate vacuolar uptake of epicatechin 3'-O-glucoside for proanthocyanidin biosynthesis in *Medicago truncatula* and *Arabidopsis*.", *Plant Cell*, Vol.21 n°8, p. 2323-2340.

RESUME

Les flavan-3-ols appartiennent à la famille des polyphénols retrouvés dans diverses plantes et majoritairement dans le raisin. Ils jouent un rôle primordial dans les mécanismes de défense des plantes, influent sur les propriétés organoleptiques du vin et sont potentiellement bénéfiques au niveau de la santé humaine. La voie de biosynthèse des flavanols monomères est décrite dans la littérature. Cependant, les mécanismes de formation des proanthocyanidines (polymères) sont inconnus à ce jour. Des études ont montré que les flavanols glycosylés sont des intermédiaires potentiels dans la biosynthèse des PA et permettent le transport des unités de flavanols du cytoplasme vers la vacuole de la cellule, où a lieu la polymérisation. Un criblage global des flavanols glycosylés présents dans des raisins à trois stades de développement et dans des vins de différents cépages a été réalisé en analysant séparément les pellicules et les pépins de raisin par une méthode d'UPLC-DAD-ESI-MS. La teneur de ces composés dépend de paramètres de type variété du raisin, tissu biologique étudié et stade de maturité. La présence de dimères de flavanol glycosylés a été montrée pour la première fois dans le raisin. Grâce à l'hémisynthèse de la (+)-catéchine 4'-O- β -glucoside et 7-O- β -glucoside, certains monomères ont été caractérisés comme appartenant à la classe des β -glucosides. Une étude quantitative a montré l'évolution des flavanols glycosylés au cours du développement de la baie de raisin (pépins et pellicules séparés) provenant de trois cépages différents. Les monomères et dimères d' (épi) catéchine diglycosylés ont été découverts pour la première fois et uniquement dans les pépins. Une diminution en monomères d' (épi) catéchine monoglycosylés a été observée dans la pellicule au cours de la maturation du raisin. Les dimères d' (épi) catéchine monoglycosylés s'accumulent un peu après le stade de véraison et diminuent ensuite à maturité. Les monomères et dimères d' (épi) catéchine diglycosylés s'accumulent dans les pépins au cours de la maturation. Finalement, l'évolution des teneurs en flavanols mono et diglycosylés au cours de microvinifications a été étudiée. On observe des profils d'extraction similaires pour les deux variétés utilisées (Grenache et Syrah). La quantité totale des différentes familles de composés augmente au cours de la vinification, et ensuite diminue en fin de FA. Certains composés sont dégradés préférentiellement, suggérant la présence d'activités glycosidases spécifiques du raisin ou de la levure.

Mots clés: flavanols glycosylés, développement du raisin, vinification, spectrométrie de masse

ABSTRACT

Flavan-3-ols belong to a group of polyphenols present in a wide variety of plants, and particularly in grapeberries. They play an important role in defense mechanisms in plants, have a significant impact on wine organoleptic properties; and their beneficial effects on human health may help to protect against chronic diseases such as atherosclerosis. The sequence of common flavanol monomer biosynthesis is widely described in the literature, but the formation mechanisms of proanthocyanidins (PA) remain unknown. Studies show that flavanol glycosides are potential intermediates in PA polymerization and have transporter roles of monomeric units from cytoplasm to vacuole in cell, where polymerization takes place. Global screening of grapeberry flavanol glycosides were carried out at three stages of grape development and in wines of different varieties; skin and seeds were measured separately using an UPLC-DAD-ESI-MS method. The composition of the target isomers depends on different parameters such as tissue type or stage of development. The presence epi catechin monoglycoside is reported here for the first time in grapes. Using (+)-catechin 4'-O- β -glucoside and 7-O- β -glucoside hemisynthesis, several monomers were shown to β -glucosides. Quantitative analysis demonstrates the evolution of flavanol glycosides in both skin and seeds during the development of three grapevine varieties. For the first time monomeric and dimeric (epi) catechin diglycosides were revealed and shown accumulate only in grape seeds during ripening. A reduction in the concentration of monomeric (epi) catechin monoglycoside was observed during grape skin development. Dimeric (epi) catechin monoglycosides accumulate after *véraison* and then decrease at the end of grape ripening. The extraction profiles of flavanol glycosides during red grape fermentation showed similar evolution patterns for both varieties used. The total concentration of different compound families increases during winemaking, and then decreases at the end of fermentation. Degradation of specific compounds was observed at the end of fermentation which may be explained by the activity of glycosidases from grape extracts released during fermentation and pressing.

Keywords: glycosylated flavanols, grape development, grape fermentation, mass spectrometry