



HAL
open science

Stilbènes de la vigne et d'essences forestières (pin, épicéa) : Etude phytochimique et recherche d'activités anti-oomycète et insecticide.

Julien Gabaston

► To cite this version:

Julien Gabaston. Stilbènes de la vigne et d'essences forestières (pin, épicéa) : Etude phytochimique et recherche d'activités anti-oomycète et insecticide.. Biologie végétale. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0302 . tel-02022911

HAL Id: tel-02022911

<https://theses.hal.science/tel-02022911>

Submitted on 18 Feb 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 PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE VÉGÉTALE

Par Julien GABASTON

Stilbènes de la vigne et d'essences forestières (pin, épicéa) :
Etude phytochimique et recherche d'activités
anti-oomycète et insecticide

Sous la direction de : Jean-Michel MERILLON

Soutenue le 05 Décembre 2018

Membres du jury :

M. RICHOMME, Pascal	Professeur, Université d'Angers	Président
Mme. ADRIAN, Marielle	Professeur, Université de Bourgogne	Rapporteur
Mme. RIVIERE, Céline	Maître de Conférences, Université de Lille	Rapporteur
M. MERILLON, Jean-Michel	Professeur, Université de Bordeaux	Directeur de thèse
Mme. CORIO-COSTET, Marie-France	Directrice de Recherche, INRA, Bordeaux	Invitée

Stilbènes de la vigne et d'essences forestières (pin, épicéa) : Etude phytochimique et recherche d'activités anti-oomycète et insecticide

De nos jours, il y a une volonté générale de se tourner vers une agriculture plus respectueuse de l'environnement et du consommateur se traduisant notamment par une démarche de réduction des intrants chimiques. Dans un contexte de développement durable, la recherche de produits naturels pour lutter contre les maladies et les ravageurs suscite un regain d'intérêt. Dans cette thèse, des extraits hydro-alcooliques issus de coproduits de la vigne (sarment, cep, racine) et d'essences forestières (écorce d'épicéa, nœud de pin) se sont révélés être une excellente source de polyphénols bioactifs, en particulier en stilbènes complexes. En effet, ces extraits ont démontré un large spectre d'activités contre différentes maladies végétales. En particulier, un potentiel oomycide contre le mildiou de la vigne et une capacité insecticide contre un parasite des Solanacées sont rapportés. En outre, la pertinence de l'utilisation de la « chimie verte » pour extraire les stilbènes comme méthode alternative aux solvants organiques a été mise en évidence. Les présents résultats renforcent une voie de recherche originale pour faire progresser une viticulture et une agriculture plus durables, en utilisant des produits de biocontrôle moins toxiques et biodégradables, constituant ainsi une solution possible et réaliste pour lutter contre les pathogènes des plantes.

Mots clés : stilbène, polyphénol, protection des plantes, oomycide, coproduit, CL-SM, RMN

Stilbenes of grapevine and forest species (pine, spruce): Phytochemical study and research of anti-oomycete and insecticide activities

Nowadays, it is a priority to turn towards a more eco- and consumer friendly agriculture resulting in the reduction of the chemical inputs. In a context of a sustainable development, the investigation of natural products to fight against diseases and pests raised a renewed interest. In this thesis, hydroalcoholic extracts derived from grapevine (cane, wood, root) and forest species (spruce bark, pine knot) by-products have demonstrated to be a great source of bioactive polyphenols, and particularly in complex stilbenes. Indeed, these extracts have proved to confer a broad spectrum of activities against different major plant diseases. In particular, an oomycide potential against downy mildew of the vine and an insecticidal capacity against Solanaceae pest were reported. Furthermore, the relevant use of “green chemistry” to extract stilbenes as an alternative method of organic solvents has been highlighted. The present findings strengthen an original line of research to advance in a more sustainable viticulture and agriculture, using less toxic and biodegradable biocontrol products, being this a possible and realistic solution to combat plant pathogens.

Keywords: stilbene, polyphenol, plant protection, oomycide, by-product, LC-MS, NMR

**Unité de recherche Œnologie EA 4577, USC 1366 INRA,
Axe Molécules d'Intérêt Biologique**

Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon

Remerciements

En premier lieu, je souhaite adresser mes plus sincères remerciements aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse : le Pr. Pascal Richomme (Université d'Angers), le Pr. Marielle Adrian (Université de Bourgogne), le Dr. Céline Rivière (Université de Lille) et le Dr. Marie-France Corio-Costet (INRA, Bordeaux).

Je tiens à remercier particulièrement mon directeur de thèse, le Pr. Jean-Michel Mérillon, pour sa confiance, ses conseils, son soutien et sa disponibilité dont il a fait preuve à mon égard.

Je souhaite également remercier le Pr. Tristan Richard de m'avoir accueilli au sein du laboratoire Molécules d'Intérêt Biologique (MIB) de l'Unité d'Œnologie ainsi que pour sa confiance et son aide au cours de ma thèse. Je remercie également le Pr. Pierre Waffo-Teguo pour ses conseils, son expérience et sa bienveillance pendant ces trois années de thèse.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de l'axe Molécules d'Intérêt Biologique (Stéphanie Cluzet, Stéphanie Krisa, Alain Decendit, Alain Badoc, Arnaud Courtois, Grégory Da Costa, Josep Valls, Caroline Rouger, Elodie Renouf, Marie-Laure Iglesias, Antonio Palos Pinto, Eric Pedrot, Gérard Fondeville, Ruth Hornedo Ortega) pour leurs accueils, leurs contributions scientifiques, leurs compétences techniques et leurs sympathies. Un merci plus particulier à Josep et Ruth pour leurs aides dans l'écriture de ce manuscrit, leurs soutiens moraux et les moments de détente.

Je remercie également les doctorants qui ont partagé à plus ou moins long terme cette thèse (Louis, Toni, David, Aleksandra, Iris, Cindy, Florence) ainsi que les différents stagiaires côtoyés au cours de ces trois ans. Une pensée pour Cécile Leborgne pour son aide durant 6 mois dans la finalisation des travaux de cette thèse.

Je tiens également à remercier l'UMR SAVE et plus particulièrement le Dr. Marie-France Corio-Costet pour son accueil, sa disponibilité et ses conseils ainsi qu'à Marie-Cécile Dufour, Anthony Bellée, Gilles Taris et Isabelle Demeaux pour leurs aides dans la réalisation de mes travaux.

Je remercie également le Dr. Emma Cantos-Villar (Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Espagne), le Dr. Roman Pavela (Crop Research Institute, République Tchèque) et le Dr. Michaël Jourdes (Unité d'Œnologie, ISVV) pour leurs collaborations.

Enfin je voudrais remercier ma famille, mes parents, ma sœur ainsi que l'ensemble de mes amis pour leurs soutiens indéfectibles, leurs patiences et leurs encouragements durant ces années de recherche.

Communications scientifiques

Publications internationales

- **Gabaston J**, Cantos-Villar E, Biais B, Waffo-Teguo P, Renouf E, Corio-Costet MF, Richard T, Mérillon JM. 2017. Stilbenes from *Vitis vinifera* L. waste: a sustainable tool for controlling *Plasmopara viticola*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 65(13):2711–2718
Publiée le 13 Mars 2017, Impact Factor: 3.412, Category: Agriculture Multidisciplinary, Position : 2/56
- **Gabaston J**, Richard T, Biais B, Waffo-Teguo P, Pedrot E, Jourdes M, Corio-Costet MF, Mérillon JM. 2017. Stilbenes from common spruce (*Picea abies*) bark as natural antifungal agent against downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Industrial Crops and Products*. 103:267-273
Publiée le 26 Avril 2017, Impact Factor: 3.849, Category: Agronomy, Position: 6/87
- **Gabaston J**, Richard T, Cluzet S, Palos Pinto A, Dufour MC, Corio-Costet MF, Mérillon JM. 2017. *Pinus pinaster* knot: a source of polyphenols against *Plasmopara viticola*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 65(40):8884-8891
Publiée le 11 Octobre 2017, Impact Factor: 3.412, Category: Agriculture Multidisciplinary, Position : 2/56
- **Gabaston J**, El Khawand T, Waffo-Teguo P, Decendit A, Richard T, Mérillon JM, Pavela R. 2018. Stilbenes from grapevine root: a promising natural insecticide against *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Pest Science*. 91:897-906
Publiée le 1 Février 2018, Impact Factor: 4.402, Category: Entomology, Position: 2/96
- **Gabaston J**, Leborgne C, Valls J, Renouf E, Richard T, Waffo-Teguo P, Mérillon JM. 2018. Subcritical water extraction of stilbenes from grapevine by-products: a new green chemistry approach. *Industrial Crops and Products*. 126:272-279
Publiée le 15 Décembre 2018, Impact Factor: 3.849, Category: Agronomy, Position: 6/87
- **Gabaston J**, Leborgne C, Waffo-Teguo P, Palos Pinto A, Richard T, Cluzet S, Mérillon JM. 2018. Wood and roots of major grapevine cultivars and rootstocks: a comparative analysis of stilbenes by UHPLC-DAD-MS/MS and NMR. *Phytochemical Analysis*.
Acceptée le 21 Novembre 2018, Impact Factor: 2.237, Category: Plant Sciences, Position: 63/222

Brevet

Demande de brevet n° FR1755428 déposée le 15/06/2017. "Extrait de noeuds d'arbres appartenant au genre *Pinus* comme fongicide". Biais B, Corio-Costet MF, **Gabaston J**, Izard JC, Mérillon JM, Richard T.

Communication par affiche

- **Gabaston J**, Cantos-Villar E, Biais B, Waffo-Teguo P, Renouf E, Corio-Costet MF, Richard T, Mérillon JM. « Stilbenes from *Vitis vinifera* L. waste: a sustainable tool for controlling *Plasmopara viticola* »

Présenté au :

Congrès : Wine Active Compounds, Beaune (France), 29-31/03/2017 – **Prix du Jury**

Séminaire : Journée des doctorants Sciences de la Vie et de la Santé, Bordeaux (France), 12/04/2017

Séminaire : Journée Scientifique de la Chimie du Vin, Villenave d'Ornon (France), 24/11/2017

Communications orales

- **Gabaston J**, Cantos-Villar E, Biais B, Waffo-Teguo P, Renouf E, Cluzet S, Corio-Costet MF, Richard T, Mérillon JM. « Vine by-products against downy mildew »

Congrès : 10th In Vino Analytica Scientia Symposium, Salamanque (Espagne), 17-20/07/2017

Langue : Anglais

- **Gabaston J**, Cantos-Villar E, Biais B, Waffo-Teguo P, Renouf E, Cluzet S, Corio-Costet MF, Richard T, Mérillon JM. « Vine by-products: a sustainable tool against downy mildew »

Séminaire : Journée des Doctorants de l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV), Villenave d'Ornon (France), 16/11/2017

Langue : Français

- **Gabaston J**, Waffo-Teguo P, Cluzet S, Corio-Costet MF, Richard T, Mérillon JM. « Polyphenols from various plant by-products against grapevine downy mildew »

Congrès : 3^{ème} Symposium International AFERP-STOLON, Rennes (France), 18-20/07/2018

Langue : Français

Sommaire

Introduction et Objectifs	1
Volume I. Etude Bibliographique	5
Chapitre I. Le mildiou de la vigne et les moyens de lutte.....	7
A. <i>Plasmopara viticola</i> , agent responsable du mildiou de la vigne	7
A.1. Classification	7
A.2. Cycle biologique	8
A.3. Propagation et impact en vignoble	10
B. Les méthodes de lutte conventionnelle.....	11
B.1. La bouillie bordelaise.....	11
B.2. Les « fongicides » de synthèse	14
C. Les méthodes de lutte alternatives.....	17
C.1. Les vignes résistantes	17
C.2. Le biocontrôle.....	19
C.3. Les stimulateurs de défense naturelle (SDN).....	21
C.4. Les oomycides végétaux	24
Chapitre II. Les composés phénoliques.....	29
A. Généralités : voie de biosynthèse	29
B. Les flavonoïdes.....	32
B.1. Anthocyanes.....	32
B.2. Flavanols et proanthocyanidines.....	33
B.3. Flavanones et flavanonols	37
B.3.1. Flavanones.....	37
B.3.2. Flavanonols	38
B.4. Flavones et flavonols	39
B.4.1. Flavones	39
B.4.2. Flavonols	40
C. Les non flavonoïdes	41
C.1. Les acides phénoliques	41
C.1.1. Les dérivées de l'acide hydroxybenzoïque	41
C.1.2. Les dérivées de l'acide hydroxycinnamique	42
C.1.3. Fonctions des acides phénoliques	43
C.2. Les lignanes	44
C.3. Les stilbènes.....	46

Chapitre III. Les coproduits ligneux d'origine viticole et d'essences forestières	49
A. Les coproduits de la viticulture	49
A.1. Les sarments de vigne	49
A.1.1. Description générale de la vigne	49
A.1.2. Chiffre (surface, production)	50
A.1.3. Composition phytochimique des sarments	51
A.1.4. Applications	52
A.2. Les ceps et racines de vigne	53
A.2.1. Description générale des ceps et racines	53
A.2.2. Chiffre (surface, production)	54
A.2.3. Composition phytochimique des ceps et racines	55
A.2.4. Applications	56
B. Les coproduits de la filière forêt et bois	56
B.1. Les écorces d'épicéa	56
B.1.1. Description générale de l'épicéa	56
B.1.2. Chiffre (surface, production)	57
B.1.3. Composition phytochimique des écorces d'épicéa	58
B.1.4. Applications	60
B.2. Les nœuds de pin	61
B.2.1. Description générale du pin maritime	61
B.2.2. Chiffre (surface, production)	62
B.2.3. Composition phytochimique des nœuds de pin	63
B.2.4. Applications	65

Volume II. Etude chimique et activité anti-mildiou des coproduits viticoles 67

Chapitre I. Caractérisation et activité anti-mildiou des coproduits issus de la vigne	69
A. Stratégie	69
B. Design expérimental	70
B.1. Extraction	70
B.2. Purification	72
B.3. Analyse	73
B.4. Test anti-mildiou	73
C. Résumé des résultats	75
D. Publication	76
Chapitre II. Les ceps et racines de vigne, sources de stilbènes complexes	103
A. Stratégie	103
B. Design expérimental	104

B.1. Matériel végétal	104
B.2. Extraction.....	105
B.3. Purification.....	106
C. Résumé des résultats.....	107
D. Publication.....	109
Chapitre III. Extraction des stilbènes complexes de la vigne par la chimie verte.....	135
A. Stratégie.....	135
B. Design expérimental	136
B.1. Extraction.....	136
B.2. Analyse	136
C. Résumé des résultats.....	137
D. Publication.....	139

Volume III. Etude chimique et activité anti-mildiou de coproduits issus d'essences forestières..... 161

Chapitre I. Caractérisation et activité anti-mildiou des écorces d'épicéa.....	163
A. Stratégie.....	163
B. Design expérimental	164
B.1. Extraction.....	164
B.2. Purification.....	164
B.3. Analyse	165
B.4. Test anti-mildiou	166
C. Résumé des résultats.....	167
D. Publication.....	169
Chapitre II. Caractérisation et activité anti-mildiou des nœuds de pin	187
A. Stratégie.....	187
B. Design expérimental	188
B.1. Extraction.....	188
B.2. Purification.....	189
B.3. Test anti-mildiou	189
C. Résumé des résultats.....	190
D. Publication.....	193

Volume IV. Etude chimique et activité insecticide d'un coproduit viticole	207
.....	
Chapitre I. <i>Leptinotarsa decemlineata</i>, ravageur de la pomme de terre : Point bibliographique	209
A. Biologie de <i>L. decemlineata</i>	209
A.1. Cycle biologique	209
A.2. Ecologie de <i>L. decemlineata</i>	210
B. Moyen de lutte	212
B.1. Les pesticides	212
B.2. Le biocontrôle	213
B.3. Les pratiques culturales	214
B.4. Plants résistants	215
B.5. Programmes de lutte intégré	216
C. Les insecticides végétaux	217
C.1. Cas de <i>L. decemlineata</i>	218
C.2. Les stilbènes comme insecticide végétal	220
Chapitre II. Caractérisation et activité insecticide de racines de vigne	223
A. Stratégie	223
B. Design expérimental	223
B.1. Extraction	223
B.2. Test insecticide	224
C. Résumé des résultats	226
D. Publication	228
Volume V. Discussions, Conclusions et Perspectives	243
Chapitre I. Discussion générale	245
Chapitre II. Conclusions et perspectives	255
Références	257

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

ASE : accelerated solvent extraction (extraction accélérée par solvant)

BTH : benzothiadiazole

CAA : amides d'acide carboxylique

CI₅₀ : concentration nécessaire pour inhiber 50% d'un pathogène

COSY : correlation spectroscopy

DAD : diode detector array (barrette de diodes)

DPPH : 2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl

CL: chromatographie en phase liquide

CLHP : chromatographie en phase liquide à haute performance

CLUHP : chromatographie en phase liquide à ultra haute performance

CMR : cancérogène, mutagène, reprotoxique

ETI : Effector-Triggered Immunity

ETS : Effector-Triggered Susceptibility

HMBC : heteronuclear multiple bond connectivity

HR : hypersensitivity reaction (réaction d'hypersensibilité)

HSQC : heteronuclear single quantum correlation

TI : trappe ionique

LDL : low density lipoprotein (lipoprotéines de basse densité)

MF : matière fraîche

MS : matière sèche

OGM : organisme génétiquement modifié

PTI : PAMP-Triggered Immunity

QoI : quinone outside inhibitors (inhibiteurs externes de la quinone)

QTL : quantitative trait locus

Q-TOF : quadripole – time of flight

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PR : pathogenesis related

PRRs : Pattern-Recognition Receptors

REACH : Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals

RMN : résonance magnétique nucléaire

ROESY : rotating frame overhause effect spectroscopy

ROS : reactive oxygen species (formes réactives de l'oxygène)

Rpv : résistance à *Plasmopara viticola*

SAM : sélection assistée par marqueurs

SDN : stimulateurs de défense naturelle

SDP : stimulateurs de défense naturelle des plantes

SM : spectrométrie de masse

SM/SM : spectrométrie de masse en tandem

UMR SAVE : unité mixte de recherche santé agroécologie du vignoble

UV : ultraviolets

Index des Figures

Figure 1. Cycle biologique de <i>Plasmopara viticola</i> , responsable du mildiou de la vigne	9
Figure 2. Exemple de « fongicides » de contact à base de soufre	14
Figure 3. Représentation du système immunitaire de la plante	21
Figure 4. Représentation des voies de signalisation impliquées dans la défense des plantes.....	22
Figure 5. Voie de biosynthèse des flavonoïdes	30
Figure 6. Voie de biosynthèse des non-flavonoïdes	31
Figure 7. Exemple de structure d'anthocyanes, dérivés glucosylés d'anthocyanidines	32
Figure 8. Structure générale des flavan-3-ols	34
Figure 9. Exemple de structures de flavan-3-ols monomériques	34
Figure 10. Exemple de structures de proanthocyanidines	35
Figure 11. Structure générale des flavanones	37
Figure 12. Structure générale des flavanonols.....	38
Figure 13. Exemple de flavanonols	38
Figure 14. Structure générale des flavones.....	39
Figure 15. Structure générale des flavonols	40
Figure 16. Structure générale des acides phénoliques	41
Figure 17. Exemple de dérivés de l'acide hydroxybenzoïque	41
Figure 18. Exemple de dérivés de l'acide hydroxycinnamique.....	42
Figure 19. Structure générale des lignanes.....	44
Figure 20. Exemple de quelques lignanes dérivées du pinorésinol	45
Figure 21. Structure générale des stilbènes	46
Figure 22. Sarments (ou rameaux aoûtés) avant et après la taille de vignes	50
Figure 23. Stilbènes majoritaires dans les sarments de vigne	52
Figure 24. Exemple de composés non-polaires présents dans les écorces d'épicéa.....	59
Figure 25. Exemple de composés polaires (phénoliques) présents dans les écorces d'épicéa	60
Figure 26. Exemple de familles de composés non polaires présents dans les nœuds de pin.....	63
Figure 27. Exemple de familles de composés phénoliques présents dans les nœuds de pin	64
Figure 28. Exemple de composés polaires issus de la dégradation de l'hémicellulose présente dans les nœuds de pin	65
Figure 29. Processus d'extraction à partir des coproduits viticoles.....	71
Figure 30. Chromatogrammes CLHP préparative à 280 nm et 306 nm de l'extrait de racine de vigne	72
Figure 31. Procédé du test anti-oomycète contre le mildiou de la vigne.....	74

Figure 32. Exemple de vigne récoltée (Tannat x Gravesac).....	104
Figure 33. Parties de la vigne étudiées	105
Figure 34. Chromatogrammes CLHP préparative à 280 nm et 306 nm de l'extrait de racine de vigne	106
Figure 35. Chromatogrammes CLHP préparative à 280 nm et 306 nm de l'extrait « déchet » de racine de vigne	107
Figure 36. Chromatogrammes CLHP préparative à 280 nm de l'extrait d'écorces d'épicéa	165
Figure 37. Procédé du test anti-oomycète à partir de molécules pures contre le mildiou de la vigne	167
Figure 38. Chromatogrammes CLHP préparative à 280 et 306 nm de l'extrait de nœuds de pin.....	189
Figure 39. Cycle de développement de <i>Leptinotarsa decemlineata</i> , le doryphore de la pomme de terre	209
Figure 40. Illustration d'une approche intégrée des différents moyens de luttés contre <i>L. decemlineata</i>	217
Figure 41. Test insecticide : évaluation de l'inhibition de la croissance larvaire de <i>L. decemlineata</i> par un extrait enrichi en stilbènes de racine de vigne.....	225
Figure 42. Test insecticide : évaluation de la mortalité de <i>L. decemlineata</i> par un extrait enrichi en stilbènes de racine de vigne dans une expérimentation en pot.....	226

Index des Tables

Tableau 1. Résumé des activités anti-mildiou de différents SDN.....	24
Tableau 2. Résumé des activités anti-mildiou des principaux extraits végétaux décrits.....	28
Tableau 3. Stilbènes identifiés dans les extraits viticoles.....	75
Tableau 4. Stilbènes identifiés dans les extraits viticoles.....	108
Tableau 5. Dosage des polyphénols dans les extraits de nœuds de pin selon différentes méthodes d'extraction (% m <i>polyphénols</i> / m <i>extrait</i>).....	191
Tableau 6. Dosage des polyphénols dans les nœuds de pin selon différentes méthodes d'extraction (g/kg nœuds de pin).....	192
Tableau 7. Inhibition du mildiou par les extraits de nœuds de pin.....	192
Tableau 8. Inhibition du mildiou par les polyphénols (purs) des nœuds de pin.....	193
Tableau 9. Récapitulatif des activités anti-mildiou des extraits de plante étudiés	246

Introduction et Objectifs

Introduction et Objectifs

La viticulture, et plus globalement l'agriculture, sont actuellement marquées par des évolutions notables des pratiques culturales, en particulier par une réduction des intrants chimiques pour lutter contre les pathogènes. Le cuivre, à travers sa formulation nommée « bouillie bordelaise », ainsi que les produits issus de la chimie de synthèse sont des outils prédominants dans les méthodes de protection des cultures face aux diverses maladies cryptogamiques. Cependant, si leurs efficacités biologiques ne sont pas remises en cause, l'utilisation de ces produits pose des problèmes écotoxicologiques avec des risques sur l'écosystème du sol, le développement de souches résistantes, des dérégulations métaboliques des cultures ou encore des risques potentiels en santé humaine. Ainsi, des restrictions réglementaires à travers différents plans nationaux et/ou européens ont été établies afin de réduire et limiter l'application de produits phytosanitaires. En conséquence, de nouvelles stratégies alternatives ou complémentaires à ces intrants chimiques doivent être développées.

Les plantes représentent des sources significatives de composés antimicrobiens naturels. Ces composés, potentiellement peu ou non toxiques pour les mammifères, garantissant une sécurité environnementale, apparaissent comme une opportunité d'exploitation comme substituts aux produits phytosanitaires. Parmi ces composés, les polyphénols et plus particulièrement les stilbènes sont des métabolites secondaires jouant le plus souvent le rôle de phytoalexines chez les plantes et manifestent une activité antimicrobienne significative. En ce sens, la recherche de sources de stilbènes est une option originale dans un objectif de valorisation des plantes comme produits naturels.

Cette thèse s'inscrit ainsi dans cette volonté de proposer des alternatives aux intrants chimiques à travers l'utilisation d'extraits végétaux à forte valeur ajoutée. De cette manière, une attention particulière a été portée vers les coproduits viticoles tels que les sarments, les ceps et les racines de vigne, ainsi que les coproduits sylvicoles comme les écorces d'épicéa et les nœuds de pin. Ces biomasses abondantes, peu valorisées, économiquement attrayantes sont une source de polyphénols bioactifs. Ce projet visait ainsi à réaliser des extraits hydro-alcooliques enrichis en polyphénols, et plus spécialement en stilbènes, à partir de ces coproduits végétaux puis d'en étudier la composition phytochimique. L'évaluation de l'activité des extraits contre le mildiou de la vigne a été investiguée. Cette maladie, engendrée par l'oomycète *Plasmopara viticola*, est une des maladies les plus destructrices en vignoble et son contrôle est un enjeu majeur en viticulture. L'activité insecticide contre *Leptinotarsa decemlineata*, un ravageur des Solanacées, a également été étudiée. En outre, l'utilisation d'une méthode extractive par « chimie verte » pour extraire les stilbènes complexes a été expérimentée dans le but de proposer des alternatives aux solvants organiques. La potentialité de développer ces extraits végétaux d'un point de vue industriel et leur valorisation en santé végétale sont discutées.

Volume I.

Etude Bibliographique

Chapitre I. Le mildiou de la vigne et les moyens de lutte

A. *Plasmopara viticola*, agent responsable du mildiou de la vigne

A.1. Classification

Au cours du temps, l'agent responsable du mildiou de la vigne a souvent changé de classification au gré des découvertes sur sa structure et son fonctionnement. Ainsi, il a été collecté pour la première fois dans le nord-est des USA en 1834 par Schweinitz et a été classifié comme un champignon de la division des Ascomycota et du genre *Botrytis* sous le nom de *Botrytis cana*. En 1848, Berkeley et Curtis ont re-classifié ce parasite comme une nouvelle espèce sous le nom de *Botrytis viticola* en référence au genre *Vitis*. En 1863, De Bary décrit le mode de reproduction de ce pathogène avec un cycle sexué et un cycle asexué et place ce parasite parmi le genre *Peronospora* dans la classe des Oomycota. Ce pionnier de l'étude des champignons avait au préalable élucidé le cycle biologique de *Phytophthora infestans*, agent responsable du mildiou de la pomme de terre. Ainsi, le mildiou de la vigne est désigné sous le nom de *Peronospora viticola* (Gessler et al. 2011).

Près de deux décennies plus tard, Shröter (1886) sépare le genre *Peronospora* en deux genres distincts ; *Peronospora* et *Plasmopara*. En 1888, le mildiou de la vigne est reclassé parmi le genre *Plasmopara* au vu des différences structurales entre les deux (Gessler et al. 2011). Dans le genre *Plasmopara*, les sporangiophores se développent à partir du mycélium intercellulaire avec des ramifications monopodiales, la plupart du temps à angle droit, avec des branches ultimes (stérigmates) « trichotomiques ». Chez *Peronospora*, les stérigmates sont dichotomiques. En outre, *Plasmopara* produit des sporanges dans lesquels les zoospores sont formées puis relarguées alors que chez *Peronospora*, les sporanges germent directement sans formation de zoospores (aposporie) (Chadefaud 1972). Ainsi, le mildiou de la vigne est renommé *Plasmopara viticola*.

Le dernier mouvement d'envergure a été la reclassification des oomycètes du règne des champignons vers le règne Chromalveolata réunissant les Alvéolés et les Chromistes. Ils ont été placés dans la division des hétérocontes (ou Straménopiles) dû à leurs relations étroites avec les organismes photosynthétiques tels que les algues brunes et les diatomées (Lutzoni et al. 2004). Cette reclassification est ainsi due aux divergences structurales entre les oomycètes et les champignons. En effet, par exemple, la paroi cellulaire des oomycètes est composée de cellulose alors que celle des champignons sont composés de chitine. Dans leur état végétatif, les oomycètes ont des noyaux sous forme diploïdes alors que les noyaux sont haploïdes chez les ascomycètes et dicaryiotiques (deux noyaux) chez les basidiomycètes (Gessler et al. 2011).

A.2. Cycle biologique

Comme décrit par De Bary en 1863, le développement de *P. viticola* se fait suivant un cycle sexué et un cycle asexué ce qui assure sa préservation et sa dissémination (**Figure 1**). Le cycle sexué démarre dès l'automne où les filaments mycéliens forment les organes sexuels avec une évolution du contenu génétique en gamètes par méiose. Il y a ensuite un croisement entre deux thalles ; le spermatocyste (ou anthéridie) qui contient les gamètes mâles et l'oogone qui contient les gamètes femelles également appelées oosphères. Ce croisement hétérothallique entre deux mycéliums génétiquement différents se déroule dans le mésophylle des feuilles. Il est également possible dans certains cas d'assister à des formes de croisement homothallique (Wong et al. 2001). Les phénomènes de plasmogamie (fusion des cytoplasmes) et de caryogamie (fusion des noyaux) aboutissent à la formation de l'oospore.

Les oospores également appelées œufs d'hiver, assurent la survie de *P. viticola* pendant la période hivernale en se maintenant en phase dormante dans les feuilles ou sur le sol. La présence d'une double paroi permet à ces structures de survivre dans des conditions extrêmes, pouvant supporter des températures allant jusqu'à -20°C (Vercesi et al. 1999). En outre, même dans des conditions optimales de température (20 ° C) et d'humidité (> 95%) précoces, les oospores ne germent pas avant Janvier (Burruano 2000).

Au printemps, lorsque les températures avoisinent les 12-13°C et une humidité suffisante, les oospores germent et donnent naissance à un filament duquel se forme une cavité piriforme appelée macroconidie (ou macrosporange ou sporocyste). A l'intérieur de cette structure, les noyaux se multiplient par mitose produisant plusieurs dizaines de zoospores (ephytia.inra.fr). Les précipitations entraînent la dissémination de ces structures via les éclaboussures de pluie. Les zoospores possèdent deux flagelles qui leur permettent de se déplacer dans l'eau et ainsi trouver un stomate par lequel pénétrer. Cette infection constitue la contamination primaire (Gobbin 2004).

Une fois présentes sur leurs tissus cibles, les zoospores perdent leurs flagelles et vont venir s'accrocher au niveau des stomates. Ce phénomène d'enkystation très rapide (<10min) est suivi par la formation d'un tube germinatif à partir des zoospores qui va grandir à travers les stomates jusqu'aux tissus internes (Kiefer et al. 2002). De nombreux hyphes mycéliens se développent et forment des haustoria (ou suçoirs) qui permettent de s'alimenter aux dépens de la vigne (Unger et al. 2007). Après 4 à 5 jours d'incubation, les premiers symptômes sont visibles sur la face adaxiale de la feuille avec la formation de « tâches d'huiles » (Allègre et al. 2007). Des contaminations secondaires vont ensuite se mettre en place grâce à des zoospores issus de sporanges provenant de la reproduction asexuée.

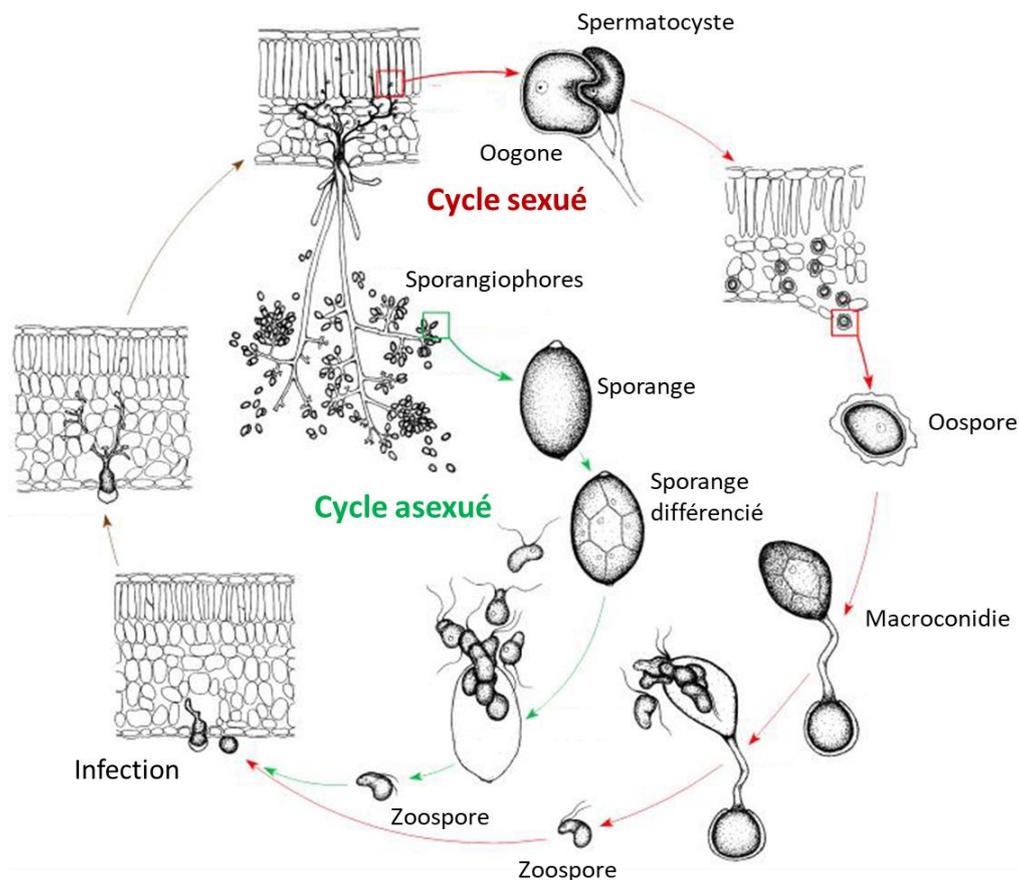


Figure 1. Cycle biologique de *Plasmopara viticola*, responsable du mildiou de la vigne.
D'après Gobbin (2004).

En effet, après 4 à 6 jours d'infection et si les conditions sont fortement humides, le mycélium peut sporuler et émettre des arbuscules à travers les stomates que l'on appelle sporangiophores (Bellow et al. 2018). Ces structures possèdent plusieurs ramifications portant à leurs extrémités des sporanges. La formation de ces structures a la particularité de se développer seulement la nuit (Rumbolz et al. 2002). Cette phase de sporulation est visible à l'œil nu avec la manifestation d'un duvet blanc sur la face abaxiale des feuilles.

Les sporanges matures vont subir des divisions mitotiques et se différencier en plusieurs parties. Chacune de ses parties va devenir caduque après 14h et sera capable de libérer des zoospores (Burruano 2000). Les sporanges ainsi que les zoospores vont se disséminer à la faveur d'éclaboussures de pluie ou par le vent. Ainsi, le cycle de reproduction asexuée se termine par la germination des zoospores qui marque donc la contamination secondaire.

A.3. Propagation et impact en vignoble

P. viticola est un parasite obligatoire qui va se nourrir des ressources de son hôte, qui peut être des feuilles, des fleurs ou de jeunes baies de raisin, afin de se développer et se disséminer. Cet agent est depuis longtemps une maladie endémique des espèces natives de *Vitis* dans le nord de l'Amérique. Il a probablement été introduit en Europe avec des boutures de vigne américaines utilisées pour replanter les vignobles français détruits par le phylloxéra. En 1878, le mildiou a été détecté par Planchon dans le sud-ouest de la France, et l'année suivante par Therry dans les environs de Lyon, par Pirotta dans le nord de l'Italie et en Suisse (Farlow 1882). Depuis la propagation de la maladie a été rapide et a attaqué les vignobles dans la plus grande partie de la France et de l'Italie. On retrouve ensuite le mildiou de la vigne dans les régions Alsace-Lorraine (Allemagne) en 1880, puis en Turquie et en Grèce en 1881 (Gobbin 2004).

Le mildiou est un pathogène dont le développement est favorisé par des températures douces mais pas trop chaudes, couplées à une forte hygrométrie. Des études ont ainsi montré que les concentrations de spores de *P. viticola* étaient fortement corrélées à l'humidité relative, au rayonnement solaire et à une température moyenne (Martínez-Bracero et al. 2018). En ce sens, le mildiou va se propager rapidement et abondamment dans des zones tempérées comme l'Europe et plus particulièrement dans la zone sud comme la France, l'Italie ou l'Espagne (Corio-Costet 2012; Rossi et al. 2008).

Dans les premières années, il était pensé que la maladie se limitait à l'invasion des feuilles, entraînant une défoliation et donc la destruction des jeunes baies par le soleil brûlant de l'été. L'infection visible des baies de raisin était quant à elle assimilée à un autre pathogène. Cependant, après quelques années, des travaux confirment que les dommages causés aux baies sont le signe d'attaques de *P. viticola*. L'adaptation du mildiou au climat européen passant d'une apparition à la fin de Juillet où les baies ne sont pas susceptibles à la fin de Mai où les baies sont plus vulnérables, a entraîné la destruction complète de vignes infectées (Gessler et al. 2011).

Ainsi, au début du XXème siècle, cette maladie est une des plus destructrices dans les vignobles européens (Allemagne, France, Suisse, Italie). Par exemple, en 1915, 70% de la récolte de raisin française a été perdue à cause de *P. viticola*. En 1930, 20 millions d'hectolitres de vin ont été perdus en France. De 1907 à 1916, le mildiou était à l'origine d'une réduction de 33% de la superficie viticole totale de la province de Baden en Allemagne. Des dommages importants ont également été signalés en Italie entre 1889 et 1934 (Gessler et al. 2011).

D'un point de vue qualitatif, la défoliation causée par *P. viticola* entraîne des changements de composition chimique au niveau des baies. La perte de feuille va déréguler le métabolisme des glucides entraînant une diminution des teneurs en sucres et dans une moindre mesure engendrer une augmentation de l'acidité dans les baies (Jermini et al. 2010). En outre, la présence du mildiou sur les feuilles entraîne des perturbations dans les échanges gazeux. En effet, une réduction drastique du taux de photosynthèse a été observée entraînant une diminution de la conductance des stomates et du mésophylle et une augmentation de la valeur de la résistance stomatique. En conséquence, la diffusion du CO₂ est rendue difficile à travers les stomates. La régulation de la transpiration et de l'utilisation de l'eau sont également des mécanismes impactés (Jermini et al. 2010).

De plus, la présence du mildiou sur les baies de raisin subissant la vinification va avoir un impact sur la qualité organoleptique du vin. De récentes études mettent en évidence des odeurs rappelant les fruits cuits (pruneau, pêche cuite, figue) et des odeurs herbacées (lierre, géranium) dans les vins rouges. Les notes de fruits cuits ont été identifiées comme étant dues aux 3-méthyl-2,4-nonanedione, γ -nonalactone et γ -déalactone, alors que les arômes herbacés et verts ont été identifiés comme étant le (Z)-1,5-octadiène-3-one et le 3-isobutyl-2-méthoxypyrazine (Pons et al. 2018).

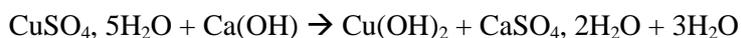
Ces données démontrent à la fois l'impact quantitatif de *P. viticola* avec une perte de la récolte mais également le rôle de ce parasite à modifier la qualité du fruit et les propriétés organoleptiques des vins. Ainsi, différentes méthodes de lutte ont été mise en place depuis plusieurs décennies afin de limiter l'infection et la dissémination de cet oomycète.

B. Les méthodes de lutte conventionnelle

B.1. La bouillie bordelaise

Le mildiou de la vigne a été découvert sur les vignobles français en 1878, comme mentionné précédemment, sans qu'aucun traitement ne soit trouvé rapidement. C'est en 1882 que Alexis Millardet a découvert par hasard l'effet toxique du cuivre sur ce pathogène. En effet, pour dissuader les passants de manger les raisins de vignes situés proches de la route, ces vignes ont été aspergées d'un mélange de sulfate de cuivre et de chaux à la fois visible de par sa couleur bleue et pour son mauvais goût. Cependant, Millardet a remarqué que les plantes traitées ne présentaient aucun symptôme de mildiou alors que le reste du vignoble souffrait de la maladie. Partant de ce constat, il a entamé des travaux mettant en évidence l'effet oomycide de ce traitement contre le mildiou dont les résultats ont été publiés en 1885 (Gessler et al. 2011).

Cette solution à base de cuivre a pris par la suite le nom de « bouillie bordelaise » en référence à la région viticole et a pour composition du sulfate de cuivre hydraté associé à de la chaux telle la réaction suivante:



En raison de la grande solubilité des ions cuivre dans l'eau et de sa capacité de pénétration dans les tissus végétaux, le sulfate de cuivre était hautement phytotoxique et ne convenait pas aux applications sur le feuillage et les fruits. Ainsi, lors de la préparation de la bouillie bordelaise, l'ajout de l'hydroxyde de calcium (chaux, $\text{Ca}(\text{OH})_2$) avec le sulfate de cuivre (CuSO_4) entraîne la formation d'une suspension bleue colloïdale d'hydroxyde de cuivre ($\text{Cu}(\text{OH})_2$), pratiquement insoluble dans l'eau, stabilisée par adsorption par le sulfate de calcium (CaSO_4). En conséquence, le cuivre n'est pas absorbé par le tissu végétal, ce qui réduit le risque de phytotoxicité de la bouillie bordelaise et augmente l'utilité du sulfate de cuivre en agriculture (Lamichhane et al. 2018).

La première préconisation de Millardet était une solution cuprique à 8%, soit 8 kg de sulfate de cuivre combiné à 15 kg de chaux dans 100 litres d'eau. Par la suite, un ajustement entre 1% et 4% de sulfate de cuivre a été adopté. En général, l'utilisation de mélanges de solutions cupriques contenant de faibles taux de cuivre (1-1,5%) a été suggérée pour les périodes où la sensibilité des vignes était faible et le risque de maladie faible. Des taux plus élevés (3-4%) ont été recommandés pour la partie la plus risquée de la saison lors de conditions très humides. Un taux compris entre 1,5 et 2% était considéré comme un traitement standard (Gessler et al. 2011).

Outre la dose appliquée, le nombre de traitements est également un facteur important dans la limitation de la propagation du mildiou. En moyenne, entre trois et cinq traitements sont indispensables aujourd'hui, généralement réalisés après la floraison et au début de la véraison. Si d'autres pesticides chimiques sont utilisés, un seul traitement peut être effectué. En cas de forte pluie, huit traitements peuvent être indispensables à cause du « lessivage » de la solution cuprique (Anatole-Monnier 2014).

La bouillie bordelaise agit comme un produit de contact, et non comme pénétrant, expliquant sa propension à être « lessivé » par la pluie perdant ainsi son efficacité. Les formulations cuivrées sont des méthodes préventives, non-systémiques, qui vont rester à la surface de la feuille sans agir à l'intérieur du système vasculaire. La bouillie bordelaise va ainsi former une barrière physique sur la feuille inhibant le développement du mildiou de la vigne avant sa pénétration (Gisi & Sierotzki 2008). Pour cela, les ions cuivre (Cu^{2+}) présent dans la bouillie bordelaise vont affecter des enzymes présentes dans les spores du mildiou bloquant ainsi leur germination (Branas 1984).

En outre, la bouillie bordelaise est également utilisée dans l'agriculture dans les cultures maraîchères (tomate, chou, pomme de terre), fruitières (pommier, prunier, abricotier) ou en floriculture (rosier). Le cuivre va agir comme un biocide à large spectre en raison de son interaction avec les acides nucléiques, la perturbation des sites enzymatiques actifs, l'interférence avec le système de transport d'énergie et enfin la rupture de l'intégrité des membranes cellulaires (Flemming & Trevors 1989; Lamichhane et al. 2018).

Cependant, l'utilisation intensive de la bouillie bordelaise depuis plus d'un siècle a engendré un certain nombre de conséquences liées à la santé humaine et à la biodiversité. Dans l'ensemble, ces composés cuivrés ont des effets négatifs directs et indirects lorsqu'ils sont appliqués tels que la phytotoxicité, le développement de résistance, l'accumulation dans le sol ou un impact sur la qualité du fruit.

De nombreux facteurs peuvent conduire à la phytotoxicité de solutions cupriques sur les plantes, comprenant l'application de formulations de cuivre hautement solubles, des quantités excessives (taux d'application trop élevé ou applications trop fréquentes), un mélange en cuve de cuivre avec d'autres produits, l'application de cuivre à des températures élevées, un temps sec ou la présence d'impuretés dans le produit (Lamichhane et al. 2018). La phytotoxicité va se traduire par une décoloration plus ou moins prononcée des feuilles due à un manque de chlorophylle (chlorose), l'assombrissement des surfaces axiales et abaxiales, des taches nécrotiques ou encore le bord des feuilles brûlé.

Le développement d'une résistance au cuivre par *P. viticola* n'a jamais été mis en évidence à notre connaissance. Cependant, *Xanthomonas campestris*, une bactérie phytopathogène responsable de nécrose sur les feuilles de vigne a déjà développé une résistance au cuivre (Marques et al. 2009). Sans traitement alternatif, l'application continue de solutions cuivrées peut augmenter la résistance d'organismes non-ciblés et ainsi rendre problématique le traitement des vignes.

Une des problématiques les plus importantes sur l'utilisation du cuivre est son accumulation dans le sol. La bouillie bordelaise peut se trouver au sol lors de la pulvérisation des vignes ou lors du lessivage occasionné par la pluie. Le cuivre peut alors impacter négativement l'écosystème microbien (bactéries et champignons) et macrobien (nématodes, vers de terre, insectes). Cet écosystème permet notamment la décomposition des résidus, le stockage et la libération des nutriments, coordonne la structure et la stabilité du sol, ou encore participe à la dégradation et l'immobilisation des pesticides et autres polluants (Kent & Triplett 2002).

En outre, la qualité des baies de raisin peut aussi être impactée par la présence de cuivre. L'application répétée de bouillie bordelaise selon quatre traitements en trois semaines entraîne une modification des teneurs en sucres, acides organiques, lipides et polyphénols, synonyme de dérégulation métabolique (Martins et al. 2014).

En conséquence, des mesures restrictives ont été adoptées au niveau européen. Il y a plus de 150 ans, les doses de cuivre étaient de 80 kg/ha/an, ce qui a mené à une accumulation sévère de cuivre dans le sol. De nos jours, l'utilisation du cuivre est limitée à 6 kg/ha/an dans la plupart des pays européens (France, Italie, Espagne). Cependant, certains pays comme l'Allemagne, la Suisse ou l'Autriche ont pris des conditions plus drastiques en abaissant cette limite à 3-4 kg/ha/an (Dagostin et al. 2011). Petit à petit, l'ensemble des pays européens seront ainsi contraints à cette limite. Pour pallier aux potentielles années de pression accrue, cette limite est une moyenne sur 5 ans pour les plantes pérennes comme la vigne.

En ce sens, cette baisse de l'utilisation du cuivre implique le besoin de développer d'autres produits pour remplacer ou compléter ce traitement cuprique. Une des solutions utilisées depuis plusieurs décennies est l'application de « fongicide » de synthèse.

B.2. Les « fongicides » de synthèse

Le développement de produits chimiques en remplacement du cuivre remonte à la Seconde Guerre mondiale (1939-1945). Cette période avait entraîné une pénurie de cuivre rendant le traitement du mildiou en vignoble difficilement gérable. La recherche s'est alors focalisée sur des alternatives au cuivre en développant des produits chimiques de contact contenant notamment du soufre dans leurs formulations. Des produits tels que les dithiocarbamates (manèbe, mancozèbe, propinèbe) ainsi que des produits organochlorés et organosoufrés liés à une structure phtalimide (captafol, folpel) (**Figure 2**) ont été développés (Gessler et al. 2011).

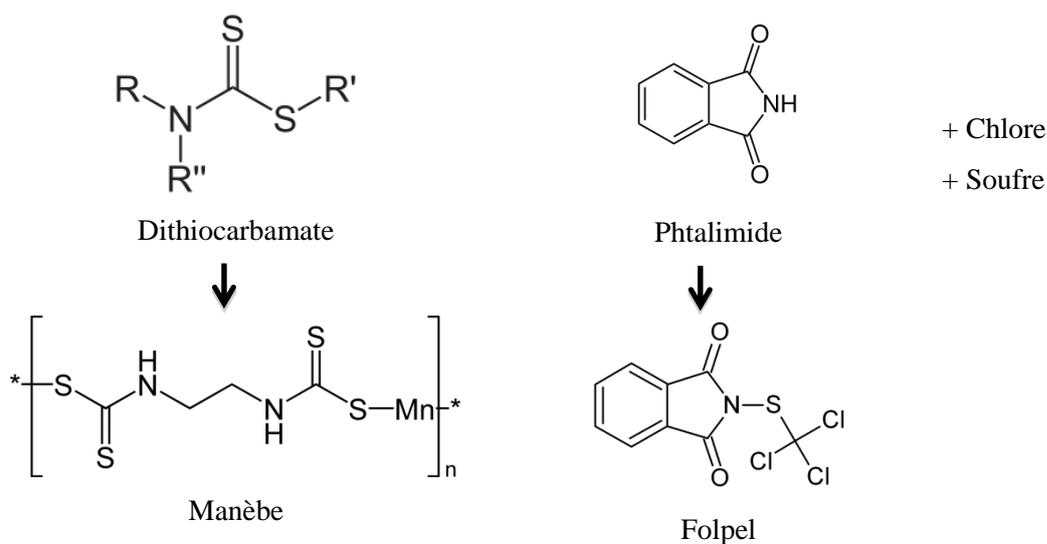


Figure 2. Exemple de « fongicides » de contact à base de soufre.

Ces produits, comme la bouillie bordelaise, forment une barrière entre la feuille et le pathogène avec des activités inhibitrices sur les sites enzymatiques, des interférences avec les systèmes de transport ou encore la modulation de la synthèse nucléique. La diversité d'action de ces produits de surface ont permis de caractériser ces produits comme des « fongicides » dit « multi-sites » (Corio-Costet 2015). En ce sens, la multiplicité de sites d'action rend difficile pour le mildiou de la vigne le développement de résistance à ces produits. Cependant, ces produits de contact sont sensibles au lessivage par la pluie et nécessitent plusieurs applications selon les conditions climatiques. De plus, ces produits sont généralement peu sélectifs et vont concéder des effets négatifs sur des organismes non ciblés qui sont bénéfiques pour l'écosystème.

Depuis une trentaine d'années, la recherche a donné naissance à d'autres « fongicides » plus spécifiques, se basant sur une activité ciblée du métabolisme du pathogène. Ces produits sont dits « uni-sites » et n'ont ainsi que peu d'effets secondaires sur d'autres processus ou organismes non ciblés. A l'inverse des produits de contact, la plupart des « fongicides » à site unique ont la capacité de pénétrer dans la feuille et sont ainsi protégés contre le lavage par la pluie (« fongicide » pénétrant); certains d'entre eux sont également systémiques et se déplacent dans des parties non traitées de la plante grâce aux réseaux vasculaires (« fongicide » systémique) (Gisi & Sierotzki 2008). Cependant, la plupart des inhibiteurs à site unique présentent un risque élevé de générer des résistances chez le mildiou. En effet, l'activité ciblée peut entraîner plus aisément une adaptation de la part du pathogène.

Parmi les « fongicides » uni-sites pénétrants, deux produits dominent le marché des « fongicides » : les amides d'acide carboxylique (CAA) et les cyanoacétamide-oximes. Les CAA ont été introduits dans les vignobles en 1988 avec le diméthomorphe suivi par l'iprovalicarbe, le fluomorphe, le bentiavalicarbe et le mandipropamide à partir des années 2000. Ces « fongicides » de synthèse ont pour mode d'action l'inhibition de la biosynthèse de la paroi cellulaire, et plus particulièrement de la cellulose, chez les oomycètes (Nanni et al. 2016). Cependant, *P. viticola* a développé une résistance à ce produit de synthèse via la mutation récessive du gène *CesA*, impliqué dans la biosynthèse de la paroi. Les cyanoacétamide-oximes, et plus particulièrement le « fongicide » cymoxanil, font également partie des produits antifongiques pénétrant les plus utilisés (Cacaj et al. 2014). Bien que son mode d'action reste encore inconnu, le cymoxanil semble affecter plusieurs processus biochimiques, tels que la synthèse d'acides nucléiques et/ou d'acides aminés. L'application du cymoxanil pouvant se faire après l'apparition de l'infection, en exploitant les propriétés curatives du « fongicide », une forte pression de sélection a été exercée générant ainsi l'apparition de résistance (Toffolatti et al. 2015).

Concernant les « fongicides » unisites systémiques, les deux « fongicides » chimiques les plus utilisés sont les inhibiteurs externes de la quinone ou QoI (Quinone outside Inhibitors), et les phénylamides (PAs). Les QoI tels que l'azoxystrobine, le famoxadone et la fénamidone sont des inhibiteurs de la respiration mitochondriale du mildiou. Pour cela, ils se lient au site Qo (la poche externe oxydante des quinones) du complexe enzymatique du cytochrome bc1 (complexe III), bloquant ainsi le transfert d'électrons dans la voie respiratoire et conduisant à un déficit énergétique dû à un manque d'ATP (Gisi et al. 2002). Cependant, des résistances aux « fongicides » QoI sont apparues via une mutation majeure dans le gène du cytochrome b mitochondrial (Corio-Costet 2015). Cette résistance a été détectée pour la première fois en 2000 et a rapidement évolué avec une augmentation rapide des isolats résistants atteignant une fréquence en 2003 de 70% à 80% en France puis de 90% en 2006 (Gisi & Sierotzki 2008). Quant aux « fongicides » phénylamides comme le méfénoxam, le métalaxyl et le béalaxyl, ils vont agir de manière systémique dans la plante et inhiber la synthèse d'ARN ribosomal (Russell 1995). Le gène ciblé par ce « fongicide » n'est pas connu mais des résistances aux phénylamides ont été développées par les pathogènes au cours du temps.

D'autres « fongicides » de synthèse systémiques ont montré des activités particulières contre le mildiou et notamment les phosphonates ou phosphites (H_2PO_3^-). Dans cette classe de « fongicides », le fosétyl-Al présente une mobilité acropète et basipète dans la plante et est actif contre les oomycètes, préférentiellement de manière curative. Outre son activité « fongicide », le fosétyl-Al est également décrit comme ayant un mécanisme activant la résistance aux maladies, comme la production de phytoalexines chez les plantes (Dufour & Corio-Costet 2013). Ce « fongicide » singulier ne présente à l'heure actuelle aucune résistance chez *P. viticola*.

Ainsi, plusieurs types de produits « fongicides » de synthèse sont disponibles pour limiter l'impact du mildiou. Les produits de contact ont l'avantage d'avoir une diversité de sites d'action mais sont peu sélectifs et sont sensibles au lessivage. Au contraire, les produits pénétrants et systémiques se trouvent protégés du lessivage. Leurs activités ciblées les rendent très actifs à faibles doses mais engendrent généralement des adaptations et donc des résistances chez le mildiou. Les applications de ces produits doivent ainsi respecter les doses recommandées et les intervalles de pulvérisation doivent être strictement suivis.

Aujourd'hui, il est possible de développer des alternatives aux méthodes conventionnelles afin de limiter l'apparition de résistance et éviter les problèmes environnementaux. Leur vocation est de compléter ou, à terme, de remplacer les « fongicides » chimiques tout en étant actifs, économiquement viables et respectueux de l'environnement.

C. Les méthodes de lutte alternative

C.1. Les vignes résistantes

Une solution alternative à l'utilisation de produits chimiques est la mise au point de variétés résistantes aux agents pathogènes. L'objectif de ces nouvelles variétés de vigne est de combiner une résistance durable au mildiou et une qualité de baie adaptée à la production de vin de haute qualité. Pour cela, des programmes génétiques ont vu le jour basés sur de nombreuses sources de résistance disponibles, avec plusieurs traits génétiques quantitatifs ou QTL (quantitative trait locus) de résistance ayant des effets divers et des stratégies de croisement permettant une résistance durable chez la vigne (Merdinoglu et al. 2014).

Dans un premier temps, de nombreuses études se sont intéressées à la recherche de marqueurs moléculaires liés à des gènes qui génèrent la résistance à *P. viticola*. Ainsi, plusieurs facteurs génétiques conférant une résistance partielle ou totale contre le mildiou de la vigne ont été découverts depuis les années 2000. Un travail sur *Muscadinia rotundifolia*, espèce résistante au mildiou, a mis en évidence deux QTL responsables de sa résistance. Les QTL identifiés ont été nommée Rpv pour « Résistance à *Plasmopara viticola* » avec Rpv1 qui est présent sur le chromosome 12 et Rpv2 qui est situé sur le chromosome 18 (Merdinoglu et al. 2003). Les phénotypes macroscopiques de la résistance médiée par ces deux locus sont différents. Les plantes Rpv2 arrêtent très rapidement le développement de *P. viticola*, inhibent complètement la sporulation de *P. viticola*, produisent de petites lésions nécrotiques, mais n'induisent pas une synthèse significative des stilbènes après l'infection. En revanche, les plantes Rpv1 réduisent la colonisation du mycélium, limite la sporulation de *P. viticola* et induisent fortement la synthèse des stilbènes après l'infection (Merdinoglu et al. 2014).

Des études sur *Vitis vinifera* cv. Régent puis sur *Vitis vinifera* cv. Bianca ont mis en lumière un troisième QTL nommé Rpv3 qui est situé sur le chromosome 18, non loin du locus Rpv2 (Welter et al. 2007). Le locus Rpv3 confère l'habilité de déclencher une réaction d'hypersensibilité chez la vigne, c'est-à-dire une réponse rapide et forte contre le pathogène, ainsi que la réduction du développement de *P. viticola* (Bellin et al. 2009).

Au cours de ces dernières années, de nombreux nouveaux QTL responsables de la résistance au mildiou ont été mis en évidence chez la vigne. Blasi et al. 2011, Schwander et al. 2012 et Venuti et al. 2013 ont montré respectivement chez *Vitis amurensis*, les QTL Rpv8 sur le chromosome 14, Rpv10 sur le chromosome 9 et Rpv12 sur le chromosome 14. Plus récemment, Ochssner et al. 2016 ont mis en évidence Rpv14 sur le chromosome 5 chez *Vitis cinerea* portant à 14 le nombre de QTL responsables de la résistance chez la vigne face au mildiou (Zini et al. 2017).

Dans un deuxième temps, les programmes génétiques mis en place ont pour objectifs de générer des résistances actives et durables, tout en étant le moins consommateur de temps et le plus fiable possible.

Des cas de contournements de la résistance par certaines souches de *P. viticola* sur certains facteurs de résistance ont été mis en exergue. En effet, *V. vinifera* cv. Bianca s'est montré résistant à deux souches de mildiou (C et U) mais susceptible à la souche L (Peressotti, 2010). Appliquées sur *V. rupestris* ces trois souches n'ont montré aucunes différences, démontrant le contournement spécifique de cette souche sur la résistance du cultivar Bianca. Des études supplémentaires ont mis en évidence que la souche L surmontait la résistance causée par le locus Rpv3 qui est caractéristique du cultivar Bianca (Merdinoglu et al. 2014). Afin d'éviter cette rupture de résistance chez les nouvelles variétés de vigne, il est admis que la méthodologie de pyramidage des gènes de résistance est la plus fiable. Ce procédé consiste à combiner plusieurs gènes de résistance permettant un spectre d'action élargi grâce à des mécanismes de défense différents. En ce sens, les programmes génétiques optent pour l'association de facteurs de résistance divers issus de *M. rotundifolia* ainsi que de Vitis américains (*V. cinerea*, *V. riparia*) et asiatiques (*V. amurensis*). Cette méthode assure ainsi une résistance efficace et durable.

Concernant les outils de croisement employés, les évolutions technologiques ont permis au cours du temps de gagner en temps et en efficacité. Les premiers programmes génétiques sont apparus dès le 19^{ème} siècle et étaient basés sur la méthode d'hybridation naturelle entre deux espèces qui est l'outil ancestral de croisement. L'objectif était d'introduire des résistances aux maladies et aux ravageurs (Pedneault & Provost 2016). Cependant, le temps de génération de nouveaux plants était très long pour évaluer les caractères phénotypiques de résistance. De plus, la présence de caractères indésirables d'un point de vue organoleptique étaient récurrents avec des saveurs indésirables, "foxé", similaires au cassis dans les vins, un défaut qui a plus tard été attribué à la présence de *V. labrusca* dans les programmes de croisement (Sun et al. 2011). Au cours des années 2000, les organismes génétiquement modifiés (OGM) ont fait leur apparition chez la vigne. Cette méthode repose sur la capacité à modifier le patrimoine génétique de la vigne à travers l'insertion d'une petite partie de l'ADN provenant d'un micro-organisme ou d'un virus. Cette modification génétique par l'homme, même bénéfique, a posé des problèmes éthiques sur la modification du vivant, des problèmes scientifiques avec des risques sanitaires et environnementaux ou encore des problèmes législatifs (préservation de l'identité, étiquetage) (Plahuta et al. 2006). Récemment, le séquençage du génome de l'espèce *Vitis* a permis de s'ouvrir vers de nouveaux programmes de croisement et a contribué de manière significative à la mise en œuvre de stratégies basées sur la sélection assistée par marqueurs (SAM) chez la vigne.

Cette méthodologie consiste, dans un premier temps, à repérer les marqueurs génétiques tels que les QTL précédemment mentionnés puis, dans un second temps, de suivre et sélectionner les individus hybrides possédant ces marqueurs lors des croisements génétiques (Ochssner et al. 2016). Généralement, les rétrocroisements basés sur le croisement entre un hybride et l'un de ses parents sont utilisés afin d'obtenir un descendant génétiquement proche. La méthode permet ainsi de court-circuiter le long développement nécessaire à l'évaluation de l'hybridation conventionnelle. En effet, la SAM permet d'évaluer les jeunes plants et d'éliminer 90% des individus qui ne possèdent pas les traits voulus sans avoir à attendre 3 ans nécessaires au développement de la vigne (Merdinoglu et al. 2014).

Si cette technique permet maintenant de réaliser des introgressions de gènes de résistance tout en gardant des qualités organoleptiques intactes, ce processus de création de variétés de vignes résistantes est long. Merdinoglu et al. 2018 rapportent que la réalisation d'un programme génétique basé sur un pyramidage de sept traits génétiques de résistance nécessite 16 ans de travaux. L'évolution rapide et variable des demandes des consommateurs en termes de qualité sensorielle du vin peut être un frein au développement de cette méthode qui requiert près de deux décennies d'expérimentations. D'autres alternatives, plus rapides et plus modulables, ont dû être développées.

C.2. Le biocontrôle

Le terme de biocontrôle est défini comme l'utilisation d'organismes vivants et/ou de substances naturelles comme méthodes de protection des cultures. Cette stratégie de lutte biologique peut s'appliquer dans la gestion des vignobles et plus particulièrement dans le combat contre *P. viticola*.

En ce sens, plusieurs travaux se sont intéressés à l'action directe de certains micro-organismes et composés naturels contre le mildiou de la vigne.

Les bactéries du genre *Bacillus* ont notamment attiré l'attention de par leur stabilité sur les plantes et de leur habilité à produire différents antibiotiques avec un large spectre d'action (Boubakri et al. 2015). Une étude réalisée trois années de suite en vignoble a notamment montré l'effet anti-mildiou de *B. subtilis* KS1, isolé à partir de baies de raisins. Un des mécanismes pour expliquer son activité est la production d'un antibiotique antifongique, l'iturine A. Ce lipopeptide a notamment montré des activités toxiques contre plusieurs champignons de la vigne (Furuya et al. 2011). En outre, une étude a révélé que l'application de bactéries isolées à partir de feuilles de vigne, *B. subtilis* et *B. pumilus*, permettait également de contrôler *P. viticola*, sur disques foliaires et en vignoble. L'utilisation d'un marqueur fluorescent a permis de mettre en évidence une forte colonisation des tissus internes des feuilles par les bactéries contribuant à favoriser l'inhibition du mildiou (Zhang et al. 2017a).

D'autres genres de bactéries ont également montré des effets directs sur *P. viticola*. L'activité de la paenimyxine, un peptide polycyclique présent dans une souche du genre *Paenibacillus*, a montré une inhibition de la mobilité des zoospores et du développement de *P. viticola* (Hao et al. 2017). Le genre *Lysobacter* avec *Lysobacter capsici* AZ78 a également montré une diminution de l'incidence de la maladie causée par *P. viticola*. La production extracellulaire de protéases, lipases et bio-surfactants sont des mécanismes anti-oomycète déjà mis en évidence dans ce genre. En outre, cette étude a mis en lumière la capacité du genre *Lysobacter* a résisté aux ions cuivre permettant d'envisager un co-traitement avec la bouillie bordelaise. De plus, *L. capsici* a montré une tolérance à différents stress environnementaux tels que le manque de nutriments, le gel, le choc thermique et l'irradiation par UV (Puopolo et al. 2014). Le genre *Streptomyces* a également présenté une activité anti-mildiou avec une réduction de la maladie de 92% sur feuilles détachées et 83% en vignoble grâce à la souche *S. atratus*. La présence de deux imides, 5-acétoxy cycloheximide et cycloheximide, permettent d'expliquer l'activité avec une réduction de la maladie de 65 et 84% respectivement (Liang et al. 2016). Ces différents résultats démontrent ainsi la potentielle application de bactéries comme agent de biocontrôle.

D'autres micro-organismes ont fait l'objet d'études pour contrôler le mildiou de la vigne, tels que les champignons. Si la plupart des traitements en biocontrôle sont préventifs, l'application de *Fusarium proliferatum* en post-infection offre de nouvelles perspectives de lutte contre *P. viticola*. En effet, l'utilisation de ce champignon a permis une réduction de la production de sporanges de 97% sur disques foliaires et a empêché la resporulation. L'analyse microscopique a notamment montré que l'hyphe de *F. proliferatum* pouvait s'enrouler autour et à l'intérieur des sporangiophores de *P. viticola*, se développant ainsi dans son hôte (Falk et al. 1996). Le traitement en vignoble a également permis une réduction de la maladie entre 53% et 99% selon les années et les cépages utilisés. Des résultats similaires ont été obtenus par l'application du champignon *Epicoccum nigrum* (Kortekamp 1997). Ce saprophyte peut également s'entourer autour des sporangiophores. La propagation des sporanges est inhibée car les sporanges matures ne peuvent pas se détacher des sporangiophores en raison du contact étroit des sporanges et des hyphes d'*E. nigrum*. Ces champignons peuvent donc s'intégrer dans un programme de lutte biologique de par leurs actions préventives et curatives contre le mildiou. L'application du champignon *Alternaria alternata* permet également une inhibition du mildiou. L'observation des interactions cellulaires par microscopie électronique en transmission révèle des vacuoles dilatées et un haustorium morphologiquement modifié chez *P. viticola* (Musetti et al. 2006). A la différence des précédents champignons, aucun contact physique n'est mis en évidence. Ici, des molécules toxiques sont produites (dicétopipérazines) permettant de limiter la sporulation de *P. viticola*.

Ainsi, une méthodologie par biocontrôle par action directe contre le mildiou avec l'utilisation de micro-organismes est une voie possible de lutte. Il existe cependant d'autres voies alternatives avec des actions indirectes, se basant sur les mécanismes de défense déjà présents chez les végétaux.

C.3. Les stimulateurs de défense naturelle (SDN)

Dans leurs habitats naturels, les plantes sont continuellement soumises à des stress biotiques pouvant être d'origine bactérienne, fongique, virale ou entomologique. Face à ces invasions, les plantes ont mis en place des mécanismes de défense leur permettant de se protéger. Deux types de défense sont présents : les défenses constitutives et les défenses induites. L'induction de ces dernières réponses s'opère par des mécanismes interconnectés, ci-après décrits.

La PTI pour « PAMP-Triggered Immunity » consiste en une immunité basale ou horizontale. La PTI est activée par les PAMPs (« Pathogen-Associated Molecular Pattern »), autrement dit par les motifs moléculaires associés aux micro-organismes. Les PAMPs vont notamment être reconnus par des récepteurs PRRs (« Pattern-Recognition Receptors ») situés à l'extérieur de la membrane plasmique dont l'activation va permettre le déclenchement d'une cascade de signalisation et ainsi aboutir à la réponse immunitaire (**Figure 3**). Cependant, la PTI peut être contournée par les agents pathogènes, ces derniers ayant parfois développés des adaptations durant leur co-évolution entre les plantes avec la production de protéines effectrices (représentées par des étoiles violettes sur la **Figure 3**). La plante est alors dans un état de sensibilité, appelé ETS pour « Effector-Triggered Susceptibility » (Pieterse et al. 2009). En retour, la plante a acquis la capacité de générer des protéines de résistance (R) permettant de reconnaître spécifiquement les effecteurs antimicrobiens. Il en résulte une mise en place d'une seconde réponse immunitaire ou résistance verticale appelée ETI (« Effector-Triggered Immunity »). Cette résistance spécifique est souvent accompagnée d'une réponse d'hypersensibilité (HR) se traduisant par une réponse intense et violente pouvant entraîner la mort de la cellule infectée (Yang et al. 2015).

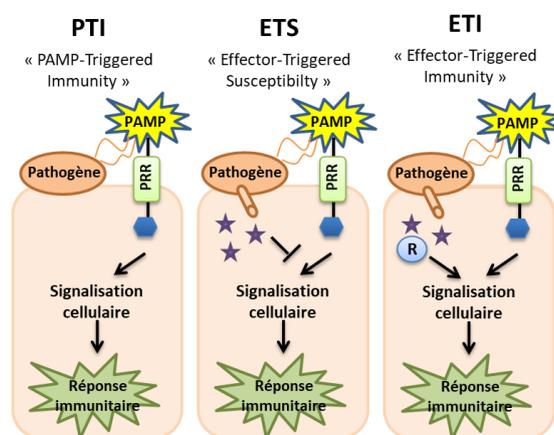


Figure 3. Représentation du système immunitaire de la plante. D'après Pieterse et al. 2009.

PAMP pour « Pathogen-Associated Molecular Pattern » ; PRRs pour « Pattern-Recognition Receptors ».

D'un point de vue moléculaire, le déclenchement de ces mécanismes de défense va entraîner l'activation de voies de signalisation et la production de composés dits de défense. Les réponses précoces mettent en jeu l'activation de protéines kinases (phosphorylation), des flux ioniques et la production de formes réactives de l'oxygène (ROS). Ces derniers peuvent permettre l'inhibition de la germination des spores et/ou du développement mycélien, ou encore provoquer la mort des cellules par peroxydation des lipides membranaires (Pontier et al. 1998). Cet arsenal de signaux précoces assure ainsi l'amplification et la spécificité du signal et permet de déclencher la synthèse d'autres signaux intracellulaires, comme les phytohormones. Parmi ces phytohormones, les trois majeures sont l'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène. Elles représentent trois voies de signalisation interconnectées (**Figure 4**). L'acide salicylique est communément énoncé comme associé à la résistance aux agents pathogènes biotrophes alors que l'acide jasmonique et l'éthylène sont plutôt affiliés aux agents pathogènes nécrotrophes (Yang et al. 2015).

La transmission de ces signaux aboutit finalement à la mise en place des défenses proprement dites. Premièrement, un renforcement de la paroi pecto-cellulosique grâce au dépôt de polysaccharides, de polymères aromatiques (similaire aux lignines) ou de glycoprotéines permet de conférer aux plantes une plus grande résistance aux activités microbiennes. Deuxièmement, une production de composés antimicrobiens non enzymatiques également appelés phytoalexines sont générés. La production d'une large gamme de protéines de défense appelées protéines PR (« pathogenesis related ») peut être également engendrée. Ces protéines peuvent désarmer les bioagresseurs en inhibant leurs protéases ou polygalacturonases, ou encore en dégradant les parois des champignons tels que l'effectuent les chitinases (Klarzynski & Fritig 2001).

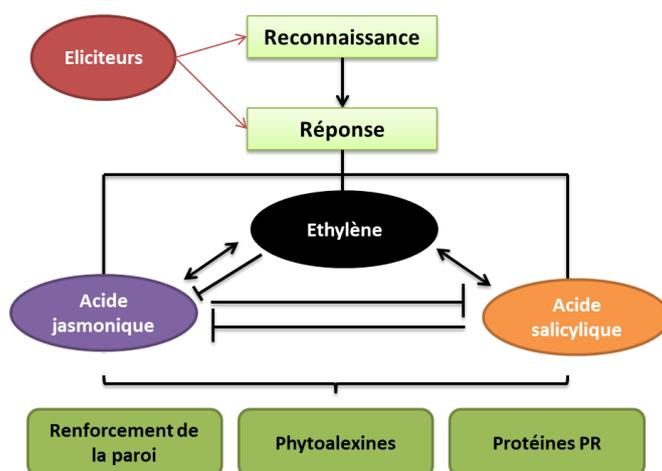


Figure 4. Représentation des voies de signalisation impliquées dans la défense des plantes.

D'après Yang et al. 2015.

Certaines molécules peuvent activer ces mécanismes de défense des végétaux afin qu'ils soient en état d'alerte au moment d'une éventuelle attaque par un phytopathogène. Ces molécules, inductrices de résistance sont appelées « éliciteurs » ou « stimulateurs des défenses naturelles des plantes » (« SDN » ou « SDP »). Les éliciteurs peuvent être d'origine naturelle ou synthétique et peuvent être reconnus par les plantes soit comme le signal initial d'une agression, soit comme des signaux d'alerte intervenant dans la cascade de signalisation (ecophytopic.fr).

Parmi les SDN provenant d'organismes biologiques, la laminarine qui est un polysaccharide composé de glucoses liés par des liaisons β -D-1,3 et ramifié par des liaisons β -D-1,6 provenant de l'algue brune *Laminaria digitata*, a beaucoup été étudiée comme éliciteur (Garde-Cerdán et al. 2017). La laminarine va intervenir, dans un premier temps, sur la réponse précoce de la plante avec une production de H_2O_2 (ROS), une modulation des flux calciques et une activation des kinases. Cependant, la laminarine n'entraîne pas de mort cellulaire. Dans un deuxième temps, la laminarine va moduler les différents mécanismes de défense systémique. La voie de signalisation de l'acide salicylique est mise en jeu avec la production de protéines PR. La voie de l'acide jasmonique est également activée avec la production de la phénylalanine ammonia lyase (PAL) et de la stilbène synthase (STS) qui sont des enzymes clés dans la production de phytoalexines chez la vigne. Ainsi, l'application de la laminarine sur vigne, à une concentration de 1 g/L, a pour finalité une réduction du mildiou de 75% (Aziz et al. 2003).

Le chitosane, un autre polysaccharide formé de D-glucosamine liée en β -(1-4) et de N-acétyl-D-glucosamine issu de la dégradation de paroi mycélienne, a également été rapporté comme éliciteur entraînant une résistance de la vigne contre le mildiou (Saigne-Soulard et al. 2015). Ce dérivé de la chitine permet la production de phytoalexines avec l'augmentation de stilbènes (resvératrol, picéide, ϵ -viniférine) et stimule la formation de protéines PR (chitinases et β -1,3-glucanase) (Aziz et al. 2006).

La méthionine, un acide aminé contenant du soufre, est connue pour son implication dans la formation des protéines mais également pour sa capacité d'élicitation. Il a été mis en évidence que la méthionine avait la capacité de générer la formation de ROS ainsi que d'induire des gènes codant des protéines PR (chitinases, glutathion-S-transférase) ou encore impliqués dans la production de phytoalexines (Boubakri et al. 2013). La méthionine permet une inhibition du mildiou de 70% *in planta* pour une concentration à 4,5 g/L (30 mM).

Ainsi, les éliciteurs d'origine naturelle ont la capacité de réduire l'impact du mildiou de la vigne à travers l'activation des défenses végétales. En ce sens, ces SDN peuvent être inclus dans un programme de biocontrôle, dont ceux relatifs à la lutte biologique.

Pour exemple d'éliciteurs synthétiques, le benzothiadiazole (BTH) qui est un analogue de l'acide salicylique, a été largement étudié pour sa capacité inductrice des défenses des plantes. L'application du BTH permet de réduire l'incidence du mildiou : de 85% d'atteinte mildiou pour les contrôles, seulement 15,8% de maladie sont rapportés après traitement BTH lors de tests effectués en serre (Harm et al. 2011). La voie de signalisation de l'acide salicylique est principalement mise en jeu avec l'induction de gènes codant des protéines PR-1, PR-2 (glucanase), PR-3 (chitinases IV), PR-8 (chitinases III) et PR-10. La production de métabolites secondaires comme les stilbènes est également stimulée avec la production de ptérostilbène, une forme méthylée du resvératrol (Dufour et al. 2013).

Le **Tableau 1** présente des activités anti-mildiou rapportées par certains éliciteurs.

Tableau 1. Résumé des activités anti-mildiou de différents SDN.

Molécules	Tests	Concentration (mg/L)	Inhibition de <i>P. viticola</i>	Références
Laminarine	<i>in planta</i>	500 - 1000	75%	Aziz et al. 2003
Chitosane	feuilles détachées	200	15 - 20%	Aziz et al. 2006
Méthionine	<i>in planta</i>	4500	70%	Boubakri et al. 2013
Benzothiadiazole	<i>in planta</i>	500	81%	Harm et al. 2011

*exprimé en 1×10^6 unités formant colonie (UFC)/mL

Trichoderma harzianum, *Streptomyces plicatus*, *Pseudomonas fluorescens*.

Cependant, il convient de mettre en lumière qu'aucun de ces SDN n'a permis une inhibition totale du mildiou même à des concentrations élevées. Seul le BTH, qui est un éliciteur synthétique, et la laminarine ont montré des résultats d'inhibition supérieure à 75% avec des concentrations moindres. Ainsi, cette méthodologie semble pouvoir s'intégrer dans des programmes de lutte en complément d'autres procédés afin de limiter l'infection du mildiou.

C.4. Les oomycides végétaux

Depuis un peu plus d'une décennie, la recherche s'intéresse désormais à l'utilisation d'extraits de plantes comme oomycide naturel. Ces sources potentielles de composés antimicrobiens ont l'avantage d'être biodégradables, respectueux de l'environnement et potentiellement peu ou pas néfastes pour la santé humaine. Ainsi, différentes stratégies d'études ont été initiées afin de trouver des extraits végétaux à la fois actifs et viables d'un point de vue économique.

Une première approche concerne l'étude de plantes médicinales dont les caractéristiques souvent antimicrobiennes en santé humaine peuvent trouver un écho en santé végétale. Une étude précurseur sur *Inula viscosa*, l'inule visqueuse (Astéracées), a été initiée pour contrôler *P. viticola* (Cohen et al. 2006). Cette plante est communément utilisée en médecine populaire pour ses propriétés officinales en tant qu'antimicrobien ou antiseptique (Ali-Shtayeh et al. 1998). Cette étude portait sur l'efficacité d'*I. viscosa* contre le mildiou de la vigne en condition de vignoble. Il en résulte que pour une inhibition de 90% du mildiou, une concentration entre 3 et 3,7 g/L (0,3-0,37%) était nécessaire.

L'habilité de *Salvia officinalis*, la sauge officinale (Lamiacées), à contrôler le mildiou en serre et en vignoble a également été étudiée (Dagostin et al. 2010). Cette plante est habituellement utilisée en médecine comme antiseptique, hépatostimulante, et tonique digestive. En condition sous serre, *S. officinalis* a permis un contrôle du mildiou entre 79,9 et 95,8% pour une concentration de 100 g de feuilles de sauge pour 1 L d'eau, alors qu'en vignoble, l'extrait de sauge a permis une réduction des symptômes de la maladie de 94%. Cependant, l'année suivante, l'extrait a entraîné une réduction de seulement 30% du mildiou, probablement dû au lessivage par de fortes pluies.

Un projet portant sur l'étude de 20 plantes médicinales aux actions anti-mildiou a également été réalisé (Rajeswari et al. 2008). Ce criblage est effectué en mélangeant les extraits avec une suspension de sporanges, suivi d'une visualisation de la germination au microscope. L'extrait de graines d'*Azadirachta indica*, le margousier (Méliacées) utilisé comme antiseptique externe en médecine ayurvédique, est le plus actif avec une inhibition de la germination à 75,4% à une concentration de 50 g/L (5%). Les extraits d'*Ocimum sanctum* (basilic sacré, Lamiacées) et de *Catharanthus roseus* (pervenue de Madagascar, Apocynacées) ont également des activités oomycides avec une inhibition de 71,8 et 68,8% respectivement, à une concentration de 100 g/L.

Cependant, il convient que ces plantes utilisées pour leurs propriétés thérapeutiques, comme *C. roseus* (alcaloïdes anti-cancéreux), ne peuvent être une source viable pour une valorisation en santé végétale.

Une stratégie portant sur l'étude approfondie de plantes utilisées en agriculture traditionnelle pour lutter contre des ravageurs ou des micro-organismes a été initiée. Une étude s'est focalisée sur l'activité anti-mildiou de 5 extraits : les écorces et feuilles de *Salix alba* (saule blanc, Salicacées), *Equisetum arvense* (prêle des champs, Equisetacées), *Artemisia absinthium* (absinthe, Astéracées) et *Artemisia vulgaris* (armoïse, Astéracées) (Andreu et al. 2018). L'extrait d'écorces de saule, riche en flavanones (ériodyctol) et flavanols (catéchine), et l'extrait d'absinthe, riche en flavanols méthylés et acides hydroxycinnamiques, ont permis une inhibition totale de la germination des spores à une concentration de 1 g/L. Cependant, des essais en vignoble n'ont pas montré d'effets oomycides, potentiellement à cause de la photosensibilité et de la biodégradation des extraits.

Une approche possible pour pallier à ce manque de connaissances phytochimiques et d'activités biologiques de certaines plantes est de réaliser des screenings à partir de banques contenant des milliers d'extraits végétaux. Cette stratégie sans *a priori* permettrait de mettre en lumière des extraits sans liens apparents avec la santé végétale mais au potentiel anti-mildiou réel.

Ainsi, une équipe suisse possédant une chimiothèque interne contenant plus de 3000 extraits végétaux et fongiques a réalisé un screening *in vitro* sur l'activité anti-mildiou de la vigne. Une première étude révèle l'efficacité d'un extrait de *Juncus effusus* (jonc épars, Juncacées) ainsi que son composé majoritaire, le déhydroeffusol, avec une inhibition totale de la germination des spores *in vitro* à 24 et 4 mg/L, respectivement. Des essais approfondis de cet extrait *in planta* (en pot) ont mis en évidence une CI_{50} de 123 mg/L et une inhibition totale du mildiou entre 250 et 500 mg/L (Thuerig et al. 2016).

Une deuxième étude, selon le même modèle, a mis en lumière un extrait de *Verbesina lanata* (Asteracées), une plante endémique d'Amérique centrale non étudiée d'un point de vue phytochimique. L'extrait a permis une inhibition totale de la germination des spores *in vitro* à 35 mg/L et une inhibition du mildiou *in planta* à 82% pour une concentration à 1 g/L (Ramseyer et al. 2017). L'activité de cet extrait a été imputée à la présence de sesquiterpènes avec le 6 β -cinnamoyloxy-4 β ,9 β ,15-trihydroxyeudesmane et la 6 β -cinnamoyloxy-1 β ,15-dihydroxyeudesm-4-ène-3-one montrant des valeurs d'inhibition totale *in vitro* de 5 et 31 mg/L, respectivement.

Un inconvénient important pour l'utilisation de ces extraits est le peu d'applications connues de ces plantes dont les cultures sont généralement marginales. Ainsi, la question d'un sourcing abondant et durable doit être posée.

En ce sens, une stratégie basée sur la valorisation de coproduits végétaux issus de l'agriculture ou d'exploitations industrielles est une approche intéressante. Si les notions de coproduits, sous-produits ou déchets divergent dans leurs définitions, il reste que ces termes désignent des matériaux résiduels d'un produit principal qui peuvent avoir pour vocation une réutilisation dans d'autres domaines. Ainsi, ces matières végétales résiduelles abondantes, au coût peu élevé, contenant des composés actifs tout en étant respectueux de la nature, peuvent être une alternative aux produits de synthèse.

Un projet européen s'est ainsi intéressé à la valorisation des écorces de huit espèces forestières en tant qu'oomyicide naturel contre le mildiou de la vigne (Mulholland et al. 2017). Les extraits d'écorces de *Larix sibirica* (mélèze de Sibérie, Pinacées) et *Larix decidua* (mélèze d'Europe, Pinacées) ont permis une inhibition du mildiou *in planta* entre 80 et 90% pour une concentration à 1 g/L. Cette activité chez le genre *Larix* est due à la présence de composés phénoliques actifs comme le larixol, larixyl acétate, laricirésinol and laricirésinol acétate. Au vu de ces résultats, une étude supplémentaire a été réalisée en se focalisant sur *L. decidua* (Thuerig et al. 2018). Des formulations portant sur un extrait d'écorces et

sur un extrait oléorésineux du mélèze ont été testées contre le mildiou *in vitro*, *in planta* et en vignoble. L'extrait oléorésineux du mélèze formulé permet une inhibition totale de la germination *in vitro* à 23 mg/L, *in planta* à 1 g/L (CI₅₀ à 0,25 g/L), et une réduction de la surface infectée en vignoble entre 49% en 2014 et 72% en 2015. L'extrait d'écorces de mélèze formulé permet quant à lui une diminution de la surface infectée en vignoble proche, de 50% en 2014 et 68% en 2015.

Dans la même lignée, une valorisation de coproduits viticoles et plus précisément des sarments de vigne a été initiée. Une étude a été réalisée sur la capacité d'extraits alcooliques de sarment de vigne à inhiber le développement du mildiou sur disques foliaires (Schnee et al. 2013). Les résultats montrent une inhibition de la mobilité des zoospores et de la sporulation à 1 g/L d'extrait. Cette activité anti-mildiou est notamment imputée à la toxicité de polyphénols appelés stilbènes qui composent cet extrait, et plus particulièrement les tétramères tels que la vitisine B et l'hopéaphénol ainsi que le dimère ϵ -viniférine. Une étude à plus grande échelle portant sur l'activité oomycide d'un extrait de sarment de vigne en serre et en vignoble a été initiée (Richard et al. 2016). Les essais en pot ont montré que pour une concentration à 5 g/L, l'extrait permettait une réduction de la fréquence d'attaque entre 59 et 69% et une diminution de la surface foliaire infectée entre 83 et 88%, ce qui était similaire aux traitements par la bouillie bordelaise. Les essais en vignoble ont révélé une réduction de la fréquence d'attaque entre 16 et 39% et une diminution de la surface foliaire infectée entre 57 et 61% ce qui est, cette fois, moins efficace que le traitement cuprique. Ce dernier résultat soulève l'importance de réaliser des formulations des extraits afin d'éviter le lessivage par la pluie et augmenter son efficacité.

Ainsi, les extraits végétaux exercent globalement une activité oomycide significative contre le mildiou de la vigne (**Tableau 2**). Si l'on compare les résultats de la littérature, on observe une inhibition totale du mildiou sur disques foliaires et *in planta* à des concentrations aux alentours de 1000 mg/L. Le passage en vignoble tend à nécessiter des doses appliquées plus élevées mais l'utilisation de formulations permettrait de limiter ce problème comme semblent le montrer les travaux de Thuerig et al. (2018).

Tableau 2. Résumé des activités anti-mildiou des principaux extraits végétaux décrits.

Plantes	Tests	Concentration en extrait (mg/L)	Inhibition de <i>P. viticola</i>	Références
<i>I. viscosa</i>	vignoble	3000 – 3700	90%	Cohen et al., 2006
<i>S. officinalis</i>	<i>in planta</i>	nd*	79,9 - 95,8%	Dagostin et al., 2011
	vignoble	nd*	94%	
<i>A. indica</i>	<i>in vitro</i>	50000	75,4%	Rajeswari et al., 2008
<i>S. alba</i>	disques foliaires	1000	100%	Andreu et al., 2018
<i>A. absinthium</i>	disques foliaires	1000	100%	Andreu et al., 2018
<i>J. effusus</i>	<i>in vitro</i>	24	100%	Thuerig et al., 2016
	<i>in planta</i>	250 – 500	100%	
<i>V. lanata</i>	<i>in vitro</i>	35	100%	Thuerig et al., 2016
	<i>in planta</i>	1000	82%	
<i>L. decidua</i>	<i>in vitro</i>	23	100%	Thuerig et al., 2018
	<i>in planta</i>	1000	100%	
	vignoble	1000	49 - 72%	
<i>V. vinifera</i>	disques foliaires	1000	100%	Schnee et al., 2013
	<i>in planta</i>	5000	83 - 88%	Richard et al., 2016
	vignoble	5000	57 - 61%	

*100 g de feuilles de sauge pour 1 L d'eau

Inula viscosa, *Salvia officinalis*, *Azadirachta indica*, *Salix alba*, *Artemisia absinthium* *Juncus effusus* *Verbesina lanata* *Larix decidua*, *Vitis vinifera*.

L'utilisation de ces extraits végétaux se base principalement sur la diversité des molécules présentes dans la plante. L'activité oomycide est due à des composés présentant des propriétés antimicrobiennes, généralement produits par la plante pour se défendre (phytoalexines). Comme le démontrent les travaux de Thuerig et al. (2018) et Richard et al. (2016) sur les coproduits sylvicoles et viticoles, les molécules responsables des activités anti-mildiou sont des composés phénoliques.

Chapitre II. Les composés phénoliques

A. Généralités : voie de biosynthèse

Les composés phénoliques font partie du métabolisme secondaire des végétaux. Ce dernier est considéré comme non essentiel pour les mécanismes basiques de photosynthèse et de respiration mais est requis pour la survie et l'adaptation des plantes à leur environnement. Les plantes ont ainsi développé différentes voies métaboliques menant à plusieurs classes de métabolites secondaires tels que, principalement, les alcaloïdes, les terpènes et les composés phénoliques, représentant plusieurs dizaines de milliers de composés capables de répondre aux différents stress biotiques et abiotiques. Ces composés agissent généralement dans la défense des plantes (herbivores, microorganismes, virus), également comme signaux (attraction pour la pollinisation) ou comme protecteurs contre les radiations ultraviolets (UV) et antioxydants (Ramawat & Mérillon 2013a).

Les composés phénoliques sont les métabolites secondaires les plus largement produits, omniprésents dans le règne végétal, même si la nature des composés varie en fonction des familles végétales. Généralement, ces composés sont formés d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyle (Sarni-Manchado & Cheynier 2006). Les végétaux semblent avoir développé la capacité de synthèse de ces composés phénoliques lors de leur adaptation d'un environnement aquatique à terrestre, majoritairement pour se protéger des rayonnements UV. On parlait alors d'« écran phénolique » (Lowry et al. 1980).

La voie de biosynthèse des composés phénoliques est appelée la voie des phénylpropanoïdes, elle-même dérivée de la voie du shikimate (**Figure 5**). Le terme « polyphénol » devrait ainsi être utilisé exclusivement lorsque le métabolite en question est issu de ces voies définies (Quideau et al. 2011). La voie de l'acide shikimique est une voie métabolique permettant l'obtention de certains acides aminés aromatiques. Elle débute par la condensation du phosphoénolpyruvate et de l'érythrose-4-phosphate suivie par différents mécanismes réactionnels de (dé)phosphorylations, déshydratations, décarboxylations et de condensations menant notamment à la formation de la phénylalanine (Lattanzio 2013; Seigler 1998). A partir de cet acide aminé se met en place la voie des phénylpropanoïdes et l'action de la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) qui transforme la phénylalanine en acide cinnamique. L'ajout d'une fonction OH par la cinnamate 4-hydroxylase (C4H) permet l'obtention de l'acide *para*-coumarique dont la réaction avec le coenzyme A via la 4-coumarate-CoA ligase (4CL) aboutit à la formation de la coumaroyl-CoA (Marè et al. 2013). Ce composé se pose alors comme un carrefour pour différentes voies métaboliques aboutissant à différentes classes de polyphénols.

Généralement, les polyphénols sont classés en deux catégories selon leurs structures; les flavonoïdes et les non-flavonoïdes. Les flavonoïdes sont des composés phénoliques responsables des couleurs rouges, oranges, jaunes, bleues ou violettes des fleurs et fruits chez les végétaux. Ce sont des composés avec une structure commune formée de deux cycles benzéniques reliés entre eux par un hétérocycle oxygéné. Pour cela, le coumaroyl-CoA est condensé avec trois unités malonyl-CoA grâce à la chalcone synthase (CHS) permettant d'obtenir les chalcones (**Figure 5**). L'isomérisation de ces dernières par la chalcone isomérase (CHI) permet la formation des flavanones, une pierre angulaire dans la voie des flavonoïdes. A partir de ces composés se forment les flavanols, les flavones et les leucoanthocyanidines. Ces dernières permettent l'obtention de flavan-3-ols (2R, 3S) tels que l'épicatéchine et d'autre part des anthocyanidines qui génèrent des formes glycosylées appelées anthocyanes. Les anthocyanidines peuvent également former des flavan-3-ols (2R, 3R) comme la catéchine. La condensation de plusieurs unités flavan-3-ols permet d'engendrer des formes polymérisées appelés proanthocyanidines ou tanins condensés (Lattanzio 2013; Oliveira et al. 2013).

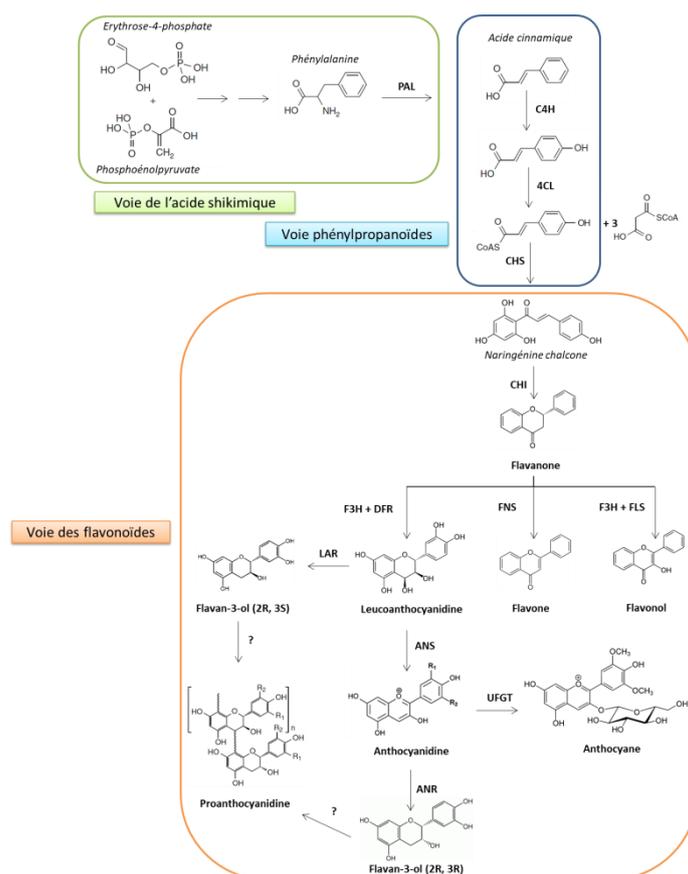


Figure 5. Voie de biosynthèse des flavonoïdes. D'après Marè et al. 2013; Oliveira et al. 2013.

PAL=phénylalanine ammonia-lyase, C4H=cinnamate 4-hydroxylase, 4CL=4-coumarate-CoA ligase, CHS=chalcone synthase, CHI=chalcone isomérase, F3H=flavanone 3-hydroxylase, FLS=flavonol synthase, FNS=flavone synthase, DFR=dihydroflavonol 4-réductase, LAR=leucoanthocyanidine réductase, ANS=anthocyanine synthase, ANR=anthocyanidine réductase, UFGT= UDP-3-O-glucosyltransférase.

Les non-flavonoïdes correspondent aux autres classes de polyphénols parmi lesquelles se trouvent les stilbènes, les acides phénoliques et les lignanes (**Figure 6**). A l'instar des flavonoïdes, les stilbènes ont pour point de départ la coumaroyl-CoA issue de la voie des phénylpropanoïdes. La condensation de la coumaroyl-CoA avec trois unités de malonyl-CoA par la stilbène synthase (STS) aboutit à la formation du resvératrol, l'unité de base des stilbènes. Le resvératrol peut, par la suite, subir différents mécanismes réactionnels tels que des glycosylations, méthylations, oligomérisations ou isomérisations aboutissant à une diversité des composés stilbéniques (Sáez et al. 2018).

En outre, le *p*-coumaroyl-CoA est également un précurseur des acides phénoliques et plus particulièrement de la voie de l'acide benzoïque à travers plusieurs réactions enzymatiques faisant intervenir l'énol-CoA hydratase (ECH), l'alcool déshydrogénase (ADH), l'acylCoA thiolase (AT) et la thiol estérase (TE) (**Figure 6**). De plus, l'acide *p*-coumarique, précurseur du *p*-coumaroyl-CoA, intervient également cette voie à travers la formation des dérivés de l'acide cinnamique. Des enzymes comme la *p*-coumarate 3-hydroxylase (C3H) et la caféïque/5-hydroxyférulique-O-méthyltransférase (COMT) interviennent dans cette voie (Goleniowski et al. 2013).

Enfin, de la voie des acides phénoliques découle la voie des lignanes où la réduction de l'acide férulique par la cinnamoyl-CoA réductase (CCR) et la cinnamyl alcool déshydrogénase (CAD) permet l'obtention de l'alcool coniférylique. La condensation de deux unités d'alcool coniférylique aboutit à la formation du pinorésinol, le précurseur de la voie des lignanes (Satake et al. 2015).

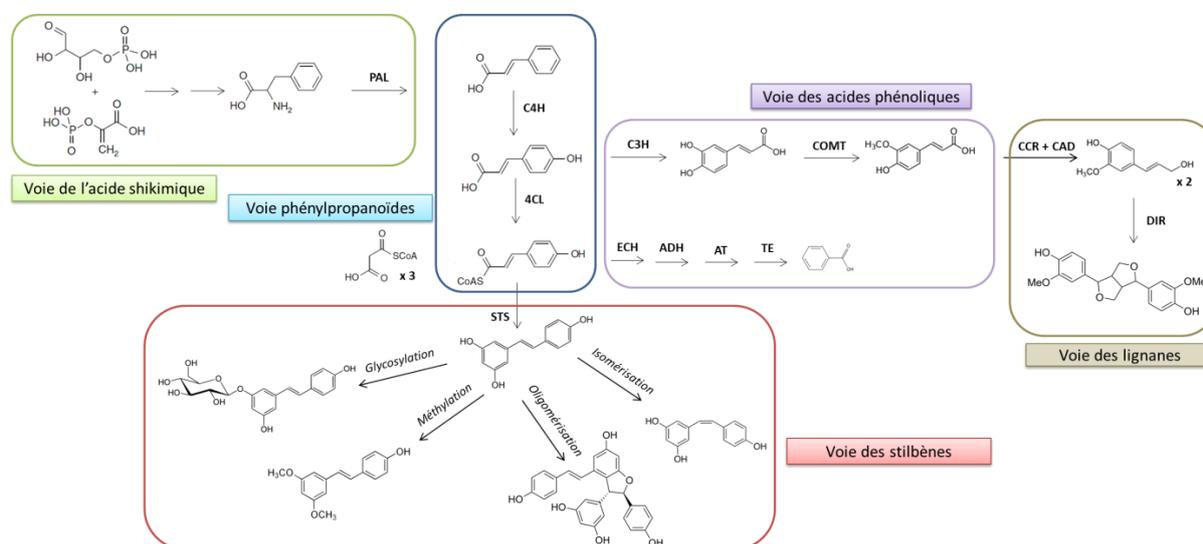


Figure 6. Voie de biosynthèse des non-flavonoïdes. D'après Marè et al. 2013; Ramawat & Mérillon 2013b; Satake et al. 2015.

PAL=phénylalanine ammonia-lyase, C4H=cinnamate 4-hydroxylase, 4CL=4-coumarate-CoA ligase, STS=stilbène synthase, C3H= *p*-coumarate 3-hydroxylase, COMT= acide caféïque/5-hydroxy acide férulique-O-méthyltransférase, ECH= enol-CoA hydratase, ADH=alcool déshydrogénase, AT=acylCoA thiolase, TE= thiol estérase, CCR= cinnamoyl-CoA réductase, CAD= cinnamyl alcool déshydrogénase, DIR=protéine dirigeante (enzyme non connue).

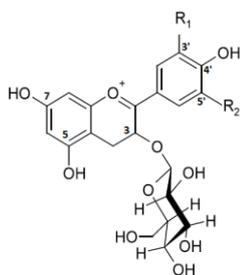
B. Les flavonoïdes

B.1. Anthocyanes

Appartenant à la famille des flavonoïdes, les anthocyanes sont des pigments naturels, responsables de la couleur bleue, violette, rouge et orange de nombreux fruits et légumes. En ce sens, au sein du règne végétal, ils jouent un rôle prédominant dans la pollinisation des fleurs de par leur pouvoir attractif et favorisent ainsi la dispersion des graines et des fruits par les animaux (zoochorie). En outre, les anthocyanes agissent comme antioxydants au sein de la plante, comme photorécepteurs ou encore sont impliquées dans la résistance aux attaques de ravageurs (De Pascual-Teresa et al. 2013).

Structurellement, les anthocyanes sont principalement présentes dans la nature sous forme d'hétérosides. La forme aglycone des anthocyanes, également appelée anthocyanidine, est basée sur l'ion flavilium ou 2-phénylbenzopyrilium présentant des groupes hydroxyle et méthoxyle dans différentes positions. En fonction du nombre et de la position des substituants hydroxyle et méthoxyle, une douzaine d'anthocyanidines différentes ont été décrites, dont six se retrouvent couramment dans les fruits et les légumes : pélargonidine, cyanidine, delphinidine, péonidine, pétunidine et malvidine (Miguel 2011).

Les unités glycosidiques peuvent être liées à l'anthocyanidine par une liaison α ou β et toujours en position 3 de l'aglycone (**Figure 7**). Lorsque des sucres supplémentaires sont présents dans la molécule d'anthocyane, ils sont liés aux positions 5 et 7, et moins fréquemment en 3' et 5'. Des hexoses comme le glucose et le galactose, et des pentoses comme le rhamnose, l'arabinose et le xylose sont les sucres les plus couramment rencontrés chez les anthocyanes. De plus, les sucres peuvent également être acylés avec différents acides organiques par l'estérification d'une fonction hydroxyle. (De Pascual-Teresa & Sanchez-Ballesta 2008). De nos jours, plus de 500 anthocyanes différentes ont été identifiées.



- R1 = R2 = H: pélargonidine -3-O-glucoside
- R1 = OH, R2 = H: cyanidine -3-O-glucoside
- R1 = R2 = OH: delphinidine-3-O-glucoside
- R1 = OCH₃, R2 = H: péonidine -3-O-glucoside
- R1 = OH, R2 = OCH₃: pétunidine -3-O-glucoside
- R1 = R2 = OCH₃: malvidine -3-O-glucoside

Figure 7. Exemple de structure d'anthocyanes, dérivés glucosylés d'anthocyanidines.

Les anthocyanes peuvent être présents dans le fruit, la fleur, la tige, les feuilles ou les racines. Elles sont généralement solubles dans l'eau et sont situées dans les vacuoles des cellules épidermiques (Raghvendra et al. 2011). Les sources principales en anthocyanes vont être les fruits rouges tels que le raisin, la myrtille, le cassis, la cerise ou la framboise. On peut aussi retrouver ces composés dans les céréales comme le maïs violet, dans les légumes comme l'aubergine ou des boissons comme le vin rouge (De Pascual-Teresa & Sanchez-Ballesta 2008). En terme de teneurs, les anthocyanes peuvent être à une concentration de 250 mg/100g de raisins rouges et jusqu'à 500 mg/L dans les vins (Li et al. 2011). L'anthocyane majoritaire dans les baies de raisin et le vin est la malvidine-3-O-glucoside alors que l'anthocyane prédominante dans les fruits en général est la cyanidine-3-O-glucoside (Kong et al. 2003).

Du fait de leur forte présence dans l'alimentation, les anthocyanes ont fait l'objet de nombreux travaux sur leurs activités biologiques. Une étude sur l'activité anti-oxydante de fractions d'anthocyanes de vin rouge italien a montré une efficacité pour piéger les ROS et inhiber l'oxydation des lipoprotéines et l'agrégation plaquettaire. Ces résultats ont ainsi montré que les anthocyanes pourraient jouer un rôle dans la prévention des maladies cardiovasculaires (Ghiselli et al. 1998). Un focus sur la malvidine-3-O-glucoside, l'anthocyane majoritaire du vin, a notamment montré une activité de cardioprotection contre les lésions d'ischémie/reperfusion (Snopek et al. 2018).

En outre, il est suggéré que les anthocyanes possèdent des propriétés anti-inflammatoire et chimiopréventive. En effet, les anthocyanes et plus particulièrement la malvidine-3-O-glucoside, ont été capables de supprimer la prolifération de l'adénocarcinome gastrique humain en stimulant l'apoptose de ces cellules cancéreuses (Shih et al. 2005).

D'autres activités ont été prêtées aux anthocyanes avec des activités antidiabétiques avec une capacité à interférer avec l'absorption du glucose et la sécrétion de l'insuline ainsi qu'un effet protecteur sur les cellules hépatiques. Des effets bénéfiques pour inverser le cours du vieillissement neuronal et comportemental ont permis de mettre en lumière leur intérêt potentiel dans la prévention des maladies neurodégénératives. Des effets oculaires avec une prévention de la dégénérescence maculaire et de la cataracte ont également été rapportés (De Pascual-Teresa et al. 2013).

B.2. Flavanols et proanthocyanidines

Les flavanols sont des flavonoïdes monomériques composés de trois classes différentes : les flavan-3-ols, les flavan-4-ols et les flavan-3,4-diols. Très peu présents dans la nature, les flavan-4-ols et les flavan-3,4-diols ne seront pas étudiés. A l'inverse, les flavan-3-ols sont très abondants dans la nature. De ces structures monomériques vont notamment découler des formes oligomérisées / polymérisées appelées proanthocyanidines ou tanins condensés.

Les flavan-3-ols ont une structure générale en C₆-C₃-C₆ munie d'une unité benzopyrane (cycles A et C) avec un cycle aromatique (cycle B) lié au carbone C-2 du cycle pyranique (cycle C). La différence entre chacune des sous-classes des flavanols précédemment citées, réside dans le modèle d'hydroxylation de l'anneau pyrane (cycle C). Dans le cas des flavan-3-ols, le groupe hydroxyle se trouve sur l'atome de carbone C-3 (**Figure 8**).

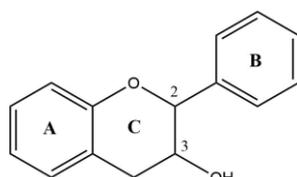
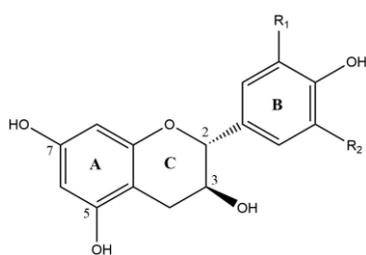


Figure 8. Structure générale des flavan-3-ols.

Communément, les flavan-3-ols du règne végétal possèdent des fonctions hydroxyles en C-5 et C-7 au niveau du cycle A et une stéréochimie de la liaison C-2 du cycle C en configuration *2R*. Les différents flavan-3-ols vont alors différer les uns des autres selon les hydroxylations présentes sur le cycle aromatique B et la stéréochimie de la liaison C-3 du cycle C qui peut être en configuration *3R* ou *3S*. Parmi les flavan-3-ols les plus répandus, il y a la catéchine, l'afézéléchol et la gallocatéchine avec une configuration *2R*, *3S* (C-2 et C-3) et l'épicatéchine, l'épiafézéléchol et l'épigallocatéchine avec une configuration *2R*, *3R* (**Figure 9**) (Oliveira et al. 2013).

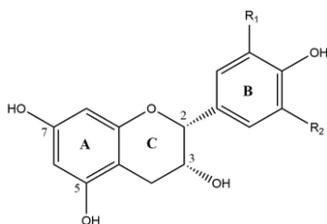


2R, *3S*

R1 = R2 = H : afézéléchol

R1 = H, R2 = OH : catéchine

R1 = R2 = OH: gallocatéchine



2R, *3R*

R1 = R2 = H : épiafézéléchol

R1 = H, R2 = OH : épicatéchine

R1 = R2 = OH: épigallocatéchine

Figure 9. Exemple de structures de flavan-3-ols monomériques.

Les proanthocyanidines sont des formes oligomériques (si $n < 6$) ou polymériques (si $n > 6$) de flavan-3-ols. Ils sont présents dans la nature avec une grande diversité de structures due aux caractéristiques structurales des flavan-3-ols monomériques ainsi qu'au type de liaison inter-flavanique ou encore au degré de polymérisation. Les liaisons inter-flavanol les plus courantes sont les liaisons C-C établies entre le C-4 du cycle C d'une unité flavanol (correspondant à l'unité supérieure) et le C-8 ou le C-6 du cycle A d'un autre flavan-3-ol (unité inférieure). Ces proanthocyanidines appartiennent au type B (dimères) (**Figure 10**). Dans les formes dimériques dites de type A, une liaison supplémentaire est présente entre le C-2 du cycle C et la fonction hydroxyle en C-5 ou C-7 du cycle A (**Figure 10**) (Santos-Buelga & Scalbert 2000). Les trimères sont également divisés en deux : le type C correspondant à deux liaisons du type B et le type D équivalent à une liaison de type B et une liaison de type A.

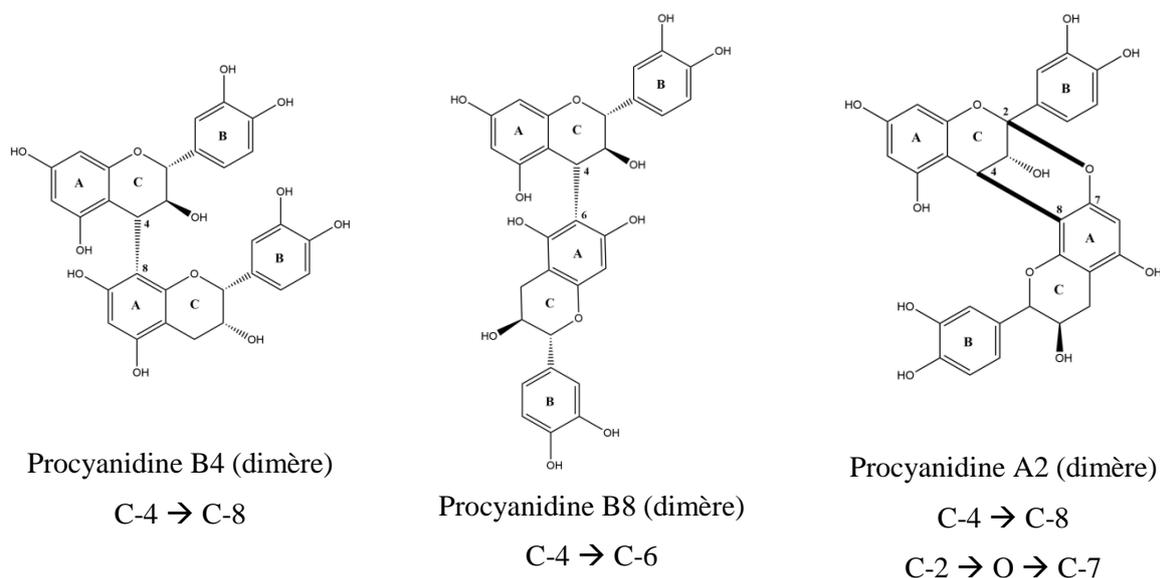


Figure 10. Exemple de structures de proanthocyanidines.

A l'heure actuelle, l'identification et la quantification des flavan-3-ols monomériques dans différentes sources végétales sont plutôt bien établies. A l'inverse, peu d'informations sur les concentrations en proanthocyanidines sont disponibles dans la littérature. Cela s'explique par la difficulté de leur extraction, caractérisation et quantification (Oliveira et al. 2013). De plus, des divergences importantes selon les auteurs sont observées pour un produit donné selon la technique de dosage utilisée ou la nature de l'échantillon analysé: variété, stade de maturité, partie du fruit considérée, transformation en denrées alimentaires... Malgré tout, on note la présence de flavan-3-ols (catéchine et épicatechine) et de proanthocyanidines (B1-B4) dans les céréales (lentille, sorgho, orge), les fruits (pomme, raisin, fruits rouges), boissons et jus (vin, cidre, bière) ou encore le cacao (Santos-Buelga & Scalbert 2000).

Au niveau de leurs activités biologiques, les flavanols et les proanthocyanidines possèdent trois propriétés essentielles ; une activité anti-oxydante, la formation de complexes avec des protéines et une chélation d'ions métalliques.

Les radicaux libres (ROS) sont impliqués dans plus d'une centaine de maladies chez l'Homme: arthrite, choc hémorragique, athérosclérose, vieillissement, ischémie, maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Les propriétés chimiques des proanthocyanidines en terme de disponibilité des hydrogènes phénoliques leur confèrent de puissantes propriétés réductrices, permettant de prédire un piégeage direct des radicaux libres. En recevant un hydrogène ou un électron, le radical libre se trouve neutralisé, ce qui prédit l'activité anti-oxydante de ces composés (Bagchi et al. 2000; Sobeh et al. 2018). Il en résulte des actions bénéfiques comme en neuroprotection (Asha Devi et al. 2011) ou dans la prévention de cancer en stimulant l'apoptose de lignée cellulaire (Engelbrecht et al. 2007).

Les proanthocyanidines ont également été étudiées pour leur capacité à interagir avec les protéines. Les interactions sont essentiellement un phénomène de surface, généralement réversible, dont les principales forces sont des liaisons hydrophobes, renforcées par l'établissement de liaisons hydrogène. Les ponts hydrogène sont établis entre les groupes phénoliques, comme donneurs de protons, et les groupes carbonyle des liaisons peptidiques, comme accepteurs de protons. Les protéines riches en proline comme les protéines salivaires ont montré les plus fortes affinités (Hagerman 1981) alors qu'un degré croissant de polymérisation des proanthocyanidines augmente la force d'interaction (Ricardo-da-Silva et al. 1991). Considérées comme ayant un effet néfaste sur la digestion, les proanthocyanidines vont généralement déclencher une sécrétion de protéines salivaires lors de leur consommation entraînant ainsi une complexation puis une précipitation. Ce rôle protecteur des protéines salivaires pour piéger les proanthocyanidines engendre une sensation d'astringence dans la bouche relative à un assèchement généralement désagréable (Ployon et al. 2018).

En outre, les proanthocyanidines ont la capacité à chélater les ions métalliques tels que le fer, le cuivre ou l'aluminium. Ces ions sont souvent impliqués dans l'initiation de réactions d'oxydation menant à la formation d'espèces radicalaires, comme par exemple la réaction de Fenton. Cette propriété permet également d'expliquer l'activité antioxydante de ces composés. Les proanthocyanidines présentes dans le vin rouge ont ainsi montré une complexation avec l'ion ferrique (Fe^{3+}) permettant une inhibition de son absorption (Cook et al. 1995). Ainsi, la consommation de boissons riches en proanthocyanidines, a été suggérée comme stratégie pour réduire l'absorption du fer chez les patients en surcharge en fer. Par contre, il est conseillé aux personnes les plus susceptibles de développer une carence en fer (enfant, femme enceinte) d'éviter une consommation excessive de ces boissons (Scalbert et al. 2002).

B.3. Flavanones et flavanonols

B.3.1. Flavanones

Comme mentionné précédemment, les flavanones est un intermédiaire obligatoire de la voie de biosynthèse des flavonoïdes. Ces composés sont moins présents dans le règne végétal que les constituants qui en découlent, ce qui peut être expliqué par cette situation de précurseurs. Structuellement, ces composés flavonoïdiques sont formés de deux cycles benzéniques (A et B), reliés entre eux par un hétérocycle (C) avec une liaison asymétrique en C-2. Les caractéristiques du squelette des flavanones sont que le cycle C est saturé et qu'il présente une fonction cétone en C-4 (**Figure 11**). Ces composés peuvent ensuite présenter différentes substitutions comme des fonctions hydroxyles en position C-5 et C-7 du cycle A et C-4' du cycle B, des glycosylations en C-7 (cycle A) ou encore des méthylations en C-4' (cycle B) (Ninomiya and Koketsu, 2013).

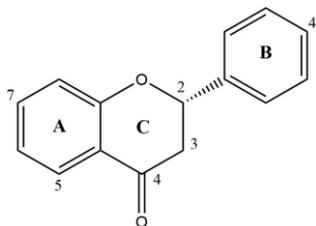


Figure 11. Structure générale des flavanones.

Les flavanones sont généralement présentes sous leurs formes glycosylées dans les végétaux. Elles sont notamment présents dans les familles des Compositées, Leguminosées et Rutacées. Les plus fortes teneurs en flavanones se trouvent dans le genre *Citrus* (Rutaceae) tels que les pamplemousses, les oranges, les mandarines, les bergamotes, les kumquats ou encore les citrons (Barreca et al. 2017). Parmi les flavanones présentes, les aglycones naringénine et hespérétine ainsi que leurs formes glycosylées (narirutine, naringine, hespéridine, néohespéridine) sont les flavonoïdes majoritaires dans ses fruits (Testai & Calderone 2017). Comme de nombreux polyphénols et plus particulièrement les flavonoïdes, les flavanones sont des composés avec des activités anti-oxydantes, anticancéreuses, antimutagènes et cardio-protectrices (Khan et al. 2014). D'autres flavanones présentes dans diverses familles végétales ont été étudiées et notamment la pinocembrine qui ne possède pas de fonction phénol sur le cycle B. Cette aglycone se trouve dans les fruits, les légumes, les herbes, les épices, les fleurs, la propolis, le thé ou le vin rouge. Outre les activités précédemment citées, la pinocembrine possède également des propriétés antimicrobiennes, antibactériennes et antifongiques (Rasul et al. 2013).

B.3.2. Flavanonols

Les flavanonols (ou dihydroflavonols) est une sous-classe des flavonoïdes qui dérive des flavanones. Ces composés sont formés comme tous les flavonoïdes de deux cycles benzéniques (A et B), reliés entre eux par un hétérocycle (C). Les propriétés relatives aux flavanonols sont que le cycle C est saturé, qu'il présente une fonction cétone en C-4 et une fonction hydroxyle en C-3 (**Figure 12**) (Selivanova et al. 1999). La différence entre les flavanonols et les flavanones est donc la présence d'une fonction –OH en C-3 du cycle C. Les flavanonols sont des dérivés 3-hydroxy des flavanones.

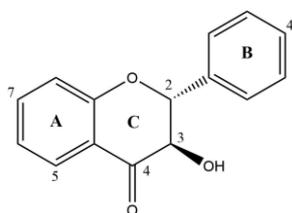


Figure 12. Structure générale des flavanonols.

Parmi les flavanonols les plus connus, il y a la pinobanksine qui dérive de la pinocembrine, la taxifoline (dihydroquercétine) qui est générée à partir de l'ériodictyol et le dihydrokaempférol issu de la naringénine (**Figure 13**) (Britsch et al. 1981). Ces flavanonols ainsi que différents dérivés glycosylés, méthylés sont présents dans bon nombre de végétaux (Andersen & Markham 2006).

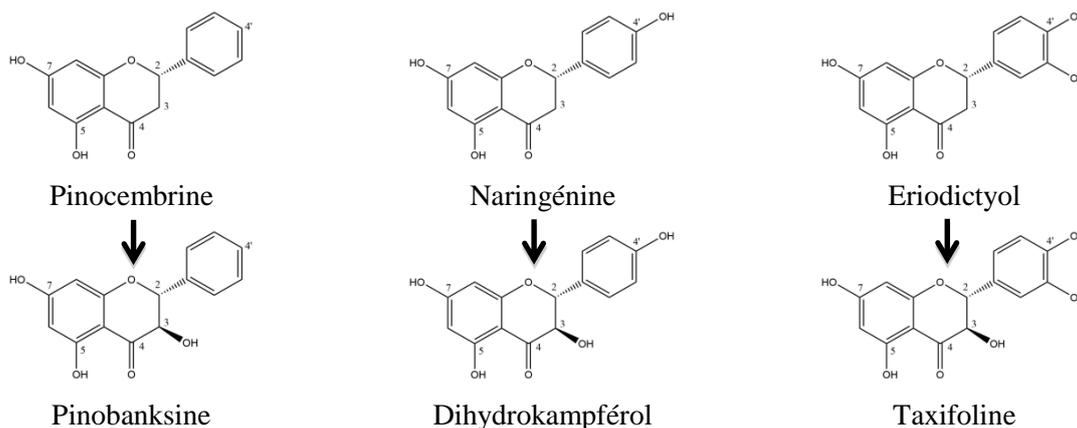


Figure 13. Exemple de flavanonols.

Les flavanonols tels que la taxifoline ou la pinobanksine présentent diverses bioactivités, telles que les activités antitumorales, antioxydantes et antivirales, et ont également des propriétés intéressantes dans les domaines cardiovasculaire et hépatique (Jaganathan & Mandal 2009; Zhang et al. 2017b).

B.4. Flavones et flavonols

B.4.1. Flavones

Les flavones sont des dérivés des flavanones où l'action de la flavone synthase (FNS) va générer une réaction de désaturation permettant la formation d'une liaison entre les carbones C-2 et C-3 du cycle C (**Figure 14**) (Hostetler et al. 2017).

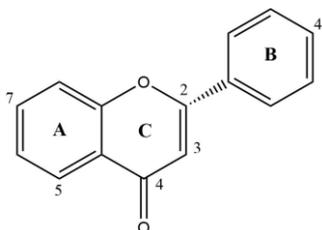


Figure 14. Structure générale des flavones.

Les flavones sont généralement présentes dans le règne végétal sous leurs formes glycosylées dans les vacuoles cellulaires. Les dérivés glycosylés de l'apigénine et de la lutéoline se trouvent majoritairement dans la camomille (*Matricaria chamomilla*, Astéracées) à hauteur de 5 g/100g MS et dans le persil (*Petroselinum crispum*, Apiacées) avec des teneurs supérieures à 1 g/100g MS (Hostetler et al. 2017). Les flavones sont également présentes dans les fruits, les légumes, les céréales ou encore des boissons. Les formes aglycones, méthylées ou non, sont également présentes dans le bois des espèces de *Prunus* (Rosacées), du bouleau et du charme-houblon (Bétulacées) (Zhang et al. 2013).

Au sein de la plante, les flavones ont montré leur capacité à fournir une protection aux végétaux contre les effets nocifs du rayonnement UV-B (280–315 nm) en s'accumulant dans les cellules épidermiques. De par leur capacité d'absorption à ces longueurs d'ondes, les flavones vont filtrer les rayons UV agissant comme un écran solaire et permettent de limiter l'impact de ces rayonnements. Les flavones offrent également une protection contre différents stress biotiques en tant que phytoalexines contre les insectes, les champignons ou les bactéries (Jiang et al. 2016).

Plusieurs études se sont également intéressées à leurs caractéristiques bénéfiques en santé humaine. Les flavones comme la lutéoline, l'apigénine, la baicaléine sont des anti-oxydants capables de piéger les ROS et possédant des activités anti-inflammatoire, antivirale et anticancéreuse. Les flavones ont également montré des propriétés potentiellement intéressantes pour la prévention de maladies cardiovasculaires, de maladies oculaires tels que la cataracte ou encore de maladies neurodégénératives (Jiang et al. 2016; Zhang et al. 2013).

B.4.2. Flavonols

Les flavonols sont également des dérivés des flavanones où l'action de la flavanone 3-hydroxylase (F3H) va générer une réaction d'hydroxylation en position C-3 du cycle C avec la formation d'une fonction OH. La flavonol synthase (FLS), à l'instar de la flavone synthase (FNS) mentionnée auparavant, va engendrer une réaction de désaturation permettant la formation d'une liaison entre les carbones C-2 et C-3 du cycle C (**Figure 15**). La différence entre les flavonols et les flavones est donc la présence de la fonction hydroxyle en C-3 du cycle C (Zhang et al. 2013).

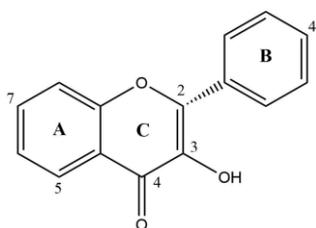


Figure 15. Structure générale des flavonols.

Les flavonols sont majoritairement présents sous leurs formes *O*-glycosides et sont largement distribués dans le règne végétal. Les principales sources alimentaires de flavonols sont les oignons, les pommes, les brocolis, le thé et le vin rouge (Huxley & Neil 2003). Parmi les flavonols les plus communément identifiés, il y a le kaempférol (monohydroxylé en position C-3'), la quercétine (dihydroxylée aux positions C-3' et C-4') et la myricétine (trihydroxylée aux positions C-3', C-4' et C-5') (Flamini et al. 2013).

A l'instar des flavones, les flavonols agissent comme des photo-protecteurs pour la plante car ils absorbent fortement aux longueurs d'onde UV-A et UV-B (Zhang et al 2013). Les flavonols jouent également un rôle important dans la copigmentation du vin en se liant avec les anthocyanes, sont des marqueurs utiles dans la taxonomie du raisin et sont considérés comme des composés bioactifs du raisin et du vin pouvant avoir une importance en nutrition et santé humaine (Flamini et al. 2013). Les radicaux libres sont notamment impliqués dans l'oxydation des LDL (lipoprotéine de basse densité) qui participe à la survenue de l'athérosclérose. Les flavonols ont ainsi montré des aptitudes dans la prévention de maladies cardiovasculaires à travers leurs capacités anti-oxydantes et le piégeage de ces radicaux libres. Des flavonols comme la quercétine (largement étudiée), pourraient être bénéfiques dans la prévention de ces maladies (Perez-Vizcaino & Duarte 2010).

D'autres flavonoïdes tels que les chalcones ou les leucoanthocyanidines, non étudiés ou très peu présents dans le matériel végétal étudié, ne seront pas décrits.

C. Les non flavonoïdes

C.1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques (ou acides phénolcarboxyliques) sont des composés formés structurellement d'un cycle phénolique et au moins une fonction acide carboxylique organique. Selon les unités carbonées de la chaîne latérale attachée au cycle phénolique, les acides phénols peuvent être divisés en composés C₆-C₁, C₆-C₂ et C₆-C₃. Les deux sous-classes les plus importantes sont les C₆-C₁ (acide hydroxybenzoïque) et C₆-C₃ (acide hydroxycinnamique) (**Figure 16**) (Goleniowski et al. 2013).



Figure 16. Structure générale des acides phénoliques.

C.1.1. Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque

Bien que le squelette de base reste le même, les acides phénols diffèrent par le nombre et la position des groupes hydroxyle ou méthoxy sur le cycle aromatique. Parmi les dérivés majoritaires de l'acide hydroxybenzoïque, il y a l'acide *para*-hydroxybenzoïque (acide 4-hydroxybenzoïque), l'acide salicylique (acide 2-hydroxybenzoïque), l'acide protocatéchique (acide 3,4-dihydroxybenzoïque), l'acide gallique (acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque), l'acide vanillique (acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque) et l'acide syringique (4-hydroxy-3,5-diméthoxybenzoïque) (**Figure 17**) (Khadem & Marles 2010).

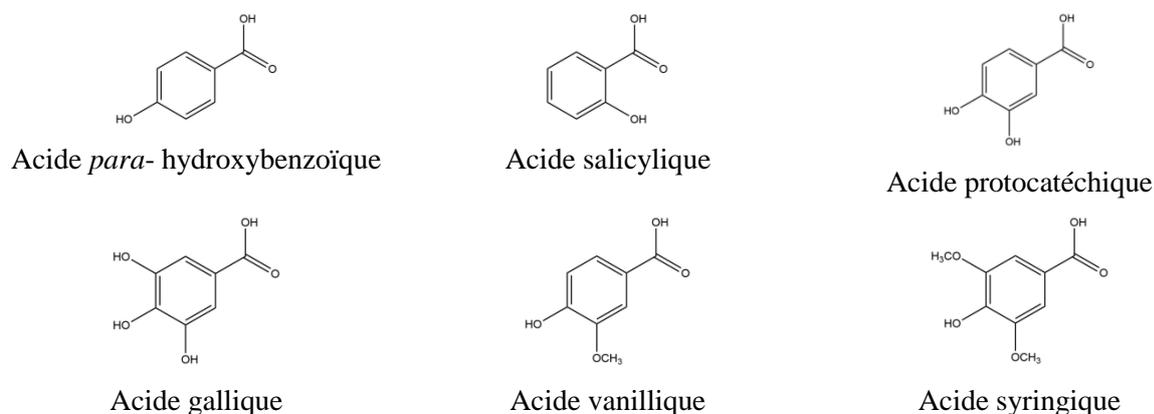


Figure 17. Exemple de dérivés de l'acide hydroxybenzoïque.

Les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque sont généralement présents dans les fruits et plus particulièrement chez les Rosacées (mûre, fraise et framboise) et les Gossulariacées (cassis, groseille) à hauteur d'une dizaine de milligrammes par kilogramme. Ils sont également distribués dans quelques herbes, épices ainsi que le thé vert et noir (Tomas-Barberan & Clifford 2000). A titre d'exemple dans les herbes et épices, l'acide protocatéchique est majoritaire dans les écorces de cannelle (*Cinnamomum verum*, Lauracées), l'acide gallique dans les clous de girofle (*Syzygium aromaticum*, Myrtacées) ou encore les acides vanillique et caféique dans la cardamome (*Elettaria cardamomum*, Zingiberacées) (Tomas-Barberan & Clifford 2000; Variyar & Bandyopadhyay 1995). Les acides phénoliques sont également présents dans les légumes comme la pomme de terre (Solanacées) avec l'acide protocatéchique et l'acide vanillique. Certaines céréales comme le blé (Poacées) contiennent l'acide vanillique, l'acide syringique, l'acide *para*-hydroxybenzoïque et l'acide salicylique (Tomas-Barberan & Clifford 2000).

C.1.2. Les dérivées de l'acide hydroxycinnamique

Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique principalement présents dans la nature sont l'acide *para*-coumarique (acide 4-hydroxycinnamique), l'acide caféique (acide 3,4-dihydroxycinnamique), l'acide férulique (acide 4-hydroxy-3-méthoxycinnamique), l'acide sinapique (acide 4-hydroxy-3,5-diméthoxycinnamique) et l'acide chlorogénique (acide 5-O-caffeoylquinique) qui est l'acide caféique estérifié par l'acide quinique (Figure 18) (El-Seedi et al. 2012).

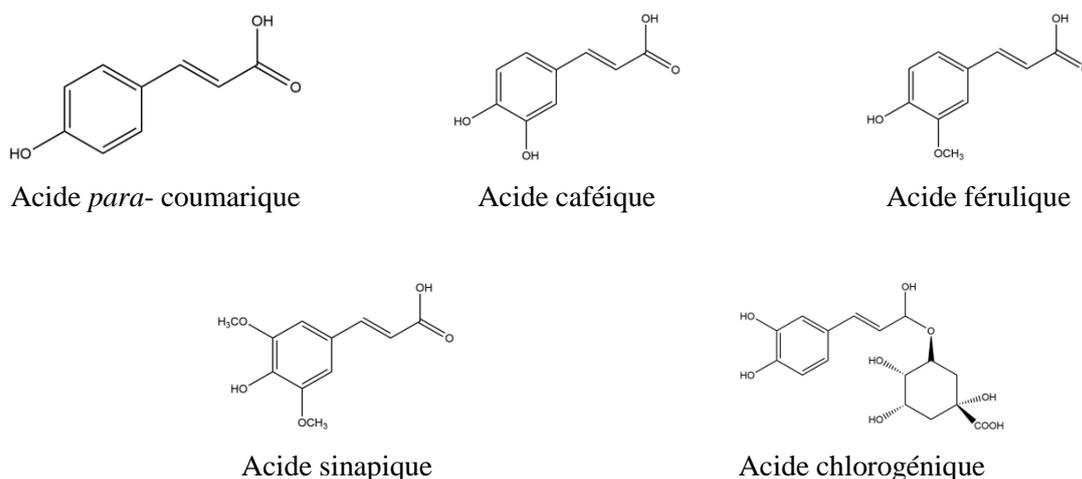


Figure 18. Exemple de dérivés de l'acide hydroxycinnamique.

Les fruits sont une source alimentaire majeure des dérivés de l'acide hydroxycinnamique comprenant les pommes, les baies diverses, les prunes, les cerises, certains agrumes et les pêches. Ces composés sont rarement sous leurs formes libres mais plutôt liés à des sucres ou estérifiés par les acides quinique, shikimique ou tartarique (D'Archivio et al. 2007). L'acide caféique et l'acide coumarique sont les composés les plus abondants (libres ou liés) dans la plupart des fruits, représentant entre 75 et 100% de la teneur totale en acide hydroxycinnamique. En dehors des fruits, les aliments comme les céréales ou les légumes (carottes, aubergines, chou, artichauts) sont également riches en dérivés de l'acide hydroxycinnamique. Dans les céréales, les acides phénoliques les plus représentés sont l'acide férulique, l'acide *p*-coumarique et l'acide sinapique. L'acide sinapique est également très présent dans les légumes de la famille des Brassicacées. Au niveau des boissons largement consommées, le café est particulièrement riche en acide chlorogénique (El-Seedi et al. 2012).

C.1.3. Fonctions des acides phénoliques

Largement présents dans les aliments, les acides phénoliques sont consommés quotidiennement ce qui a engendré de nombreuses études biologiques en santé humaine. Ces composés phénoliques ont une activité antioxydante qui pourrait permettre de prévenir des maladies liées au stress oxydant tels que les accidents cardio- et cérébro- vasculaires et/ou les cancers. Cette propriété antioxydante est notamment liée à leur aptitude à donner un atome d'hydrogène et à leur capacité à stabiliser les radicaux libres via leur système conjugué comprenant le noyau aromatique et la chaîne latérale dans le cas des acides hydroxycinnamiques (El-Seedi et al. 2012). De par ces aptitudes, les acides phénoliques tels que les acides caféique, chlorogénique ou férulique montrent leur capacité à inhiber l'oxydation des LDL qui jouent un rôle clé dans l'athérosclérose à l'origine des maladies coronariennes (Borochoy-Neori et al. 2015; Meyer et al. 1998). En outre, la teneur en acide vanillique dans différents miels est corrélée significativement avec l'activité anticancéreuse testée sur des cellules du cancer de la prostate et du cancer du sein (Spilioti et al. 2014). Les acides phénoliques ont aussi montré des activités antimicrobiennes contre des bactéries (*P. aeruginosa* et *S. aureus*) ou des champignons du genre *Candida* (Goleniowski et al. 2013; Teodoro et al. 2015).

Au sein de la plante, les acides phénoliques jouent également des rôles importants notamment lors de l'attaque de phytopathogènes. Des travaux ont montré une augmentation de leur production lors de périodes d'infection, utilisés sous leurs formes simples comme molécules de signalisation ou associés à des composés de la paroi cellulaire comme la lignine pour renforcer sa structure (Cvikrová et al. 2006; Mandal et al. 2010). Les acides phénols ont également montré des activités antifongiques contre des champignons de la vigne tels que *Botrytis cinerea* ou de la famille des Botryosphaeriaceae, responsables des maladies du bois (Lambert et al. 2012; Patzke & Schieber 2018).

C.2. Les lignanes

Les lignanes sont des polyphénols initialement formés par le couplage de deux unités d'alcool coniférylique, dérivant de la voie métabolique des acides phénoliques et qui aboutit à une liaison au niveau du carbone central C-8 (Teponno et al. 2016). La structure néoformée est le pinorésinol qui est la pierre angulaire de cette voie métabolique duquel va découler les différentes lignanes. Ces composés sont notamment divisés en huit sous-groupes distincts selon la présence ou non d'oxygène dans le squelette et les divers motifs de cyclisation. On note ainsi des noyaux furofurane, furane, dibenzylbutane, dibenzylbutyrolactone, dibenzylbutyrolactol, aryltétraline et arylnaphthalène et dibenzocyclooctadiène (**Figure 19**) (Suzuki & Umezawa 2007).

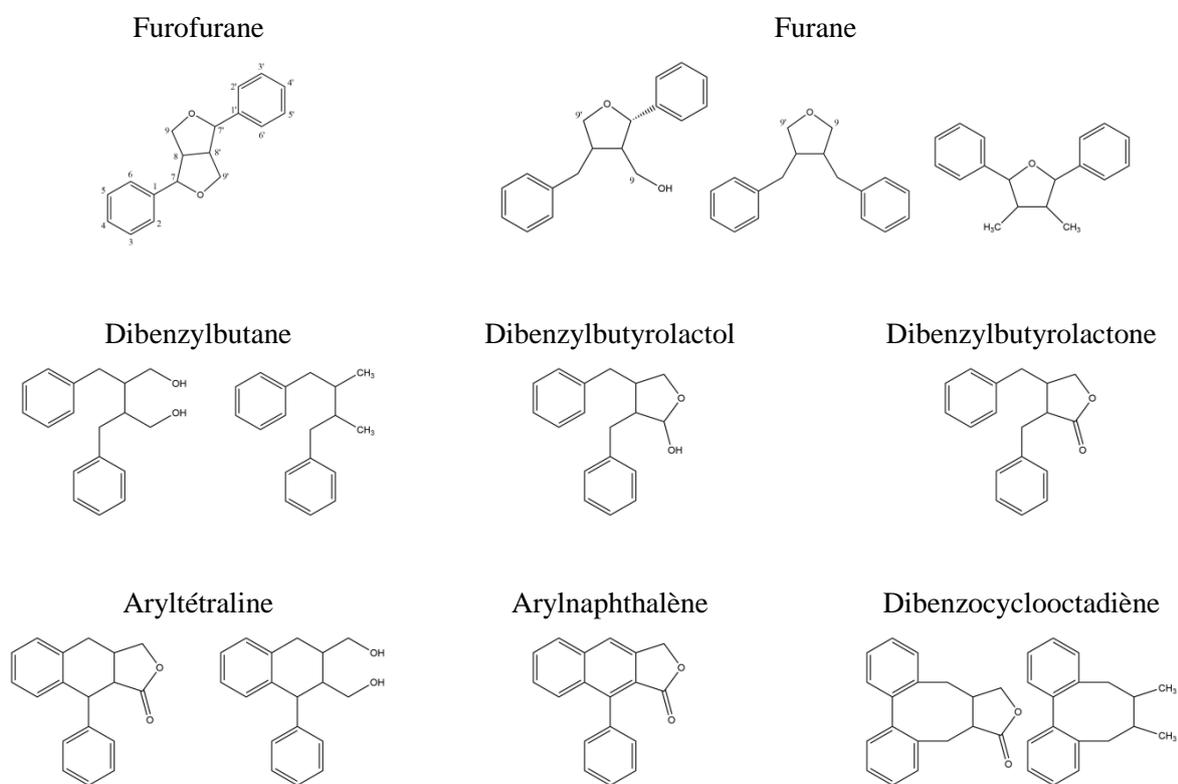


Figure 19. Structure générale des lignanes.

D'après Suzuki et al. (2007).

Parmi les lignanes communément générées, le pinorésinol donne naissance au laricirésinol puis au sécoisolaricirésinol grâce à la pinorésinol/laricirésinol réductase. Le laricirésinol a la capacité de former l'isolaricirésinol par isomérisation, le sécoisolaricirésinol peut générer le matairésinol via la sécoisolaricirésinol déhydrogénase et ce dernier génère d'autres lignanes à squelette dibenzylbutyrolactone comme la nortrachélogénine (**Figure 20**) (Suzuki & Umezawa 2007).

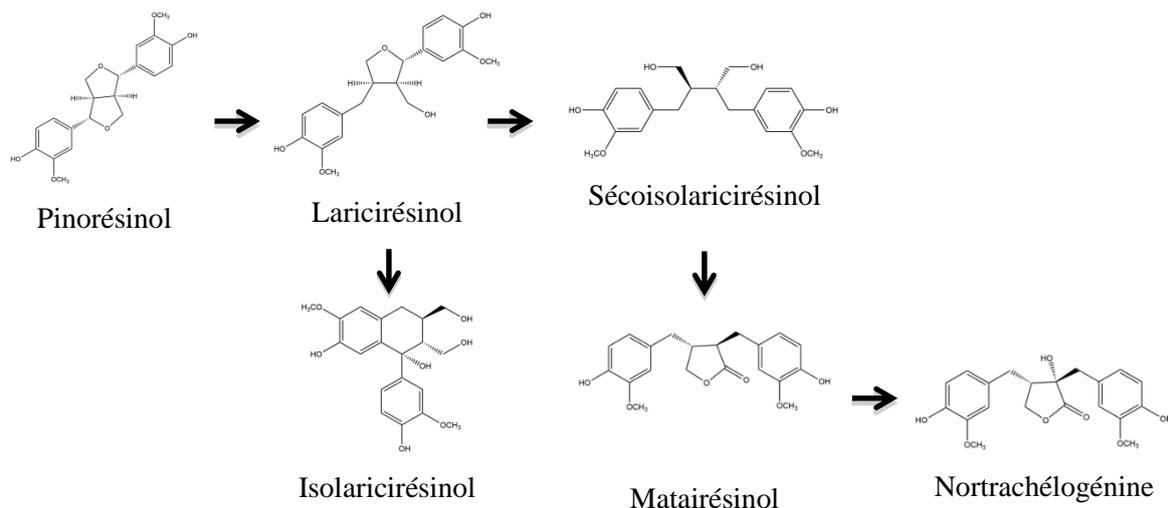


Figure 20. Exemple de quelques lignanes dérivées du pinorésinol.

Les principales sources alimentaires des lignanes sont généralement les graines comme celles du lin (*Linum usitatissimum*, Linacées) et du sésame (*Sesamum indicum*, Pédaliacées) avec plusieurs grammes par kilogramme. Les lignanes sont également présents dans les légumes comme la citrouille (Cucurbitacées) et dans les fruits tels que les airelles, les fraises, l'avocat ou la mangue (Adlercreutz 2007).

Les lignanes sont également distribués plus largement dans le règne végétal et notamment dans le bois et les nœuds de conifères de la famille des Pinacées comme l'épicéa (*Picea abies*) avec le matairésinol, le mélèze (*Larix decidua*) avec le laricirésinol ou les espèces de pin (*Pinus nigra*, *Pinus sylvestris*) contenant majoritairement de la nortrachélogénine (Holmbom et al, 2003)

L'activité biologique des lignanes, au niveau santé humaine, a largement été étudiée de par la diversité des composés et par leur présence dans l'alimentation. Les lignanes possèdent ainsi des activités antioxydantes, anticancéreuses, antimicrobiennes, anti-inflammatoires et immunosuppressives (Saleem et al. 2005). Il peut être noté que certaines activités biologiques de ces lignanes sont liées à la bioactivation de ces composés en phyto-oestrogènes sous forme d'entérolactone ou d'entérodiol. Ce terme de phyto-oestrogène provient de leur origine végétale et de leur capacité à se lier au récepteur aux oestrogènes chez l'Homme, entraînant des activités oestrogéniques ou anti-oestrogéniques. Ces composés, également nommés entérolignanes, vont être produits par le microbiote gastro-intestinal qui permet la réalisation de différentes conversions chimiques. Des études épidémiologiques et pharmacologiques ont ainsi révélé que l'entérodiol et son produit d'oxydation l'entérolactone pourraient permettre une protection contre l'ostéoporose, les maladies cardiovasculaires, l'hyperlipidémie, la ménopause et les cancers du sein, du côlon et de la prostate (Landete 2012).

Au sein de la plante, les lignanes jouent un rôle important dans la défense des plantes contre divers agents pathogènes et organismes nuisibles. Des lignanes (sécoisolaricirésinol, pinorésinol, eudesmine, laricirésinol et laricirésinol-4-méthyl éther) présents dans l'araucaria du Chili (*Araucaria araucana*, Araucariacées) ont notamment montré des activités antibactériennes contre diverses bactéries Gram positives et des propriétés antifongiques contre des champignons de pourriture blanche et de coloration du bois (Céspedes et al. 2006). De même, des lignanes issus de grains de blé comme le pinorésinol et le sécoisolaricirésinol ont montré une inhibition du développement mycélien et du niveau de trichothécène (mycotoxines) de souche de *Fusarium graminearum* (Kulik et al. 2014). Les lignanes se présentent donc comme des agents antimicrobiens et des acteurs bénéfiques pour la santé des végétaux.

C.3. Les stilbènes

Les stilbènes (1,2-diphényléthylène) sont des composés polyphénoliques formés de deux noyaux phényles reliés entre eux par un pont éthylène générant une structure en C₆-C₂-C₆. Cette double liaison permet de générer des stilbènes pouvant exister sous deux formes : la forme *trans* (*E*) et la forme *cis* (*Z*) (**Figure 21**) (Pawlus et al. 2012). Les noyaux aromatiques sont généralement substitués par différentes fonctions tels que des groupes hydroxyles, méthyles, méthoxyles, prényles ou géranyles. Les unités monomériques peuvent également se coupler conduisant à la construction de dimères, de trimères, de tétramères et allant jusqu'aux octamères (Shen et al. 2013).



Figure 21. Structure générale des stilbènes.

Plus d'un millier de stilbènes naturels ont été décrits dans la littérature. Malgré cette diversité chimique, seul un nombre limité de familles de plantes produit ces métabolites secondaires comme par exemple les Polygonacées, les Cypéracées, les Pinacées ou les Vitacées (Rivière et al. 2012). Parmi les stilbènes communément identifiés, le resvératrol est l'unité monomérique de base des stilbènes, pouvant former le picéide par glycosylation, le ptérostilbène par méthylation, ou les viniférines et vitisines par oligomérisation.

Les stilbènes ont beaucoup été étudiés sur le plan nutrition et santé. En effet, cela fait suite à la mise en évidence du paradoxe français également appelé le « French Paradox ». Cette dénomination fait référence à un nombre moins important de maladies cardio-vasculaires en France par rapport aux autres pays occidentaux, malgré des facteurs de risques importants comme la consommation de matières grasses. Des études épidémiologiques ont ainsi suggéré qu'une consommation modérée de vin pourrait, par sa richesse en polyphénols, être responsable de cette protection (Renaud & de Lorgeril 1992; Renaud & Gueguen 1998). Au cours des années 90, de nombreuses études ont été réalisées sur la composition du vin en polyphénols, ainsi que sur les activités biologiques de ces composés. Ces études ont permis la découverte du resvératrol dans le vin en 1992 puis d'autres stilbènes par la suite (Siemann & Creasy 1992). Les nombreuses études biologiques réalisées sur le resvératrol ont montré que ce composé avait des propriétés intéressantes dans le domaine du cancer (Jang 1997), des maladies cardio-vasculaires (Zordoky et al. 2015), des maladies neurodégénératives (Richard et al. 2014) ou du vieillissement de la peau (Soeur et al. 2015).

Quant à leur rôle dans la plante, les stilbènes sont associés à la résistance des végétaux aux maladies et leur synthèse est souvent une réponse à une attaque d'agents phytopathogènes. On parle alors de phytoalexines. De nombreuses études sur différentes plantes ont mis en exergue le caractère antifongique des stilbènes. D'une part, il a été démontré que face à une attaque d'un champignon (*Botrytis cinerea*), la vigne produisait *in vivo* de nombreux stilbènes comme le resvératrol ou les viniférines permettant de diminuer la croissance mycélienne et la germination des spores (Jeandet et al. 2002). D'autre part, des stilbènes complexes provenant des sarments de la vigne peuvent inhiber *in vitro* la croissance de *P. viticola* et de plusieurs champignons impliqués dans les maladies du bois chez la vigne (Lambert et al. 2012; Schnee et al. 2013). De plus en plus d'études portent également sur la résistance des conifères aux champignons. Le pin produit notamment un stilbène analogue au resvératrol, la pinosylvine, grâce à la pinosylvine synthase qui est une enzyme propre au genre *Pinus*. Ce stilbène monomérique a notamment montré des activités antifongiques permettant aux conifères de se défendre (Celimene et al. 1999; Lee et al. 2005).

Chapitre III. Les coproduits ligneux d'origine viticole et d'essences forestières

A. Les coproduits de la viticulture

A.1. Les sarments de vigne

A.1.1. Description générale de la vigne

D'un point de vue taxonomique, la vigne appartient à la famille des Vitacées qui contient en son sein 16 genres différents dont les genres *Vitis*, *Parthenocissus* ou encore *Ampelopsis*. Le genre *Vitis* est le taxon de cette famille le plus étudié et le plus intéressant pour la filière vitivinicole du fait de l'adaptation à la culture de nombreuses espèces que ce genre contient. Parmi les espèces du genre *Vitis*, la vigne européenne *Vitis vinifera* est la plus cultivée du fait de la qualité de ses fruits (Pawlus et al. 2013). Cette dernière est, de nos jours, cultivée dans le monde entier. En outre, deux autres zones géographiques sont pourvoyeurs d'espèces avec les *Vitis* américains tels que *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri* ou encore *V. labrusca* connu pour sa production de jus ainsi que des *Vitis* asiatiques comme *V. amurensis*, *V. coignetiae* ou *V. thunbergii* utilisés en médecine traditionnelle (Rivière et al. 2012).

Si *V. vinifera* est largement utilisé pour la qualité de ses baies, il en reste néanmoins sensible à certaines maladies. En effet, le phylloxéra, (*Daktulosphaira vitifoliae*, un puceron du sol), a été l'une des maladies les plus dévastatrices des vignobles français, causant près de 70% de perte à la fin du 19^{ème} siècle (Ollat et al. 2017). Depuis, les parties aériennes de l'espèce européenne *V. vinifera* sont greffées sur des parties souterraines appelées porte-greffes issus de *Vitis* américains sauvages qui sont résistants à cette maladie (Ollat et al. 2016). Ainsi, la vigne cultivée est de nos jours issue d'un greffage de différentes variétés de *V. vinifera* (Merlot, Cabernet-Sauvignon, Gamay..) sur différents porte-greffes (Fercal, Riparia, 3390 Couderc..) permettant d'allier qualité des baies et résistance à ce pathogène.

Au niveau de son anatomie et de sa physiologie, la vigne est une liane pérenne, en général ligneuse et sarmenteuse. Les sarments sont des rameaux de vigne venant s'insérer sur le tronc et qui poussent chaque année (**Figure 22**). Au cours du printemps, les jeunes pousses vertes sont nommées rameaux puis, en fin d'été, suite au phénomène d'aoûtement se traduisant par la formation de suber (ou liège) dans la partie la plus externe du liber secondaire, il convient de désigner ces rameaux par le terme de

sarments (ou rameaux aoûtés). Leur fonction principale est d'amener la sève aux différents organes de la vigne afin de favoriser leur développement (Fournioux & Adrian 2011). Parmi ces organes, il y a les feuilles de vigne qui sont alternes, pétiolées, palmatilobées, en forme de cœur à la base, dentées sur les bordures et souvent velues en dessous (www.tela-botanica.fr: *Vitis vinifera*). Au niveau des inflorescences, les fleurs de vigne vont être groupées en glomérules et sont généralement hermaphrodites, possédant à la fois les organes mâles et femelles. Lorsque les anthères (mâles) s'ouvrent, les grains de pollen se dispersent et pénètrent dans le pistil (femelle) où ils germent. Ils traversent ensuite le stigmate, le style et finissent au niveau de l'ovule où ils vont permettre la fécondation des ovules générant ainsi une autopolinisation (Fournioux & Adrian 2011). Il en résulte la formation du fruit appelé baie ou grain de raisin possédant entre 1 et 4 pépins.

Sarment



Figure 22. Sarments (ou rameaux aoûtés) avant et après la taille de vignes.

Afin d'avoir une récolte et une maturation correcte des baies, il est nécessaire de régulariser le nombre et le volume des grappes. En effet, une trop grande abondance de baies entraînerait des besoins nutritifs trop importants engendrant ainsi des déficits de croissance. De plus, limiter le nombre de bourgeons permet également d'assurer une vigueur plus importante à la vigne face aux différents stress biotiques et abiotiques et donc de garantir la pérennité de la vigne. En ce sens, une taille des sarments est effectuée chaque année afin de limiter le nombre de rameaux et donc de grappes (Billet et al. 2018). Ainsi, cela va entraîner annuellement une quantité importante de sarments.

A.1.2. Chiffres (surface, production)

Aujourd'hui, la vigne est une des plantes fruitières les plus cultivées au monde avec une surface viticole mondiale qui a atteint 7,6 millions d'hectares (ha) en 2016 (OIV, 2018). L'Europe représente un peu moins de la moitié de cette surface avec 3,3 millions d'ha. Concernant les pays producteurs, les

vignobles espagnols, français et italiens correspondent, à eux trois, à 75% de cette superficie européenne avec respectivement 975, 785 et 690 milliers d'ha en 2016.

En fonction de la densité de plantation, du climat et de la vigueur du cépage, la taille des vignes peut engendrer un volume de sarments estimé entre 2 et 5 tonnes par hectare et par an (Guerrero et al. 2016). En France, selon le bassin viticole (Bourgogne, Aquitaine, Champagne, Charentes), le ratio de production de cette biomasse est en moyenne de 2 tonnes par hectare et par an (ATLAS, 2017).

Ainsi, avec une superficie totale comprise entre 700 000 et 800 000 ha, la France génère environ entre 1,4 et 1,6 million de tonnes de sarments par an (FranceAgriMer 2016). De par cette biomasse abondante et renouvelable chaque année, de nombreuses études se sont intéressées à sa composition phytochimique.

A.1.3. Composition phytochimique des sarments

La multitude d'espèces du genre *Vitis* (*V. vinifera*, *V. riparia*, *V. amurensis*, etc.) et de cultivars de l'espèce *V. vinifera* (Merlot, Cabernet-Sauvignon, etc.) ainsi que l'abondance de ces coproduits ont entraîné de nombreuses recherches sur l'identification et la quantification des composés présents.

Les différents travaux ont mis en évidence que les composés majoritaires des sarments de vigne étaient les stilbènes. Un screening de 6 stilbènes dans 16 cultivars de l'espèce cultivée *V. vinifera* a montré des teneurs en stilbènes totaux comprises entre 2,8 et 8,5 g/kg de sarment avec une moyenne à 4,7 g/kg de sarment (Lambert et al. 2013). Une étude similaire portant sur 22 variétés de vigne issues de l'espèce *V. vinifera* a montré des concentrations similaires en stilbènes entre 2 et 6 g/kg de sarment (Guerrero et al. 2016). Une expérimentation portant sur des espèces du genre *Vitis* d'origines américaine et asiatique avec une quantification de 9 stilbènes a mis en exergue des concentrations en stilbènes pouvant atteindre 19,5 g/kg de sarment (Pawlus et al. 2013).

Parmi les stilbènes majoritaires dans les sarments, les différents travaux mettent en lumière la forte présence du dimère ϵ -viniférine avec des teneurs moyennes dans *V. vinifera* à 2,1 g/kg de sarment et dans les *Vitis* sauvages à 3,2 g/kg de sarment avec un maximum à 5,7 g/kg de sarment chez *V. riparia* (Lambert et al. 2013; Pawlus et al. 2013). Le monomère resvératrol fait également partie des stilbènes majoritaires avec des teneurs maximales pouvant atteindre 6 g/kg de sarment (Tříska et al. 2017; Vergara et al. 2012). D'autres stilbènes ont également montré des concentrations significatives dans les sarments tels les tétramères vitisine B et hopéaphénol et le monomère picéatannol (**Figure 23**).

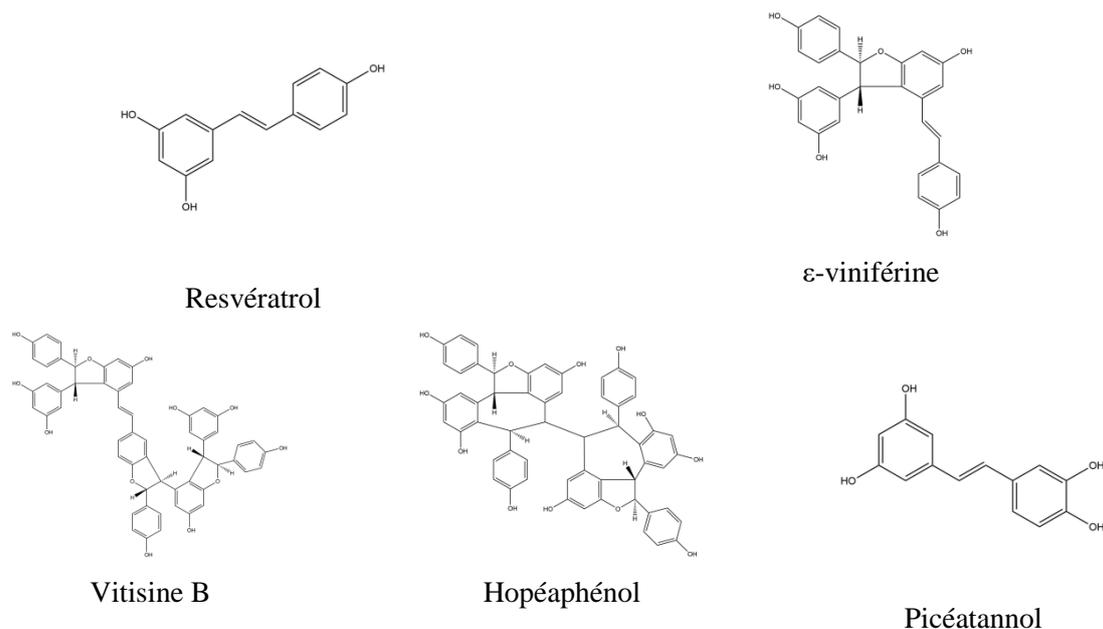


Figure 23. Stilbènes majoritaires dans les sarments de vigne.

Outre les stilbènes, d'autres composés polyphénoliques ont été mis en évidence, et plus particulièrement des flavonoïdes. Ainsi, des flavanols monomériques ont été identifiés comme la catéchine et l'épicatéchine à des teneurs comprises entre 0,5 et 0,8 g/kg de sarment et 0,2 et 0,4 g/kg de sarment, respectivement (Rodríguez-Cabo et al. 2018). Des formes oligomérisées ont été mis en évidence avec la procyanidine B1 (dimère épicatechine-catéchine), la procyanidine B2 (dimère de catéchines) ou encore la procyanidine C1 (trimère d'épicatechines) (Sáez et al. 2018). Une étude récente a isolé 81 composés à partir de sarment de vigne et a proposé l'identification d'autres formes polymérisées ($n > 6$) de procyanidines et prodelfinidines (Montero et al. 2018).

De plus, des acides phénoliques ont également été caractérisés dans les sarments de vigne avec la présence d'acide gallique (0,10-0,15 g/kg de sarment) et d'acide caféique (0,01-0,02 g/kg de sarment) (Farhadi et al. 2016).

A.1.4. Applications

Depuis la nuit des temps, la vigne est cultivée pour ses baies qui sont utilisées principalement pour l'élaboration de vin à l'aide d'un procédé de fermentation. Outre le vin, les baies sont utilisées en tant que raisins de table, c'est-à-dire pour une consommation directe, pour la fabrication de jus, ou encore comme fruits secs (Creasy & Creasy 2009).

Comme décrit précédemment, les sarments de vigne sont des coproduits issus de cette filière viticole et constituent une biomasse importante à valoriser compte tenu de sa richesse en composés phénoliques. Un extrait de sarment de vigne a ainsi été développé et est actuellement commercialisé sous le nom de Vinéatrol® par la société Actichem (Montauban, France). Sujet de nombreuses études, cet extrait a montré des activités antioxydantes, anticancéreuses ou encore cardioprotectrices grâce notamment à sa richesse en resvératrol et ϵ -viniférine (Marel et al. 2008; Müller et al. 2009; Romain et al. 2012). En Europe, la commercialisation d'un extrait de sarment en tant que tel ne peut être envisagée en nutraceutique du fait de l'absence de cette partie de la vigne dans la liste des plantes autorisées (www.legifrance.gouv.fr). Cependant, les législations étant variables d'un continent à un autre, des compléments alimentaires à bases d'extrait de sarment peuvent être commercialisés, comme par exemple au Japon. D'autres extraits de sarments sont commercialisés par la même société pour des applications dans le domaine de la cosmétique.

En outre, le Vinéatrol® a été étudié en œnologie comme alternative au SO₂. Les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des stilbènes permettent d'envisager cet extrait de sarment de vigne comme agent conservateur du vin. Utilisé à faible dose, cet extrait est capable de conserver la composition du vin sans perte de qualité, ouvrant le champ à de nouvelles voies de valorisation (Raposo et al. 2018).

Enfin, le Vineatrol® a fait l'objet d'étude en santé végétale et plus précisément comme agent oomycide. Cette étude, mentionnée auparavant (Vol.I, ChapI., C.4., Les oomycides végétaux), a mis en évidence la capacité de l'extrait de sarment de vigne à réduire la fréquence d'attaque et diminuer l'infection foliaire causée par *P. viticola* en serre et en vignoble (Richard et al. 2016). Les stilbènes présents dans les sarments tels que le resvératrol, l' ϵ -viniférine, la vitisine B et l'hopéaphénol ont également montré des activités toxiques contre cet oomycète (Schnee et al. 2013).

Actuellement, les sarments de vigne sont beaucoup étudiés et plusieurs voies de valorisation sont possibles. Les autres parties ligneuses de la vigne, pérennes, peuvent également générer des coproduits qui sont peu étudiés et qui pourraient constituer de nouvelles sources de valorisation.

A.2. Les ceps et racines de vigne

A.2.1. Description générale des ceps et racines

Hormis les sarments, les parties végétatives ligneuses de la plante comptent en leur sein le cep de vigne, également appelé tronc, et le système racinaire. Ensemble, ces deux parties représentent entre 50 et 75% de la biomasse de la vigne (Keller 2015).

Le tronc est une structure rigide et forte avec pour fonction le maintien des structures supérieures. Pour cela, le cep est souvent prolongé horizontalement pour former un ou plusieurs bras (ou cordons) permanents qui soutiennent le bois âgé d'un an, autrement dit les sarments. De plus, le cep de vigne va également aider la croissance de la vigne avec un rôle de transport de l'eau et des nutriments à travers ses vaisseaux conducteurs. Le cep sert aussi d'organe de stockage pour les glucides et autres nutriments, qui favorisent la croissance précoce au printemps ou pendant les périodes de stress (Keller 2015).

Le tronc est également marqué par l'opération de greffage entre les parties aériennes (ou greffon), dans la majorité des cas issues de l'espèce *V. vinifera*, et les parties souterraines provenant d'un porte-greffe d'espèces américaines. De ce fait, un bourrelet de greffe se forme au niveau de l'assemblage de ces deux interfaces et peut être visible selon les porte-greffes utilisés (Fournioux & Adrian 2011).

Les plants de vigne cultivés ont la particularité d'être toujours produits par bouturage. En ce sens, un jeune plant est constitué d'un greffon et d'un fragment de sarment de porte-greffe, dont la culture en pépinière va permettre à des racines de prendre naissance latéralement à partir de la tige. On parle également de racines adventives. Pour cette raison, le système racinaire de la vigne est de type fasciculé où les « n » racines adventives vont devenir les « n » racines principales, en divergeant dans le sol dans différentes directions en formant un faisceau (Fournioux & Adrian 2011). A partir de ces racines principales vont également émerger des racines secondaires, également nommées radicales.

Les fonctions du système racinaire, qui est l'interface entre la vigne et le sol, sont de fournir un soutien physique à la vigne dans le sol et d'être responsable de l'absorption de l'eau et de nutriments (Creasy & Creasy 2009). Les racines servent également de stockage pour les glucides et autres nutriments, qui favorisent la croissance initiale des jeunes plants et des racines. En outre, elles sont une source d'hormones végétales (cytokinines et acide abscissique) qui modifient la physiologie des pousses (Keller 2015).

A.2.2. Chiffres (surface, production)

Actuellement, le cycle moyen de la vigne est compris entre 30 et 40 ans, entraînant par la suite un renouvellement des parcelles. A cela s'ajoute l'arrachage de vigne qui peut intervenir pour des questions de réduction de surface cultivée ou pour toutes autres raisons. En ce sens, un gisement de ceps et racines de vigne est produit chaque année dans les vignobles. Ainsi, en fonction des régions viticoles, une production de ceps et racines de vigne entre 8 et 14 tonnes par ha est engendrée (ADEME 2009). Annuellement, on peut donc estimer un volume de ceps et racines entre 0,2 et 0,4 tonnes par ha et par an.

Comme mentionné auparavant, la superficie totale des vignes cultivées en France est comprise entre 700 000 à 800 000 ha (OIV, 2018). Ainsi, les vignobles français vont produire entre 0,15 et 0,4 million de tonnes de ceps et racines de vigne chaque année.

Une étude portant sur l'année 2006 a ainsi rapporté une production de coproduits viticoles sur cette année-là de 1,8 million de tonnes, dont 79% concernait les sarments soit près de 1,4 million de tonnes et 21% de ceps et racines soit 0,4 million de tonnes (FranceAgriMer 2016). Ces chiffres concordent avec les estimations précédentes et confirment le volume important de biomasse issue de la filière viticole.

A.2.3. Composition phytochimique des ceps et racines

A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressés aux composés présents dans la partie tronc de la vigne. La plupart des données sur la composition phytochimique des ceps de vigne provient de travaux portant sur l'impact des maladies du bois tels que l'esca. Ainsi, une étude sur *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affecté par l'esca en vignoble a montré que le bois asymptotique était riche en stilbènes (Amalfitano et al. 2011). La présence de monomère (resvératrol), dimères (ϵ -viniférine, pallidol, ampelopsine A et B, léachianol F et G), trimères (α -viniférine) et tétramères (hopéaphénol, isohopéaphénol, ampélopsine H) ont été mis en évidence avec une teneur totale en stilbènes de 12 g/kg de bois. Les stilbènes majoritaires étaient des oligomères avec l' α -viniférine, l' ϵ -viniférine et l'isohopéaphénol. Une étude portant sur l'impact des champignons de la famille des Botryosphaeriaceae sur des vignes âgées de 2 mois montre également la présence de stilbènes dans la partie tronc du contrôle (Lambert et al. 2013). Une présence accrue d'hopéaphénol (1,1 g/kg) suivi de l'isohopéaphénol (0,9 g/kg) et d' ϵ -viniférine (0,6 g/kg) a été montrée, confirmant la présence de stilbènes complexes.

A l'instar des sarments, la partie cep de vigne contient également des flavonoïdes avec des flavanols monomériques (catéchine et épicatechine) ainsi que leurs formes oligomérisées avec des procyanidines dont les teneurs rapportées sont faibles à hauteur de 5,5 mg/kg de bois (Rusjan et al. 2017). De plus, l'acide gallique faisant partie des acides phénoliques est également identifié.

Concernant les racines de vigne, plusieurs études ont recensé les composés présents mettant en évidence une forte diversité avec plus d'une trentaine de stilbènes identifiés (Kim et al. 2014; Wei et al. 2016). Esatbeyoglu et al. 2016 rapporte la présence significative d' ϵ -viniférine et de vitisine A, puis dans une moindre mesure de resvératrol, ampélopsine A, miyabénol C, vitisine B et picéatannol alors que Korhammer et al. 1995 fait état d'« une large quantité » de vitisine B dans les racines de vigne.

Les parties souterraines semblent donc être riches en stilbènes complexes. Le fait que la majorité des stilbènes tétramériques aient été découverts dans les racines de vigne semble être une preuve concordante à ces propos (Fujii et al. 2005; Huang et al. 2005; Reniero et al. 1996).

A.2.4. Applications

A l'heure actuelle, très peu d'études ont mis en évidence des activités biologiques ou des applications pour un extrait de cep de vigne. Un travail sur l'activité neuro-protectrice d'extraits de vigne dont un extrait de tronc a mis en évidence une activité antioxydante de l'extrait et son rôle potentiel dans la prévention de la neuro-dégénération (Wang et al. 2010). De par leur richesse en stilbènes complexes, différents domaines d'exploitation peuvent s'ouvrir aux extraits de ceps de vigne.

Concernant les racines de vignes, quelques études font état d'activités biologiques avec des propriétés antioxydante, anti-inflammatoire, de neuro-protection ou encore d'anti-obésité permettant d'envisager le développement d'extraits de racines de vigne dans des programmes nutraceutiques (Esatbeyoglu et al. 2016; Lin et al. 2015; Wang et al. 2010).

En outre, un extrait de racine de vigne est actuellement commercialisé sous le nom de Vitisin® pour être inclus dans une préparation de crème cosmétique. Produit par la société Actichem, les vertus de cet extrait seraient un éclaircissement de la peau et une réduction de zones hyper-pigmentées (www.actichem.fr).

Les ceps et racines de vigne sont des coproduits riches en stilbènes complexes, mais peu d'études de ces extraits ont été réalisées dans le domaine de la santé végétale. Des recherches approfondies permettraient d'exploiter cette biomasse sous forme d'extrait bioactif contre différents pathogènes.

B. Les coproduits de la filière forêt et bois

B.1. Les écorces d'épicéa

B.1.1. Description générale de l'épicéa

L'épicéa (*Picea abies*), également appelé épicéa commun ou épinette de Norvège, est une espèce d'arbres résineux de la famille des Pinacées et du genre *Picea*. Concernant sa répartition géographique, ce conifère est majoritairement présent en Europe dans les Alpes (France, Italie, Suisse), en Scandinavie, dans les Balkans et dans le nord de la Russie (Salem et al. 2016). Au niveau de son habitat, l'épicéa est très résistant au froid et peut s'adapter à différents sols : humide, organique ou minéral (Latva-Mäenpää et al. 2014).

D'un point de vue botanique, l'épicéa est un arbre à feuillage persistant qui peut atteindre jusqu'à 60 mètres de hauteur avec un tronc droit, une cyme pyramidale et des branches (ou rameaux) horizontales présents dès la base du tronc. Souvent confondu avec le sapin, de nombreux points structuraux les différencient tels que la présence d'une seule pointe à l'extrémité des aiguilles, contre deux pour les sapins, ou encore des cônes (ou fruits) pendants chez l'épicéa et montants chez le sapin (www.tela-botanica.org: *Picea abies*). Concernant sa reproduction, il s'agit d'une espèce monoïque, portant à la fois des cônes mâles et femelles sur le même arbre. Cependant, la plupart des semences sont issues d'allofécondation c'est-à-dire entre arbres voisins voire éloignés du fait d'une dissémination du pollen par le vent (anémogamie). L'autofécondation représente moins de 1% permettant ainsi une diversité génétique et donc une meilleure adaptation à son habitat au cours du temps (Skrøppa 2003).

En se focalisant sur les écorces, celles-ci sont de couleur rougeâtre de par leurs richesses en résine. En ce sens, l'épicéa se distingue facilement du sapin de par la couleur de son tronc, ce qui lui vaut le surnom de « sapin rouge ». Lorsqu'elles sont jeunes, les écorces ont la forme d'écailles fines et deviennent ensuite plus grosses et irrégulières avec l'âge (www.tela-botanica.org: *Picea abies*). Dans les industries de la filière forêt-bois, les écorces sont éliminées du processus de par leur richesse en composés ligneux. Ces écorces sont ré-utilisées dans les usines en tant que combustibles générant une source d'énergie par la chaleur (Bianchi et al. 2014). Cependant, selon une étude récente, la production de bioénergie à partir de résidus de récolte forestière provoque des émissions comparables aux émissions des combustibles fossiles (Repo et al. 2011). En ce sens, trouver de nouvelles voies de valorisation aux écorces d'épicéa est un enjeu majeur pour les industries sylvicoles.

B.1.2. Chiffres (surface, production)

Actuellement, les forêts françaises sont divisées en deux types d'arbres ; les arbres feuillus constitués par le chêne, le hêtre, le châtaigner et autres feuillus et d'autre part, les arbres résineux comprenant l'épicéa, le sapin, le pin maritime, le pin sylvestre, le douglas et autres résineux. Les arbres feuillus représentent 72% de la surface des forêts soit 11,1 millions d'hectares contre 4,5 millions d'hectares pour les arbres résineux (28%) (FCBA 2016). Cependant, ce sont les bois de conifères qui sont les plus récoltés avec 75% de la production annuelle. En termes de volume, cela représente 15,9 millions de m³ de bois pour les arbres résineux contre 5,1 millions de m³ de bois pour les arbres feuillus (ADEME 2015).

Concernant l'épicéa, il s'agit d'un des conifères les plus présents dans les forêts françaises avec une surface de 613000 hectares correspondant à un volume 188 millions de m³ de bois. Souvent non dissocié du sapin, avec lequel il est confondu, ces deux conifères ont des surfaces similaires et

représente à eux deux 25% des arbres résineux (FCBA 2016). Au niveau de la production annuelle, l'épicéa et le sapin ont généré un volume d'environ 6,5 millions de m³ de bois en 2013, ce qui représente 30% de la production totale de bois en France. La moitié de cette production correspond à l'épicéa. Ainsi, en termes de masse, 1m³ correspondant à 500 kg chez l'épicéa, il peut donc être estimé une production de bois d'épicéa à environ 1,6 million de tonnes en 2013 (ADEME 2015).

Aujourd'hui, les écorces d'arbres représentent des volumes considérables dans les industries de la filière forêt-bois. En effet, une usine papetière qui utilise 1000 de tonnes de bois résineux va générer habituellement entre 40 à 50 tonnes d'écorces soit une part de 5% du bois utilisé (ADEME 2015). Au niveau de l'épicéa, le taux massique d'écorce représente un pourcentage légèrement supérieur avec 7% du bois (FCBA 2016). Il peut donc être estimé qu'à partir d'une production annuelle de 1,6 million de tonnes de bois d'épicéa, il y a un engendrement de 112000 tonnes d'écorce d'épicéa par an en France.

Ces coproduits sylvicoles représente donc une biomasse importante. Si les écorces d'épicéa sont généralement brûlées ou laissées au sol, sans exploitation économique, la présence voire l'abondance de composés bioactifs pourrait faire de ces coproduits une source de valorisation intéressante.

B.1.3. Composition phytochimique des écorces d'épicéa

De par son volume conséquent et son intérêt de valorisation grandissant, l'écorce d'épicéa est aujourd'hui un matériau très étudié d'un point de vue phytochimique avec de nombreux travaux de recherche concernant la méthode d'extraction et la composition chimique qui en résulte.

L'extrait d'écorce d'épicéa contient de nombreux composés non polaires qui correspondent à des diterpènes et plus particulièrement des abiétanes, une catégorie de composés bioactifs que l'on trouve principalement dans les résines d'arbres résineux (**Figure 24**). Ces molécules sont généralement extraites à l'aide de solvants apolaires tels que l'hexane. L'acide déhydroabiétique est la principale composante de la teneur en diterpènes (Angelis et al. 2016). Les écorces d'épicéa et sa résine contiennent également les acides abiétique, néoabiétique, primaire, isoprimary, lévopimarique, sandrakipimarique et palustrique. En plus des diterpènes, on retrouve dans les écorces des monoterpènes comme l' α -pinène ou des sesquiterpènes comme l' α -cadinol ou le β -caryophyllène (Kreps et al. 2017). Outre la famille des molécules terpéniques, les écorces contiennent également des stéroïdes comme le β -sitostérol et le campesterol.

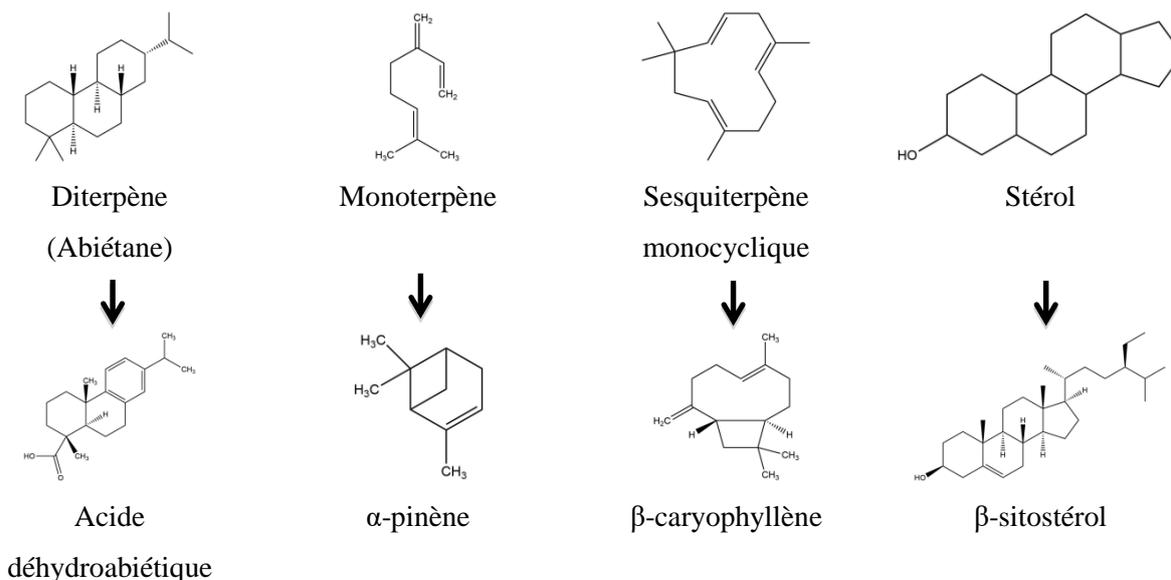


Figure 24. Exemple de composés non-polaires présents dans les écorces d'épicéa.

D'autre part, plusieurs composés phénoliques, notamment les stilbènes, les flavonoïdes, les tanins et les lignanes ont été référencés dans des extraits polaires d'écorce d'épicéa (**Figure 25**). Ces composés phénoliques sont généralement obtenus à l'aide de solvants tels que l'acétone, l'éthanol, ou le méthanol. Les stilbènes font partie des polyphénols majoritaires des écorces d'épicéa avec notamment les formes monomériques glucosylées telles que l'astringine, l'isorhapontine et le picéide. Les formes aglycones respectives avec le picéatannol, l'isorhapontigénine et le resvératrol sont également présentes en faible quantité (Mulat et al. 2014). De plus, des formes dimériques caractéristiques de l'épicéa ont été mises en lumière sous le nom de picéasides (Li et al. 2008).

Des flavonoïdes ont également été identifiés dans les écorces de *P. abies* comme les flavanonols taxifoline et taxifoline-3'-O-glucoside ainsi que la catéchine, un flavanol (Angelis et al. 2016). Un extrait aqueux obtenu à partir d'écorce de *P. abies* contient également des tanins condensés, issus de la polymérisation de deux à treize unités de flavanols. (Bianchi et al. 2014). Enfin, dix lignanes ont également été reportés dans un extrait éthanolique d'écorces d'épicéa avec pour composé majoritaire le pinorésinol (Pan & Lundgren 1995).

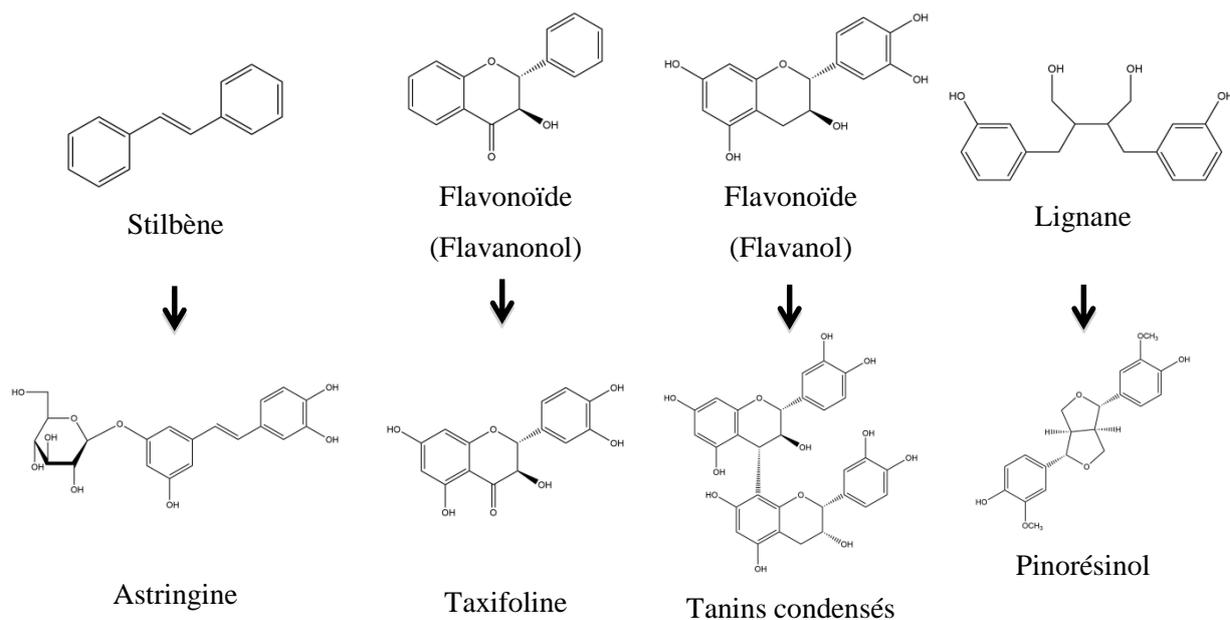


Figure 25. Exemple de composés polaires (phénoliques) présents dans les écorces d'épicéa.

B.1.4. Applications

L'épicéa est utilisé dans différents domaines industriels de par la qualité de son bois. Celui-ci est blanc, tendre, un peu plus léger que celui du sapin et contient un peu moins de résine que ce dernier. Pour ces raisons, le bois d'épicéa est plus apprécié que celui du sapin. Ainsi, l'épicéa est un bois polyvalent qui est utilisé dans les domaines de la menuiserie pour la confection de meubles ou autres constructions de taille réduite ainsi que dans les charpentes qui constituent des ouvrages plus importants. En outre, de par sa blancheur et la longueur de ses fibres, le bois d'épicéa est utilisé pour la fabrication de la pâte à papier (Latva-Mäenpää et al. 2013). De manière plus surprenante, certains épicéas du Jura avec une exceptionnelle lenteur et régularité de croissance procurent une qualité dite de résonance. Ces bois sont utilisés en lutherie pour la fabrication des violons, violoncelles, contrebasses, caisses et touches de pianos (www.tela-botanica.org: *Picea abies*). Par ailleurs, l'épicéa est également utilisé en tant qu'arbre ornemental et plus particulièrement comme arbre de Noël (Shafizadeh & Kavanagh 2005).

Comme mentionné précédemment, les écorces d'épicéa sont des coproduits et constituent une biomasse importante à valoriser compte tenu de sa richesse en composés phénoliques. Ainsi, différentes études se sont intéressées à ce gisement dans divers domaines d'applications.

Un extrait d'écorces d'épicéa a ainsi montré le meilleur potentiel antioxydant *in vitro* par rapport à d'autres écorces d'arbre comme *Pinus banksiana* (*pin gris*), *Populus tremula* (le tremble) ou *Thuja occidentalis* (thuya occidentale) (Pietarinen et al. 2006).

D'autres études ont également mis en évidence cette capacité antioxydante d'extraits d'écorces d'épicéa à travers le piégeage de radicaux 2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Co et al. 2012). Ainsi, les extraits d'écorces d'épicéa pourraient être valorisées comme source de substances actives dans l'industrie nutraceutique (Jyske et al. 2014).

Les écorces d'épicéa ont également été étudiées pour une utilisation dans le domaine dermo-cosmétique. Un screening de 30 extraits provenant de 10 écorces de conifères a mis en exergue qu'un extrait méthanolique d'écorces d'épicéa possédait des activités antioxydante, anti-élastase et anti-collagénase. Pour ces raisons, cet extrait pourrait être bénéfique en limitant le vieillissement de la peau (Hubert, 2016). De plus, l'extrait d'écorces d'épicéa montre des activités antibactériennes contre *Staphylococcus aureus* qui est l'agent pathogène responsable d'infections cutanées, le plus répandu dans les pays occidentaux (Angelis, 2016). Ainsi, les extraits d'écorce d'épicéa pourraient être valorisés en étant intégrés dans des produits dermo-cosmétiques.

Les écorces d'épicéa ont également été étudiées vis-à-vis des pathogènes fongiques qui attaquent l'épicéa. En effet, les écorces sont la première barrière physique qui sépare les ravageurs des ressources présentes dans le bois. De nombreuses études ont ainsi montré la capacité des écorces à produire des composés aux propriétés antimicrobiennes et plus particulièrement les stilbènes (Hammerbacher et al. 2013). L'astringine, l'isorhapontine et l'isorhapontigénine ont été testés *in vitro* contre des champignons infectant les conifères. L'aglycone isorhapontigénine a montré la meilleure activité (Woodward & Pearce 1988). Ainsi, les écorces d'épicéa pourraient être valorisées dans le domaine de la santé végétale, sous forme d'extraits ou comme source de composés bioactifs.

B.2. Les nœuds de pin

B.2.1. Description générale

Le pin maritime (*Pinus pinaster* ou *Pinus maritima*), également appelé pin des Landes, appartient à la famille des Pinacées qui contient plus de 100 espèces. Au niveau taxonomique, Kramer et Green ont placé en 1990 le genre *Pinus* dans la famille des Pinacées, sous la classe Pinatae, et dans la subdivision Coniferophytina des Gymnospermes (Maimoona et al. 2011). Si certaines de ces espèces sont cultivées dans le monde entier, le pin maritime est exclusivement planté en Europe et plus particulièrement sur la façade atlantique ainsi que sur le pourtour méditerranéen (Conde et al. 2014). En effet, le pin maritime préfère un bioclimat humide, où les hivers sont plutôt tempérés et chauds. S'il peut résister entre 2 et 4 mois de sécheresse, cette espèce est peu résistante aux froids rigoureux (Rameau et al. 1989).

D'un point de vue botanique, *P. pinaster* est un pin de taille moyenne pouvant atteindre des hauteurs entre 20 et 30 mètres, et qui peut vivre jusqu'à 500 ans. Le tronc est flexueux et se caractérise par une absence de branches à sa base (www.tela-botanica.org: *Pinus pinaster*). Le pin maritime arbore une écorce à écusson pyramidal d'une couleur brun-rouge luisant lorsque l'arbre est jeune puis s'assombrit vers une couleur plus mate avec l'âge. Le feuillage est constitué d'aiguilles longues, épaisses, rigides, disposées par paire et de couleur verte foncée. Ses fruits, également nommés cônes, sont ovales, de couleur brune et mesurent jusqu'à 20 cm de long (Rameau et al. 1989). Pour sa reproduction, *P. pinaster* est une espèce monoïque avec la présence de cônes mâles et femelles sur le même individu. A l'instar de l'épicéa, le pin maritime est une plante anémogame avec des cônes mâles qui produisent du pollen dispersé par le vent pour féconder les cônes femelles et entretenir une diversité génétique (www.tela-botanica.org: *Pinus pinaster*).

Les diverses applications du pin maritime reposent sur la qualité de son bois, lourd et dense. Cependant, cette filière génère de nombreux coproduits et notamment les nœuds. Ces structures, qui correspondent à l'insertion des branches sur le tronc, sont riches en résines faisant des nœuds une matière non désirée. Lors des procédés de transformation en pâte à papier, les nœuds de pin peuvent être séparés du bois avant ou après cuisson. Le plus souvent, les nœuds sont soumis à la cuisson et sont recueillis après filtration sur tamis de la pâte, endommageant par la chaleur les composés présents. Une séparation après broyage du bois par différence de densité mais avant la cuisson peut permettre une préservation des composés bioactifs et une valorisation par le biais d'un procédé d'extraction (ADEME 2009).

B.2.2. Chiffres (surface, production)

Le pin maritime fait partie des arbres résineux au même titre que l'épicéa. Sa superficie dans les forêts françaises est d'environ 1 million d'hectares soit 7% de la surface totale, ce qui correspond à l'association de l'épicéa et du sapin (FCBA 2016). *P. pinaster* est également une des productions les plus importantes en France avec un volume de bois récolté d'environ 3,6 millions de m³ en 2013 (ADEME 2015). Chez le pin maritime, le mètre cube correspond à une masse entre 450 et 575 kg permettant d'estimer la production annuelle de pin maritime à 1,8 million de tonnes en 2013 (FCBA 2016).

Indésirables, les nœuds de pin maritime représentent entre 1 et 2% du poids du tronc (Celhay 2013). Il peut donc être estimé qu'à partir d'une récolte annuelle de 1,8 million de tonnes de bois de *P. pinaster*, il y a une production entre 18000 et 36000 tonnes de nœuds de pin par an en France. Ces résultats

concordent avec les données de productions actuelles d'une usine française, qui utilise entre 1000 et 2000 tonnes de bois par jour générant donc entre 10 et 40 tonnes de nœuds, soit à l'année entre 3500 et 15000 tonnes de nœuds de pin sur un seul site (Celhay 2013).

Utilisés comme source d'énergie à défaut d'une réelle valorisation économique, les nœuds de pin sont pourtant un gisement de matière première important en France. La diversité qualitative et quantitative des composés présents dans ces coproduits a ainsi suscité un intérêt pour son exploitation dans divers domaines.

B.2.3. Composition phytochimique des nœuds de pin

A l'instar d'autres arbres résineux tels que l'épicéa, le pin maritime et plus particulièrement les nœuds sont riches en composés lipophiles présents dans les résines (**Figure 26**). Obtenus à l'aide de solvants apolaires comme l'hexane, les composés non polaires majoritaires sont les acides résiniques d'origine terpénique (226-551 g/kg selon les extraits) avec notamment dans un ordre décroissant l'acide déhydroabiétique, l'acide abiétique, l'acide palustrique, l'acide néoabiétique et l'acide primaire (Conde et al. 2014). Les acides gras (50-197 g/kg extrait) sont également des composés dominants dans les nœuds de pin avec la présence notable de l'acide oléique, l'acide palmitique, l'acide linoléique et l'acide stéarique (Conde et al. 2014). Dans une moindre mesure, les nœuds comportent également des juvabionones qui sont des sesquiterpènes provenant de l'ester méthylique de l'acide todomatuique, ainsi que la présence d'esters et de triglycérides (Conde et al., 2013a).

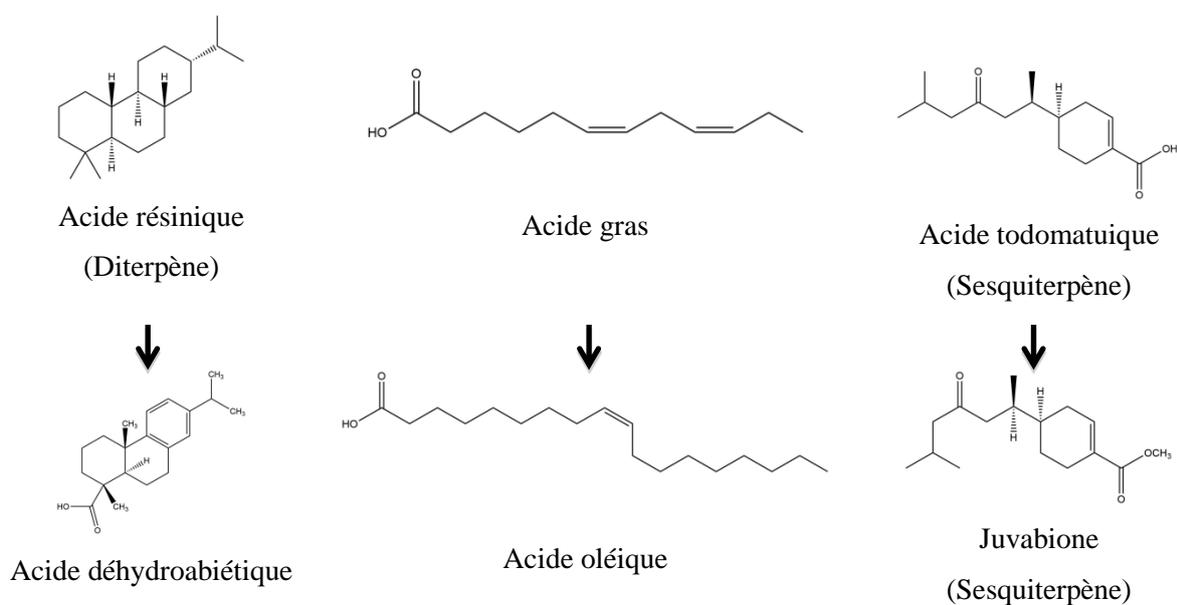


Figure 26. Exemple de familles de composés non polaires présents dans les nœuds de pin.

Les arbres résineux, y compris les pins, sont connus pour posséder un riche spectre de composés phénoliques extractibles, comprenant des stilbénoides, des flavonoïdes et des lignanes (Willför et al. 2003). Les nœuds de *P. pinaster*, à travers des extraits obtenus dans un mélange acétone-eau, ont ainsi montré des teneurs en composés phénoliques pouvant atteindre 342 g/kg selon les extraits (**Figure 27**). Parmi eux, les lignanes sont les composés majoritaires avec la nortrachélogénine, le pinorésinol, l'isolaricirésinol, le sécoisolaricirésinol et le todolactol pouvant atteindre des concentrations à hauteur de 227 g/kg d'extrait (Conde et al. 2014). Les flavonoïdes (11-226 g/kg d'extrait) sont également prédominants dans les nœuds de pin avec dans l'ordre décroissant la pinocembrine, la pinobanksine, le dihydrokaempférol, la taxifoline et la pinobanksine-3-acétate (Conde et al., 2013b). Non négligeables, les stilbènes avec la pinosylvine et son dérivé méthylé peuvent avoir des teneurs allant jusqu'à 33 g/kg d'extrait alors que les acides phénoliques sont peu présents (2,9 g/kg d'extrait) (Conde et al. 2014).

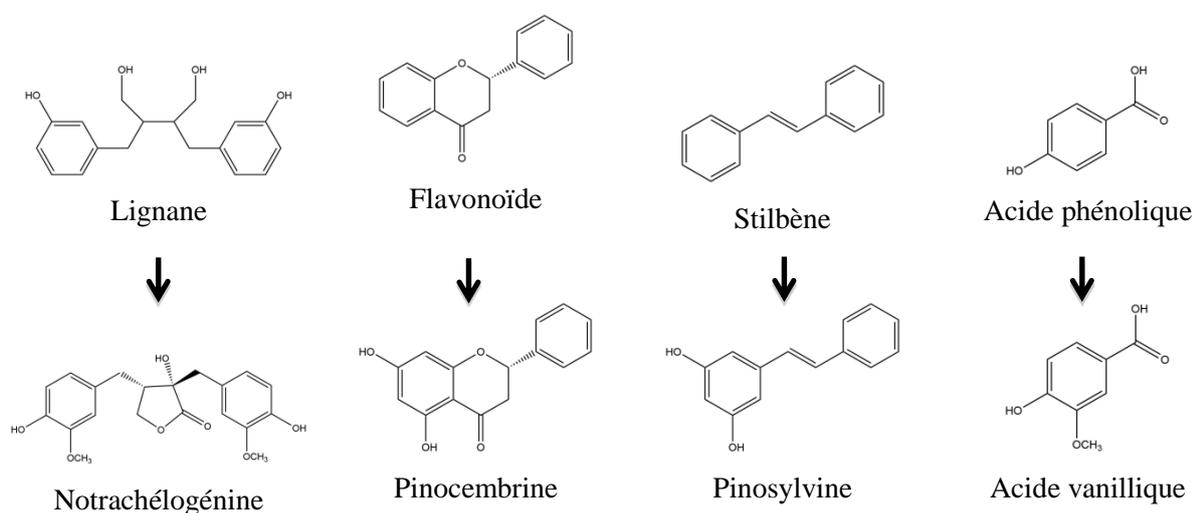


Figure 27. Exemple de familles de composés phénoliques présents dans les nœuds de pin.

Enfin, le bois et les nœuds de pin maritime sont formés de composés pariétaux qui constituent la paroi cellulaire du bois avec la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (González-Muñoz et al. 2012). Il peut être noté que l'extraction par solvant aqueux du pin maritime aboutit à la dégradation de l'hémicellulose et à l'obtention de nombreux dérivés (**Figure 28**). L'hémicellulose, majoritairement du galactoglucomananne, entraîne des concentrations considérables en oligosaccharides tels que les mannane-oligosaccharides (2 à 10 unités d'oses) et en polysaccharides comme les mannanes (> 10 unités d'oses) avec des valeurs entre 780 et 964 g/kg d'extrait. Des monosaccharides (mannose, xylose, galactose ou arabinose) sont également mis en évidence avec une teneur de 94 g/kg d'extrait (Conde et al. 2013a; González-Muñoz et al. 2012; Rivas et al. 2016).

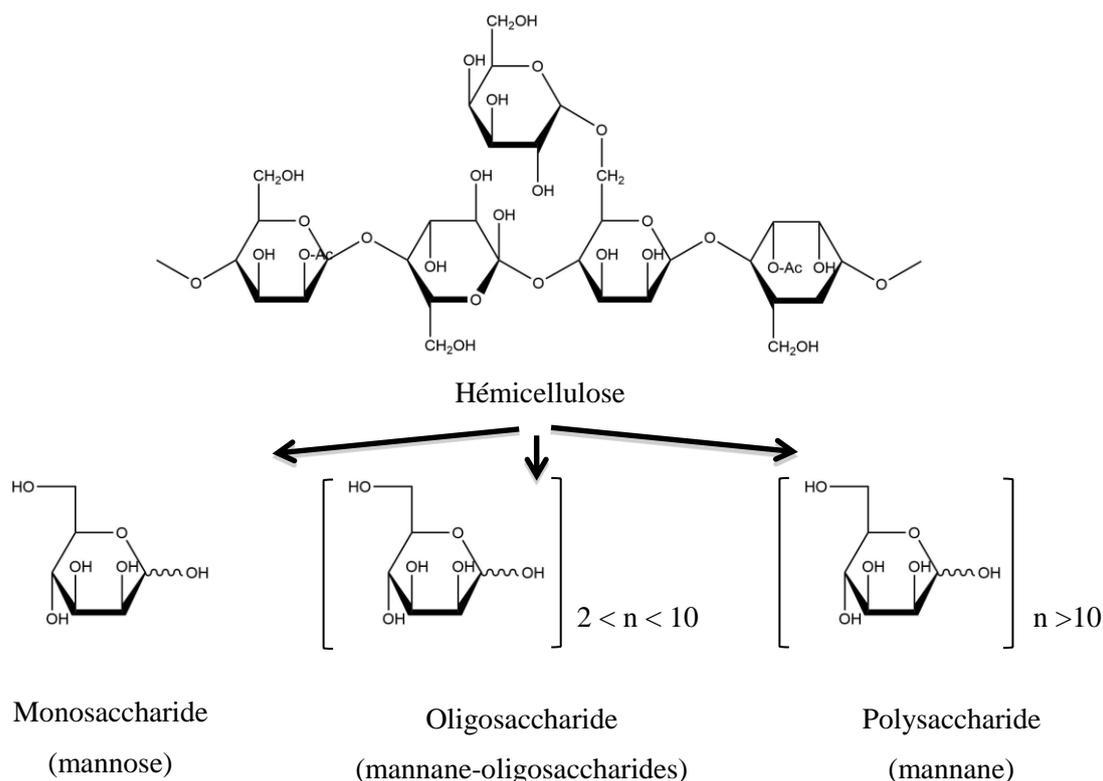


Figure 28. Exemple de composés polaires issus de la dégradation de l'hémicellulose présente dans les nœuds de pin.

B.2.4. Applications

De par la qualité de son bois, le pin maritime est utilisé, d'une part, dans les domaines de la charpenterie, de la menuiserie (lambris) ou encore de la caisserie (caisse d'emballage) (Rameau et al. 1989). D'autre part, le bois du pin maritime est très utilisé pour la fabrication de pâte à papier (Baptista et al. 2008). L'ensemble de ces applications génère de nombreux coproduits dont la valorisation est variable selon la nature de la matière.

Les écorces de pin maritime font parties des coproduits dont la valorisation est aujourd'hui bien établie. Elles sont utilisées depuis la nuit des temps pour leurs propriétés bénéfiques pour la santé, de la réduction de l'inflammation mis en évidence par Hippocrate (400 av. J.-C.) à la prévention du scorbut causé par une carence en vitamine C introduit par J. Cartier en 1534 (Maimoona et al. 2011). L'activité de ces écorces de pin provient de leur richesse en procyanidines qui sont des oligomères de catéchine et épicatechine. Aujourd'hui, des extraits d'écorces de pin sont commercialisés sous le nom de Pycnogénol® en tant que complément alimentaire notamment pour ses vertus antioxydantes (Rohdewald 2005).

Concernant les nœuds de pin maritime, aucune valorisation n'est mise en évidence, hormis leur réutilisation comme source d'énergie dans l'industrie. Pour autant, la richesse en composés phénoliques dans les nœuds de pin suscite de l'intérêt pour son exploitation dans différents domaines. D'une part, les lignanes, les flavonoïdes ou encore les stilbènes ont montré des activités antioxydante et anti-inflammatoire (Laavola et al. 2016; Neacsu et al. 2007; Pietarinen et al. 2006). Les nœuds de pin peuvent donc être valoriser comme une source de principes actifs pour les filières des compléments alimentaires, et cosmétique.

D'autre part, des études ont montré le caractère antimicrobien de ces polyphénols et notamment des pinosylvines contre des champignons responsables de la pourriture blanche et de la pourriture brune chez certains conifères (Celimene et al. 1999). Les lignanes et les flavonoïdes ont également été mis en évidence pour leurs propriétés antifongiques contre des champignons filamenteux (Céspedes et al. 2006; Valimaa et al. 2007). En ce sens, utiliser les nœuds de pin, riches en polyphénols, pour la protection de culture face à différents pathogènes pourrait être une voie de valorisation intéressante sous forme d'extrait.

Volume II.

Etude chimique et activité anti-mildiou des
coproduits viticoles

Chapitre I. Caractérisation et activité anti-mildiou des coproduits issus de la vigne

A. Stratégie

A l'heure actuelle, la viticulture est une des activités de l'agriculture produisant le plus de coproduits. L'entretien de la vigne en période de repos hivernal est ainsi générateur de déchets avec notamment les sarments lors de la taille des vignes. Cette biomasse est généralement sous-exploitée engendrant des difficultés de stockage ou des coûts de retraitement élevés. La valorisation de ces sources de composés bioactifs est donc aujourd'hui un challenge important en agriculture.

Ainsi, les sarments de vigne sont des matériaux accessibles chaque année en quantité importante, ce qui a entraîné une forte étude chimique et biologique à son sujet. En ce sens, des extraits de sarments de vigne, riches en stilbènes, ont déjà fait l'objet d'études de valorisation dans le domaine phytosanitaire et plus particulièrement dans la lutte contre le mildiou de la vigne. Les propriétés antifongiques ont été évaluées à la fois *in vitro* sur disques foliaires et *in vivo* en serre et en vignoble. Ces travaux ont révélé une bonne activité anti-mildiou des sarments de vigne parfois comparable aux produits de synthèse.

Partant du postulat d'une activité antifongique significative des sarments de vigne, l'idée de comparer ces résultats aux autres parties végétatives de la vigne comme les cepes et les racines s'est posée. Accessible lors des renouvellements des vignobles, ces sous-produits de la viticulture sont peu étudiés et pourraient constituer une source d'approvisionnement complémentaire aux sarments.

Cette étude vise donc à évaluer le pouvoir oomycide de trois coproduits viticoles ; les cepes et racines de vigne avec pour référence les sarments de vigne. Un criblage phytochimique des extraits sera effectué afin de mettre en évidence les disparités de composition entre les extraits. Les activités anti-mildiou des extraits seront évaluées sur disques foliaires par traitement préventif.

De par les données de la littérature, on peut présumer d'une composition chimique basée principalement sur la présence de stilbènes dans les extraits viticoles. De plus, les propriétés antimicrobiennes des stilbènes permettent d'envisager une activité anti-mildiou par les extraits de sarment, cep et racine.

B. Design expérimental

B.1. Extraction

Le projet étant une valorisation de coproduits en tant qu'agents actifs naturels, plusieurs conditions doivent être respectées lors de la réalisation de l'extrait notamment au niveau économique, environnemental et industriel. Ainsi, la production de l'extrait doit être simplifiée au maximum pour permettre un transfert technologique à grande échelle, et utiliser des solvants peu toxiques et peu coûteux tout en gardant un extrait actif.

Les stilbènes sont des composés avec une gamme de polarité assez large impliquant un choix d'un système de solvants adapté à ces conditions. Un mélange entre un solvant organique et de l'eau a été choisi avec un pourcentage favorisant le solvant organique. Ainsi, différents solvants ont été envisagés tels que le méthanol, l'éthanol, l'acétone ou encore l'acétate d'éthyle. La classification du méthanol en CMR (cancérogène, mutagène, réprotoxique) ou l'apolarité avérée de l'acétate d'éthyle ont permis d'éliminer ces possibilités. L'acétone présente des avantages mais ses vapeurs irritantes peuvent être un handicap à son utilisation. Le caractère peu toxique et le prix très avantageux de l'éthanol ont fait de ce solvant le candidat idéal. Différents tests d'optimisation ont permis de choisir un système de solvants basé sur un mélange éthanol-eau à 85/15 (v/v).

Afin de faciliter et limiter les étapes de production, il a été choisi de seulement réaliser des extraits bruts sur les ceps et racines de vigne (l'extrait de sarment étant préalablement fourni) :

- L'extrait de sarment de vigne est un produit commercial de la société Actichem servant de référence dans notre étude et obtenu selon un protocole breveté (W1). Les sarments sont soumis à une extraction par de l'éthanol pur chauffé avec une proportion massique (poids/volume) comprise entre 5 et 15. Le temps de contact entre le matériel végétal et le solvant d'extraction est compris entre quelques heures et 24 heures. Après filtration et évaporation du solvant organique, un extrait brut est obtenu. Cet extrait éthanolique est ensuite purifié par un mélange hydro-alcoolique permettant la précipitation de composés insolubles non désirés et éliminés par centrifugation. L'extrait est ensuite concentré dans un réacteur/évaporateur puis séché dans un mélangeur/sécheur permettant l'obtention d'une poudre homogène marron claire.
- Les ceps et racines de vigne ont été extraits selon un protocole établi au sein du laboratoire (**Figure 29**) :

- Les ceps et racines de vigne ont été récoltés directement dans des vignobles du sud-ouest de la France respectivement dans un vignoble du Gers et de Gironde.
- Une étape d'amenuisement du matériel végétal suivie d'un broyage ont été réalisés permettant l'obtention d'une poudre avec une granulométrie inférieure à 4 mm.
- L'extraction a été réalisée dans des conditions massiques (poids/volume) à 1/10 soit 100 g de matériel végétal avec 1 litre d'un mélange de solvants éthanol – eau à 85/15 (v/v). L'extraction se déroule dans un bécher de 3 litres placé sur une plaque chauffante permettant une extraction contrôlée à 60°C. L'agitation peut être assurée par un barreau aimanté ou un agitateur à hélice à régulation mécanique.
- L'extraction est suivie d'une filtration sur coton. Deux extractions successives de deux heures sont réalisées afin d'épuiser le matériel végétal en composés d'intérêts.
- Les filtrats sont mélangés et une concentration sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif permet d'éliminer l'éthanol.
- La phase aqueuse est ensuite congelée puis mise au lyophilisateur quelques jours.
- Une poudre marron homogène est ainsi obtenue et conservée dans un endroit sec à l'obscurité.

1- Récolte du matériel végétal

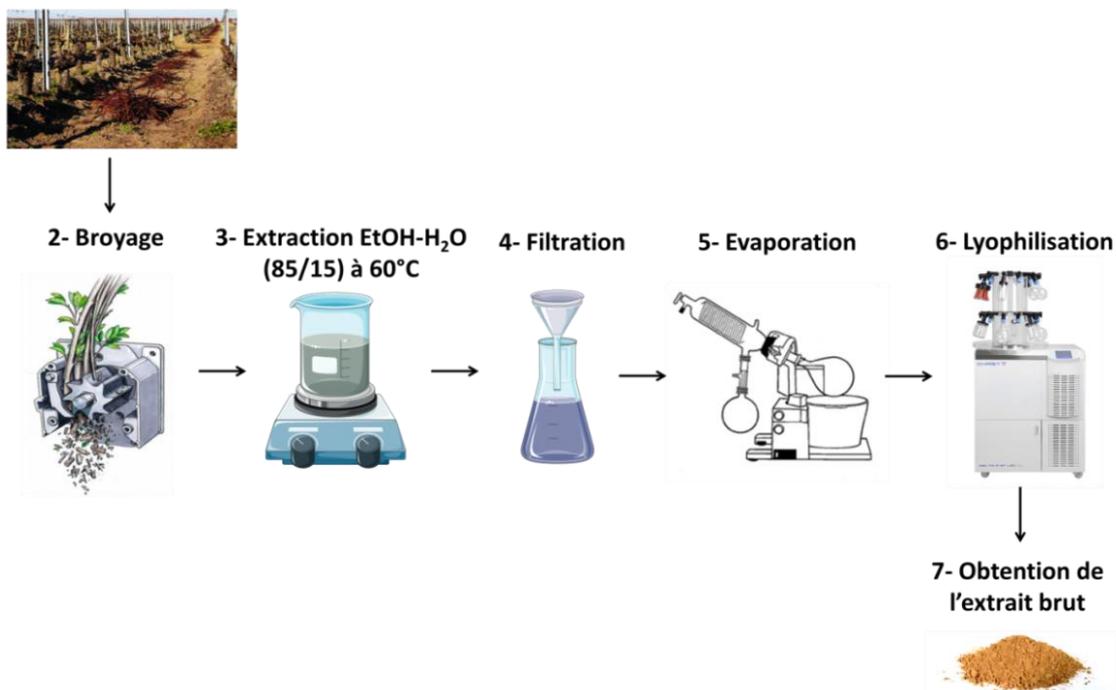


Figure 29. Processus d'extraction à partir des coproduits viticoles.

B.2. Purification

L'isolement des composés présents dans les extraits viticoles a pour but de caractériser chaque molécule par LC-MS et RMN et ainsi réaliser un screening chimique des extraits. De plus, les molécules purifiées seront utilisées pour les tests antifongiques afin d'évaluer leurs propriétés propres contre le mildiou de la vigne.

L'étape de purification des composés a été réalisée par CLHP préparative. Ce système repose sur une séparation chromatographique liquide sur colonne C18 à phase inverse avec une détection par un détecteur à barrette de diode suivie d'une récupération manuelle des composés. Il a été choisi de travailler sur l'extrait de racine de vigne du fait de la présence d'un large éventail de stilbènes allant des monomères aux tétramères. Un total de 10 composés a été récupéré en fonction de deux longueurs d'ondes (280 et 306 nm) comme indiqué sur la **Figure 30**.

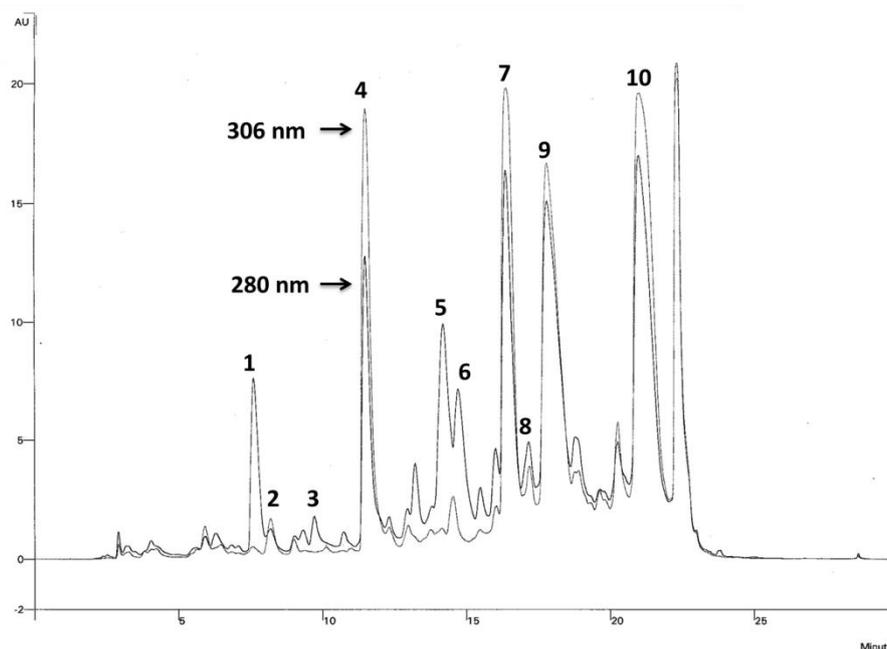


Figure 30. Chromatogrammes CLHP préparative à 280 nm et 306 nm de l'extrait de racine de vigne.

Si la pureté est insuffisante (<90%), une nouvelle étape de purification est réalisée plus finement par CLHP semi-préparative. Les 10 composés purifiés sont ensuite analysés structurellement par RMN afin de finaliser leurs caractérisations ; **1**, ampélopsine A ; **2**, (*E*)-picéatannol ; **3**, pallidol ; **4**, (*E*)-resvératrol ; **5**, hopéaphénol ; **6**, isohopéaphénol ; **7**, (*E*)- ϵ -viniférine ; **8**, (*E*)-miyabénol C ; **9**, vitisine A ; **10**, vitisine B. Ces composés servent dans la suite de l'étude comme standards pour les dosages dans les extraits ainsi que pour les tests antifongiques. D'autre part, la (*E*)- ω -viniférine a été fournie par notre laboratoire pour permettre sa quantification dans les différents extraits.

B.3. Analyse

Les extraits ainsi que les molécules isolées ont été analysés par chromatographie liquide couplée à un détecteur UV-visible (CLUHP-DAD) permettant de déterminer le temps de rétention et les données spectrales (spectre UV, maximum d'absorption ou λ_{max}) de chaque composé. De plus, ce système est relié à un spectromètre de masse à trappe ionique (TI) permettant l'obtention des masses molaires des composés. Cet outil est également utilisé dans le but de fragmenter les ions moléculaires et ainsi collecter les informations concernant les ions produits. Ces fragments sont propres à chaque molécule et apportent des renseignements sur la structure des composés.

En outre, les composés purifiés par CLHP préparative sont analysés par résonance magnétique nucléaire (RMN). L'analyse monodimensionnelle permet de déterminer la nature des noyaux aromatiques, des liaisons en présence et apporte des informations structurales sur les molécules. La comparaison à la banque de données du laboratoire ainsi que les données de la littérature permet d'identifier sans ambiguïté les composés et ainsi caractériser les extraits.

B.4. Test anti-mildiou

Les tests antifongiques ont pour objectif d'étudier l'action préventive des extraits viticoles (sarment, cep et racine) contre le développement mycélien du mildiou. Les molécules qui composent ces extraits sont également étudiées afin d'évaluer leurs pouvoirs antifongiques et ainsi corrélés leurs activités à celles des extraits. Les tests antifongiques ont été élaborés à l'aide de l'expertise de l'UMR SAVE de l'INRA de Bordeaux (Dr MF Corio-Costet), spécialisée dans l'étude des pathogènes de la vigne (**Figure 31**).

- Une première étape d'optimisation de la solubilité de l'extrait et des molécules pures a été nécessaire. Une présence de solvant organique était inévitable du fait de l'apolarité des stilbènes. Ainsi, des tests avec 1 ou 2% de solvants tels que l'éthanol ou le DMSO ont été réalisés. Une absence de phytotoxicité et d'influence sur la croissance du mildiou a été observée à 1% d'éthanol permettant de valider ce procédé de dissolution.
- La deuxième étape de ce procédé a été de déterminer le meilleur moyen de dispersion de l'extrait sur les disques foliaires (huit disques par concentration). Nous nous sommes orientés vers un microdiffuseur sous pression (Ecospray®) manuel permettant un dépôt en fines gouttelettes de nos extraits et des molécules pures.

➤ La troisième étape, un jour après le traitement préventif par nos extraits, est l'inoculation de *P. viticola* avec une concentration ajustée à 15000 sporanges/mL en faisant un dépôt de trois gouttes de 15 µL par disque. Etant donnée la disposition de 8 disques par boîte, un total de 24 spots est réalisé par concentration. La mise à l'obscurité des boîtes permet l'ouverture des stomates et la pénétration des zoospores. Après élimination du reliquat d'eau, les boîtes sont mises en culture durant sept jours.

➤ La quatrième étape consiste en l'observation du développement du mildiou puis le calcul du pourcentage d'inhibition causé par l'extrait ou les molécules pures. Pour cela, un score compris entre 0 (pas de développement) et 100 (développement totale) est mesuré visuellement au niveau de la sporulation du mildiou. Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport au témoin avec la formule suivante :

$$\text{Inhibition} = (\text{Croissance Témoin} - \text{Croissance Extrait}) / \text{Croissance Témoin}$$

Le pourcentage d'inhibition en fonction du \log_{10} des différentes concentrations permet l'obtention d'une courbe dose-réponse. L'équation de la droite de la partie linéaire permet de calculer la concentration nécessaire pour inhiber 50% du mildiou (CI_{50}).

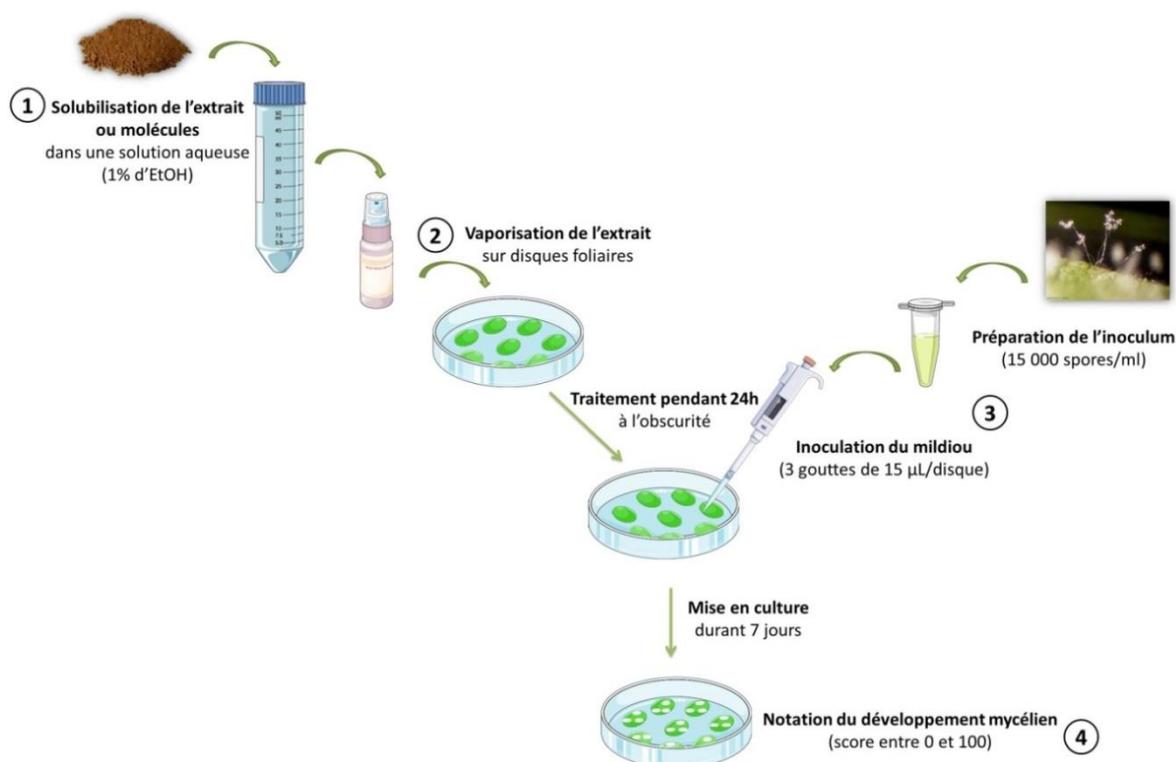


Figure 31. Procédé du test anti-oomycète contre le mildiou de la vigne.

C. Résumé des résultats

Les extraits hydro-alcooliques de sarments, ceps et racines de vigne ont été analysés par CLUHP-DAD-SM et RMN permettant d'identifier 11 stilbènes avec des degrés de polymérisation différents (Tableau 3).

Tableau 3. Stilbènes identifiés dans les extraits viticoles.

Monomères	Dimères	Trimères	Tétramères
(<i>E</i>)-picéatannol	ampélopsine A	(<i>E</i>)-miyabénol C	hopéaphénol
(<i>E</i>)-resvératrol	pallidol		isohopéaphénol
	(<i>E</i>)- ϵ -viniférine		vitisine A (r2-viniférine)
	(<i>E</i>)- ω -viniférine		vitisine B (r-viniférine)

Le vitisinol C et la (*E*)- δ -viniférine, deux dimères, ont également été détectés dans les extraits viticoles mais n'ont pu être quantifiés, étant en dessous des limites de quantification.

Le dosage des stilbènes dans les différents extraits a été réalisé à l'aide des standards préalablement purifiés par CLHP préparative. Ainsi, les composés majoritaires sont :

- l' ϵ -viniférine (126.12 mg/g extrait) et le resvératrol (61.15 mg/g extrait) pour l'extrait de sarment ;
- l' ϵ -viniférine (79.39 mg/g extrait), l'isohopéaphénol (79.13 mg/g extrait) et la vitisine B (56.91 mg/g extrait) dans l'extrait de cep ;
- la vitisine B (128.29 mg/g extrait), l'ampélopsine A (21.78 mg/g extrait) et la vitisine A (20.93 mg/g extrait) dans l'extrait de racine.

Par degré de polymérisation, les monomères sont prédominants dans les sarments (6.4%) et peu présents dans les ceps (1.1%) et racines (1.2%). Les dimères sont majoritairement dans les sarments (17.3%) et les ceps (15.1%). Les tétramères sont quant à eux supérieurs dans les ceps et les racines (17.2%). Ainsi, un phénomène d'oligomérisation des stilbènes a été mis en évidence des parties aériennes de la vigne vers les parties souterraines.

Au niveau des concentrations totales en stilbènes, les extraits de ceps et de sarments sont similaires, avec des valeurs aux alentours de 350 mg/g d'extrait. L'extrait de racines est un peu moins riche avec une concentration en stilbènes de 223.72 mg/g d'extrait.

Les tests antifongiques réalisés sur *P. viticola* ont révélé une forte activité anti-mildiou des extraits de ceps et racines de vigne. La concentration causant 50% d'inhibition du développement du mildiou (CI₅₀) est respectivement trois et deux fois plus faible avec les extraits de ceps (60 mg/L) et racines (120 mg/L) qu'avec l'extrait de référence de sarments (210 mg/L). De plus, les extraits de ceps et racines permettent une inhibition totale du mildiou à 500 mg/L contre 800 mg/L pour l'extrait de sarment. Concernant les molécules pures, les composés les plus actifs sont la vitisine B (CI₅₀ de 12 µM), l'hopéaphénol (18 µM), la vitisine A (20 µM) et l'isohopéaphénol (45 µM), soit quatre tétramères.

Ainsi, on peut déduire une corrélation entre l'activité des extraits et la présence des différents stilbènes. Les ceps et racines de vigne sont riches en tétramères ce qui explique leurs fortes activités. L'extrait de racine, pourtant 1,5 fois moins riche en stilbènes que l'extrait de sarments, est deux fois plus actif du fait de la présence accrue de vitisine A et B. De même, les extraits de ceps et sarments de vigne ont une quantité en stilbènes similaire avec cependant un différentiel d'activité antifongique d'un facteur quatre en faveur de l'extrait de cep, qui s'explique par la forte présence en vitisine B et isohopéaphénol. Ces résultats montrent ainsi le potentiel antifongique des extraits viticoles et notamment les extraits de ceps et racines.

D. Publication

Les résultats ont été rédigés sous forme d'un article scientifique intitulé « Stilbenes from *Vitis vinifera* L. waste : a sustainable tool for controlling *Plasmopara viticola* », qui a été soumis le 17 Janvier 2017 dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, puis accepté et publié le 13 Mars 2017.

Stilbenes from *Vitis vinifera* L. Waste: A Sustainable Tool for Controlling *Plasmopara viticola*

Julien Gabaston,[†] Emma Cantos-Villar,[‡] Benoît Biais,[†] Pierre Waffo-Teguo,[†] Elodie Renouf,[†]
Marie-France Corio-Costet,[§] Tristan Richard,[†] Jean-Michel Mérillon^{†*}

[†]Université de Bordeaux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de Recherche Œnologie EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique (Gesvab) - Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, CS 50008 - 210, chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France

[‡]Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Rancho de la Merced, Junta de Andalucía, Ctra. Trebujena, Km 3.2, P.O. Box 589, Jerez de la Frontera 11471, Cádiz, Spain.

[§]UMR Santé Végétale, 1065, ISVV, IFR 103, INRA, Rue Edouard Bourleaud, CS 20032, 33882, Villenave d'Ornon, France

*Corresponding author: jean-michel.merillon@u-bordeaux.fr

ABSTRACT

Stilbene-enriched extracts from *Vitis vinifera* waste (cane, wood and root) were characterized by UHPLC-MS. Eleven stilbenes were identified and quantified as follows: ampelopsin A, *E*-piceatannol, pallidol, *E*-resveratrol, hopeaphenol, isohopeaphenol, *E*- ϵ -viniferin, *E*-miyabenol C, *E*- ω -viniferin, r2-viniferin and r-viniferin. The fungicide concentration inhibiting 50% of growth of *Plasmopara viticola* sporulation (IC₅₀) was determined for the extracts and also for the main compounds isolated. r-Viniferin followed by hopeaphenol and r2-viniferin showed low IC₅₀ and thus high efficacy against *Plasmopara viticola*. Regarding stilbene extracts, wood extract followed by root extract showed the highest antifungal activities. These data suggest that stilbene complex mixtures from *Vitis vinifera* waste could be used as a cheap source of bioactive stilbenes for the development of natural fungicides.

Keywords: cane, wood, root, UHPLC-MS, grapevine waste, mildew, antifungal activity.

INTRODUCTION

Grapevine downy mildew, which is caused by the oomycete *Plasmopara viticola*, is a devastating disease worldwide. Most commercially important cultivars of the European grapevine (*Vitis vinifera*) are highly susceptible to this pathogen. Therefore, adequate control by fungicides is crucial, particularly in rainy climates. In France, field observations have shown that downy mildew infection was rated as severe for 25 out of the last 50 years and losses in Europe due to this disease have been huge. The greatest losses to American viticulturists from this disease occurred in the Northern United States, where in some localities from 25 to 75% of the vineyard was destroyed.¹

Plasmopara viticola attacks flower clusters, leaves and young berries and it is controlled with frequent applications of chemical fungicides to avoid yield and quality losses. Depending on meteorological conditions, 8-12 fungicide applications are necessary to control it. Currently, *Plasmopara viticola* control is based on the use of copper but this can cause environmental problems owing to its accumulation in the soil.¹ Despite its unfavorable eco-toxicological profile, the use of copper is still tolerated in acknowledgment of its unique properties as a wide-spectrum fungicide and bactericide.

However, copper compounds have been included in Annex I to Directive 91/414/EEC² (concerning the placing of plant protection products on the market). “Therefore, it is necessary that Member States introduce monitoring plans in vulnerable areas, where the contamination of the soil compartment by copper is a matter of concern, in order to set, where appropriate, limitations as maximum applicable rates”. Therefore, the future of viticulture is currently dependent on the availability of copper unless alternatives are identified. The use of microorganisms for biocontrol has been proposed as a powerful alternative. *Aureobasidium pullulans* provides minimal protection,³ meanwhile *Trichoderma harziaum* T39 treatment enhances the expression of defense-related genes.⁴ However, in the recent past, microbial biocontrol agents have not shown good and consistent activity against *Plasmopara viticola* in the field.¹

Several molecules that induce resistance reactions in grapevine have been shown to increase resistance to downy mildew in susceptible grapevines, such as laminarin,⁵ oligosaccharides,⁶ β -aminobutyric acid (BABA), linoleic acid, benzothiadiazole-7-carbo-thioic acid S-methyl ester (BTH)^{3,7} and thiamine.⁸ One of the defense mechanisms induced in plants after treatment with these molecules is the biosynthesis of stilbenes, which are phytoalexins with high antimicrobial properties.⁹

The application of plant extracts, which usually contain these molecules, can also induce resistance to downy mildew in grapevine.^{3,10} Recently cane extracts were proposed as a potentially active raw material for developing a natural fungicide.^{11, 12} They contain stilbene compounds, thereby justifying their bioactivity. Numerous studies have been published on the antifungal activity of stilbenes (mainly *E*-resveratrol, pterostilbene, ϵ -viniferin and δ -viniferin) on *Plasmopara viticola*.¹³ Isohopeaphenol and miyabenol C have been described as stress metabolites in *Plasmopara viticola*-infected leaves.¹⁴ Moreover, oligomers such as miyabenol C, isohopeaphenol, *r*-viniferin and *r2*-viniferin are known to reduce the growth of the fungus related with grape trunk diseases.¹⁵

On the other hand, wine production generates a large amount of waste with low added value.¹⁶ Grapevine cane represents a large source of waste derived from the wine industry, with an estimated volume between 2-5 tons per hectare per year.

Likewise, when the vineyard is too old or vineyard removal is required for any reason, grapevine wood and roots also constitute a huge source of waste with low added value and high stilbene content.¹⁷⁻¹⁸ The surface area of vineyards has been reduced dramatically in recent years, especially in Europe. For example, France has recently decreased its vineyard surface area by 13.500 hectare/year¹⁹ leading to an estimated 1.75 million tons of wastes including 79% canes and 21% wood and roots.²⁰ Currently the surface area of vineyards worldwide has stabilized, although old grapevines are constantly being replaced by new ones.

This study tested three stilbene extracts from different vineyard waste sources (cane, wood and root) for their ability to fight *Plasmopara viticola* in grapevine under control conditions. The bioactivity of the main stilbene compounds present in the extracts was also tested. The data may help in selecting the most suitable grapevine waste for developing natural antifungal agents.

MATERIAL AND METHODS

Plant material

Grapevine plants of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon, kindly supplied by Dr. Corio-Costet (UMR SAVE, INRA, Villenave d’Ornon, France), were propagated from wood cuttings in a greenhouse. After three weeks, rooted cuttings were potted in a sandy soil and were grown under controlled conditions at 25/20 °C day/night temperature with 75% relative humidity and a 15/9h light/dark photoperiod. Downy mildew assays were performed with two-month-old plants with 10-12 leaves by collecting leaves from the upper part of the shoots (fourth leaf below the apex).

Pathogen material

Plasmopara viticola isolate (ANN-01) collected in 2015 on *Vitis vinifera* cultivar Ugni-blanc in a commercial vineyard located in Charente (France) was multiplied and inoculated as previously described.²¹ Briefly, 15 μ l drops of a 5000 sporangia mL⁻¹ spore suspension were incubated for 7 days at 22°C with a 16 h day/8 h night photoperiod. The isolate was sensitive to quinone outside inhibitor fungicides (QoI, mitochondrial cytochrome b inhibitor) and carboxylic acid amid fungicides (CAA, cellulose synthase inhibitor), but resistant to metalaxyl (RNA synthesis inhibitors). The isolate was sub-cultured weekly on fresh grapevine leaves (*V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon).

Stilbene extracts from *Vitis vinifera*

Extract of grapevine cane (*Vitis vinifera*), named Vineatrol[®], was kindly provided by Actichem (Montauban, France). Grapevine canes were harvested in the region of Bordeaux (France) and were composed by a mixture of Cabernet-Sauvignon and Merlot cultivars. They were dried in open air for at least two months until their moisture content was lower than 20%. Extract was prepared according to the patented protocol.²² Briefly, extraction was carried out on grapevine canes with ethanol as solvent. A purification step on crude extract was then performed with a hydro-alcoholic mixture to precipitate any apolar impurities, which were then removed by centrifugation. The solid obtained after removal of the solvent was a brown powder (Vineatrol[®]). This extract has been recently tested in greenhouse and vineyard against downy mildew¹² and it was used in the current study as a reference. A mixture of Cabernet Franc and Tannat grapevine wood (*Vitis vinifera*) was harvested in a vineyard located in the South-West region of France (Gers) and was supplied by Actichem (Montauban, France). It was dried at room temperature for two months in conditions with no light, and then crushed in powder. Extraction was carried out in our lab with an ethanol-water mixture (85/15; v/v) under agitation at 60°C. Ethanol was removed by evaporation under reduced pressure and aqueous phase was lyophilized producing a brown powder. Grapevine roots were harvested in the “Saint Christoly de Blaye” vineyard in the region of Bordeaux (France). Grapevine root was SO4 rootstocks (*Vitis riparia* x *Vitis berlandieri*). As previously described, roots were dried, crushed and extracted with an ethanol-water mixture (85/15; v/v) under agitation at 60°C in our lab. After ethanol evaporation *in vacuo*, water phase was lyophilized to produce a brown powder.

Chemicals and Standards

The following compounds were isolated and purified: *E*-resveratrol, *E*-piceatannol, pallidol, ampelopsin A, *E*- ϵ -viniferin, *E*- ω -viniferin, *E*-miyabenol C, hopeaphenol, isohopeaphenol, r2-viniferin and r-viniferin, from *Vitis vinifera* root and cane extracts as described in isolation by preparative HPLC section. The identity and purity of these compounds were analyzed by UHPLC-UV-DAD, LC-MS and quantitative NMR as described below and compared to data from the laboratory.^{15, 23-24} In addition, UV-VIS spectra of each stilbene were recorded on a Cary 300 Bio UV-Visible spectrophotometer in MeOH. Purity of compounds was estimated $\geq 95\%$.

For UHPLC-MS analyses and isolation of compounds by preparative HPLC, water was purified using an Elga water purification system (Bucks, U.K.). LC-MS-grade acetonitrile (VWR, Fontenay-sous-bois, France) and formic acid (Fisher Scientific, Loughborough, U.K.) were used for LC-MS analysis. For preparative HPLC, HPLC-grade acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) and HPLC-grade methanol were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Identification and Quantification by UHPLC-MS

An UHPLC Agilent 1290 Series from Agilent Technologies (Santa Clara, CA) was used to identify and quantify the stilbenes. It consisted of an auto sampler module, a binary pump with degasser, a column heater/selector and an UV-VIS-DAD. An Agilent Zorbax SB-C18 (100 mm x 2.1 mm x 1.8 μm) column was used for analysis. The solvent system consisted of water acidified with 0.1% formic acid as solvent A and acetonitrile acidified with 0.1% formic acid as solvent B. Elution was performed at a flow rate of 0.4 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ with the following gradient: 10% B (from 0 to 1.7 min), 10 to 20% B (from 1.7 min to 3.4 min), 20 to 30% B (from 3.4 min to 5.1 min), 30% B (from 5.1 min to 6.8 min), 30 to 35% B (from 6.8 min to 8.5 min), 35 to 60% B (from 8.5 min to 11.9 min), 60 to 100% B (from 11.9 min to 15.3 min), 100% B (from 15.3 to 17 min), 100 to 10% B (from 17 to 17.3 min). An Esquire 6000 ion trap mass spectrometer using an ESI source (Bruker-Daltonics, Billerica, MA) was coupled to the UHPLC. Alternating negative and positive mode with a range of m/z 100–1200 was used to obtain ion chromatograms. Nitrogen was used as the drying gas at 10 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ with nebulizer pressure at 40 psi and temperature at 365°C. Capillary voltage was 3100 V, capillary exit voltage was -118.3V, skimmer voltage was -40 V, and trap drive was 58.1. Extracts were dissolved in methanol-water mixture (1/1, v/v) at 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, filtered on 0.45 μm PTFE and injected at 1 μl . Analyses were performed in triplicate. Pure standards produced by the laboratory were injected at several concentrations (0, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) in independent triplicate to obtain calibration and equation curves. Data were analyzed with Bruker Data Analysis 3.2 software. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were evaluated at the maximum wavelength of absorption of each compound. The linearity of the standard responses was determined by plotting the peak area versus the compound concentrations.

Stilbene isolation by preparative HPLC

Stilbenes were purified from extracts by a Varian Pro Star equipped with an Agilent Zorbax SB-C18 PrepHT column (250 mm x 21.2 mm, 7 μm) and on-line detection. Extracts were solubilized at 40 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ in methanol-water (50/50; v/v) and filtered on PTFE 0.45 μm . The solvent system consisted of water acidified with 0.025% TFA as solvent A, and acetonitrile acidified with 0.025% TFA as solvent B. Elution was performed at a flow rate of 20 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ with the following gradient: 40% B (from 0 to 5 min), 40 to 55% B (from 5 min to 25 min), 55 to 100% B (from 25 min to 26 min), 100% B (from 26 min to 31 min), 100 to 40% B (from 31 min to 32 min), 40% B (from 32 min to 35 min).

NMR Experiments

NMR analyses were conducted on a Bruker Ultrashield 600 MHz NMR spectrometer equipped with a cryogenic TXI probe head. NMR spectra were obtained in 3-mm tubes with d_4 -methanol or acetone- d_6 as solvent. Bruker Topspin software version 3.2 was used for data analysis.

Antifungal tests against downy mildew

Sporangia were obtained as described above, harvested and suspended in sterile water at 4 °C before inoculation on the abaxial face of leaves with 20 droplets of 15 μl . Grapevine leaves were kept one night in the dark for stomata opening and zoospore penetration. Using a vacuum pump, the residual droplets were aspirated and leaves were incubated for 7 days under controlled conditions (22°C) with a 16 h light day (35 $\mu\text{m}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).²¹ For antifungal assays, 25 mm-wide leaf discs were generated with a pastry-cutter and randomly disposed on humidified filter paper in Petri dishes. Eight repetitions were performed for each concentration. The different extracts were prepared in sterile water with 1% of ethanol with a range of seven concentrations (0, 50, 100, 200, 300, 500 and 800 mg/L). In the same conditions, stilbenes were solubilized in sterile water with 1% ethanol according to the procedure described by Pezet et al.⁹ and Schnee et al.¹¹ Stilbene was prepared at eight concentrations (0, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 μM). Total solubility was obtained for ampelopsin A, hopeaphenol, isohopeaphenol, *E*- ϵ -viniferin, *E*-miyabenol C and r2-viniferin while a colloidal solution was formed for *E*-resveratrol and r-viniferin at the highest concentration. Dilutions were sprayed with a micro-diffuser (0.7 mm) having a pressure reserve (Ecospray®) on the leaf discs. Controls were done by spraying sterile water with 1% of ethanol onto leaf discs. One day later, the leaf surfaces were dried and 3 droplets of 15 μl per disc were deposited from a spore suspension at 15×10^3 sporangia per ml. As described above, inoculated leaf discs were cultivated for 7 days. Three independent experiments were carried out. Downy mildew development was measured according to the density of mycelium and number of sporulation sites. By comparison with the control discs, a conversion to a percentage of inhibition was performed. The relation between inhibition values and \log_{10} of the concentration allowed dose-response curves to be obtained. The \log_{10} dose to inhibit 50% of downy mildew (CI_{50}) was calculated from the regression equation of the linear part of the sigmoid curve.^{21,25-26}

Statistical analyses

Three independent experiments of eight repetitions were carried out for each stilbene extract. Data are shown as means \pm SEM. The statistical analysis was performed on the three extracts at each specific concentration. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison post hoc tests was carried out by using R software. Significant differences between each extract was set at *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, • $p < 0.1$.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical characterization of stilbene extracts

Extracts from grapevine wood and root as well as reference grapevine cane extract were characterized. Eleven stilbenes were identified by LC-MS and by comparison with standards in the extracts as follows: ampelopsin A, *E*-piceatannol, pallidol, *E*-resveratrol, hopeaphenol, isohopeaphenol, *E*- ϵ -viniferin, *E*-miyabenol C, *E*- ω -viniferin, r2-viniferin and r-viniferin (Figure 1, Supplementary data). Mass spectral data for these compounds are shown in Table 1.

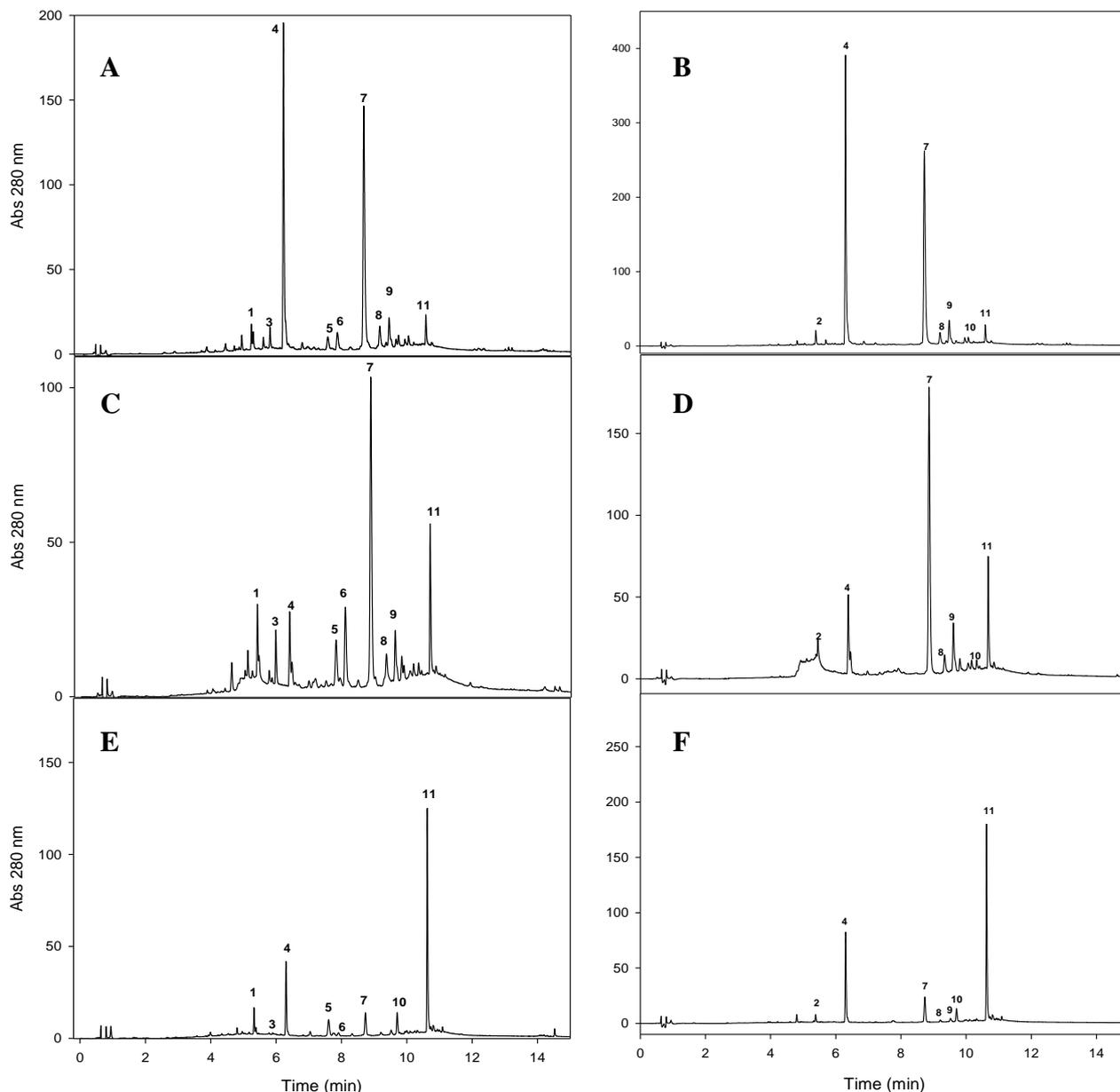


Figure 1. UHPLC-DAD chromatogram of cane extract at 280 nm (A) and 306 nm (B), wood extract at 280 nm (C) and 306 nm (D) and root extract at 280 nm (E) and 306 nm (F). (1) ampelopsin A, (2) *E*-piceatannol, (3) pallidol, (4) *E*-resveratrol, (5) hopeaphenol, (6) isohopeaphenol, (7) *E*- ϵ -Viniferin, (8) *E*-miyabenol C, (9) *E*- ω -viniferin, (10) r2-viniferin, (11) r-viniferin.

Mass data for *E*-piceatannol, pallidol, *E*-resveratrol, hopeaphenol, isohopeaphenol, *E*- ϵ -viniferin, *E*-miyabenol C and *E*- ω -viniferin were in agreement with those described by other authors with minor changes in product ions owing to different fragmentation conditions.²⁷⁻³⁰ However, differences were found in the mass spectral data for ampelopsin A, r2-viniferin and r-viniferin. Gorená et al.²⁷ reported different product ions for the abovementioned compounds, probably owing to different conditions in the LC-MS method and the sample preparation (water/acetonitrile 85:15 v/v). In addition to mass spectrometry data, UV-VIS data based on λ_{max} (**Table 1**) and UV spectrum (data not shown) corroborated those in the literature. Ampelopsin A, hopeaphenol, isohopeaphenol and pallidol showed respectively λ_{max} at 283, 283, 281 and 284 nm, in agreement with the absence of conjugation between phenol units.^{31,14,32} In agreement with the literature, *E*-resveratrol, *E*-piceatannol, *E*- ϵ -viniferin, *E*- ω -viniferin, *E*-miyabenol C, r2-viniferin and r-viniferin, were characterized by λ_{max} at 306, 324, 324, 322, 323, 328 and 321 nm respectively, meaning the presence of one double bond in *trans*-configuration in their structure.³³⁻

^{35,14,36-37} In addition to UV-VIS and mass spectral data, stilbenes were also analyzed by NMR. All ¹H NMR spectra of stilbenes matched with data reported in the literature, thereby confirming unambiguously the nature of each stilbene (**Supplementary data**). Furthermore, vitisinol C and δ -viniferin were also detected in all the extracts but under the LOQ (data not shown).

Table 1. UHPLC-DAD-MS/MS data of stilbenes determined in extracts

Stilbene	Peak	t _R	λ_{max} (nm)	Pseudomolecular ion [M-H] ⁻	Product ions
ampelopsin A	1	5.4	283	469	451, 375, 363, 347, 335, 281, 257, 227
<i>E</i> -piceatannol	2	5.5	290, 304, 325	243	225, 215, 201, 181, 175, 157, 141, 135, 107
pallidol	3	5.9	284	453	435, 406, 391, 369, 359, 346, 273, 265
<i>E</i> -resveratrol	4	6.4	306, 319	227	185, 143
hopeaphenol	5	7.8	283	905	811, 717, 611, 451, 357, 299
isohopeaphenol	6	8.1	283	905	811, 717, 675, 611, 451, 358, 265
<i>E</i> - ϵ -viniferin	7	8.9	285, 308, 323	453	435, 411, 369, 359, 347, 253, 225
<i>E</i> -miyabenol C	8	9.4	323	679	661, 637, 611, 573, 479, 451, 409, 345, 273, 228
<i>E</i> - ω -viniferin	9	9.7	322	453	435, 411, 395, 369, 333, 307, 285, 251, 225
r2-viniferin	10	9.8	285, 328	905	811, 799, 693, 545, 451, 359, 265
r-viniferin	11	10.7	286, 321	905	887, 811, 799, 717, 545, 451, 359, 317

Stilbene concentrations varied widely depending on the nature of the extracts. Of note, each compound was quantified with its own calibration curve at the maximum wavelength (**Table 1**) so the amount was not underestimated. The main compounds were *E*- ϵ -viniferin (126.12 mg/g dw extract) and *E*-resveratrol (61.15 mg/g dw extract) in cane extract; *E*- ϵ -viniferin (79.39 mg/g dw extract), isohopeaphenol (79.13 mg/g dw extract) and r-viniferin (56.91 mg/g dw extract) in wood extract; r-viniferin (128.29 mg/g dw extract), ampelopsin A (21.78 mg/g dw extract) and r2-viniferin (20.93 mg/g dw extract) in root extract (**Table 2**). In light of the pattern described from the same tissue (cane, wood and root) by other authors, the results can be somewhat generalized. Indeed, it appears that grapevine cane usually has *E*- ϵ -viniferin and *E*-resveratrol as its main compounds,³⁸⁻⁴⁰ grapevine wood has more *E*- ϵ -viniferin and isohopeaphenol,⁴¹ while grapevine root is generally rich in r-viniferin, ampelopsin A and r2-viniferin.^{37,31,42} Furthermore, *E*-piceatannol had low concentrations in the three extracts while r2-viniferin was low in cane extract (7.17 mg/g dw extract), *E*-resveratrol in wood extract (7.26 mg/g dw extract) and pallidol in root extract (0.73 mg/g dw extract). Cane and wood extracts showed similar total stilbene concentrations (**Table 2**), about 350 mg/g extract, while root extract showed a somewhat lower concentration in stilbenes (223.72 mg/g extract).

The relative abundance of each stilbene was different among the extracts. *E*- ϵ -viniferin was the most abundant in cane and wood extracts with 12.6% and 7.9% respectively, while it was low in root extract (1.3%). The opposite was found for r-viniferin, with a richness of 12.8% in root extract but only 5.6% and 2.0% in wood and cane extracts, respectively. These results shown that the degree of oligomerization of stilbene increased from the aerial organs of the grapevine to the root system. Indeed, monomeric stilbenes (*E*-resveratrol, *E*-piceatannol) were found in higher quantities in grapevine cane (6.4%) than in wood and root (1.1% and 1.2% respectively).

Dimeric stilbenes (*E*- ϵ -viniferin, *E*- ω -viniferin, ampelopsin A, pallidol) were predominant in grapevine cane and wood (17.3% and 15.1% respectively), while the content was low in roots (3.6%). Finally, tetrameric stilbenes (r-viniferin, r2-viniferin, isohopeaphenol and hopeaphenol) were abundant in grapevine wood and roots (17.2 % in both of them) contrary to cane, in which the content was the lowest (7.6%).

Thus, the three extracts (cane, wood and root) showed total stilbene concentrations in the same range. However, different levels of bioactivity of the stilbene extracts could be expected owing to their different composition.

Table 2. Limits of detection (LOD) ($\mu\text{g/ml}$), limits of quantification (LOQ) ($\mu\text{g/ml}$), and calibration curve coefficients (R^2) of standard stilbenes. Stilbene content in hydroalcoholic extracts (mg/g dw extract). (%) between brackets.

	ampelopsin A	<i>E</i> -piceatannol	pallidol	<i>E</i> -resveratrol	hopeaphenol	isohopeaphenol	<i>E</i> - ϵ - viniferin	<i>E</i> -miyabenol C	<i>E</i> - ω - viniferin	r2- viniferin	r- viniferin	Total Stilbenes
LOD	0.23	0.04	0.17	0.03	0.16	0.30	0.07	0.22	0.07	0.25	0.10	
LOQ	0.69	0.13	0.53	0.08	0.48	0.92	0.21	0.68	0.20	0.75	0.31	
R^2	0.998	0.995	1	0.999	1	0.998	1	1	0.998	0.997	0.995	
Cane	16.84	3.35	12.76	61.15	14.22	35.21	126.12	21.08	17.14	7.17	19.87	339.99
	(1.7%)	(0.3%)	(1.3%)	(6.1%)	(1.4%)	(3.5%)	(12.6%)	(2.1%)	(1.71%)	(0.7%)	(2.0%)	(34%)
Wood	36.84	3.78	19.29	7.26	26.64	79.13	79.39	13.39	15.54	12.98	56.91	351.45
	(3.7%)	(0.4%)	(1.9%)	(0.7%)	(2.4%)	(7.9%)	(7.9%)	(1.3%)	(1.6%)	(1.3%)	(5.6%)	(35%)
Root	21.78	1.21	0.73	10.95	18.14	5.29	13.01	2.12	1.27	20.93	128.29	223.72
	(2.2%)	(0.1%)	(0.07%)	(1.1%)	(1.8%)	(0.5%)	(1.3%)	(0.2%)	(0.1%)	(2.1%)	(12.8%)	(22%)

Antifungal activity of the extracts and stilbenes on *Plasmopara viticola*

Once the extracts had been characterized, antifungal assays were performed by adding the extracts on the leaves prior to inoculation in order to investigate the preventive efficacy of the extracts on *Plasmopara viticola*. Extracts were prepared in ethanol to ensure their dissolution, and the final ethanol concentration was 1% (v/v). One percent of ethanol in water does not affect zoospore mobility and disease development.⁹ The level of sporulation was determined by visual scoring at 7 days post-inoculation as previously described.²¹

Grapevine cane extract (Vineatrol®) has recently been tested in greenhouse and vineyard.¹² It showed a significant anti-mildew action *in vivo* comparable to the copper product traditionally used. From these data, we evaluated the activity of the grapevine wood and root extracts and compared them with this active cane extract.

The bioactivity of the three stilbene extracts was tested at different concentrations (**Figure 2**). A wide range of concentrations (50-800 mg/l) was assayed. No inhibition was observed in the control at any concentration. Wood and root extracts totally inhibited the growth of *Plasmopara viticola* from 500 mg/L, as did cane extract from 800 mg/L (**Figure 2**). At 100 mg/L, sporulation was inhibited 3.1%, 32.0% and 62.6% by cane, root and wood extracts, respectively. Thus, the wood extract followed by root extract showed a better anti-mildew activity than the reference cane extract. Schnee et al.¹¹ tested various crude cane extracts at a set concentration against *Plasmopara viticola*, *Erisiphe necator* and *Botrytis cinerea*. However, they classified the extracts as fungitoxic (+)/non-fungitoxic (-) but did not report the percentage of sporulation inhibited. *Leontodon filii* extract has also been found to be moderately efficient against *Plasmopara viticola*.⁴³

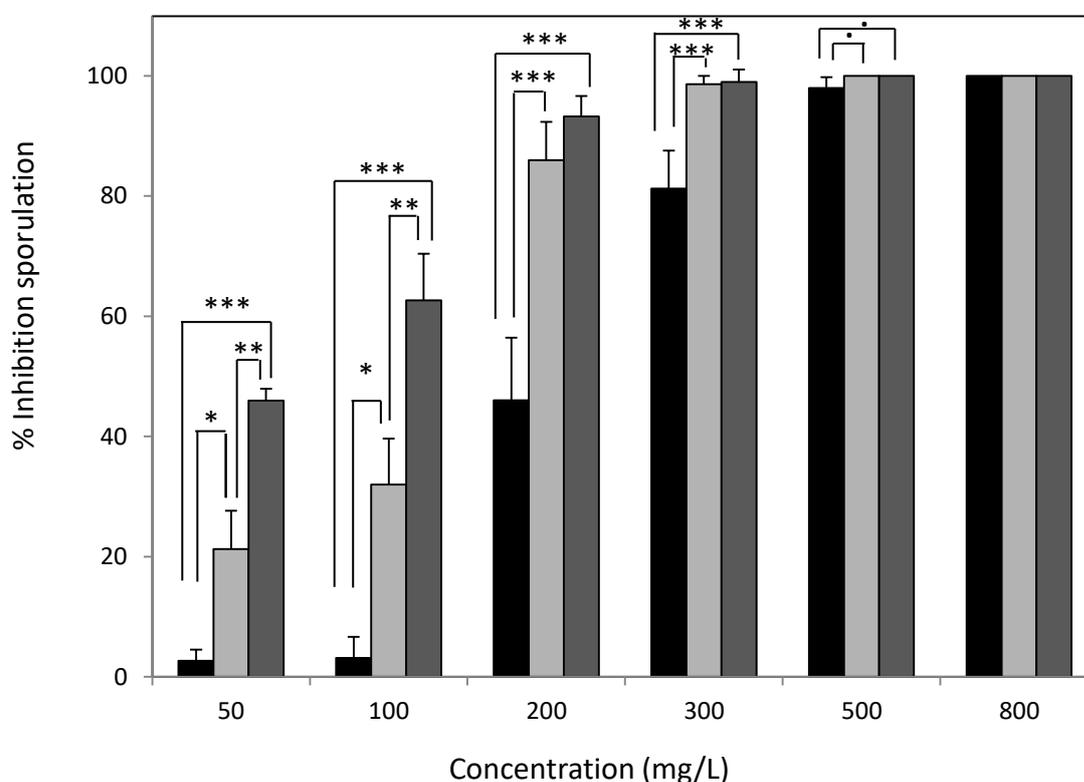


Figure 2. Effect of stilbene extracts (cane, root, and wood) on *Plasmopara viticola* sporulation in artificially inoculated leaf disc 7 days after inoculation. Results are expressed as means \pm SEM. Significant difference between each extract was set at *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, • $p < 0.1$. Black bar = cane extract, light gray bar = root extract, and dark gray bar = wood extract.

The IC_{50} , i.e. the concentration which inhibited 50% of disease development, was also determined for the extracts (cane, wood and root) by using dilution series. This allowed a more precise calculation of the IC_{50} values, as confirmed by the high correlation coefficient of each regression equation of the linear part of the sigmoid curve (**Table 3**). The lowest value was found for wood extract (60 mg/L), followed by root extract (120 mg/L) and cane extract (210 mg/L). Thus wood extract showed the highest antifungal activity (**Table 3**), more than three times superior to cane extract, although their stilbene levels were similar (**Table 2**). Remarkably, the

root extract with the lowest content of stilbenes had a huge anti-mildew activity, almost twice better than the cane extract.

IC₅₀ was then calculated for the main stilbenes found in the extracts. To this end, a previous purification of the main compounds was carried out as described in the materials and methods section. For pure stilbenes, data for IC₅₀ are expressed both in mg/L, for the purpose of comparison with the extract data, and in μM, so that results from other authors can be compared (**Table 3**).

The lowest IC₅₀, and thus the highest efficacy against *P. viticola*, was shown by r-viniferin (12 μM), followed by hopeaphenol (18 μM) and r2-viniferin (20 μM), in agreement with the findings of Schnee et al.,¹¹ who reported 12 and 26 μM for r-viniferin and hopeaphenol respectively. However, they did not determine IC₅₀ for r2-viniferin. Therefore, r-viniferin is as toxic as pterostilbene (IC₅₀ 12.7 μM) and δ-viniferin (IC₅₀ 14.7 μM),⁹ the most potent toxic stilbenes.³² IC₅₀ values higher than those found for r-viniferin were found for isohopeaphenol (45 μM), *E*-miyabenol C (103 μM) and *E*-ε-viniferin (155 μM), in increasing order. To our knowledge, this is the first time that IC₅₀ values are reported for r2-viniferin, isohopeaphenol and *E*-miyabenol C. However, lower IC₅₀ values have been reported for *E*-ε-viniferin, e.g. 63 and 71.2 μM.^{9,11}

Table 3. Concentration (mg/L) causing 50% inhibition of mildew development monitored by sporulation of *Plasmopara viticola*

	IC ₅₀ ^a	R ²
cane extract	210	1
root extract	120	1
wood extract	60	0.9717
ampelopsin A	438 (934*)	1
<i>E</i> -resveratrol	110 (484*)	0.9812
hopeaphenol	16 (18*)	1
isohopeaphenol	40 (45*)	0.9784
<i>E</i> -ε-viniferin	70 (155*)	1
<i>E</i> -miyabenol C	40 (103*)	0.9983
r2-viniferin	18 (20*)	0.9966
r-viniferin	10 (12*)	1

*Data expressed in μM. ^a Calculated from dose-response curves + correlation coefficients

The highest IC₅₀ values were found for *E*-resveratrol and ampelopsin A, 484 and 934 μM respectively (**Table 3**). In fact, *E*-resveratrol is considered to be a precursor of compounds of higher fungal toxicity rather than as an antifungal compound itself.⁴⁴ Our data are again in contrast with those of other authors. For example, Schnee et al.¹¹ reported 282 and 121 μM for the IC₅₀ of ampelopsin A and *E*-resveratrol, respectively, while Pezet et al.⁹ found 145 μM for the IC₅₀ of *E*-resveratrol. These differences in IC₅₀ values could be due to differences in the antifungal bioassays used. While the abovementioned authors prepared a mixture of zoospores and stilbenes and then added it on the leaves for curative purposes, stilbene solutions were added on the leaves in the current experiments and inoculated the zoospores one day later in order to test the preventive effect of the extracts on *Plasmopara viticola* infection. However, our results are in agreement with those of Malarcan et al.⁴⁵ showing a negative correlation between the degree of stilbene oligomerization in *Vitis* hybrid leaves and the evolution of *P. viticola* infection.

To summarize, we demonstrate the ability of stilbene extracts obtained from *Vitis vinifera* waste to inhibit *Plasmopara viticola*. Wood extract had the highest antifungal bioactivity against downy mildew *in vitro* followed by root extract and finally the reference cane extract. Root extract contained the lowest stilbene concentration but it showed a high antifungal bioactivity against *Plasmopara viticola in vitro*. The high concentrations of r-viniferin and to a lesser extent of r2-viniferin in root, coupled with a potential synergistic effect that may occur between stilbenes, could contribute to this fact. We confirm that r-viniferin is highly active against *P. viticola*. Although wood extract and cane extract showed similar total stilbene concentrations, the concentration of r2-viniferin, r-viniferin, hopeaphenol and isohopeaphenol in wood extract was higher than in cane extract, so this could account for the difference in their bioactivity. Moreover, the IC₅₀ data for r2-viniferin, isohopeaphenol and *E*-miyabenol C are reported for the first time.

The present findings strongly suggest that grapevine waste such as wood and roots from *Vitis vinifera* may be preferentially used as cheap sources of bioactive stilbenes for developing natural fungicides. Indeed, wood and roots together contain the four most active compounds (r-viniferin, r2-viniferin, hopeaphenol and isohopeaphenol) at high levels. The potential reduction in the use of toxic fungicides coupled with the exploitation of grapevine waste would represent a significant step forward in promoting sustainability in viticulture.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

¹H-NMR annotated spectrum of isolated stilbenes (Figure S1 to S11). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Jean-Michel Méryllon: phone, +33 5 57 57 59 50; email, jean-michel.merillon@u-bordeaux.fr

Notes

The authors declare no competing financial interest

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully thank StilNov Laboratory (ANR LabCom Project ANR-14-LAB5-0005-01) and Actichem (Montauban, France) for providing grapevine products for the purification of stilbene standards. The work was supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project). We are also grateful to S. Gambier for providing the plants and to D. Blancard for the illustrated pictures (INRA, UMR SAVE). Cantos-Villar thanks the mobility program Salvador de Madariaga from “Ministerio de Educación y Deporte” for financial support for her stay at the “Institut des Sciences de la Vigne et du Vin”.

REFERENCES

- (1) Gessler, C.; Pertot, I.; Perazzolli, M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathol. Mediterr.* **2011**, *50*, 3-44.
- (2) Directive 91/414/EEC. Commission of the European Union. 2009. Commission Directive 2009/37/EC. Official Journal of the European Union, L 104: 23-27.
- (3) Harm, A.; Kassemeyer, H. H.; Seibicke, T.; Regner, F. Evaluation of chemical and natural resistance inducers against downy mildew (*Plasmopara viticola*) in grapevine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2011**, *62*, 184-192.
- (4) Banani, H.; Roatti, B.; Ezzahi, B.; Giovannini, O.; Gessler, G.; Pertot, I.; Perazzolli, M. Characterization of resistance mechanisms activated by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole to downy mildew in different grapevine cultivars. *Plant Pathol.* **2014**, *63*, 334-343.
- (5) Aziz, A.; Poinssot, B.; Daire, X.; Adrian, M.; Bezier, A.; Lambert, B.; Joubert, J. M.; Pugin, A. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2003**, *16*, 1118-1128.
- (6) Saigne-Soulard, C.; Abdelli-Belhadj, A.; Téléf-Micouleau, M.; Cluzet, S.; Corio-Costet, M.F.; Méryllon, J.M. Oligosaccharides from *Botrytis cinerea* and elicitation of grapevine defense. In *Polysaccharides*. Ramawat, K.G., Merillon, J. M. Eds.; Springer International Publishing Switzerland, **2015**, *32*, 939-958.
- (7) Dufour, M. C.; Lambert, C.; Bouscaut, J.; Merillon, J. M.; Corio-Costet, M. F. Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*. *Plant Pathol.* **2013**, *62*, 370-382.
- (8) Boubakri, H.; Poutaraud, A.; Wahab, M.A.; Clayeux, C.; Baltenweck-Guyot, R.; Steyer, D.; Marcic, C.; Mliki, A.; Soustre-Gacougnolle, I. Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *BMC Plant Biology*, **2013**, *13*, 31-46.
- (9) Pezet, R.; Gindro, K. G.; Viret, O.; Richter, H. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis*. **2004**, *43*, 145-148.
- (10) Godard, S.; Slacanin, I.; Viret, O.; Gindro, K. Induction of defense mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiol. Biochem.* **2009**, *47*, 827-37.

- (11) Schnee, S.; Queiroz, E.F.; Voinesco, F.; Marcourt, L.; Dubuis, P.H.; Wolfender, J.L.; Gindro, K. *Vitis vinifera* canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *J Agric Food Chem.* **2013**, 61, 5459-5467.
- (12) Richard, T.; Abdelli-Belhad, A.; Vitrac, X., Waffo-Téguo, P.; Mérillon, J.-M. *Vitis vinifera* canes, a source of stilbenoids against downy mildew. *OENO One.* **2016**, 50, 137-143.
- (13) Chong, J.; Poutaraud, A.; Huguéney, P. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Sci.* **2009**, 177, 143–155.
- (14) Mattivi, F.; Vrhovsek, U.; Malacarne, G.; Masuero, D.; Zulini, L.; Stefanini, M.; Moser, C.; Velasco, R.; Guella, G. Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid *Vitis vinifera* (Merzling × Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *J Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 5364-5375.
- (15) Lambert, C.; Bisson, J.; Waffo-Téguo, P.; Papastamoulis, Y.; Richard, T.; Corio-Costet, M. F.; Mérillon, J. M.; Cluzet, S. Phenolics and their antifungal role in grapevine wood decay: focus on the *Botryosphaeriaceae* family. *J Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 11859-11868.
- (16) Teixeira, A.; Baenas, N.; Dominguez-Perles, R.; Barros, A.; Rosa, E.; Moreno, D. A.; Garcia-Viguera, C. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: a review. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 15638-15678.
- (17) Wang, W.; Tang, K.; Yang, H. R.; Wen, P. F.; Zhang, P.; Wang, H. L.; Huang, W. D. Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiol. Biochem.* **2010**, 48, 142-152.
- (18) Pawlus, A. D.; Waffo-Téguo, P.; Shaver, J. ; Mérillon, J. M. Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a review. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **2012**, 46, 57-111.
- (19) OIV, 2016. <http://www.oiv.int/en/databases-and-statistics/statistics>. Accessed 25 July 2016.
- (20) FranceAgriMer. L'observatoire national des ressources en biomasse. Évaluation des ressources disponibles en France. 2012. <http://www.franceagrimer.fr/Stockage-Actualites/Archives/2012/Observatoire-national-des-ressources-en-biomasse-evaluation-des-ressources>. Accessed 27 July 2016.
- (21) Corio-Costet M. F.; Dufour, M. C.; Cigna, J.; Abadie, P.; Chen, W. J. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *Eur. J. Plant Pathol.* **2011**, 129, 315-329.
- (22) Method for extracting resveratrol and/or ε-viniferin. Patent number WO 01/03713 A1.
- (23) Rivière, C.; Pawlus, A.D.; Mérillon, J. M. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in *Vitaceae*. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 1317-1333.
- (24) Pawlus, A. D.; Sahli, R.; Bisson, J.; Rivière, C.; Delaunay, J. C.; Richard, T.; Gomès, E.; Bordenave, L.; Waffo-Téguo, P.; Mérillon, J. M. Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species. *J Agric Food Chem.* **2013**, 61, 501-511.
- (25) Sombardier, A.; Dufour, M. C.; Blancard, D.; Corio-Costet, M. F. Sensitivity of *Podosphaera aphanis* isolates to DMI fungicides: distribution and reduced cross-sensitivity. *Pest Manag. Sci.* **2010**, 66, 35-43.
- (26) Dufour M.C.; Corio-Costet, M. F. Variability in the sensitivity of biotrophic grapevine pathogens (*Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*) to acibenzolar-S methyl and two phosphonates. *Eur. J. Plant Pathol.* **2013**, 136, 247–259.
- (27) Moss, R.; Mao, Q.; Taylor, D.; Saucier, C. Investigation of monomeric and oligomeric wine stilbenoids in red wines by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, 27, 1815–1827.
- (28) Gorena, T.; Saez, V.; Mardones, C.; Vergara, C.; Winterhalter, P.; Von Baer, D. Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chem.* **2014**, 155, 256–263.
- (29) Fernandez, M. I.; Guerrero, R. F.; García-Parilla, M. C.; Puertas, B.; Richard, T.; Rodriguez-Warner, M.; Winterhalter, P.; Monti, J.P.; Cantos-Villar, E. Isorhapontigenin: a novel bioactive stilbene from wine grapes. *Food Chem.* **2010**, 5, 219-224.
- (30) 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. *Mass Spectrom.* **2014**, 49, 860-9.
- (31) Reniero, F.; Rudolph, M.; Angioni, A.; Bernreuther, A.; Cabras, P.; Mattivi, F. Identification of two stilbenoids from *Vitis* roots. *VITIS-J. Grapevine Res.* **2015**, 35, 125.

- (32) Khan, M.A.; Nabi, S.G.; Prakash, S.; Zaman, A. Pallidol, a resveratrol dimer from *Cissus pallida*. *Phytochemistry*. **1986**, 25, 1945–1948.
- (33) Langcake, P.; Pryce, R.. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* **1976**, 9, 77–86.
- (34) Bavaresco, L.; Fregoni, M.; Trevisan, M.; Mattivi, F.; Vrhovsek, U.; Falchetti, R. The occurrence of the stilbene piceatannol in grapes. *VITIS-J. Grapevine Res.* 2002, 41, 133.
- (35) Langcake, P.; Pryce, R.. A new class of phytoalexins from grapevines. *Specialia*. **1977**, 151–152.
- (36) Korhammer, S.; Reniero, F.; Mattivi, F. An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochemistry*. **1995**. 38, 1501–1504.
- (37) Oshima, Y.; Kamijou, A.; Ohizumi, Y.; Niwa, M.; Ito, J.; Hisamichi, K.; Takeshita, M. Novel oligostilbenes from *Vitis coignetiae*. *Tetrahedron*. **1995**.51, 11979–11986.
- (38) Vergara, C.; von Baer, D.; Mardones, C.; Wilkens, A.; Wernekinck, K.; Damm, A.; Macke, S.; Gorena, T.; Winterhalter, P. Stilbene Levels in Grape Cane of Different Cultivars in Southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS Method. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 929–933.
- (39) Lambert, C.; Richard, T.; Renouf, E.; Bisson, J.; Waffo-Tégou, P.; Bordenave, L.; Ollat, N.; Mérillon, J. M.; Cluzet, S. Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *J. Agric Food Chem.* **2013**, 61, 11392-11393.
- (40) Guerrero, R.F.; Biais, B.; Richard, T.; Puertas, B.; Waffo-Teguo, P.; Merillon, J.-M.; Cantos-Villar, E. Grapevine cane's waste is a source of bioactive stilbenes. *Ind. Crops Prod.* **2016**, 94, 884–892.
- (41) Amalfitano, C.; Agrelli, D.; Arrigo, A.; Mugnai, L.; Surico, G.; Evidente, A. Stilbene polyphenols in the brown red wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by “esca proper”. *Phytopathol. Mediterr.* **2011**, 50, 224–235.
- (42) Esatbeyoglu, T.; Ewald, P.; Yasui, Y.; Yokokawa, H.; Wagner, A.E.; Matsugo, S.; Winterhalter, P.; Rimbach, G. Chemical characterization, free radical scavenging, and cellular antioxidant and anti-inflammatory properties of a stilbenoid-rich root extract of *Vitis vinifera*. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–11.
- (43) Tostão, Z.; Noronha, J.P.; Cabrita, E.J.; Medeiros, J.; Justino, J.; Bermejo, J.; A novel pentacyclic triterpene from *Leontodon filii*. *Fitoterapia*. **2005**, 76, 173-180.
- (44) Jeandet, P.; Douillet-Breuil, A.; Bessis, R.; Debord, S.; Sbaghi, M.; Adrian, M. Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 2731- 2741.
- (45) Malacarne, G. ; Vrhovsek, U. ; Zulini, L. ; Cestaro, A. ; Stefanini, M. ; Mattivi, F. ; Delledone, M. ; Velasco, R. ; Moser, C. Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. *BMC Plant Biol.* **2011**, 11, 1–14.

Supporting Information

Stilbenes from *Vitis vinifera* L. waste: a sustainable tool for controlling *Plasmopara viticola*

Julien Gabaston^a, Emma Cantos-Villar^b, Benoît Biais^a, Pierre Waffo-Teguo^a, Elodie Renouf^a, Marie-France Corio-Costet^c, Tristan Richard^a, Jean-Michel Méryllon^{a*}

^aUniversité de Bordeaux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de Recherche Enologie EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique (Gesvab) - Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, CS 50008 - 210, chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France

^bInstituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA), Rancho de la Merced, Junta de Andalucía, Ctra. Trebujena, Km 3.2, P.O. Box 589, Jerez de la Frontera 11471, Cádiz, Spain.

^cUMR Santé Végétale, 1065, ISVV, IFR 103, INRA, Rue Edouard Bourleaud, CS 20032, 33882, Villenave d'Ornon, France

*Corresponding author: jean-michel.merillon@u-bordeaux.fr

List of Supporting Information

Figure S1. ¹ H-NMR spectrum of ampelopsin A (CD ₃ OD, 600MHz)	S3
Figure S2. ¹ H-NMR spectrum of <i>E</i> -piceatannol (CD ₃ OD, 600MHz)	S4
Figure S3. ¹ H-NMR spectrum of pallidol (CD ₃ OD, 600MHz)	S5
Figure S4. ¹ H-NMR spectrum of <i>E</i> -resveratrol (CD ₃ OD, 600MHz)	S6
Figure S5. ¹ H-NMR spectrum of hopeaphenol (CD ₃ OD, 600MHz)	S7
Figure S6. ¹ H-NMR spectrum of isohopeaphenol (CD ₃ OD, 600MHz)	S8
Figure S7. ¹ H-NMR spectrum of <i>E</i> - ϵ -viniferin (CD ₃ OD, 600MHz)	S9
Figure S8. ¹ H-NMR spectrum of <i>E</i> -cis-trans-miyabenol C (acetone-d ₆ , 600MHz)	S10
Figure S9. ¹ H-NMR spectrum of <i>E</i> - ω -viniferin (CD ₃ OD, 600MHz)	S11
Figure S10. ¹ H-NMR spectrum of r2-viniferin (CD ₃ OD, 600MHz)	S12
Figure S11. ¹ H-NMR spectrum of r-viniferin (CD ₃ OD, 600MHz)	S13
REFERENCES	S14

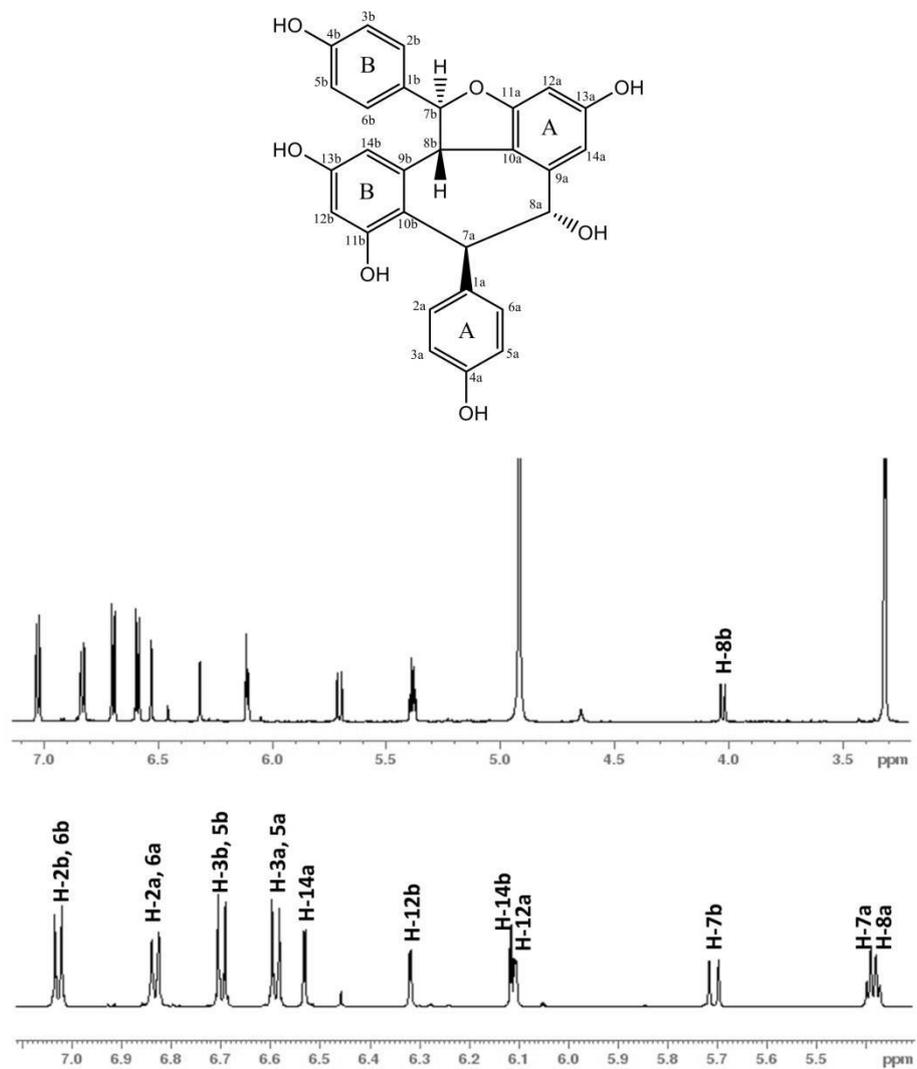


Figure S1. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of ampelopsin A (CD_3OD , 600MHz). ¹

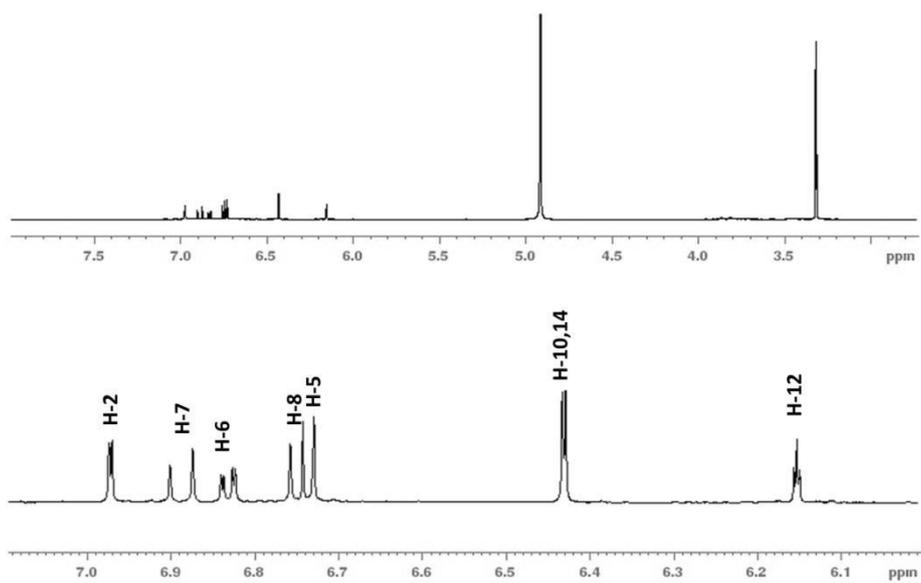
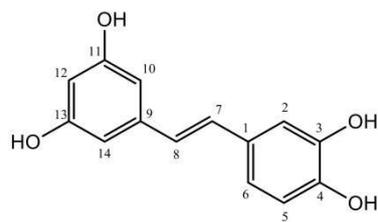


Figure S2. ¹H-NMR spectrum of *E*-piceatannol (CD₃OD, 600MHz).²

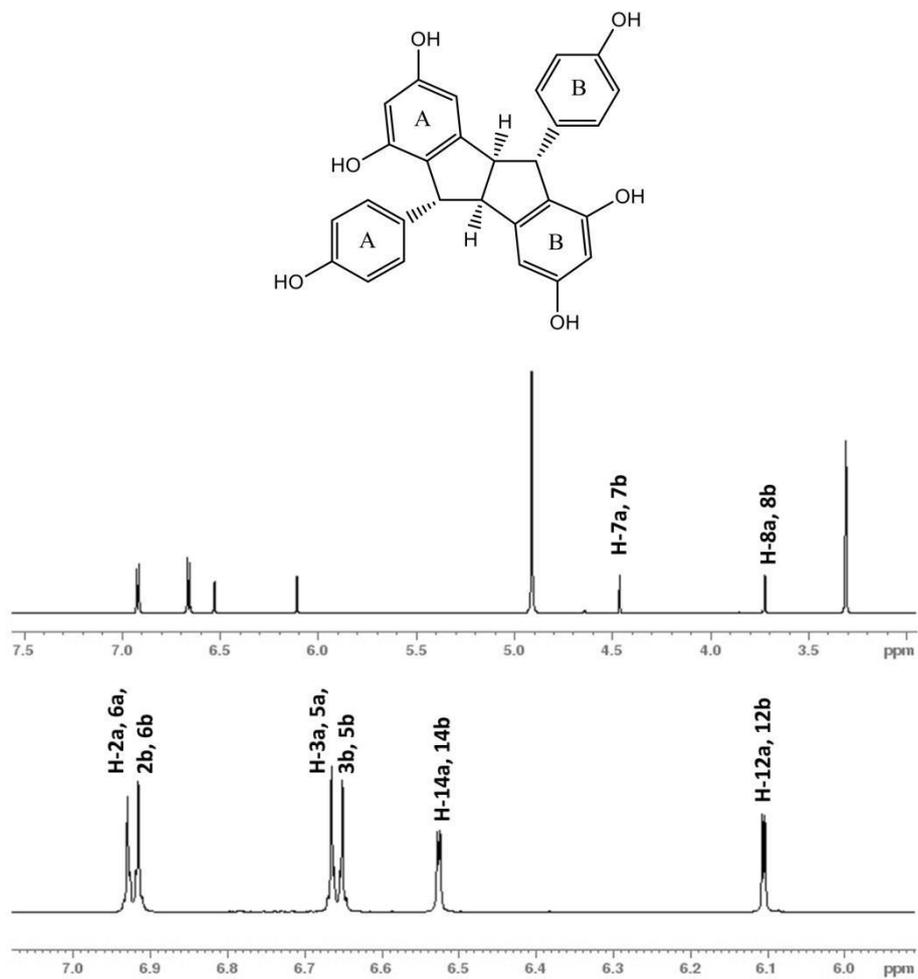


Figure S3. ¹H-NMR spectrum of pallidol (CD₃OD, 600MHz).³

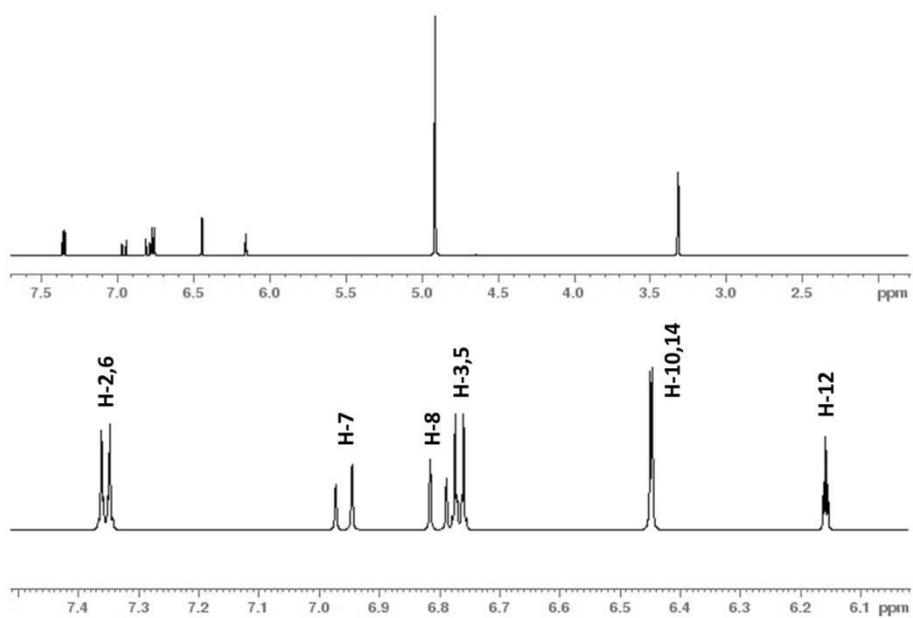
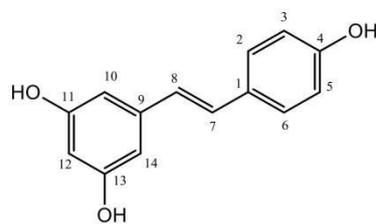


Figure S4. ¹H-NMR spectrum of *E*-resveratrol (CD₃OD, 600MHz).²

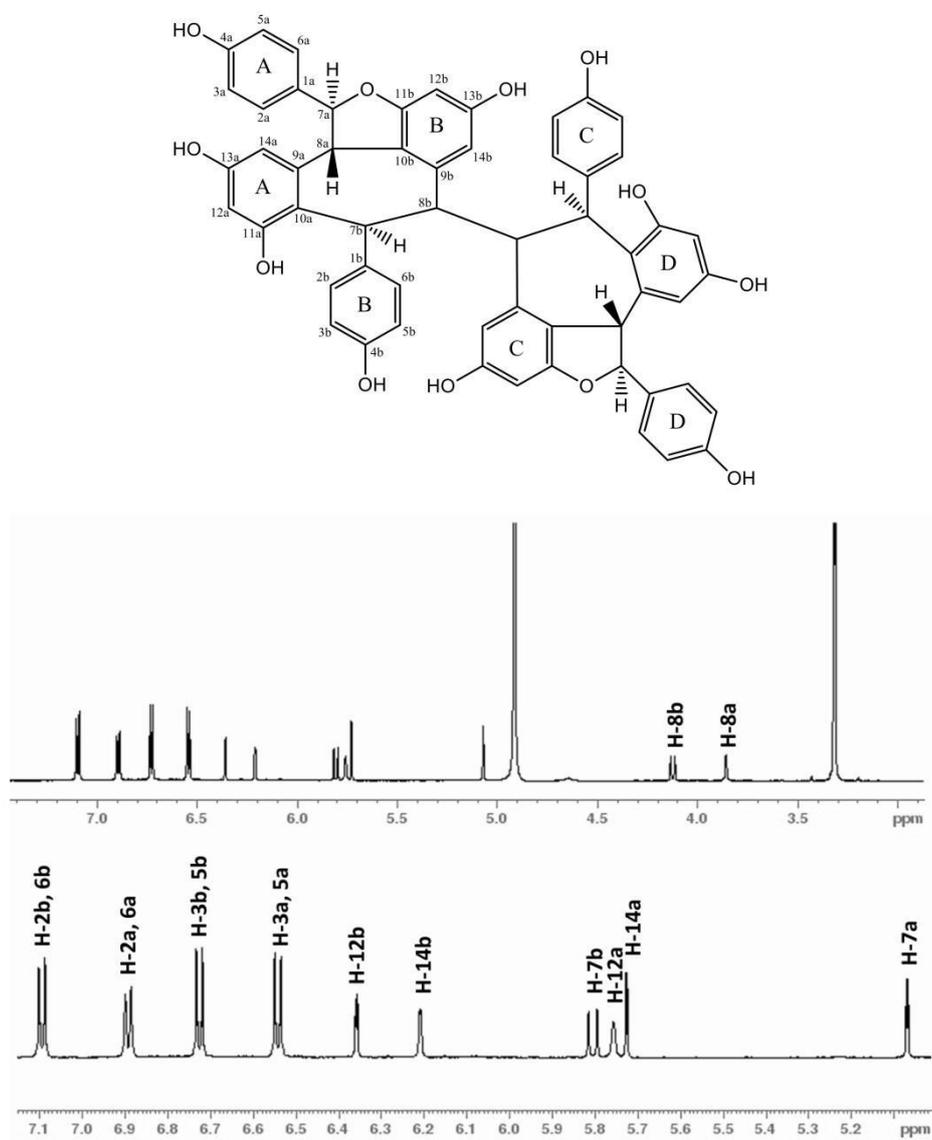


Figure S5. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of hopeaphenol (CD_3OD , 600MHz). ²

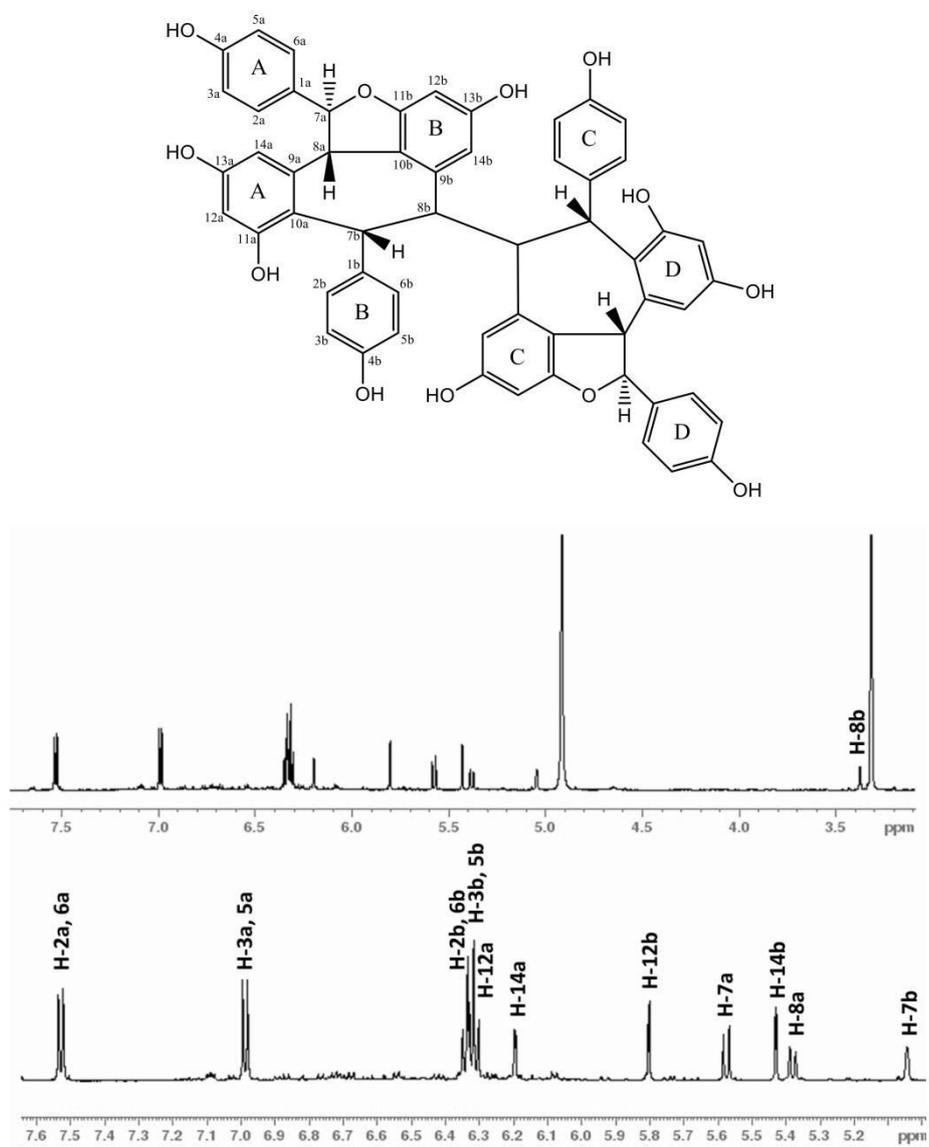


Figure S6. ¹H-NMR spectrum of isohopeaphenol (CD₃OD, 600MHz). ²



Figure S7. ¹H-NMR spectrum of *E-ε*-viniferin (CD₃OD, 600MHz). ⁴

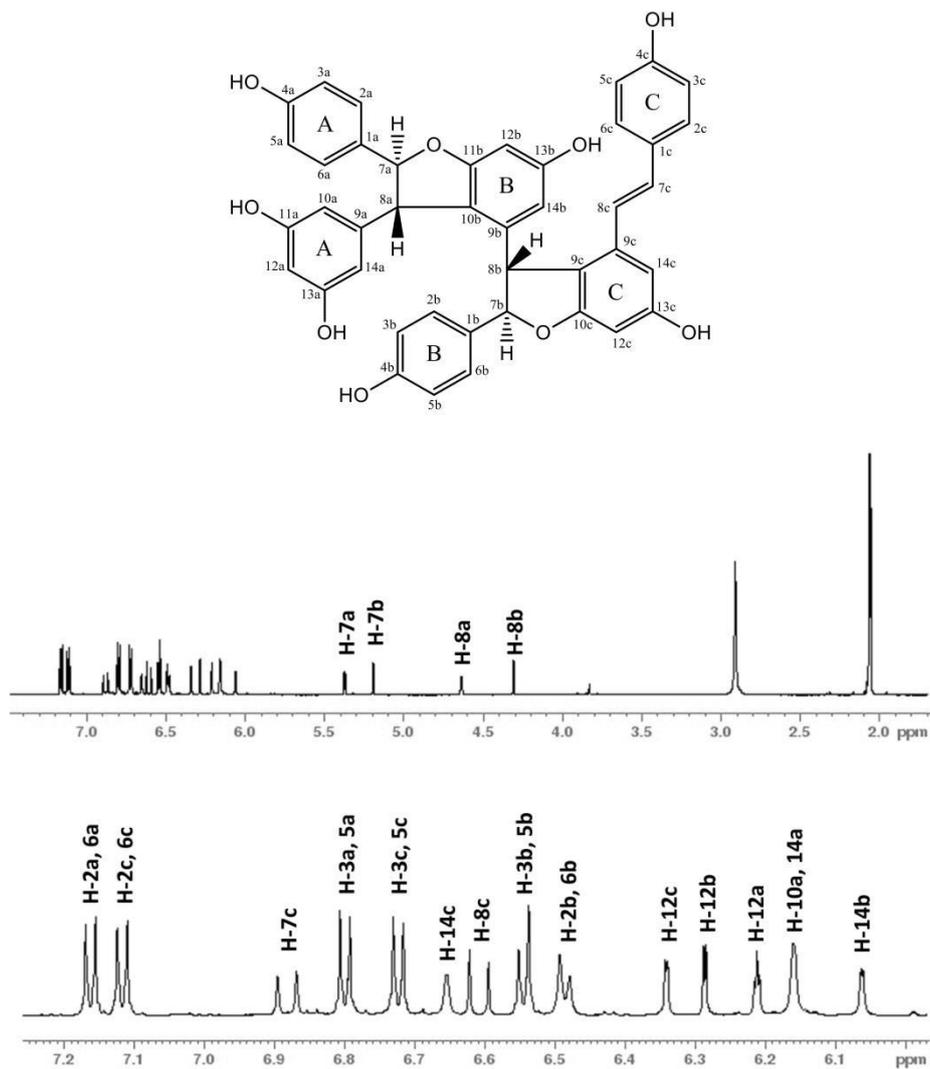


Figure S8. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of *E-cis-trans-miyabenol C* (acetone- d_6 , 600MHz).⁵

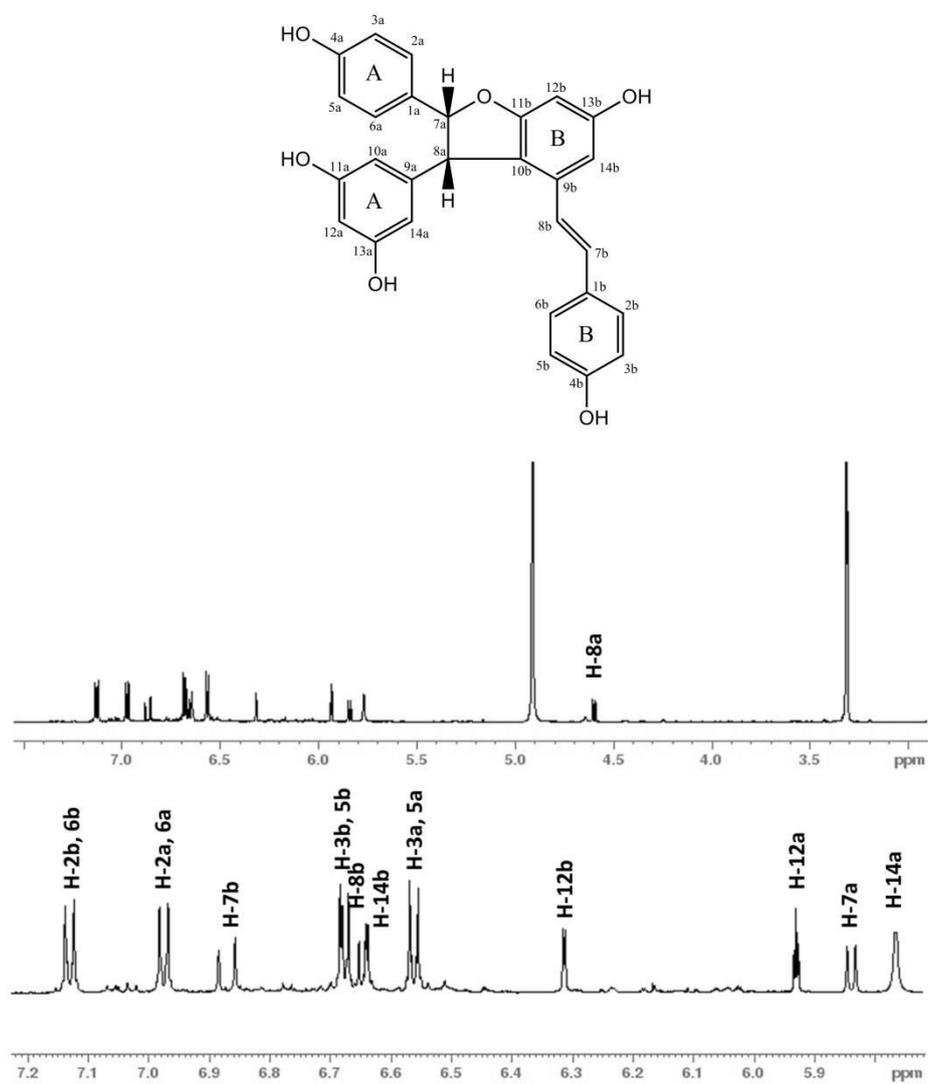


Figure S9. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of *E*- ω -viniferin (CD_3OD , 600MHz).⁴

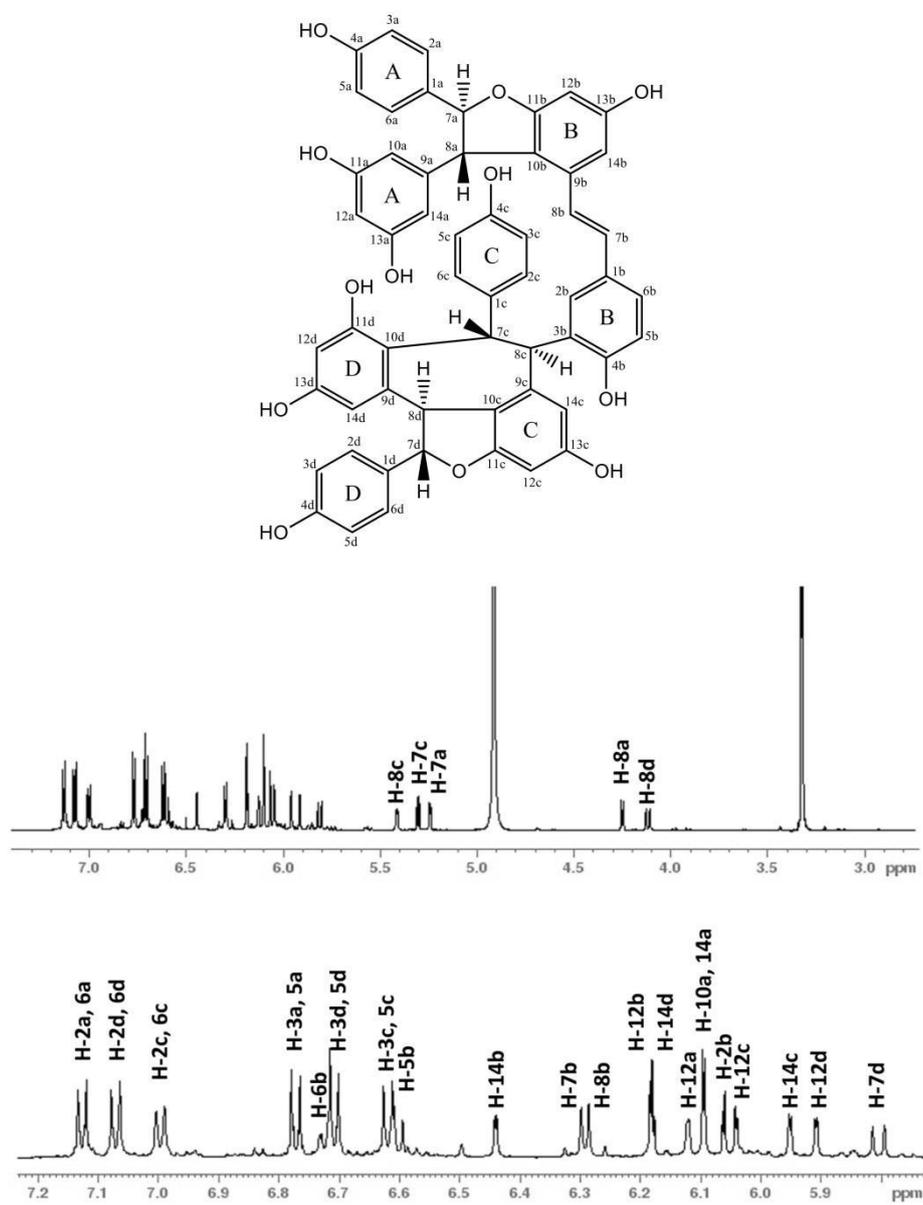


Figure S10. ¹H-NMR spectrum of r2-viniferin (CD₃OD, 600MHz).⁶

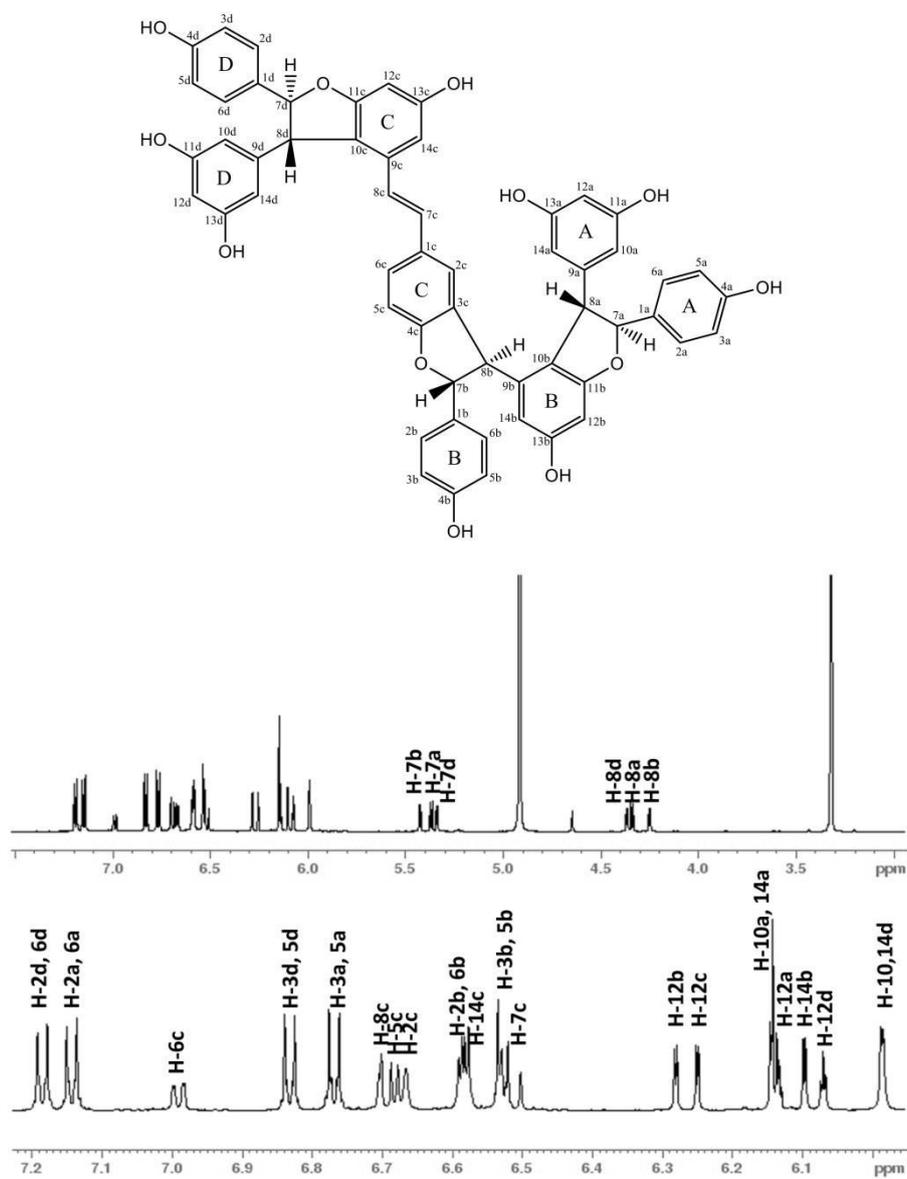


Figure S11. ¹H-NMR spectrum of r-viniferin (CD₃OD, 600MHz).⁷

REFERENCES

- (1) Kim, Y.M.; Lee, E. W.; Eom, S. H.; Kim, T. H. Pancreatic lipase inhibitory stilbenoids from the roots of *Vitis vinifera*. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2014**, *65*, 97–100.
- (2) Lambert, C.; Richard, T.; Renouf, E.; Bisson, J.; Waffo-Téguo, P.; Bordenave, L.; Ollat, N.; Mérillon, J. M.; Cluzet, S. Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *J. Agric Food Chem.* **2013**, *61*, 11392-11393.
- (3) Mattivi, F.; Vrhovsek, U.; Malacarne, G.; Masuero, D.; Zulini, L.; Stefanini, M.; Moser, C.; Velasco, R, Guella, G. Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid *Vitis vinifera* (Merzling × Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *J Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5364-5375.
- (4) Pawlus, A.D.; Cantos-Villar, E.; Richard, T.; Bisson, J.; Poupard, P.; Papastamoulis, Y.; Monti, J.-P.; Teissedre, P.-L.; Waffo-Téguo, P.; Mérillon, J.-M. Chemical dereplication of wine stilbenoids using high performance liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Chromatogr. A.* **2013**. 1289, 19–26.
- (5) Papastamoulis, Y.; Bisson, J.; Temsamani, H.; Richard, T.; Marchal, A.; Mérillon, J.-M.; Waffo-Téguo, P. New E-miyabenol isomer isolated from grapevine cane using centrifugal partition chromatography guided by mass spectrometry. *Tetrahedron.* **2015**. *71*, 3138–3142.
- (6) Korhammer, S.; Reniero, F.; Mattivi, F. An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochemistry.* **1995**. *38*, 1501–1504.
- (7) Oshima, Y.; Kamijou, A.; Ohizumi, Y.; Niwa, M.; Ito, J.; Hisamichi, K.; Takeshita, M. Novel oligostilbenes from *Vitis coignetiae*. *Tetrahedron.* **1995**. *51*, 11979–11986.

Chapitre II. Les ceps et racines de vigne, sources de stilbènes complexes

A. Stratégie

L'étude précédente a mis en exergue la potentialité d'application d'extraits issus de coproduits viticoles dans le domaine de la santé végétale et plus particulièrement dans la lutte contre le mildiou de la vigne. Deux extraits se sont illustrés du fait de leurs fortes activités antifongiques, les extraits de ceps et racines de vigne. Ces deux parties végétatives de la vigne se sont distinguées par leur richesse en stilbènes tétramériques qui leur confèrent leurs propriétés anti-mildiou.

Cependant, il est important de noter que la vigne est marquée par une grande diversité génétique de par l'association d'un greffon conférant la qualité du fruit et d'un porte-greffe donnant la résistance à certaines maladies. On dénombre ainsi plus de 100 cépages différents utilisés pour l'élaboration du vin et jusqu'à 80 porte-greffes. Cette variabilité peut donc engendrer des changements de teneurs en stilbènes et ainsi impacter la valorisation de ces sous-produits.

A l'heure actuelle, très peu d'études se sont intéressées à ces deux parties de la vigne comme source de composés à forte valeur ajoutée. Ces deux sous-produits de la viticulture sont disponibles lors de l'arrachage des vignes qui peut intervenir lorsque le vignoble est trop vieux, qu'il doit être remplacé ou pour toutes autres raisons. La nécessité de contact et de partenariat avec les vignobles pour l'approvisionnement de ces matières végétales a pu rendre difficile leur accessibilité et donc leur étude.

En ce sens, ce projet vise à étudier les teneurs en stilbènes dans les ceps et racines de vigne provenant de différentes combinaisons cépages/porte-greffe. Le point de mire de cette étude est de déterminer quels cépages et quels porte-greffes sont les plus riches en stilbènes complexes et seraient donc les plus intéressants à valoriser. De plus, la distribution des stilbènes à travers la vigne est étudiée afin d'apprécier quels organes seraient en mesure d'être exploités en priorité.

On peut s'attendre à une diversité qualitative et quantitative de la composition en stilbènes du fait de la diversité génétique des couples cépages/porte-greffe. Un effet d'oligomérisation des stilbènes des parties aériennes vers les parties souterraines avait été mis en évidence dans la précédente étude. Il sera donc intéressant de voir si ce phénomène peut être généralisé chez la vigne.

B. Design Expérimental

B.1. Matériel végétal

La collaboration avec différents vignobles français a permis d'obtenir différentes associations cépage/porte-greffe s'efforçant de représenter les combinaisons communes en France :

Région de Bordeaux	Merlot x Gravesac Cabernet Sauvignon x 101-14 Millardet et Grasset Cabernet Sauvignon x 4010 Castel Chardonnay x Fercal
Région Vallée de la Loire	Gamay Noir x 3309 Couderc Cabernet Franc x 3309 Couderc Sauvignon Blanc x 3309 Couderc Chenin Blanc x Riparia Gloire de Montpellier
Région Sud-Ouest	Tannat x Gravesac

Cinq pieds vignes par condition ont été récupérés permettant une bonne représentativité des échantillons (**Figure 32**). Cette multiplicité de prélèvement tend ainsi à éviter un potentiel biais par la présence d'un pied de vigne touché par certaines maladies du bois qui pourraient impacter les teneurs en stilbènes. Aucun des pieds de vigne récoltés ne présentait une zone de nécrose.



Figure 32. Exemple de vigne récoltée (Tannat x Gravesac).

Afin d'étudier la distribution précise des stilbènes tout au long de la vigne, il a été choisi de séparer la plante en sept parties distinctes (**Figure 33**). On considèrera que la dénomination « cépage » correspond aux parties aériennes avec les sarments (1), les bras (2) et le tronc supérieur (3) alors que la dénomination « porte-greffe » équivaut aux parties souterraines avec le tronc inférieur (5), les racines (6) et les radicelles (7). Une zone intermédiaire correspondant au point de connexion entre le cépage et le porte-greffe est appelée zone de greffage (4).

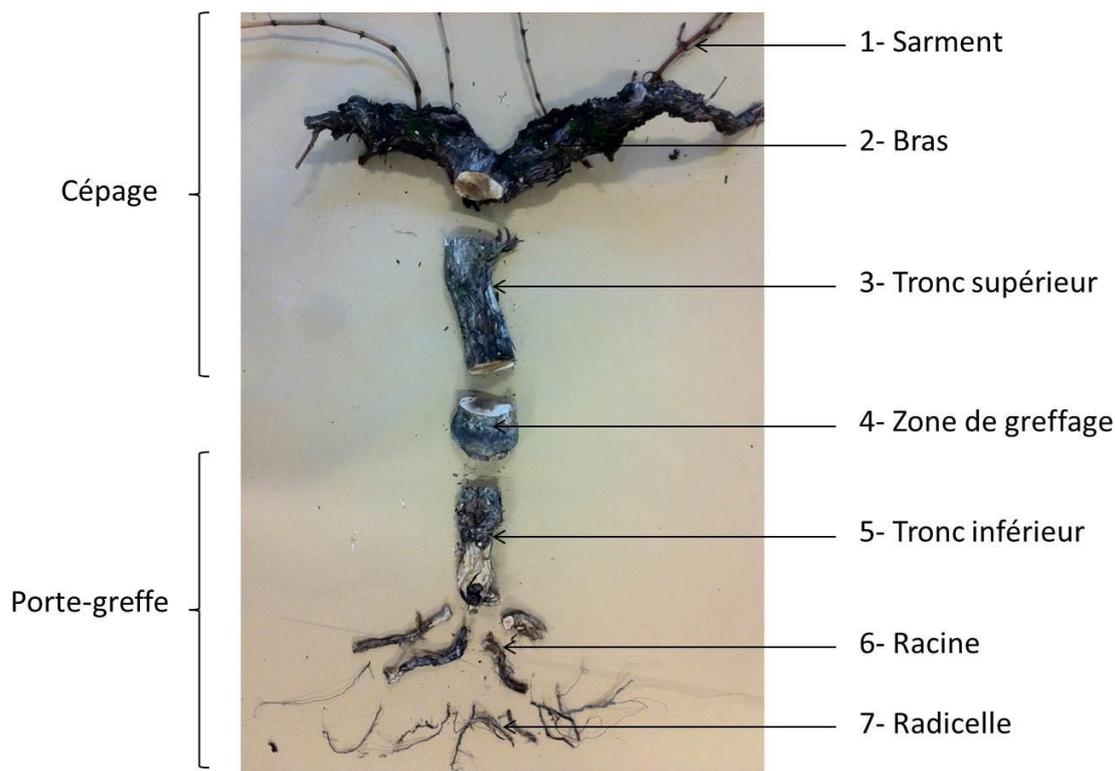


Figure 33. Parties de la vigne étudiées.

B.2. Extraction

La méthode d'extraction s'inspire des conditions utilisées préalablement avec un système de solvant basé sur un mélange hydro-alcoolique. Cependant, le nombre conséquent de combinaisons cépage/porte-greffe couplé à la division de la plante en sept parties et la volonté de réaliser des extractions en triplicata nécessite une adaptation du protocole. En ce sens, l'utilisation d'un extracteur ASE (Extraction Accélérée par Solvant) a été requise. Cet outil permet la réalisation d'extraction automatisée avec une gestion de la température, de la pression ou encore de la filtration, facilitant ainsi la multiplication des échantillons avec une bonne répétabilité.

Ainsi, les extractions ont été effectuées sur 5 g de matériel végétal déposé dans une cellule ASE de 34 mL contenant un filtre. Une solution éthanol/eau à 85/15 (v/v) a été utilisée avec une température contrôlée à 60°C et une pression de 100 bars. Trois cycles de 5 min correspondant à trois extractions successives indépendantes ont été réalisés. Le solvant organique a été ensuite éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif. La phase aqueuse a été congelée puis lyophilisée afin d'obtenir une poudre homogène. Les différentes extractions ont été effectuées en triplicata.

L'ensemble des extraits a ensuite été analysé par CLUHP-DAD-SM afin d'identifier et quantifier les différents stilbènes présents.

B.3. Purification

L'étude précédente a permis la caractérisation de 11 stilbènes dans les extraits de sarments, ceps et racines de vigne. Cependant, les analyses CLUHP-DAD-SM des extraits issus de différents cépages/porte-greffes ont permis de mettre en évidence d'autres stilbènes en quantité non négligeable. Le but de cette étape de purification est d'isoler ces composés afin de compléter la caractérisation des extraits viticoles et d'enrichir la base de données des stilbènes. Cela permettra également de pouvoir doser précisément ces composés avec leur propre étalon.

La purification des composés a été réalisée par CLHP préparative. Il a été choisi de travailler sur l'extrait de racine de vigne issu du couple Merlot x Gravesac du fait de sa richesse en stilbènes. Un total de 11 composés ont été récupérés en fonction de deux longueurs d'onde (280 et 306 nm) comme indiqué sur la **Figure 34**. Les composés indiqués en rouge correspondent aux stilbènes non caractérisés dans la précédente étude alors que les composés indiqués en noir sont déjà connus. Ces composés ont été analysés par CLUHP-DAD-SM et RMN.

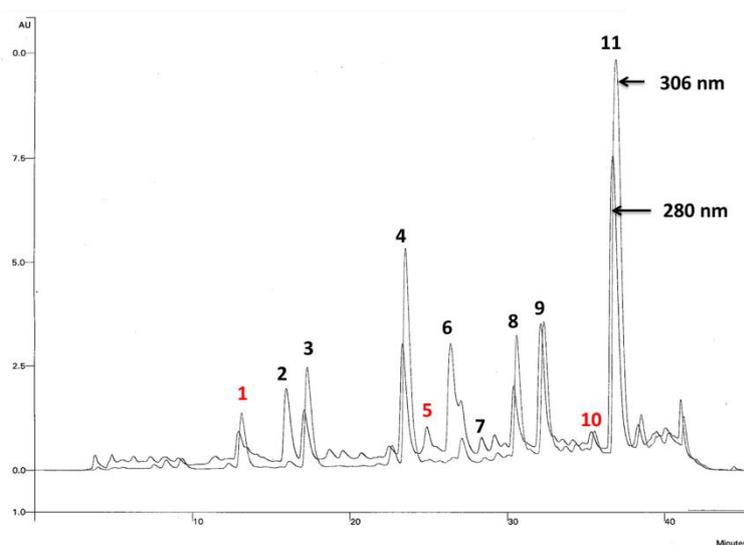


Figure 34. Chromatogrammes CLHP préparative à 280 nm et 306 nm de l'extrait de racine de vigne.

Ainsi, l'isolement des composés a permis l'obtention des stilbènes déjà identifiés : **2**, ampélopsine A ; **3**, (*E*)-picéatannol ; **4**, (*E*)-resvératrol ; **6**, hopéaphénol ; **7**, isohopéaphénol ; **8**, (*E*)- ϵ -viniférine ; **9**, vitisine A ; **11**, vitisine B. L'utilisation des outils analytiques ont permis la caractérisation de trois autres stilbènes : **1**, (*E*)-picéide ; **5**, viniférol E ; **10**, ampélopsine F.

En outre, le reliquat d'extrait obtenu après l'isolement de ces composés est conservé. En effet, la purification des composés majoritaires permet de faire émerger des composés plus minoritaires dans l'extrait dit « déchet ». Cet extrait a fait l'objet d'une nouvelle étape de purification permettant l'isolement de quatre autres stilbènes indiqués en rouge (**Figure 35**).

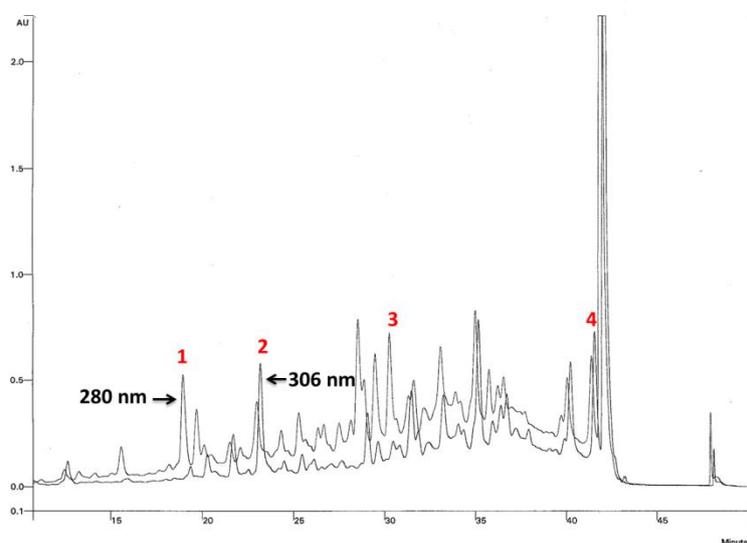


Figure 35. Chromatogrammes CLHP préparative à 280 nm et 306 nm de l'extrait « déchet » de racine de vigne.

Les analyses CLUHP-DAD-SM et RMN, corrélées aux données de la littérature, ont permis l'identification de ces stilbènes: **1**, ampélopsine F ; **2**, parthénocissine A ; **3**, ampélopsine H; **4**, vitisine C. De plus, le pallidol, la (*E*)- ω -viniférine et le miyabénol C déjà présents dans l'étude préalable font également partie des molécules à disposition.

C. Résumé des résultats

Les données UV basées sur la longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}), les informations des ions moléculaires et les ions produits par fragmentation SM/SM ainsi que les données structurales par RMN ont permis la détermination des différentes molécules. Ainsi, une "banque" de stilbènes riche de

18 composés a permis la caractérisation des extraits viticoles. Le **Tableau 4** est une mise à jour de ces stilbènes en fonction de leur degré d'oligomérisation.

Tableau 4. Stilbènes identifiés dans les extraits viticoles.

Monomères	Dimères	Trimères	Tétramères
(<i>E</i>)-picéatannol	ampélopsine A	(<i>E</i>)-miyabénol C	hopéaphénol
(<i>E</i>)-resvératrol	pallidol	(<i>E</i>)-ampélopsine E	isohopéaphénol
(<i>E</i>)-picéide	(<i>E</i>)- ϵ -viniférine		vitisine A (r2-viniférine)
	(<i>E</i>)- ω -viniférine		vitisine B (r-viniférine)
	ampélopsine F		vitisine C
	(<i>E</i>)-parthénocissine A		viniférol E
			ampélopsine H

La séparation de la vigne en sept parties avait pour vocation de suivre la distribution des stilbènes tout au long de la plante. Ainsi, il a été mis en évidence que les monomères sont essentiellement localisés dans les sarments de vigne (30% des stilbènes totaux) avec notamment une forte présence de (*E*)-resvératrol (0,3-4,4 g/kg MS). Les dimères, à l'image de l'(*E*)- ϵ -viniférine (moyenne de 3.7 g/kg MS), sont concentrés majoritairement dans la partie bois (bras, tronc supérieur et zone de greffage) représentant environ 45% des stilbènes totaux. Les tétramères sont quant à eux principalement accumulés dans le tronc inférieur, les racines et radicelles, représentant respectivement 50%, 69% et 73% des stilbènes, s'appuyant notamment sur une forte concentration en vitisine B qui peut atteindre jusqu'à 24,3 g/kg MS. Ces observations sont similaires pour toutes les combinaisons cépage/porte-greffe à disposition.

Ainsi, ce phénomène d'oligomérisation croissante des stilbènes des sarments vers les racines en passant par la partie bois a pu être généralisé chez la vigne. Ces données métabolomiques de la vigne, mises en évidence pour la première fois, permettent donc d'appréhender les besoins en certains composés en fonction des applications souhaitées, par exemple les tétramères présents dans la partie basse de la vigne pour la santé végétale.

En outre, cette étude avait pour objectif d'évaluer la diversité et les teneurs en stilbènes dans différents cépages et différents porte-greffes.

L'évaluation des cépages portait sur huit cultivars différents en fonction des données en stilbènes sur les bras, le tronc supérieur et la zone de greffage. Ainsi, trois cépages se sont distingués dont le Tannat présentant une moyenne de 19,4 g/kg MS dans ces trois parties de la vigne, le Merlot avec une moyenne de 18,1 g/kg MS et le Gamay Noir avec une moyenne de 16.9 g/kg MS. Au contraire, le cépage Chardonnay est un des moins riches en stilbènes avec une moyenne de 9,9 g/kg MS.

La comparaison de six porte-greffes a également été réalisée en se basant sur les teneurs en stilbènes dans le tronc inférieur, les racines et radicelles. Le porte-greffe Gravesac avec des teneurs en stilbènes dans les racines à hauteur de 31,0 g/kg MS et dans les radicelles à 43,1 g/kg MS ainsi que le porte-greffe Fercal avec respectivement 28,1 et 39,0 g/kg MS dans les racines et radicelles sont les plus riches en stilbènes. Au contraire, le porte-greffe 4010 Castel présentant des teneurs dans les racines et radicelles à 16,3 et 20,1 g/kg MS, respectivement, est un des porte-greffes les moins prolifiques en stilbènes.

Ainsi, cette étude a permis de mettre en lumière un phénomène physiologique d'oligomérisation croissante des stilbènes des parties aériennes vers les parties souterraines. Cet évènement semble général chez la vigne, quelque soit la diversité génétique générée par les différentes combinaisons greffon/porte-greffe. En outre, ces travaux ont mis en exergue une forte teneur en stilbènes dans certains cépages tels que le Tannat, le Merlot ou le Gamay Noir ainsi que certains porte-greffes comme le Gravesac et le Fercal. En fonction des besoins et des applications potentielles, ces résultats permettent ainsi d'aiguiller vers les meilleures sources en stilbènes.

D. Publication

Les résultats ont été rédigés sous forme d'un article scientifique intitulé « Wood and roots of major grapevine cultivars and rootstocks: a comparative analysis of stilbenes by UHPLC-DAD-MS/MS and NMR », qui a été soumis le 28 Août 2018 dans *Phytochemical Analysis* et accepté le 21 Novembre 2018.

Wood and roots of major grapevine cultivars and rootstocks: a comparative analysis of stilbenes by UHPLC-DAD-MS/MS and NMR

Julien Gabaston,¹ Cécile Leborgne,¹ Pierre Waffo-Teguo,¹ Josep Valls,¹ Antonio Palos Pinto,¹ Tristan Richard,¹ Stéphanie Cluzet,¹ Jean-Michel Méryllon^{1*}

¹Univ. Bordeaux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de Recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique - ISVV, 33882 Villenave d'Ornon cedex, France

*Corresponding author (Tel: +33 5 57 57 59 50; E-mail: jean-michel.merillon@u-bordeaux.fr)

Funding information

French Ministry of Higher Education and Research, Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

ABSTRACT

Introduction: Grapevine wood and roots are by-products obtained during vineyard management. This plentiful biomass is known to be rich in stilbenes and can be used as a source of high-value compounds as well as active natural extracts. However, the stilbenes in grapevine wood and roots from different cultivars and rootstocks remain to be characterized.

Objective: The present study investigated the stilbene content of eight major *Vitis vinifera* cultivars and six different rootstocks. In addition, the distribution of stilbenes was established for each of seven parts into which the plants were sub-divided.

Methodology: For stilbene characterization and quantification purposes, an ultra-high performance liquid chromatography-diode array detector-mass spectrometry (UHPLC-DAD-MS/MS) analysis of different samples was carried out. Moreover, structural data of stilbenes was unambiguously studied by nuclear magnetic resonance (NMR) spectra.

Results: Whatever the cultivar/rootstock combination, stilbenes were found to be oligomerized from the aerial part to the root system. Furthermore, stilbene content varied widely depending on the cultivars and rootstocks. For instance, the cultivars Merlot, Tannat and Gamay noir were the richest in stilbenes while the rootstocks Gravesac, Fercal and 3390C contained the highest amounts.

Conclusion: These findings provide insight into the knowledge that major grapevine cultivars and rootstocks can be used as a potential source of complex stilbenes.

Keywords: Grape variety, scion, rootstock, stilbene, resveratrol, viniferin, vitisin

1. INTRODUCTION

Grapevines are among the most widely cultivated plants in the world. In the 19th century, Europe faced one of the deadliest vineyard diseases called phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*), a soil-borne aphid which had destroyed nearly 70% of French vineyards by 1884.¹ Since then, the European species *Vitis vinifera* which confers quality has been grafted to the wild American *Vitis* rootstock which controls phylloxera and other soil-borne pests.² Rootstocks also play a role in response to various abiotic stresses (salinity, drought, limestone) as well as modify the vigor of the scion, biomass accumulation, yield and phenology.³⁻⁵ Nowadays, approximately 70 to 80 rootstocks are used worldwide due to their beneficial characteristics.² Regarding the scion, there are currently more than 6000 grape varieties listed in the world. Among them, only a hundred *V.*

vinifera varieties are used for winemaking and only a few are used in France such as Merlot, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Sauvignon Blanc, Chardonnay and Gamay.⁶ As a consequence, the large number of cultivars combined with the various rootstocks has contributed to increasing the variability and adaptation of grapevine in the vineyard.

As fruit quality also depends on good vineyard management, regular vineyard upkeep generates large quantities of waste. The vine needs pruning every year, leading to an average volume of two tons per hectare per year depending on the variety.⁷ With a total surface area between 700,000 and 800,000 hectares, France generates about 1.4 million tons of grapevine canes per year.⁸ In addition, if the vineyard is too old and needs to be replaced, the uprooting of vines generates considerable biomass. Therefore, France produces between 0.3 and 0.4 million tons of wood and roots per year.^{8,9} These by-products, which until now is characterized with low added value, are known to be rich in polyphenols, especially in stilbenes.

Stilbenes are phenolic compounds derived from the phenylpropanoid pathway of the secondary metabolism of plants. They possess a wide range of compounds from monomers to octamers with various derived forms such as glycosylated, methylated, isomerized and isoprenylated.¹⁰⁻¹¹ Stilbenes are generally known as phytoalexins for their role in plant resistance to various pathogens.¹² Several studies have shown the antifungal activity of complex stilbenes on *Plasmopara viticola* (downy mildew), *Botrytis cinerea* (gray mold) and *Erysiphe necator* (powdery mildew), the three major fungal pathogens affecting grapevines.^{13,14} Another study also reported the ability of complex stilbenes to reduce the growth of grapevine wood decay fungi.¹⁵ Subsequently, plant extracts rich in stilbenes could be an alternative or complementary strategy to chemical pesticides. Recent findings have demonstrated the large quantity of complex stilbenes in grapevine wood and roots, mainly tetramers such as vitisin A, vitisin B and hopeaphenol. The latter have greater antifungal efficacy than the monomeric and dimeric stilbenes, so the potential for this biomass is clear.¹⁶

The characterization of stilbenes in plant extracts depends widely on the chosen analytical methodology. A combination of techniques providing different orthogonal data (such as m/z, tandem MS fragmentation data, photodiode array spectra, full ¹H and/or ¹³C NMR, 2-D NMR spectra, retention time, etc.) is highly advantageous for metabolite identification.¹⁷ Thus, we applied different methodologies to ensure the orthogonality of the data. Ultra-high performance liquid chromatography coupled with diode-array detector and tandem mass spectrometry (UHPLC-DAD-MS/MS) is a robust and sensitive technique for the analysis of stilbenes. The DAD detector provides preliminary structural data based on the UV absorption properties of stilbenes, whose chromophores usually exhibit three bands of absorption, named band I (308-336 nm), II (281-313 nm) and III (around 230 nm).¹⁸ Band III is associated with the presence of phenolic moieties. These absorption peaks can help in the rapid screening of stilbenes in the sample. Furthermore, the UV data can be used to discriminate isomers. Trans-stilbenes show a predominant intensity in bands I and II whereas cis-stilbenes exhibit maximal absorption in band II. On the other hand, tandem mass spectrometry is used to obtain information about molar masses of compounds, which correspond to the molecular ion (MS data), as well as about the fragmentation of this molecular ion (MS/MS data). The fragments produced are specific to each molecule and provide useful information on the structure of the compounds.⁶ Unfortunately, MS techniques cannot be used to discriminate stereoisomeric stilbenes due to similar fragment patterns. Accordingly, NMR analyses should be carried out to unequivocally assign the structure of each compound. One-dimensional NMR analysis can be used to determine the nature of the aromatic ring, the nature of conjugated double bonds and the presence of associated forms (methyl, glucose).¹⁹ Two-dimensional NMR (COSY, ROESY, HSQC, HMBC) is based on proton-proton and proton-carbon couplings and can be used to define the connectivity of the main atoms of the whole oligomers.²⁰ Therefore, by combining the supplementary data obtained by the different spectroscopic techniques, we ensured the accurate characterization of the compounds in the extract.

Currently, grapevine by-products are under-exploited with little information available on stilbene amounts in grapevine wood and roots from different cultivars and rootstocks. Therefore, we decided to fill the gap by comparing different combinations of major cultivars and rootstocks from various vineyards. The findings extend the knowledge on stilbenes in these grapevine parts and highlight the most proliferative grape varieties and rootstocks for developing natural extracts.

2. EXPERIMENTAL

2.1 Plant material

The cultivar / rootstock combinations were harvested in several vineyards in France. For each combination, five grapevine plants were deposited in the Molécules d'Intérêt Biologique (MIB) laboratory at ISVV (Villenave d'Ornon, France). The grapevine plants showed no symptoms of wood diseases. The cultivars, rootstocks, planting dates and grapevine origin are listed in **Table 1**. The combinations Tannat x Gravesac and Cabernet Franc x 3309C did not have any canes at the time of uprooting.

Table 1. Cultivar/rootstock combinations, planting date and origins.

Cultivar	Rootstock	Planting date	Origin (city, region, country)
Merlot	Gravesac	1990	St Laurent du Bois (Region of Bordeaux, France)
Cabernet Sauvignon	101-14 MGt	1986	Villenave d'Ornon (Region of Bordeaux, France)
Cabernet Sauvignon	4010 Castel	1984	Villenave d'Ornon (Region of Bordeaux, France)
Chardonnay	Fercal	2009	Villenave d'Ornon (Region of Bordeaux, France)
Tannat	Gravesac	1993	Crouseilles (Region of Madiran, France)
Chenin blanc	Riparia GM	1942	Vouvray (Region of Val de Loire, France)
Gamay noir	3309C	1977	Fougères sur Bièvre (Region of Val de Loire, France)
Sauvignon blanc	3309C	1968	Fougères sur Bièvre (Region of Val de Loire, France)
Cabernet Franc	3309C	1946	Chinon (Region of Val de Loire, France)

MGt = Millardet et Grasset, GM = Gloire de Montpellier, C = Couderc

The grapevine plants were cut into seven parts as follows: canes, arms, upper trunk, grafting zone, lower trunk, roots, and rootlets (**Figure 1**). The scion cultivar is the aerial part with cane, arm and upper trunk, the rootstock is composed of the lower trunk, the roots and rootlets, while the point of connection between these two parts is called the grafting zone. Each sample was ground, dried for two weeks in an oven at 35 °C and then stored in a dry place until extraction.

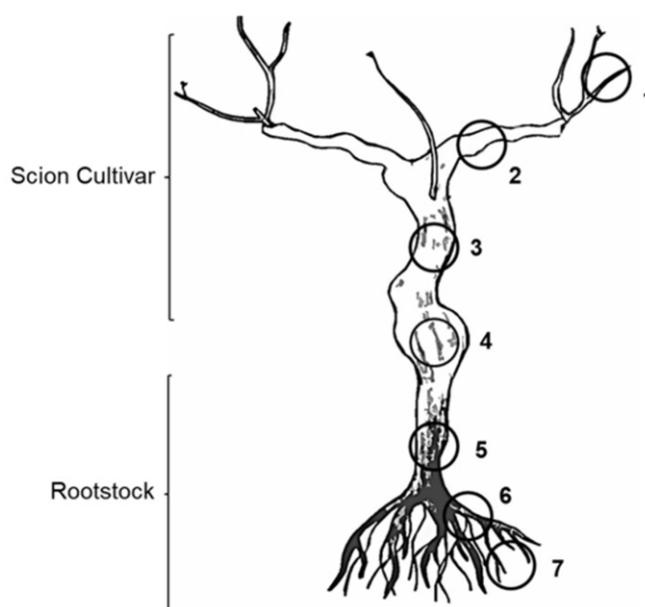


Figure 1. Investigated grapevine parts. 1, cane; 2, arm; 3, upper trunk; 4, grafting zone; 5, lower trunk; 6, roots; 7, rootlets. Scion cultivar corresponds to cane, arm and upper trunk. Rootstock corresponds to lower trunk, roots and rootlets. Grafting zone corresponds to point of connection between scion cultivar and rootstock.

2.2 Extraction

Extraction was performed using an Accelerated Solvent Extraction (ASE) apparatus (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA). Five grams of powder were deposited in a 34-mL cartridge with a cellulose filter. Extraction was carried out in triplicate for each grapevine part with the following parameters: temperature, 60 °C; heat, 5 min; static time, 5 min; rinse volume, 60%; purge, 100 s; pressure, 100 bars; extraction solvent, ethanol/water (85/15; v/v), three independent cycles. Organic solvents were removed using a rotary evaporator to obtain grapevine extracts.

2.3 Chemicals and Standards

Extraction was performed with absolute ethanol purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France) and purified water using an Elga water purification system (High Wycombe, U.K.). Analyses were performed with LC-MS-grade acetonitrile (VWR, Fontenay-sous-bois, France), formic acid (Fisher Scientific, Loughborough, U.K.) and HPLC-grade methanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Standard isolations were carried out with HPLC-grade acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

Stilbenes were purified as standards from grapevine extracts: *E*-piceid, *E*-piceatannol, *E*-resveratrol, ampelopsin A, ampelopsin F, pallidol, *E*-parthenocissin A, *E*- ϵ -viniferin, *E*- ω -viniferin, *E*-miyabenol C, *E*-ampelopsin E, viniferol E, hopeaphenol, isohopeaphenol, ampelopsin H, vitisin A, vitisin B, vitisin C (Preparative HPLC profiles are available in Supporting Information, Figure S1 and S2). The preparative HPLC was a Varian Pro Star equipped with an Agilent Zorbax SB-C18 PrepHT column (250 mm x 21.2 mm, 7 μ m). Elution was carried out with a flow rate of 17 mL/min with water acidified (0.025% TFA) as solvent A and acetonitrile acidified (0.025% TFA) as solvent B with the following gradient: 20% B (0–5 min), 20 to 45% B (5–35 min), 45 to 55% B (35–38 min), 55 to 100% B (38–40 min), 100% B (40–45 min) 100 to 40% B (45–48 min). Compounds of interest were collected manually after UV detection. Their purity was evaluated by UHPLC-DAD and was estimated to be $\geq 90\%$. All purified standards were characterized by NMR and spectral information was compared with data from the laboratory bank.

2.4 LC-MS Analysis

The UHPLC apparatus was an Agilent 1290 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an auto sampler module, a binary pump with a degasser, a column heater/selector and a UV/Vis diode-array detector (DAD). The column was a 100 mm x 2.1 mm i.d., 1.8 μ m, Zorbax SB-C18 with a 2.1 mm x 5 mm i.d. guard column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Elution parameters consisted of a flow rate of 0.4 mL/min with water acidified (0.1% formic acid) as solvent A and acetonitrile acidified (0.1% formic acid) as solvent B using the following gradient: 17% B (0–0.4 min), 17 to 30% B (0.4–4.4 min), 30 to 38% B (4.4–7.4 min), 38 to 50% B (7.4–9.0 min), 50 to 100% B (9.0–10.0 min). An Esquire 6000 ion trap mass spectrometer (Bruker-Daltonics, Billerica, MA) with an electrospray ionization source was linked to the UHPLC. The MS method was performed with the following parameters: negative mode (range of m/z 100–1200); drying gas (nitrogen), 10 L/min; nebulizer pressure, 40 psi; temperature, 365°C; capillary voltage, 3100 V; capillary exit voltage, -118.3V; skimmer voltage, -40 V; trap drive, 58.1. Grapevine extracts were analyzed by dissolving powders in a methanol-water mixture (1/1, v/v) at 1 mg/ml, filtered on 0.45 μ m polytetrafluoroethylene (PTFE) and performed in triplicate. Calibration and equation curves were obtained by injecting standards in independent quintuplicate at several concentrations (0, 5, 10, 50, 100 μ g/ml) according to Feinberg's method (2001).²¹ Data were processed with Bruker Data Analysis 3.2 software.

2.5 NMR Analysis

The apparatus was a 600 MHz NMR spectrometer equipped with a cryogenic TXI probe head (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany). Isolated compounds were dissolved in methanol- d_4 or acetone- d_6 in 3-mm tubes. Bruker Topspin (v.3.2) software was used for 1D and 2D NMR spectra processing.

2.6 Polarimetry

Optic rotation $[\alpha]_D$ was carried out with a Jasco P-2000 polarimeter (Lisses, France) by dissolving pure compound in methanol. Experiment was performed at 25 °C.

2.7 Statistical analyses

Three independent extractions were performed for each grapevine part according to the various cultivars or rootstocks. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison post hoc tests using GraphPad Prism software. Significant differences were represented by different letters.

3. STRUCTURAL DATA OF ISOLATED COMPOUNDS

***E*-Piceid (1).** $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7.37 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H10a+H14a), 7.02 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, H8a), 6.85 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, H7a), 6.79 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H, H2a), 6.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H11a+H13a), 6.61 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H, H6a), 6.44 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H4a), 4.89 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, Glc H1'), 3.93 (dd, $J = 2.3, 12.1$ Hz, 1H, Glc H6'), 3.71 (dd, $J = 6.0, 12.1$ Hz, 1H, Glc H6'), 3.49-3.36 (m, 4H, Glc H2'+ H3'+ H4'+ H5').

Ampelopsin A (2). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7.02 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H2a+H6a), 6.69 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.58 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H3a+5a), 6.52 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H14a), 6.31 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12b), 6.11 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H14b), 6.10 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H12a), 5.70 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, H7b), 5.38 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H7a), 5.36 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, H8a), 4.02 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, H8b). $[\alpha]_{\text{D}} = +157^\circ$ (MeOH; c 0.07).²²

***E*-Piceatannol (3).** $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 6.97 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H2a), 6.88 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H7a), 6.83 (dd, $J = 2., 8.1$ Hz, 1H, H6a), 6.74 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H8a), 6.72 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H5a), 6.42 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H10a+H14a), 6.10 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12a).

Ampelopsin F (4). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7.01 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2a+H6a), 6.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.68 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.50 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H3b+5b), 6.37 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14a), 6.34 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14b), 6.07 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12b), 6.00 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12a), 4.08 (br s, 1H, H7a), 4.01 (br s, 1H, H8b), 3.55 (br s, 1H, H7b), 3.24 (br s, 1H, H8a). $[\alpha]_{\text{D}} = +21^\circ$ (MeOH; c 0.03).²³

Pallidol (5). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 6.92 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, H2a+H6a+H2b+H6b), 6.65 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, H3a+H5a+H3b+H5b), 6.52 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H14a+H14b), 6.10 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H12a+H12b), 4.46 (s, 2H, H7a+H7b), 3.72 (s, 2H, H8a+H8b). $[\alpha]_{\text{D}} = 0^\circ$ (MeOH; c 0.03).²⁰

***E*-Resveratrol (6).** $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7.35 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2a+H6a), 6.95 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, H7a), 6.80 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, H8a), 6.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.44 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H10a+H14a), 6.15 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12a).

***E*-Parthenocissin A (7).** $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7.08 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2a+H6a), 7.03 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.96 (br s, 1H, H7a), 6.69 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14a), 6.67 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.57 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.18 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12a), 6.06 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H10b+H14b), 6.04 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H12b), 4.17 (br s, 1H, H7b), 4.05 (br s, 1H, H8b).

Viniferol E (8). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 6.84 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2a+H6a), 6.77 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2d+H6d), 6.76 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.66 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2c+H6c), 6.65 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.64 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H3d+H5d), 6.52 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H14d), 6.50 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H3c+5c), 6.23 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12c), 6.19 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12a), 6.16 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12d), 6.14 (d, $J = 2.0$ Hz, 4H, H10a+H14a+H10c+H14c), 5.87 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12b), 5.56 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14b), 5.20 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H7a), 5.02 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H7c), 4.99 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, H7d), 4.67 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, H7b), 3.94 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H8a), 3.86 (dd, $J = 9.7, 12.1$ Hz, 1H, H8b), 3.72 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H8c), 3.48 (dd, $J = 9.7, 12.1$ Hz, 1H, H8d). $[\alpha]_{\text{D}} = +307^\circ$ (MeOH; c 0.05).²⁴

Hopeaphenol (9). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7.09 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, H2b+H6b+H2c+H6c), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H2a+H6a+H2d+H6d), 6.72 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H, H3b+H5b+H3c+H5c), 6.54 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H, H3a+H5a+H3d+H5d), 6.35 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H12b+H12c), 6.20 (br s, 2H, H14b+H14c), 5.80 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H, H7b+H7c), 5.75 (br s, 2H, H12a+H12d), 5.72 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H14a+H14d), 5.06 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H7a+H7d), 4.12 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H, H8b+H8d), 3.85 (br s, 2H, H8a+H8d). $[\alpha]_{\text{D}} = +344^\circ$ (MeOH; c 0.09).²⁵

Isohopeaphenol (10). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7.52 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H2a+H6a+H2d+H6d), 6.98 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H3a+H5a+H3d+H5d), 6.34 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H2b+H6b+H2c+H6c), 6.32 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H3b+H5b+H3c+H5c), 6.30 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H12a+H12d), 6.19 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H14a+H14d), 5.80 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H12b+H12c), 5.57 (d, $J = 10.2$ Hz, 2H, H7a+H7d), 5.42 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H14b+H14c), 5.37 (d, $J = 10.2$ Hz, 2H, H8a+H8d), 5.04 (br s, 2H, H7b+H7c), 3.36 (br s, 2H, H8b+H8c). $[\alpha]_{\text{D}} = -198^\circ$ (MeOH; c 0.07).²⁰

Ampelopsin H (11). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7.11 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H2a+H6a+H2d+H6d), 6.74 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H3a+H5a+H3d+H5d), 6.74 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H2b+H6b+H2c+H6c), 6.55 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H3b+H5b+H3c+H5c), 6.30 (t, $J = 2.0$ Hz, 2H, H12a+H12d), 6.27 (d, $J = 2.0$ Hz, 4H, H10a+H14a+H10d+H14d), 6.20 (s, 2H, H12b+H12c), 5.30 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H7a+H7d), 4.30 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H8a+H8d), 4.28 (s, 2H, H7b+H7c), 3.96 (s, 2H, H8b+H8c). $[\alpha]_{\text{D}} = -67^\circ$ (MeOH; c 0.07).²⁶

E- ϵ -viniferin (12). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7.14 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H2a+H6a), 7.04 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.82 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, H7b), 6.77 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.65 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.63 (s, 1H, H14b), 6.57 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, H8b), 6.25 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12b), 6.18 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12a), 6.16 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H10a+H14a), 5.36 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H7a), 4.34 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H8a). $[\alpha]_{\text{D}} = 0^\circ$ (MeOH; c 0.06).^{27,28}

E-Miyabenol C (13). $^1\text{H NMR}$ ($\text{CO}(\text{CD}_3)_2$) δ 7.16 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2a+H6a), 7.11 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2c+H6c), 6.88 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H7c), 6.80 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.72 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3c+H5c), 6.65 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H14c), 6.61 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H8c), 6.54 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.48 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.33 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H12c), 6.28 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12b), 6.21 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12a), 6.15 (br s, 2H, H10a+H14a), 6.06 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14b), 5.37 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H7a), 5.19 (br s, 1H, H7b), 4.63 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H8a), 4.09 (br s, 1H, H8b). $[\alpha]_{\text{D}} = -111^\circ$ (MeOH; c 0.10).²⁹

E- ω -viniferin (14). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7.12 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.97 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2a+H6a), 6.86 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H7b), 6.68 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.66 (d, $J = 16.1$ Hz, 2H, H8b), 6.63 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H14b), 6.55 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H3a+H5a), 6.31 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12b), 5.92 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12a), 5.83 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H7a), 5.76 (br s, 2H, H10a+H14a), 4.59 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H8a). $[\alpha]_{\text{D}} = -130^\circ$ (MeOH; c 0.07).

Vitisin A (15). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7.12 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2a+H6a), 7.07 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2d+H6d), 6.99 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2c+H6c), 6.77 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.72 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H, H6b), 6.70 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3d+H5d), 6.61 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3c+H5c), 6.60 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H5b), 6.43 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14b), 6.30 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H7b), 6.27 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H8b), 6.18 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12b), 6.17 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14d), 6.12 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12a), 6.09 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H10a+H14a), 6.06 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H2b), 6.03 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12c), 5.95 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14c), 5.90 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12d), 5.80 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, H7d), 5.41 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H8c), 5.30 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, H7a), 5.24 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H7c), 4.24 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, H8a), 4.11 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H, H8d). $[\alpha]_{\text{D}} = +190^\circ$ (MeOH; c 0.10).³⁰

E-Ampelopsin E (16). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7.24 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, H2a+H6a+H2c+H6c), 6.93 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, H3a+H5a+H3c+H5c), 6.65 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H, H7b), 6.60 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.56 (d, $J = 16.8$ Hz, 1H, H8b), 6.46 (s, 1H, H12b), 6.25 (d, $J = 2.0$ Hz, 4H, H10a+H14a+H10c+H14c), 6.18 (t, $J = 2.0$ Hz, 2H, H12a+H12c), 5.44 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H7a+H7c), 4.55 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, H8a+H8c). $[\alpha]_{\text{D}} = 0^\circ$ (MeOH; c 0.03).³¹

Vitisin B (17). $^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ 7.18 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2d+H6d), 7.14 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2a+H6a), 6.99 (dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, 1H, H6c), 6.83 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3d+H5d), 6.76 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.70 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H8c), 6.68 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H5c), 6.66 (br s, 1H, H2c), 6.58 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.57 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H14c), 6.53 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.51 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H7c), 6.28 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12b), 6.24 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12c), 6.14 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H10a+H14a), 6.13 (t, $J =$

2.0 Hz, 1H, H12a), 6.09 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14b), 6.06 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12d), 5.98 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H10d+H14d), 5.42 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H7b), 5.36 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, H7a), 5.33 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, H7d), 4.36 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, H8d), 4.33 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H, H8a), 4.24 (d, $J = 4.9$ Hz, 1H, H8b). $[\alpha]_D = -97^\circ$ (MeOH; c 0.22).²⁷

Vitisin C (18). ¹H NMR (CD₃OD) δ 7.14 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2d+H6d), 6.90 (dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz, 1H, H6c), 6.97 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.94 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2a+H6a), 6.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3d+H5d), 6.74 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.74 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H8c), 6.66 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H5c), 6.60 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H2c), 6.60 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14c), 6.56 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H7c), 6.25 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12b), 6.25 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12c), 6.17 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, H12d), 6.14 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H10d+H14d), 6.13 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14b), 6.10 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12a), 5.87 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H10a+H14a), 5.35 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, H7d), 5.18 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H7a), 5.18 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H7b), 4.36 (d, $J = 6.2$ Hz, 1H, H8d), 4.27 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, H8b), 3.59 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H8a). $[\alpha]_D = +128^\circ$ (MeOH; c 0.03).³²

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Identification of Stilbenes

Eighteen stilbenes were found in the different grapevine parts by successful application of LC-MS combined with NMR analysis. Monomers (*E*-piceid, *E*-piceatannol, *E*-resveratrol), dimers (ampelopsin A, ampelopsin F, pallidol, *E*-parthenocissin A, *E*- ϵ -viniferin, *E*- ω -viniferin), trimers (*E*-miyabenol C, *E*-ampelopsin E) and tetramers (viniferol E, hopeaphenol, isohopeaphenol, ampelopsin H, vitisin A, vitisin B, vitisin C) were discriminated by comparison with standards and library data (LC-MS profile and structures of identified stilbenes are available in Supporting Information, Figure S3-S7). The UHPLC-DAD-MS/MS data of stilbenes identified in the various grapevine organs are shown in **Table 2**.

Table 2. HPLC-DAD-MS/MS data of stilbenes in grapevine extracts.

Peak	Stilbene	t_R	λ_{max} (nm)	$[M-H]^-$ (m/z)	MS/MS fragments
1	<i>E</i> -piceid	2.7	320	389	227
2	ampelopsin A	3.5	283	469	451, 375, 363, 357, 347, 281
3	<i>E</i> -piceatannol	3.5	324	243	225, 201, 183, 175, 157, 141
4	ampelopsin F	4.2	282	453	433, 411, 360, 346, 289
5	pallidol	4.4	282	453	435, 404, 359, 265
6	<i>E</i> -resveratrol	4.9	306	227	185, 143
7	<i>E</i> -parthenocissin A	5.1	320	453	435, 359, 343, 327, 289
8	viniferol E	5.9	283	923	905, 881, 803, 707, 637, 601, 451
9	hopeaphenol	6.4	282	905	811, 717, 611, 451, 357
10	isohopeaphenol	6.6	284	905	811, 717, 675, 611, 421, 357
11	ampelopsin H	6.9	285	905	811, 794, 717, 705, 699, 611, 503
12	<i>E</i> - ϵ -viniferin	7.2	323	453	435, 411, 369, 359, 347, 265
13	<i>E</i> -miyabenol C	7.5	323	679	661, 637, 573, 479, 451, 345
14	<i>E</i> - ω -viniferin	7.7	312	453	435, 411, 395, 369, 359, 347, 333
15	vitisin A	8.0	327	905	811, 799, 454, 451, 439, 359
16	<i>E</i> -ampelopsin E	8.7	327	679	661, 637, 585, 491, 447
17	vitisin B	9.1	326	905	887, 811, 799, 557, 545, 451, 439, 359, 347
18	vitisin C	9.3	327	905	887, 811, 799, 781, 675, 557, 545, 451, 359

UV-Vis information based on λ_{max} values provided valuable data on the structure of the compounds of interest by separating the stilbenes into two groups. First, there were stilbenes that did not have conjugation in their structures leading to an absorption maximum close to 280 nm while others were characterized by λ_{max} values between 306 and 327 nm. This indicated the presence of a double bond in *E*-configuration among the phenol units.²⁰ In addition, mass spectrometry data with pseudomolecular ions as well as product ions provided useful structural information (**Table 2**). These mass spectral data are in agreement with accurate mass fragmentation patterns reported by other authors.^{33,34} In such cases, there were minor differences because the MS conditions were not exactly the same. However, little information on fragmentation data and product ions was available about some uncommon stilbenes such as ampelopsin F, viniferol E, ampelopsin H, ampelopsin E and vitisin C.

Thus, NMR analyses were performed on individual compounds to elucidate the stilbene structure (see above, **Structural Data of Isolated Compounds** section). Accurate ^1H NMR spectra of all isolated products corroborated the literature data, allowing the unequivocal assignment of 18 stilbenes in the extracts.

4.2 Oligomerization of Stilbenes from Aerial to Root Parts

Quantitation of stilbenes in the extracts was performed according to the calibration curve at the maximum wavelength of each compound. By separating the grapevine into seven parts, we were able to assess the distribution of the stilbenes throughout the plant. Based on the degree of polymerization, monomeric stilbenes were mainly present in canes, averaging 30% of total stilbenes with a maximum amount observed in Cabernet Sauvignon (x 101-14 MGt) at 55.2% (**Figure 2**). The dimeric forms were mostly present in wood such as the grapevine arm, upper trunk and the grafting zone, with averages of 44.3, 44.9 and 44.2%, respectively. The tetrameric stilbenes predominated in the root system, especially in the lower trunk, roots and rootlets, with an average yield of 50.0, 69.2 and 73.3%, respectively. Their proportion represented up to 78.9% of total stilbenes in Tannat rootstock (x Gravesac) roots and up to 88.9% of stilbenes in Fercal rootstock (x Chardonnay) rootlets (**Figure 2**).

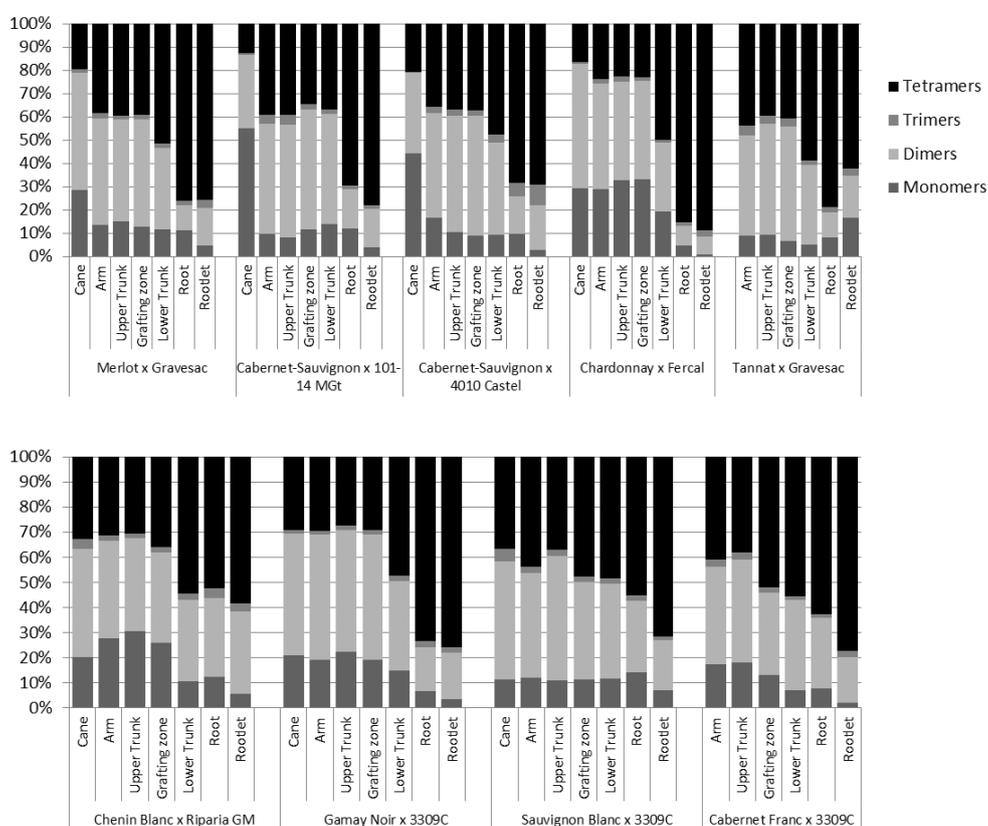


Figure 2. Stilbene monomers, dimers, trimers and tetramer content (%) in the seven parts of grapevine according to different cultivar / rootstock combinations.

Regarding individual composition, the main compounds in canes were the monomeric stilbene resveratrol, with values between 0.3 and 4.4 g/kg DW, and the dimer ϵ -viniferin, with contents between 1.3 and 4.0 g/kg DW (**Table 3**). In wood, ϵ -viniferin was generally the most abundant with values in the arms between 2.2 and 6.2 g/kg DW, in the upper trunk between 2.0 and 5.0 g/kg DW and in the grafting zone between 2.3 and 7.7 g/kg DW (**Table 3**). Overall, ϵ -viniferin accounted for an average of 3.7 g/kg DW in woody parts, representing about 27.5% of total stilbenes. Regarding rootstocks, the tetramer vitisin B was the main compound with values increasing from 3.0 to 5.9 g/kg DW in the lower trunk, from 4.5 to 17.1 g/kg DW in roots and from 4.9 to 24.3 g/kg DW in rootlets (**Table 4**). Other tetramers such as vitisin A were also abundant with contents up to 7.0 g/kg DW in the 3309C rootstock (x Gamay noir), and hopeaphenol with values up to 6.8 g/kg DW in the 3309C rootstock (x Cabernet Franc).

Table 3. Stilbene concentrations (g/kg DW) in aerial parts of *Vitis vinifera* cultivars.

Compounds	Merlot				Cabernet Sauvignon ^a				Cabernet Sauvignon ^b				Chardonnay				Tannat			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
piceid	0.1	0.3	0.3	0.2	nq	0.1	nq	0.1	nq	0.1	nq	nq	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
ampelopsin A	0.2	1.1	1.2	1.0	nd	0.6	0.5	1.0	nd	0.4	0.4	0.4	0.4	1.1	1.0	1.0	1.3	1.1	1.6	2.2
piceatannol	0.4	0.7	0.6	0.5	0.4	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.2
ampelopsin F	0.1	0.3	0.4	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	nq	0.1	0.1	0.1	nd	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
pallidol	0.1	0.7	0.5	0.6	0.3	0.5	0.4	0.5	0.2	0.4	0.4	0.3	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.5	0.7	0.6
resveratrol	0.8	1.7	1.7	1.4	4.4	1.0	0.7	1.2	2.7	1.6	0.9	0.7	0.9	2.3	2.7	3.1	1.3	1.1	1.5	1.3
parthenocissin A	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	0.1	0.2	nq	0.2	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3
viniferol E	0.2	1.5	1.2	1.1	nd	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3	0.3
hopeaphenol	0.1	2.3	1.8	1.7	0.6	1.6	1.2	1.1	0.6	1.2	1.0	0.7	0.3	0.6	0.4	0.5	0.9	1.1	1.0	1.7
isohopeaphenol	nd	0.3	0.2	0.2	nq	1.1	1.1	1.5	nq	0.8	0.8	0.8	0.1	0.7	0.7	0.8	3.6	3.9	4.8	3.8
ampelopsin H	nd	0.3	0.2	0.2	nq	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3	0.2
ε-viniferin	1.9	6.2	5.0	5.0	2.2	4.1	3.4	4.0	1.9	3.3	3.5	3.2	1.3	2.4	2.0	2.5	4.0	3.4	5.0	7.7
miyabenol C	0.1	0.5	0.3	0.3	0.1	0.3	0.3	0.2	nq	0.3	0.3	0.2	nq	0.2	0.2	0.2	0.7	0.5	0.6	0.7
ω-viniferin	0.1	0.5	0.5	0.5	nq	0.6	0.5	0.5	nq	0.5	0.5	0.4	0.1	0.3	0.3	0.3	0.8	0.7	1.3	1.4
vitisin A	0.1	0.4	0.4	0.4	nq	0.2	0.1	0.1	nq	0.1	0.1	0.1	nq	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5
ampelopsin E	nd	0.1	0.1	0.1	nd	0.1	0.1	0.1	nd	nd	nd	nq	nd	nd	nd	nd	nq	nq	nq	0.2
vitisin B	0.4	2.5	2.9	2.7	0.3	1.6	1.3	1.0	0.5	1.4	1.4	1.3	0.1	0.6	0.8	0.9	0.6	0.6	0.8	3.3
vitisin C	0.1	0.2	0.2	0.2	nd	0.1	0.1	0.1	nd	0.1	0.1	0.1	nd	nd	nq	nq	0.1	0.1	0.1	0.3
Total	4.7	19.8	17.9	16.5	8.5	12.7	10.6	12.1	6.5	11.0	9.9	8.8	3.4	9.4	9.5	11.0	15.1	14.3	18.9	25.1

1 = Cane, 2 = Arm, 3 = Upper Trunk, 4 = Grafting Zone

nd = not determined, nq = not quantified.

^aCabernet Sauvignon x 101-14 MGt^bCabernet Sauvignon x 4010 Castel

Table 3. *Continuation.*

<i>Compounds</i>	Chenin blanc				Gamay noir				Sauvignon blanc				Cabernet Franc		
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	2	3	4
piceid	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	nq	0.1	0.1	0.2	nq	nq	0.1
ampelopsin A	0.1	0.6	0.6	0.8	1.4	1.5	1.2	1.6	0.2	0.8	0.6	1.7	0.8	0.6	1.0
piceatannol	0.3	0.5	0.4	0.2	0.5	0.3	0.5	0.6	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2
ampelopsin F	nq	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
pallidol	0.2	0.6	0.6	0.5	0.2	1.1	0.7	0.8	0.1	0.3	0.3	0.4	0.6	0.5	0.3
resveratrol	1.1	3.6	3.5	3.0	1.0	3.0	2.8	2.5	0.3	0.8	0.6	1.1	1.7	1.7	1.4
parthenocissin A	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4	0.3	0.4	nq	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2
viniferol E	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.2	nq	0.1	0.0	0.1	0.2	0.2	0.2
hopeaphenol	0.6	1.2	0.9	1.0	0.6	1.5	1.0	1.0	0.3	0.6	0.5	1.0	0.9	0.7	1.4
isohopeaphenol	0.6	1.2	1.2	1.2	0.5	2.6	1.8	1.9	0.5	1.3	1.5	2.1	1.3	1.3	1.2
ampelopsin H	0.6	0.5	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
ϵ -viniferin	2.6	3.9	2.9	2.7	1.8	5.3	4.4	5.0	1.5	2.6	2.8	3.2	2.2	2.4	2.3
miyabenol C	0.3	0.3	0.3	0.3	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2
ω -viniferin	0.2	0.6	0.5	0.5	0.1	0.7	0.7	0.7	0.1	0.3	0.4	0.3	0.4	0.5	0.2
vitisin A	0.2	0.2	0.2	0.4	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.1	0.6	0.3	0.3	0.8
ampelopsin E	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nq	nq	nq	nq	nq	nq	nd	nd	nd
vitisin B	0.3	1.4	1.3	1.8	0.7	0.6	0.7	1.4	0.5	1.8	0.9	3.1	1.6	1.2	2.7
vitisin C	nq	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	nq	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
Total	7.3	15.4	13.2	13.2	7.9	18.5	15.0	17.2	4.0	9.8	8.7	15.0	11.1	10.4	12.6

1 = Cane, 2 = Arm, 3 = Upper Trunk, 4 = Grafting Zone

nd = not determined, nq = not quantified.

Table 4. Stilbene concentrations (g/kg DW) in root parts of different rootstocks.

<i>Compounds</i>	Gravesac ^a			101-14 MGt			4010 Castel			Fercal			Gravesac ^b		
	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7
piceid	0.3	0.3	0.3	0.6	0.4	0.3	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.3	0.4
ampelopsin A	1.3	1.5	5.3	2.2	1.5	2.7	1.0	0.7	2.4	0.4	0.5	1.8	1.1	0.9	2.3
piceatannol	0.9	0.9	0.5	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.4	0.2
ampelopsin F	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
pallidol	0.7	0.4	0.2	0.6	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1	0.4	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2
resveratrol	1.3	2.3	1.2	2.1	2.1	0.6	1.2	1.3	0.3	3.0	1.0	0.2	0.4	1.7	3.2
parthenocissin A	0.3	0.4	0.6	0.3	0.5	0.5	0.3	0.4	0.4	0.2	0.3	0.4	0.2	0.4	0.5
viniferol E	1.8	1.8	1.7	0.2	0.3	0.3	0.1	0.2	0.1	0.3	0.4	0.5	0.2	0.6	0.2
hopeaphenol	1.5	1.8	1.1	1.2	1.6	1.5	0.9	1.1	1.1	1.4	2.1	2.7	2.0	2.6	1.1
isohopeaphenol	0.2	0.2	0.2	2.6	2.2	1.5	1.4	1.8	1.3	0.4	0.3	0.2	1.3	1.8	0.6
ampelopsin H	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1
ε-viniferin	4.4	0.8	0.5	6.4	1.6	0.6	4.0	1.1	0.7	3.8	1.2	0.5	3.2	1.3	1.1
miyabenol C	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	nq	0.1	0.3	0.2
ω-viniferin	0.3	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.4	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
vitisin A	1.0	2.8	5.0	0.4	1.3	2.1	0.8	1.2	1.3	0.7	3.1	6.0	0.8	2.8	2.5
ampelopsin E	0.2	0.4	1.3	0.2	0.1	0.3	0.4	0.9	1.6	0.1	0.3	0.9	0.2	0.3	0.4
vitisin B	5.6	16.2	23.9	3.0	10.1	13.3	3.6	6.3	9.3	5.9	17.1	24.3	4.0	14.2	9.6
vitisin C	0.2	0.4	0.6	0.2	0.5	0.7	0.3	0.4	0.6	0.3	0.7	1.0	0.2	0.5	0.3
Total	20.5	31.0	43.1	21.3	23.3	25.1	15.3	16.3	20.1	18.3	28.1	39.0	14.7	28.8	23.3

5 = Lower Trunk, 6 = Roots, 7 = Rootlets.

MGt = Millardet et Grasset.

nd = not determined, nq = not quantified.

^aMerlot x Gravesac^bTannat x Gravesac

Table 4. *Continuation.*

<i>Compounds</i>	Riparia GM			3309C ^a			3390C ^b			3309C ^c		
	5	6	7	5	6	7	5	6	7	5	6	7
piceid	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	0.3	0.5	0.2	0.3	0.4
ampelopsin A	1.3	1.1	4.7	1.1	1.1	4.3	1.8	1.6	3.9	2.6	2.2	3.8
piceatannol	0.2	0.3	0.1	0.5	0.2	0.1	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	nq
ampelopsin F	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3
pallidol	0.4	0.5	0.2	0.6	0.3	0.2	0.5	0.5	0.2	0.6	0.3	0.1
resveratrol	1.7	2.0	0.9	1.7	1.1	0.7	1.4	1.8	1.1	2.1	2.0	0.2
parthenocissin A	0.3	0.3	0.4	0.4	0.5	0.6	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.5
viniferol E	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2	0.8	0.7	0.5
hopeaphenol	2.1	2.4	1.2	1.4	1.9	2.3	1.1	0.9	1.5	6.8	5.6	5.0
isohopeaphenol	1.9	1.3	0.6	1.6	2.1	1.4	2.4	1.8	1.7	4.6	4.0	2.1
ampelopsin H	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.5	0.4	0.2
ε-viniferin	3.8	4.1	1.2	3.3	1.7	0.7	3.5	2.3	0.8	8.9	6.0	1.3
miyabenol C	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3
ω-viniferin	0.3	0.3	0.1	0.3	0.2	0.1	0.3	0.2	0.0	0.3	0.2	0.1
vitisin A	1.6	1.7	5.0	0.8	2.9	7.0	0.6	1.1	3.1	2.5	3.0	4.0
ampelopsin E	0.2	0.5	0.5	0.1	0.2	0.4	0.0	nq	0.2	0.3	0.2	0.5
vitisin B	4.1	4.5	4.9	3.3	8.6	12.7	3.0	5.4	11.8	4.7	6.7	13.8
vitisin C	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.5	0.2	0.3	0.6	0.2	0.3	0.6
Total	19.2	20.4	21.0	16.3	22.1	32.0	16.5	17.5	26.7	36.3	32.9	33.7

5 = Lower Trunk, 6 = Roots, 7 = Rootlets.

GM = Gloire de Montpellier, C = Couderc.

nd = not determined, nq = not quantified.

^aGamay noir x 3309C

^bSauvignon blanc x 3309C

^cCabernet Franc x 3309C

The increasing oligomerization of stilbenes in grapevine from the aerial parts to the root has already been demonstrated in a study on cane, wood and root.¹⁶ The present findings on various grapevine cultivars and rootstocks from several vineyards and different geographical locations clearly confirm this phenomenon. Indeed, whatever the cultivar/rootstock combination, the degree of stilbene polymerization increased systematically in the direction of the root system. In addition, by separating the grapevine into several parts, we were able to visualize the zones of transition. For example, there was a change in composition from the cane to the arm with a shift in the monomer / oligomer ratio in favor of oligomers. Similarly, the lower trunk where the wood and root system meet is a key zone since vitisin B and vitisin A levels increased considerably at this point.

Several hypotheses could explain these findings. Recent studies have shown that complex stilbenes are among the most toxic compounds against grapevine pathogens.¹⁴ Thus, the strong pressure exerted by soil microorganisms could stimulate their synthesis in roots and allow the grapevine to defend itself.³⁵ Regarding the mechanism of reaction, it is likely that *E-ε*-viniferin is transformed into vitisin B by oxidation. Indeed, studies have shown that *E-ε*-viniferin preferentially forms vitisin B via the oxidation of metals such as silver or copper.^{36,37} This would explain the strong decrease in *E-ε*-viniferin in the roots and the increase in vitisin B (**Table 4**). In addition, the oxidation of stilbenes has already been reported in studies on the dimerization of monomers under the action of fungal-derived enzymes.^{38,39} Furthermore, the time factor could also play a role in these differing degrees of polymerization. Indeed, grapevine canes that are pruned each year do not undergo much stress, whereas wood and roots that are several decades old would accumulate stilbenes over time.

4.3 Stilbenes from Various Grapevine Cultivars and Rootstocks

Viticultural co-products such as wood and roots are a source of bioactive stilbenes that may be used for several applications. Indeed, grapevine waste have a hopeful future of valorization in phytosanitary field as stilbenes have antifungal, oomycide and insecticide activities.^{14,16,40} In addition, grapevine extracts could be used for oenological purposes as alternative to SO₂ during the winemaking and also as toasted chips additive in order to produce wine with complex organoleptic properties.^{41,42} However, stilbene abundance could widely vary depending on the variety and rootstock, so there is a need to assess the stilbene composition of cultivars and rootstocks in order to determine the best sources.

Regarding the grape varieties, Merlot was one of the richest in stilbenes with a content of 19.8, 17.9 and 16.5 g/kg DW in the arm, upper trunk and grafting zone, respectively (**Figure 3**). Tannat also had a significant stilbene content of 14.3 g/kg DW in the arm, 18.9 g/kg DW in the upper trunk and 25.1 g/kg DW in the grafting zone. Gamay noir also contained significant levels of stilbenes, especially in the arm (18.5 g/kg DW) and grafting zone (17.2 g/kg DW). Conversely, Chardonnay contained the lowest levels with 3.4 g/kg DW in the cane and an average at 9.9 g/kg DW in the woody parts (**Figure 3**). Cabernet Sauvignon (both 101-14 MGt and 4010 Castel rootstocks), Sauvignon Blanc and Cabernet Franc also contained fewer total stilbenes throughout the seven parts.

Grapevine canes are abundant worldwide, and the findings of the numerous studies already conducted on their stilbene contents are largely in agreement with our results. For example, a study on the stilbene concentrations in the canes of the major grape varieties found 5.2 g/kg DW in Merlot, 5.8 g/kg DW in Cabernet Sauvignon and 3.2 g/kg in Chardonnay, while we found 4.7 g/kg DW in Merlot, between 6.5 and 8.5 g/kg DW in Cabernet Sauvignon and 3.4 g/kg DW in Chardonnay.⁶ On the other hand, comparative data on the stilbenes in wood from other cultivars is lacking. Some authors have investigated wood diseases and their data on asymptomatic wood is comparable to ours. A study on *Vitis vinifera* cv. Sangiovese wood affected by “Esca Proper” showed that asymptomatic wood was rich in dimeric, trimeric and tetrameric stilbenes with a total stilbene content of 12 g/kg DW, which is in agreement with our results.⁴³ Another recent work on Esca-associated fungi reported that healthy wood of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon contained stilbenes up to a milligram per kg, i.e. about 1000-fold lower than our results. This difference might be due to the low number of stilbenes quantified.⁴⁴

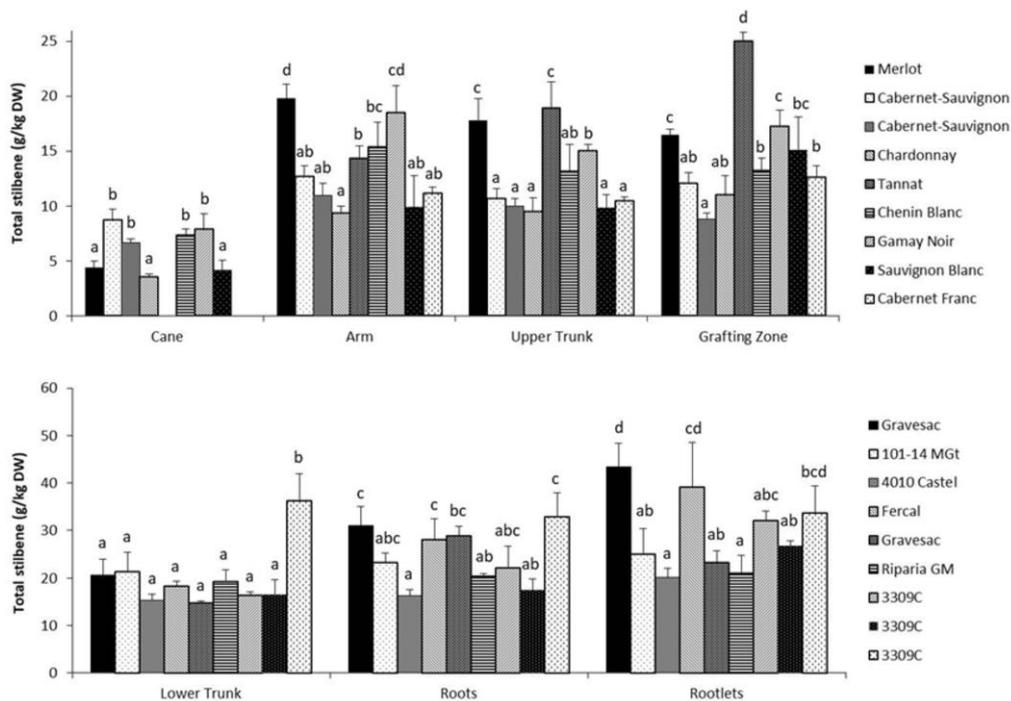


Figure 3. Total stilbene content (g/kg DW) in the seven parts according to different cultivar / rootstock combinations. A. Cultivar part. B. Rootstock part. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison post hoc tests. Significant differences are represented by different letters.

Concerning rootstocks, Gravesac grafted on Merlot contained the most abundant total content of stilbenes with 31.0 g/kg DW in roots and 43.1 g/kg DW in rootlets (**Figure 3**). Fercal also had substantial stilbene levels in roots and rootlets with 28.1 g/kg DW and 39.0 g/kg DW respectively. On the other hand, 4010 Castel was the least rich with 16.3 g/kg DW in roots and 20.1 g/kg DW in rootlets (**Figure 3**). Riparia Gloire de Montpellier also had low values of 20.4 g/kg DW in roots and 21.0 g/kg DW in rootlets. Studies have also analyzed stilbene contents in different rootstocks grown in pots but very few in real vineyard conditions. Comparative analyses of several 2-year-old rootstocks showed contents (*E-resveratrol* and *E- ϵ -viniferin*) ranging from 0.87 to 2.93 g/kg FW.⁴⁵ Recently, a study on *Vitis vinifera* cv. Merlot grafted on the TK5BB rootstock from a 10-year-old vineyard reported *E-piceid*, *E-resveratrol*, *E- ϵ -viniferin* levels of 1.61 g/kg DW.⁴⁶ The levels we found are 10-fold higher than those reported elsewhere. Indeed, we evaluated the levels of 18 stilbenes while other authors examined only a few compounds.

In summary, the present work shows that the wood and roots of major grapevine cultivars and rootstocks used in viticulture contain a wide range of stilbenes from monomeric to tetrameric forms. We demonstrate for the first time that the oligomerization of stilbenes increases progressively from the aerial part to the root system. In addition, we report that stilbene contents vary according to the type of cultivar and rootstock. The cultivars Merlot, Tannat and Gamay noir and the rootstocks Gravesac, Fercal and 3390C appear to be the richest in stilbenes. These findings fill the gap in our knowledge of stilbene contents in the different parts of the grapevine and pave the way for the development of natural extracts to be used in biocontrol.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Eric Pedrot for his NMR technical assistance and Ray Cooke for copyediting the manuscript.

REFERENCES

- Ollat N, Bordenave L, Tandonnet, JP, Boursiquot JM, Marguerit E. Grapevine rootstocks: origins and perspectives. *Acta Hort.* 2016;1136:11–22.

2. Ollat N, Cookson SJ, Lauvergeat V, Marguerit E, Barrieu F, Gambetta G, Goutouly JP, Tandonnet JP, Vivin P, Delrot S. Grapevine roots: the dark side. *Acta Hort.* 2017;1188: 213–226.
3. Habran A, Commisso M, Helwi P, Hilbert G, Negri S, Ollat N, Gomès E, Van Leeuwen C, Guzzo F, Delrot S. Rootstocks/scion/nitrogen interactions affect secondary metabolism in the grape berry. *FrontPlant Sci.* 2016;7:1-11.
4. Jones TH, Cullis BR, Clingeleffier PR, Ruhl EH. Effects of novel hybrid and traditional rootstocks on vigour and yield components of shiraz grapevines. *Aust J Grape Wine Res* 2009;15 (3):284–292.
5. Whiting MD, Lang G, Ophardt, D. Rootstock and training system affect sweet cherry growth, yield, and fruit quality. *HortScience.* 2005;40 (3):582–586.
6. Lambert C, Richard T, Renouf E, Bisson J, Waffo-Téguo P, Bordenave L, Ollat N, Mérillon JM, Cluzet S. Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *J Agric Food Chem.* 2013; 61 (47):11392–11399.
7. ATLAS. Projet biomasse vitivinicole. 2017. <http://www.vignevin.com/recherche/territoires/valorisation-biomasse-vitivinicole.html> (accessed August 01, 2018).
8. FranceAgriMer. L'observatoire national des ressources en biomasse. Evaluation des ressources disponibles en France. 2016. <http://www.franceagrimer.fr/Stockage-Actualites/Archives/2016/Observatoire-national-des-ressources-en-biomasse-evaluation-desressources> (accessed August 01, 2018).
9. ADEME. Biomasse forestière, populeuse et bocagère disponible pour l'énergie à l'horizon 2020. 2009. <http://www.ademe.fr/biomasse-forestiere-populeuse-bocagere-disponible-lenergie-a-lhorizon-2020> (accessed August 01, 2018).
10. Pawlus AD, Waffo-Téguo P, Shaver J, Mérillon JM. Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a Review. *Oeno One.* 2012;46 (2):57-111.
11. Rivière C, Pawlus AD, Mérillon JM, Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Nat. Prod. Rep.* 2012;29 (11):1317-1333.
12. Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J Agric Food Chem.* 2002;50(10):2731–2741.
13. Pezet R, Gindro K, Viret O, Richter H. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *VITIS-GEILWEILERHOF.* 2004;43(3):145–148.
14. Schnee S, Queiroz EF, Voinesco F, Marcourt L, Dubuis PH, Wolfender JL, Gindro K. *Vitis vinifera* canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *J Agric Food Chem.* 2013;61(23):5459–5467.
15. Lambert C, Bisson J, Waffo-Téguo P, Papastamoulis Y, Richard T, Corio-Costet MF, Mérillon JM, Cluzet S. Phenolics and their antifungal role in grapevine wood decay: focus on the Botryosphaeriaceae family. *J Agric Food Chem.* 2012;60(48):11859–11868.
16. Gabaston J, Cantos-Villar E, Biais B, Waffo-Teguo P, Renouf E, Corio-Costet MF, Richard T, Mérillon JM. Stilbenes from *Vitis vinifera* L. waste: a sustainable tool for controlling *Plasmopara viticola*. *J Agric Food Chem.* 2017;65(13):2711–2718.
17. Sumner LW, Amberg A, Barrett D, Beale MH, Beger R, Daykin CA, Fan TWM, Fiehn O, Goodacre R, Griffin JL, Hankemeier T, Hardy N, Harnly J, Higashi R, Kopka J, Lane AN, Lindon JC, Marriott P, Nicholls AW, Reily MD, Thaden JJ, Viant MR. Proposed Minimum Reporting Standards for Chemical Analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics.* 2007;3(3):211–221.
18. Hillis W, Ishikura N. The chromatographic and spectral properties of stilbene derivatives. *J Chromatog.* 1968 (32):323–336.
19. Gabaston J, Richard T, Cluzet S, Palos Pinto A, Dufour MC, Corio-Costet MF, Mérillon JM. *Pinus pinaster* knot: a source of polyphenols against *Plasmopara viticola*. *J Agric Food Chem.* 2017;65(40):8884–8891.
20. Mattivi F, Vrhovsek U, Malacarne G, Masuero D, Zulini L, Stefanini M, Moser C, Velasco R, Guella G. Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid *Vitis*

vinifera (Merzling × Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *J Agric Food Chem*. 2011;59(10):5364–5375.

21. Feinberg M. *L'assurance qualité dans les laboratoires agroalimentaires et pharmaceutiques*. Paris :Tec & Doc (Editions) ; 2001. 348 p.

22. Ha DT, Chen QC, Hung TM, Youn UJ, Ngoc TM, Thuong PT, Kim HJ, Seong YH, Min BS, Bae K. Stilbenes and oligostilbenes from leaf and stem of *Vitis amurensis* and their cytotoxic activity. *Archives of Pharmacol Research*. 2009;32(2):177–183.

23. Takaya Y, Yan KX, Terashima K, He YH, Niwa M. Biogenetic reactions on stilbene tetramers from Vitaceaeous plants. *Tetrahedron*. 2002;58(45):9265–9271.

24. Fujii F, He YH, Terashima K, Takaya Y, Niwa M. Three new stilbeneoligomers from the roots of *Vitis vinifera* 'Kyohou'. *Heterocycles*. 2005;65(10):2461–69.

25. Guebailia HA, Chira K, Richard T, Mabrouk T, Furiga A, Vitrac X, Monti JP, Delaunay JC, Mérillon JM. Hopeaphenol: the first resveratrol tetramer in wines from North Africa. *J Agric Food Chem*. 2006;54(25):9559–64.

26. Tanaka T, Ito T, Nakaya K, Iinuma M, Takahashi Y, Naganawa H, Riswan S. Six new heterocyclic stilbene oligomers from stem bark of *Shorea hemsleyana*. *Heterocycles*. 2001;55(4):729-740.

27. Pawlus AD, Sahli R, Bisson J, Rivière C, Delaunay JC, Richard T, Gomès E, Bordenave L, Waffo-Teguo P, Mérillon JM. Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species. *J Agric Food Chem*. 2013;61(3):501–11.

28. Kurihara H, Kawabata J, Ichikawa S, Mishima M, Mizutani J. Oligostilbenes from *Carex kobomugi*. *Phytochemistry*. 1991;30(2):649–53.

29. Papastamoulis Y, Bisson J, Tamsamani H, Richard T, Marchal A, Mérillon JM, Waffo-Teguo P. New *E*-miyabenol isomer isolated from grapevine cane using centrifugal partition chromatography guided by mass spectrometry. *Tetrahedron*. 2015;71(20):3138–42.

30. Ito J, Gobaru K, Shimamura T, Niwa M. Absolute configurations of some oligostilbenes from *Vitis coignetiae* and *Vitis vinifera* 'Kyohou'. *Tetrahedron*. 1998;54:6651-6660.

31. Huang K-S, Lin M. Oligostilbenes from the roots of *Vitis amurensis*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 1999;2(1):21–28.

32. Ito J, Niwa M. Absolute structures of new hydroxystilbenoids, vitisin C and viniferal, from *Vitis vinifera* 'Kyohou'. *Tetrahedron*. 1996;52(30):9991–98.

33. Gorena T, Saez V, Mardones C, Vergara C, Winterhalter P, Von Baer D. Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chem*. 2014;155:256–263.

34. Moss R, Mao Q, Taylor D, Saucier C. Investigation of monomeric and oligomeric wine stilbenoids in red wines by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry: study of wine stilbenoids in red wines by UPLC/ESI-QTOFMS. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2013;27(16):1815–1827.

35. Bavaresco L, Pezzuto S, Fornaroli A, Ferrari F. Grapevine iron-chlorosis occurrence and stilbene root concentration as affected by the rootstock and arbuscular mycorrhizal infection. In *VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding*. 2002. 401–410pp.

36. Sako M, Hosokawa H, Ito T, Iinuma M. Regioselective oxidative coupling of 4-hydroxystilbenes: synthesis of resveratrol and ϵ -viniferin (*E*)-dehydrodimers. *J Org Chem* 2004;69(7):2598–2600.

37. Velu SS, Di Meo F, Trouillas P, Sancho-Garcia JC, Weber JFF. Regio- and stereocontrolled synthesis of oligostilbenoids: theoretical highlights at the supramolecular level. *J Nat Prod*. 2013;76(4):538–546.3

38. Cichewicz RH, Kouzi SA, Hamann MT. Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *J Nat Prod*. 2000;63(1):29–33.

39. Gindro K, Schnee S, Righi D, Marcourt L, Nejad Ebrahimi S, Codina JM, Voinesco F, Michellod E, Wolfender JL, Queiroz EF. Generation of antifungal stilbenes using the enzymatic secretome of *Botrytis cinerea*. *J Nat Prod*. 2017;80(4):887–898.

40. Gabaston J, El Khawand T, Waffo-Teguo P, Decendit A, Richard T, Mérillon JM, Pavela R. Stilbenes from grapevine root: a promising natural insecticide against *Leptinotarsa decemlineata*. *J Pest Sci*. 2018;91:897–906.

41. Raposo R, Chinnici F, Ruiz-Moreno MJ, Puertas B, Cuevas FJ, Carbu M, Guerrero RF, Ortiz-Somovilla V, Moreno-Rojas JM, Cantos-Villar E. Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots: impact on the wine quality. *Food Chem.* 2018;243:453–460.
42. Cebrian-Tarancon C, Sanchez-Gomez R, Salinas MR, Alonso GI, Oliva J, Zalacain A. Toasted vine-shoot chips as enological additive. *Food Chem.* 2018;126:272–279.
43. Amalfitano C, Agrelli D, Arrigo A, Mugnai L, Surico G, Evidente A. Stilbene polyphenols in the brown red wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by “esca proper”. *Phytopathol Mediterr.* 2011;50(4):224–235.
44. Rusjan D, Persic M, Likar M, Biniari K, Mikulic-Petkovsek M. Phenolic responses to esca-associated fungi in differently decayed grapevine woods from different trunk parts of “Cabernet sauvignon”. *J Agric Food Chem.* 2017;65(31):6615–6624.
45. Bavaresco L, Cantù E, Trevisan M. Chlorosis occurrence, natural arbuscular mycorrhizal infection and stilbene root concentration of ungrafted grapevine rootstocks growing on calcareous soil. *J Plant Nutr.* 2000;23(11–12):1685–1697.
46. Németh G, Hegyi O, Dunai A, Kocsis L. Stilbenes in the different organs of *Vitis vinifera* cv. Merlot grafted on TK5BB rootstock. *Oeno One.* 2017;51(3):323–328.

Supporting Information

Wood and roots of major grapevine cultivars and rootstocks: a comparative analysis of stilbenes by UHPLC-DAD-MS/MS and NMR

Julien Gabaston,¹ Cécile Leborgne,¹ Pierre Waffo-Teguo,¹ Josep Valls,¹ Antonio Palos Pinto,¹
Tristan Richard,¹ Stéphanie Cluzet,¹ Jean-Michel Mérillon^{1*}

¹Univ. Bordeaux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de Recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366
INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique - ISVV, 33882 Villenave d'Ornon cedex, France

*Corresponding author (Tel: +33 5 57 57 59 50; E-mail: jean-michel.merillon@u-bordeaux.fr)

List of Supporting Information

Figure S1. Preparative HPLC chromatograms at 280 nm and 306 nm of grapevine extract.	130
Figure S2. Preparative HPLC chromatograms at 280 nm and 306 nm of grapevine extract without major compounds.	130
Figure S3. LC-MS chromatograms at 280 nm and 306 nm of grapevine extract.	131
Figure S4. Monomeric stilbenes identified in grapevine extracts.	132
Figure S5. Dimeric stilbenes identified in grapevine extracts.	132
Figure S6. Trimeric stilbenes identified in grapevine extracts.	133
Figure S7. Tetrameric stilbenes identified in grapevine extracts.	133

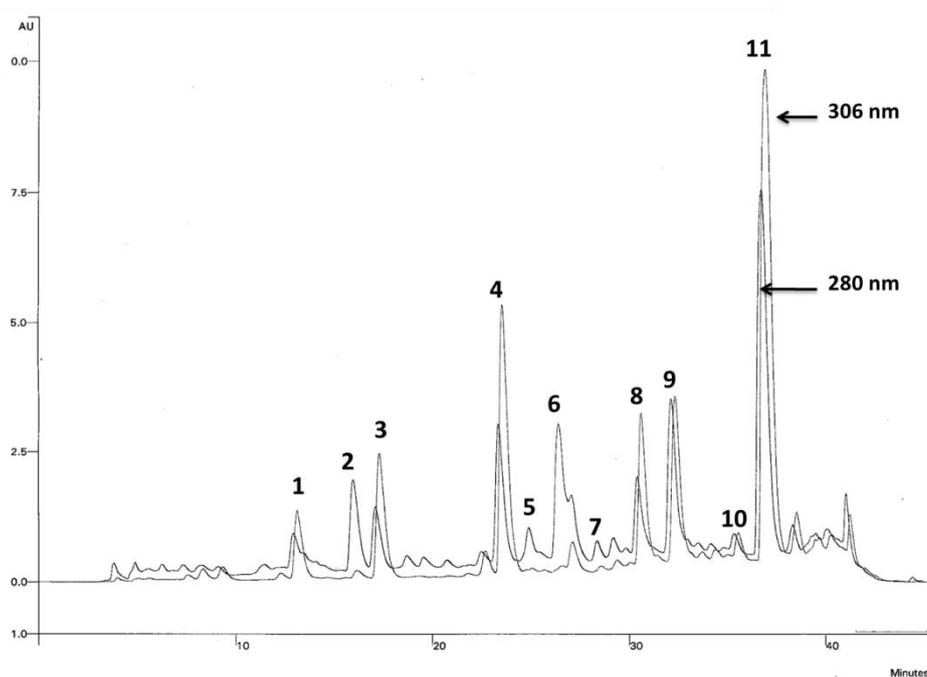


Figure S1. Preparative HPLC chromatograms at 280 nm and 306 nm of grapevine extract. **1**, (*E*)-piceid; **2**, ampelopsin A; **3**, (*E*)-piceatannol; **4**, (*E*)-resveratrol; **5**, viniferol E; **6**, hopeaphenol; **7**, isohopeaphenol; **8**, (*E*)- ϵ -viniferin; **9**, vitisin A; **10**, ampelopsin F; **11**, vitisin B.

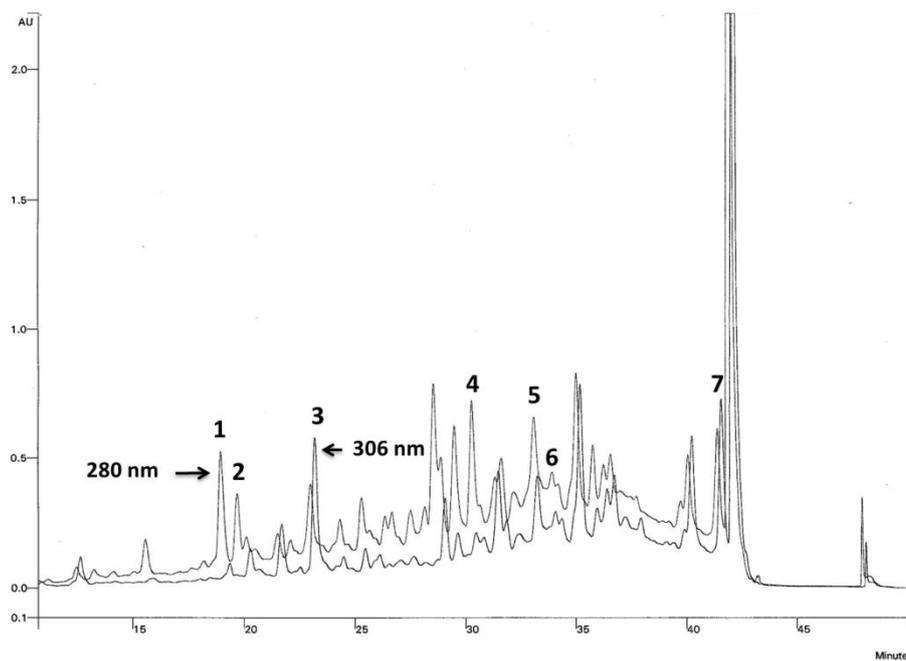


Figure S2. Preparative HPLC chromatograms at 280 nm and 306 nm of grapevine extract without major compounds. **1**, ampelopsin F; **2**, pallidol; **3**, parthenocissin A; **4**, ampelopsin H; **5**, miyabenol C; **6**, ω -viniferin; **7**, vitisin C.

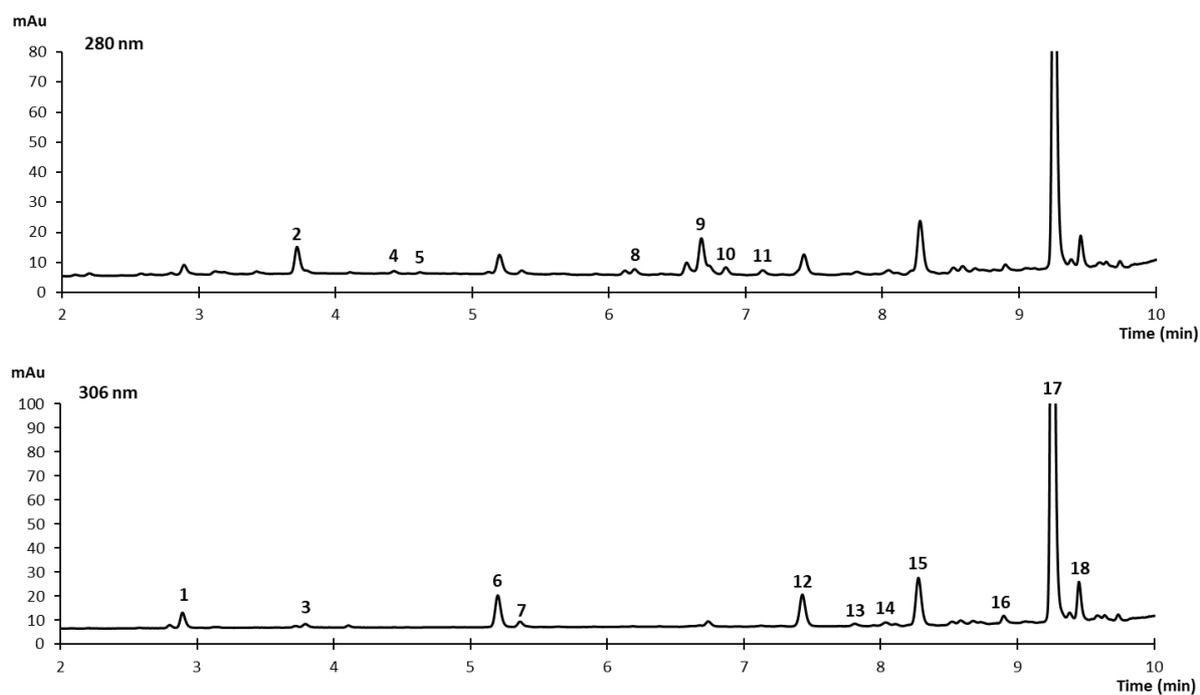
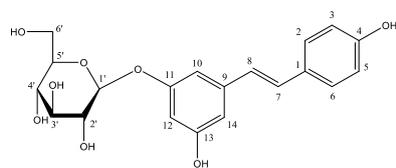
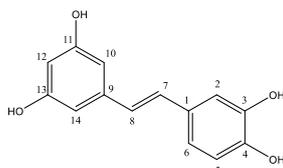


Figure S3. LC-MS chromatograms at 280 nm and 306 nm of grapevine extract. **1**, (*E*)-piceid; **2**, ampelopsin A; **3**, (*E*)-piceatannol; **4**, ampelopsin F; **5**, pallidol; **6**, (*E*)-resveratrol; **7**, parthenocissin A; **8**, viniferol E; **9**, hopeaphenol; **10**, isohopeaphenol; **11**, ampelopsin H; **12**, (*E*)- ϵ -viniferin; **13**, miyabenol C; **14**, ω -viniferin; **15**, vitisin A; **16**, (*E*)-ampelopsin E; **17**, vitisin B; **18**, vitisin C.

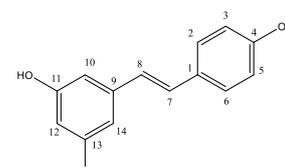
Monomers



E-piceid



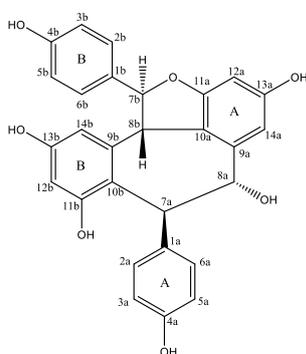
E-piceatannol



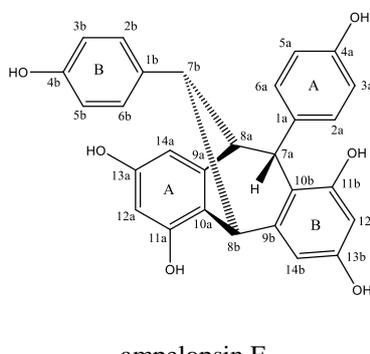
E-resveratrol

Figure S4. Monomeric stilbenes identified in grapevine extracts.

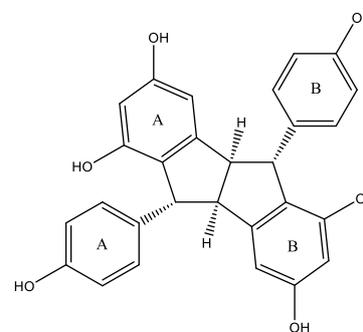
Dimers



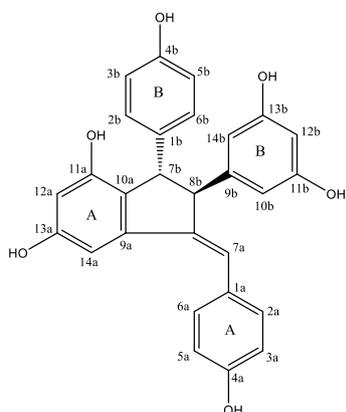
ampelopsin A



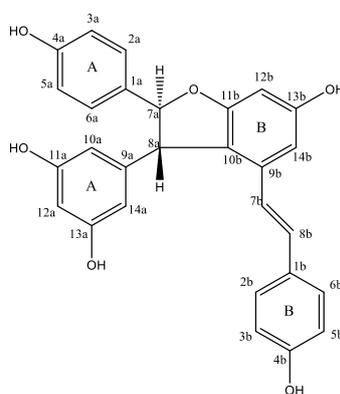
ampelopsin F



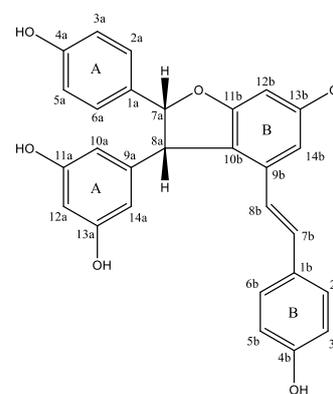
pallidol



E-parthenocissin A



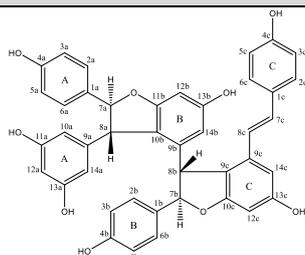
E-ε-viniferin



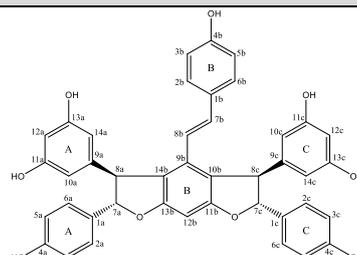
E-ω-viniferin

Figure S5. Dimeric stilbenes identified in grapevine extracts.

Trimers



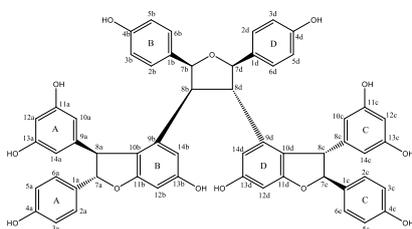
E-miyabenol C



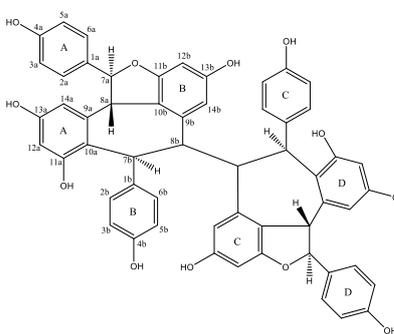
E-ampelopsin E

Figure S6. Trimeric stilbenes identified in grapevine extracts.

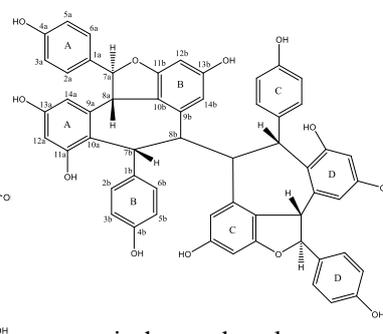
Tetramers



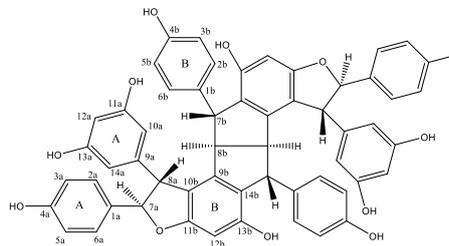
viniferol E



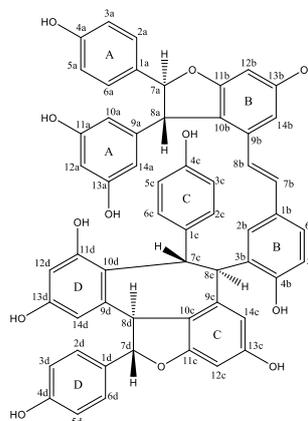
hopeaphenol



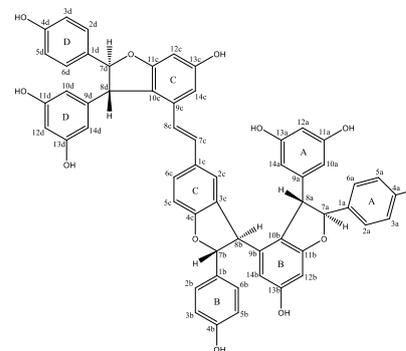
isohopeaphenol



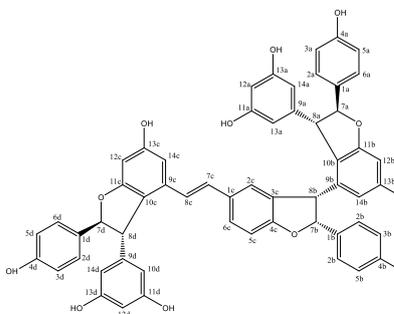
ampelopsin H



vitisin A



vitisin B



vitisin C

Figure S7. Tetrameric stilbenes identified in grapevine extracts.

Chapitre III. Extraction des stilbènes complexes de la vigne par la chimie verte

A. Stratégie

Les précédents travaux ont permis de mettre en évidence que des extraits hydro-alcooliques de ceps et racines de vigne étaient particulièrement actifs contre le mildiou de la vigne. La richesse en tétramères dans ces organes, responsables de l'activité oomycide, a pu être généralisée. En effet, un phénomène d'oligomérisation des stilbènes des sarments vers les racines a été mis en exergue pour la première fois chez la vigne quels que soient le cépage et le porte-greffe utilisés. Ces travaux encourageaient ainsi la valorisation des parties bois et racines en tant qu'agent antioomycète.

Ce projet s'inscrivant dans une vision d'agriculture écologique et durable, il est important d'étudier les différentes possibilités pour l'obtention d'extraits respectueux de l'environnement. Les extraits précédents ont été obtenus avec un mélange éthanol-eau qui correspond au système le plus adapté à l'utilisation d'un solvant organique. Malgré une polarité variable avec la présence de formes oligomériques augmentant leur apolarité, la question d'une alternative aux solvants organiques pour l'extraction des stilbènes peut se poser.

Actuellement, il y a un regain d'intérêt pour la recherche de procédés d'extraction mêlant innovation, efficacité économique et respect écologique demandé par les consommateurs. Cette « idéologie » se nomme la « chimie verte ». Elle se traduit notamment par la recherche d'alternatives aux solvants organiques dont une voie est l'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction dans des conditions dites sous-critiques. Cette méthode est basée sur une utilisation exclusive de l'eau avec l'application d'une haute température et d'une haute pression permettant de modifier les propriétés physico-chimiques de l'eau et ainsi diminuer sa polarité. Ainsi, cette méthodologie offre la possibilité d'extraire des composés polaires et apolaires.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la potentialité d'utilisation d'une méthodologie avec eau sous-critique pour extraire les stilbènes complexes à partir de coproduits de la vigne (sarment, cep, racine). Pour cela, une optimisation du protocole d'extraction sera initiée avec l'étude de deux paramètres importants : la température et le temps d'extraction. La comparaison des rendements d'extraction des stilbènes oligomériques entre l'eau sous-critique et un solvant organique conventionnel permettra de statuer sur l'efficacité de cette méthodologie innovante.

B. Design Expérimental

B.1. Extraction

Ce procédé innovant à partir d'eau sous-critique nécessite l'utilisation d'un outil performant, ajustable (température et temps d'extraction) et reproductible pour la réalisation des extractions. En ce sens, l'utilisation d'un extracteur automatisé ASE a été choisie.

Les extractions ont été effectuées à quatre températures différentes avec une gamme élargie de 100, 130, 160 et 190 °C. En dessous de 100 °C, on considère que les conditions de l'eau ne sont pas dites « sous-critiques », c'est-à-dire n'ayant pas d'effet physico-chimique sur l'eau et ne permettant pas d'acquérir de nouvelles propriétés. L'ASE ayant une limitation de température à 200 °C, il n'était pas possible de viser des températures supérieures.

Concernant le temps de contact entre l'eau et le matériel végétal, trois différents temps d'extraction ont été choisis : 5, 15 et 30 minutes. Au-delà, on peut considérer que cette procédure serait trop consommatrice de temps et d'énergie (chauffage) avec une accélération d'usure de la machine de par l'association de hautes températures et de temps d'extractions (> 30 minutes).

Les extractions ont été effectuées avec 5 g de poudre (sarment, cep ou racine de vigne) dans une cellule ASE de 34 mL équipée de joint en viton et contenant un filtre en fibre de verre permettant une résistance aux conditions d'eau sous-critique. La pression fixe de l'extracteur ASE, 100 bars, est utilisée. Le choix d'extraction sur un seul cycle a été privilégié afin de mettre en évidence des différences dans les rendements d'extraction permettant de révéler les conditions les plus appropriées, et de réduire le temps d'utilisation de la machine, plus intéressant économiquement.

Ce procédé d'eau sous-critique est comparé dans cette étude à une méthode classique d'extraction basée sur l'utilisation d'un solvant organique. Le contrôle consiste en une extraction par ASE avec un mélange éthanol-eau à 85/15 (v/v) à 60 °C. Cette méthodologie joue ainsi la continuité avec les précédents travaux. Toutes les extractions ont été effectuées en triplicata.

B.2. Analyse

A l'instar des travaux précédents, les extraits obtenus ont été étudiés par CLUHP-DAD couplé à un spectromètre de masse à trappe ionique permettant l'analyse de la composition en stilbènes avec les temps de rétention, les spectres UV, les ions moléculaires et les ions produits par fragmentation.

En outre, au cours de cette étude, un stilbène peu commun observable seulement en condition d'eau sous-critique a été isolé afin de réaliser sa caractérisation complète. Hormis l'utilisation de la CLUHP-DAD-TI offrant des données sur sa masse molaire, ses fragments caractéristiques et donc des informations sur sa structure, une analyse par spectrométrie de masse à haute résolution a été réalisée. En effet, le composé a été étudié par CLUHP couplée à un spectromètre de masse Q-TOF (Quadripole – Time Of Flight). Ce système permet d'obtenir la masse exacte des composés ainsi que la prédiction de leurs formules brutes. Ce système à haute résolution permet donc d'accéder à des informations supplémentaires sur la structure du composé.

Le pouvoir rotatoire du composé est également étudié par polarimétrie. Ce système repose sur la propriété que possèdent certains composés à dévier le vecteur d'un faisceau lumineux qui les traversent. On peut ainsi noter l'angle de polarisation qui est une des caractéristiques propre à chaque molécule.

Pour compléter la caractérisation de ce composé, une analyse RMN mono- et bi-dimensionnelle (COSY, ROESY, HSQC, HMBC) a été réalisée. La COSY et la ROESY permettent respectivement de visualiser les couplages proton-proton scalaires et spatiaux alors que la HSQC et la HMBC correspondent respectivement au couplage proton-carbone à une liaison covalente (aussi nommé $J1$) et jusqu'à trois liaisons covalentes ($J3$). Ainsi, ces outils analytiques ont permis l'élucidation structurale de ce composé et plus globalement une caractérisation précise des extraits obtenus par la méthodologie d'eau sous-critique.

C. Résumé des résultats

Le screening chimique des différents extraits a permis d'identifier 18 stilbènes. Ces composés sont les mêmes stilbènes préalablement identifiés avec l'utilisation du solvant organique hydroalcoolique traditionnel: (*E*)-picéide, (*E*)-picéatannol, (*E*)-resvératrol, ampélopsine A, ampélopsine F, pallidol, (*E*)-parthénocissine A, (*E*)- ϵ -viniférine, (*E*)- ω -viniférine, miyabénol C, ampélopsine E, viniférol E, hopéaphénol, isohopéaphénol, ampélopsine H, vitisine A (r2-viniférine) et vitisine B (r-viniférine). De plus, comme mentionné précédemment, un stilbène non identifié a été isolé et caractérisé. L'ensemble de ces stilbènes sont quantifiés dans les différents extraits par CLUHP-DAD.

Le premier objectif de cette étude a été d'optimiser le procédé d'extraction des stilbènes par eau sous-critique à partir de matrices complexes telles que les coproduits viticoles. Pour cela, deux paramètres importants ont été modulés, la température et le temps d'extraction.

L'effet de la température a été testé pour les valeurs de 100, 130, 160 et 190 °C. Globalement, on note une augmentation croissante du rendement en stilbène de 100 à 160 °C avant un plateau ou une décroissance à 190 °C pour les extraits de sarment, cep et racine de vigne. La température optimale semble donc être à 160 °C.

L'effet du temps d'extraction repose sur trois périodes distinctes avec 5, 15 ou 30 minutes de contact entre l'eau et le matériel végétal. De façon générale, à faible température (100 et 130 °C), le temps d'extraction n'a pas d'influence, avec des rendements similaires à 5, 15 et 30 minutes. Cependant, à des températures de 160 ou 190 °C, un temps de 5 minutes suffit pour obtenir un meilleur rendement en stilbènes, notamment pour les sarments et racines de vigne. On peut ainsi admettre que le temps d'extraction optimal est de 5 minutes.

Par rapport au contrôle basé sur l'utilisation d'un mélange éthanol-eau, les rendements en stilbènes sont légèrement supérieurs pour la méthode avec solvant organique vis-à-vis des extraits à l'eau sous-critique de sarment et racine de vigne, mais sont similaires avec l'extrait de cep de vigne.

En outre, on peut souligner que pour une température de 190 °C et un temps de contact long de 30 minutes, il y a une décroissance généralisée du rendement en stilbènes dans les extraits de sarment, cep et racine de vigne, synonyme d'une potentielle dégradation de ces composés.

Le deuxième objectif de cette étude a été d'évaluer le potentiel d'une méthodologie d'eau sous-critique pour extraire les stilbènes complexes à partir des coproduits de la vigne.

Comme mis en évidence dans les précédents travaux, les sarments se sont révélés être riches en resvératrol (1.54 g/kg MS) et ϵ -viniférine (0.99 g/kg MS) dans l'extrait hydro-alcoolique de référence. L'extraction par eau sous-critique a permis d'atteindre des valeurs du même ordre de grandeur avec respectivement 1.30 g/kg MS et 0.66 g/kg MS pour le resvératrol et l' ϵ -viniférine.

Comme attendu, le mélange traditionnel éthanol-eau permet d'extraire dans les ceps de vigne le resvératrol (2.35 g/kg MS) et l' ϵ -viniférine (2.72g/kg MS) mais également des composés plus complexes comme les tétramères vitisine B (0.96 g/kg MS) et isohopéaphénol (0.87 g/kg MS). L'eau sous-critique a permis d'obtenir le resvératrol à 2.11 g/kg MS et l' ϵ -viniférine à 1.83 g/kg MS, confirmant la bonne tenue de la méthodologie d'eau sous-critique à extraire les stilbènes peu oligomérisés. De façon surprenante, l'isohopéaphénol est extrait à 1.45 g/kg MS, soit deux fois plus qu'en condition de contrôle. La vitisine B est quant à elle moins extraite (0.12 g/kg MS).

Dans les racines de vigne, connues pour être riches en stilbènes oligomériques, la méthode de référence permet d'extraire majoritairement les tétramères vitisine B, vitisine A et hopéaphénol avec respectivement 8.33 g/kg MS, 2.11 g/kg MS et 1.52 g/kg MS. L'eau sous-critique permet d'obtenir la vitisine A de manière similaire à 2.14 g/kg MS et 1,5 fois plus d'hopéaphénol avec 2.23 g/kg MS. Le procédé d'eau sous-critique permet donc d'extraire aussi bien voir mieux certains stilbènes complexes que les solvants organiques. Ces résultats sont toutefois à nuancer par la faible extraction de la vitisine B (1.64 g/kg MS). D'une part, la vitisine B est un stilbène très apolaire ce qui rend son extraction difficile par un solvant exclusivement aqueux. D'autre part, les analyses ont révélé que la vitisine B ainsi que la vitisine A ont leur rendement qui décroît au fur et à mesure que la température et le temps d'extraction augmentent, à partir de 160 °C et 5 minutes. Au contraire, un composé non identifié voit son rendement augmenter, révélant un plausible lien entre ces observations.

En premier lieu, ce stilbène non commun a été caractérisé structuralement, mettant en évidence un tétramère. Composé d'une unité ampélopsine A et d'une unité ampélopsine F, ce tétramère avait été reporté dans une étude portant sur des transformations synthétiques de stilbènes à l'aide de réactions à l'acide sulfurique à partir de vitisine A, elle-même issue de la vitisine B.

Cette étude permet d'appuyer l'hypothèse que ce composé est issu de la transformation de la vitisine A et vitisine B sous l'effet de hautes températures, hautes pressions et un temps d'extraction long. Pour le confirmer, la vitisine A purifiée a été soumise à un traitement à l'eau sous-critique (190 °C et 15 minutes) mettant en exergue la formation de ce composé. Ainsi, c'est la première fois que ce composé a été obtenu à partir d'une matrice naturelle et a été nommé vitisine F.

En résumé, les stilbènes présents dans les coproduits de la vigne ont été préférentiellement extraits dans des conditions d'eau sous-critique à 160 °C avec un temps de contact de 5 minutes. Cette méthode d'extraction innovante a permis d'extraire les stilbènes complexes dans le même ordre de grandeur que les solvants organiques classiques. La rapidité de l'extraction peut être un atout pour un futur développement industriel. Toutefois, l'application d'une température élevée (190 °C) et une longue durée d'extraction peut entraîner la modification ou la dégradation des stilbènes.

D. Publication

Les résultats ont été rédigés sous forme d'un article scientifique intitulé « Subcritical water extraction of stilbenes from grapevine by-products: a new green chemistry approach », qui a été soumis le 20 Juin 2018 dans *Industrial Crops & Products*, puis accepté le 6 Octobre 2018 et publié le 15 Décembre 2018.

Subcritical water extraction of stilbenes from grapevine by-products: a new green chemistry approach

Julien Gabaston,^a Cécile Leborgne,^a Josep Valls,^a Elodie Renouf,^b Tristan Richard,^a Pierre Waffo-Tegu, ^a Jean-Michel Méryllon^{ab*}

^aUniv. Bordeaux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de Recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique (Gesvab) - ISVV, 33882 Villenave d'Ornon cedex, France

^bPolyphénols Biotech (Technology Transfer Unit), ISVV, 33882 Villenave d'Ornon cedex, France

*Corresponding author: jean-michel.merillon@u-bordeaux.fr

Abstract

Currently, one of the biggest challenges in viticulture is to valorize the huge amount of biomass, especially grapevine waste. Subcritical water is a sustainable and eco-friendly method of extraction based on the use of water as an extracting agent, corresponding to the strategy called "green chemistry". Application of a high temperature and a high pressure maintains the water in its liquid form allowing polar and less polar compounds to be extracted. Stilbenes are low-polarity compounds that normally require organic solvents for their extraction. This study investigated the possibility of using a subcritical water process to extract complex stilbenes from three vine co-products: cane, wood, and root. Various temperatures (100, 130, 160 and 190 °C) and contact times (5, 15 and 30 min) were tested by accelerated solvent extraction (ASE). The highest stilbene yield was obtained at 160 °C and 5 min for cane (3.62 g/kg dry mass), wood (9.32 g/kg dry mass) and root (12.1 g/kg dry mass). ASE allowed the extraction of monomers, dimers, trimers and tetramers of stilbenes in similar amounts as with conventional organic solvents. In addition, the subcritical extraction conditions led to the formation of an uncommon tetrameric stilbene, named vitisin F. The possibility of using "green chemistry" for extracting oligomeric stilbenes is a step forward in the search for alternatives to organic solvents.

Keywords: polyphenols, stilbenes, vine by-products, subcritical water, eco-extraction

1. Introduction

For several decades, viticulture has been a predominant economic and societal activity, particularly in Europe. France, Italy and Spain are among the largest producers of wine worldwide generating half of the world's wine production, about 134 million hectoliters out of the 279 million hectoliters of wine (Eurostat, 2017). However, viticultural practices are one of the most productive agricultural activities of vegetal waste (Valls et al., 2017). Indeed, grapevine canes are pruned each year generating a large source of biomass. In France, about 1.4 million tons of grapevine canes per year are generated (FranceAgrimer, 2016) while the Castilla-La Mancha region in Spain produces about 1.15 million tons of cane (Sánchez-Gómez et al., 2014). The replacement of vineyards also generates a large amount of grapevine wood and root waste. The French vineyards generate about 0.4 million tons of this biomass per year (ADEME, 2009; ATLAS, 2017). Currently, the difficulty of storing byproducts as well as their reprocessing costs has made waste management burdensome. To meet this challenge, the European Parliament issued a directive stipulating that waste prevention is the priority in waste management, and that waste recycling should be given priority over energy re-use (Directive 2008/98 EC, 2008). Thus, one of the biggest challenges in agriculture is to create alternatives and valorize the huge amount of biomass, especially in viticulture.

Recently, studies have shown innovative applications for vine co-products. Extracts of grapevine canes showed *in vitro* antifungal activities against the three major vineyard diseases: *Plasmopara viticola*, *Botrytis cinerea* and *Erysiphe necator* (Schnee et al., 2013). Focusing on *P. viticola* infection, greenhouse and vineyard studies conducted with a cane extract against downy mildew produced similar results to traditional treatments (Richard et al., 2016). Recent studies of the other vegetative parts of the grapevine have demonstrated that wood and root extracts are more active against downy mildew than cane extracts (Gabaston et al., 2017). Furthermore, extracts of cane and roots exerted an insecticidal activity against *Spodoptera littoralis* and *Leptinotarsa decemlineata* (Gabaston et al., 2018; Pavela et al., 2017). Thus, the use of viticultural co-products in the phytosanitary field has a promising future for valorization. Additionally, cane extracts have recently been tested as alternatives to SO₂ for winemaking and could be used in the oenological field (Raposo et al., 2018). Canes were also tested as a new oenological additive as toasted chips in order to produce wines with complexity in terms of flavor and taste (Cebrián-Tarancón et al., 2018).

These activities are due notably to the presence of stilbenes in the vegetative parts of the grapevine. Stilbenes are polyphenolic compounds with a C6-C2-C6 structure that are derived from the secondary metabolism of plants (Pawlus et al., 2012; Rivière et al., 2012). They are particularly known for their antimicrobial properties and act as phytoalexins (i.e. molecules produced by the plant to defend itself) in certain families of plants (Jeandet et al., 2002). Recent work showed the activity of oligomeric stilbenes present in grapevine against several pathogens (Schnee et al., 2013). Vitisins A (r2-viniferin) and B (r-viniferin), hopeaphenol and isohopeaphenol are tetramers that have demonstrated antifungal properties against downy mildew (Gabaston et al., 2017). Another study also reported the efficacy of complex stilbenes in reducing the growth of grapevine wood decay fungi (Lambert et al., 2012). The presence of these complex stilbenes in active extracts is therefore important and their extraction from viticultural co-products is a major challenge.

At present, oligomeric stilbenes have been extracted from plant materials by using traditional methods based on organic solvents owing to their polarities. Solvents such as ethanol, methanol, acetone and ethyl acetate have been widely used in conventional solid-liquid extraction processes (Merken and Beecher, 2000). However, this excessive consumption of organic solvents has a negative impact on the environment with the generation of toxic waste. Solvents can also impact human health; for example, methanol was recently classified as a CMR (carcinogenic, mutagenic, or toxic for reproduction) product (Directive 67/548/EEC and 1999/45/EC, 2008). In addition, these traditional extraction methods are generally time-consuming and labor-intensive (Choi et al., 2003).

Therefore, there is renewed interest in the use of sustainable and environmentally friendly solvents as alternatives to organic solvents, corresponding to a strategy called "green chemistry". These principles tend to reduce the use of organic solvents in favor of clean solvents such as water. One of the trends in ecofriendly polyphenol extraction techniques is the use of subcritical water (García-Marino et al., 2006; Ju and Howard, 2006). The method is based on the use of water as an extracting agent at a high temperature (between 100 and 374 °C) and a high pressure to maintain water in its liquid form (Davidov-Pardo et al., 2014). This combination of high temperature and pressure makes it possible to modify the physicochemical properties of water by lowering the dielectric constant and thus decreasing the water polarity (Aliakbarian et al., 2012). As a result, the method can be used to extract non-polar compounds. Some recent works have focused on the extraction of stilbenes with subcritical water from grapevine canes. Extraction with water at increasing temperatures accompanied by ethanol as co-solvent made it possible to obtain the monomer (*E*)-resveratrol and the dimer (*E*)- ϵ -viniferin (Karacabey et al., 2012). A variation in temperature up to 100 °C and pressure up to 100 bars allowed the extraction of (*E*)-resveratrol and its glycosylated form, (*E*)-piceid (Sánchez-Gómez et al., 2014). However, the extraction of more complex stilbenes and the determination of the optimal subcritical water conditions for stilbenes remain unexplored.

The present study investigated the use of subcritical water process to extract complex stilbenes from three vine co-products: cane, wood, and root. The optimal extraction conditions were determined in terms of temperature and extraction time. The possibility of using subcritical water as an alternative to organic solvents for extracting oligomeric stilbenes is discussed.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Grapevine canes, woods and roots were collected from the “Château Rochemorin” vineyard in the region of Bordeaux (France) in 2017. We used a Merlot cultivar grafted on a Riparia Gloire de Montpellier rootstock. Each part was crushed once on an electric shredder (Bosch, Stuttgart, Allemagne) and finely ground with a cutting mill (Fritsch, Idar-Oberstein, Allemagne). Samples were stored in a dry place until extraction.

2.2. Extraction Procedure

Subcritical water extraction was carried out using an accelerated solvent extraction (ASE) apparatus (Dionex Corporation, Sunnyvale, CA). Extraction was performed at four different temperatures (100, 130, 160 and 190 °C) and three different times of extraction (5, 15 and 30 min). All extractions were done with five grams of powder in a 34 mL cartridge containing a fiberglass filter with the following parameters: pressure, 100 bars; cycle, 1; rinse volume, 30%; purge, 100 s; extraction solvent, water. Controls were performed on the ASE apparatus with five grams of samples and an ethanol-water mixture (85/15; v/v) at 60 °C and one cycle of 5 min. All extractions were carried out in triplicate on grapevine cane, wood and root.

2.3. Chemicals and Standards

Extractions with subcritical water were performed with purified water from an Elga water purification system (High Wycombe, U.K.). Control extractions were carried out with absolute ethanol purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France). Analyses were performed with LC-MS-grade acetonitrile (VWR, Fontenay-sous-bois, France), formic acid (Fisher Scientific, Loughborough, U.K.) and HPLC-grade methanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Standard isolations were carried out with HPLC-grade acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

Stilbenes were purified as standards using a Varian Pro Star preparative HPLC equipped with an Agilent Zorbax SB-C18 PrepHT column (250 mm x 21.2 mm, 7 µm) and a diode array detector. Elution was performed with a flow rate of 17 mL/min with acidified water (0.025% TFA) and acidified acetonitrile (0.025% TFA) with the following gradient: 20% B (0–5 min), 20 to 45% B (5–35 min), 45 to 55% B (35–38 min), 55 to 100% B (38–40 min), 100% B (40–45 min) 100 to 40% B (45–48 min). Purified standards were characterized by NMR and spectral data were compared with those of the laboratory library. Stilbenes obtained as standards were: *E*-piceid, *E*-piceatannol, *E*-resveratrol, ampelopsin A, ampelopsin F, pallidol, *E*-parthenocissin A, *E*- ϵ -viniferin, *E*- ω -viniferin, *E*-miyabenol C, *E*-ampelopsin E, viniferol E, hopeaphenol, isohopeaphenol, ampelopsin H, vitisin A, vitisin B, vitisin F. Purity was evaluated by UHPLC-DAD and was estimated to be $\geq 90\%$.

2.4. LC-MS Analysis

2.4.1. LC-DAD/ESI-IT

An UHPLC Agilent 1290 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) apparatus equipped with an auto sampler module, a binary pump with a degasser, a column heater/selector and a UV/Vis diode-array detector (DAD) was used. The column was a 100 mm x 2.1 mm i.d., 1.8 µm, Zorbax SB-C18 with a 2.1 mm x 5 mm i.d. guard column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Elution was performed at a flow rate of 0.4 mL/min with acidified water (0.1% formic acid) as solvent A and acidified acetonitrile (0.1% formic acid) as solvent B using the following gradient: 17% B (0–0.4 min), 17 to 30% B (0.4–4.4 min), 30 to 38% B (4.4–7.4 min), 38 to 50% B (7.4–9.0 min), 50 to 100% B (9.0–10.0 min). An Esquire 6000 ion trap mass (IT) spectrometer (Bruker-Daltonics, Billerica, MA) with an electrospray ionization source (ESI) was coupled to the LC. The MS method was performed as follows: negative mode (range of m/z 100–1200); drying gas (nitrogen), 10 L/min; nebulizer pressure, 40 psi; temperature, 365°C; capillary voltage, 3100 V; capillary exit voltage, -118.3V; skimmer voltage, -40 V; trap drive, 58.1. Grapevine extracts were dissolved in methanol-water mixture (1/1; v/v) at 1 mg/mL, filtered on 0.45 µm polytetrafluoroethylene (PTFE) and analyzed in triplicate. Calibration and equation curves were obtained by injecting standards in independent quintuplicates at several concentrations (0, 5, 10, 50, 100 µg/mL) according to Feinberg’s method (2001). Data were processed with Bruker Data Analysis 3.2 software.

2.4.2. LC-DAD/ESI-Q-TOF

An UHPLC-DAD/ESI-Q-TOF system with an Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) apparatus equipped with an UV/Vis diode-array detector (DAD) and an ESI-Q-TOF mass spectrometer (Agilent 6530 Accurate Mass) was used. Analyses were performed on an Agilent Zorbax SB-C18 (100 mm x 2.1 mm x 1.8 μ m) column. Chromatographic elution was performed with a solvent system consisting of acidified water (0.1% formic acid) as solvent A and acidified acetonitrile (0.1% formic acid) as solvent B. Separation was performed at a flow rate of 0.3 mL/min with the following gradient: 1 to 100% B (0-5 min), 100% (5-6 min) and 100 to 1% (6-7 min). Mass spectrometry analyses were carried out in negative mode. The drying gas used was nitrogen at 9 L/min at 300°C with a nebulizer pressure of 25 psi. Sheath gas flow and temperature were set at 11 L/min and 350°C. Capillary voltage was 4000 V. Data processing was performed with Mass Hunter Qualitative Analysis software.

2.6. Polarimetry

Optic rotation $[\alpha]_D$ was performed with a Jasco P-2000 polarimeter (Lisses, France) by dissolving 1.5 mg of pure vitisin F in 1.5 mL of methanol. Experiment was carried out in triplicate at 25 °C.

2.5. NMR Analysis

The nuclear magnetic resonance apparatus was a 600 MHz Avance III spectrometer equipped with a 5-mm TXI probe head with Z-gradient coils (Bruker, Wissembourg, France). Pure compounds (1 mg) were dissolved in 200 μ L of d_4 -methanol or acetone- d_6 in 3-mm tubes. ^1H -NMR experiments were performed with a time domain (TD) of 32768 real data point (32k) using a 16.0183 ppm (9610.98 Hz) spectral width (SW), a relaxation delay (RD) set to 1.2 s and an required acquisition time (AQ) of 1.704 s. For monodimensional NMR, the number of scan (NS) was equal to 64. Molecular assignment were carried out by two-dimensional ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^1H HSQC and ^1H - ^1H HMBC procedure. All 2D-experiments were achieved with a TD of 2048 real data point x 256 increments with a SW of 14.0228 ppm (8413.68 Hz) and 220.0000 ppm (132000 Hz) in proton and carbon dimension respectively, with NS equal to 64 and RD set to 1.2 s. Bruker Topspin (v.3.2) software was used for 1D and 2D NMR spectra processing.

2.6. Statistical analyses

Three independent extractions were performed for each subcritical water condition. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison post hoc tests using GraphPad Prism software. Significant differences were represented by different letters.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of grapevine by-products

According to the nature of the extracts, 18 different stilbenes were determined by UHPLC-DAD-MS thanks to their retention times, the UV spectra, and the molecular ions (**Supplementary data, Table S1**). All data were correlated with the standards present in the laboratory and literature data bank (Gorena et al., 2014; Moss et al., 2013). An NMR structural analysis of each compound was performed to rule out any possibility of ambiguity on isomers such as hopeaphenol and isohopeaphenol (**Supplementary data, Table S1**). Thus, several stilbenes with different degrees of polymerization were characterized; (*E*)-piceid, (*E*)-piceatannol and (*E*)-resveratrol as monomers; ampelopsin A, ampelopsin F, pallidol, (*E*)-parthenocissin A, (*E*)- ϵ -viniferin and (*E*)- ω -viniferin as dimers; miyabenol C and ampelopsin E as trimers; viniferol E, hopeaphenol, isohopeaphenol, ampelopsin H, vitisin A (r2-viniferrin) and vitisin B (r-viniferin) as tetramers. These compounds are the main stilbenes already identified in vine by-products by using conventional organic solvents for extraction (Gabaston et al., 2017). In addition, an uncommon tetramer was isolated from the root parts in subcritical water conditions. Each identified compound was then quantified by UHPLC-DAD in the different extracts according to its own equation curve established at its maximum of absorption (Biais et al., 2017).

3.2. Optimal conditions of subcritical water procedure

We sought to establish the optimal subcritical water extraction conditions in terms of temperature and extraction time. A control was performed by using conventional organic solvents such as ethanol (Billet et al., 2018; Gabaston et al., 2017; Vergara et al., 2011). An extended temperature range from 100 to 190 °C with steps at 130 and 160 °C was chosen. With canes and using an extraction time of 5 min, stilbene yields increased from 1.24, 2.39, 3.62 g/kg dry mass at 100, 130 and 160 °C respectively and then decreased to 2.77 g/kg dry mass at 190 °C (**Figure 1A**). With times of 15 and 30 min, there was an increase from 100 to 130 °C followed by a plateau at 160 °C and a decrease at 190 °C. Regarding wood and roots, a similar phenomenon was observed at the times of 5, 15 or 30 min with a significant increase in stilbene extraction from 100 °C to 160 °C (**Figure 1B and 1C**). A plateau was exhibited from 160 °C to 190 °C at 5 and 15 min and a decrease in efficiency at 30 min. Overall, the extractability of total stilbenes increased from 100 to 160 °C in grapevine canes, wood and roots, followed by a plateau or a decrease in yield at 190 °C. An extraction temperature of 160 °C appeared to be optimal.

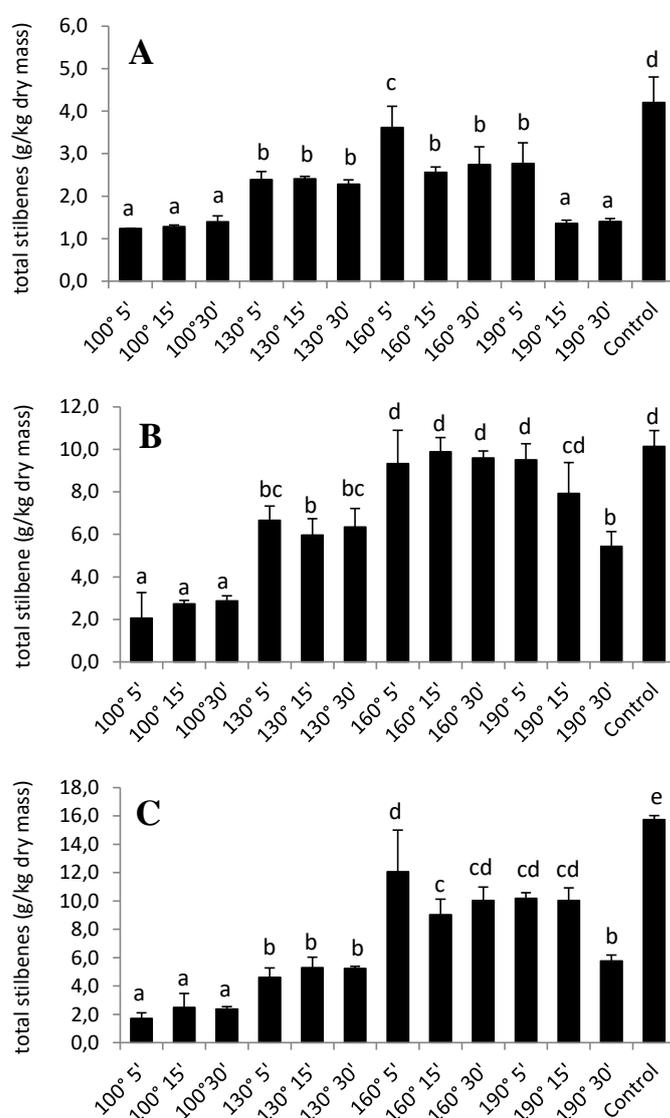


Figure 1. Total stilbene content (g/kg dry mass) obtained by subcritical water extraction with different temperatures (100 °C, 130 °C, 160 °C and 190 °C) and extraction times (5 min, 15 min and 30 min). A. Extraction from grapevine cane. B. Extraction from grapevine wood. C. Extraction from grapevine root. Different letters indicate significant difference according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls multiple comparison post hoc tests.

Concerning the extraction time, a contact between water and plant material at 5, 15 and 30 minutes were applied. In cane, yields were similar at 5, 15 and 30 minutes at 100 °C (1.24, 1.29 and 1.40 g/kg dry mass, respectively) and at 130 °C (2.39, 2.41 and 2.28 g/kg dry mass, respectively). However, with a temperature of 160 °C or 190 °C, 5 minutes of extraction produced a greater yield than 15 and 30 min (**Figure 1A**). In roots, yields were similar with 5, 15 and 30 min of extraction at 100 and 130 °C. The optimal yield was obtained from 5 min of extraction at 160 and 190 °C (**Figure 1C**). With wood, the extraction time had less influence since the total yield was the same with 5, 15 and 30 minutes extraction. This was the case at 100, 130 and 160 °C. At 190 °C, a time of 5 and 15 min provided the same amount of stilbenes whereas the yield was decreased at 30 min (**Figure 1B**). The contact time between the water and the material had less impact at low temperatures than with 5 minutes of extraction at high temperatures. In addition, a longer contact time did not allow more stilbenes to be extracted. Thus, the optimal conditions for extracting stilbenes were a temperature of 160 °C and an extraction time of 5 minutes. Furthermore, the high temperature (190 °C) combined with a long contact time (15 and/or 30 min) seemed to have a detrimental effect on the stilbenes as the total content decreased. It is well-known that polyphenols, especially resveratrol, are easily degradable owing to their susceptibility to oxidation. A study on the stability of resveratrol showed that increased temperatures at 125 °C, 150 °C and 175 °C resulted in 17 %, 39 % and 70 % lower yields, respectively (Liazid et al., 2007). There have been similar findings with other polyphenols such as lignans, for which an increase in temperature at 180 °C in subcritical water extraction was correlated with a decrease in yield due to their degradation (Kanmaz, 2014). Likewise, a study on the subcritical water extraction of anthocyanins and total phenolics from grape skin reported the degradation of polyphenols from 130 to 160°C (Ju and Howard, 2005).

Compared to the control, the total stilbene yield from canes and roots was slightly higher with the use of a conventional solvent while no significant difference was found for wood with subcritical water extraction (**Figure 1**). The difference could be due to the extractability of some compounds, thereby impacting the total stilbene content.

3.3. Extraction of complex stilbenes by subcritical water

The possibility of using subcritical water as a new method for extracting complex stilbenes was investigated in this study. Grapevine canes are known to be rich in monomeric and dimeric stilbenes (Lambert et al., 2013) so they were an ideal choice for the first test of subcritical water conditions. The control composed of conventional organic solvents with a hydro-alcoholic mixture confirmed the literature data with the extraction mostly of resveratrol (1.54 g/kg dry mass) and ϵ -viniferin (0.99 g/kg dry mass) (**Table 1**).

Table 1. Stilbene content (g/kg dry mass) obtained in grapevine cane by subcritical water procedure.

	100° 5'	100° 15'	100° 30'	130° 5'	130° 15'	130° 30'	160° 5'	160° 15'	160° 30'	190° 5'	190° 15'	190° 30'	Control
<i>Monomers</i>													
piceid	0.03	0.03	0.03	0.04	0.05	0.05	0.07	0.07	0.07	0.06	0.05	0.04	0.03
piceatannol	0.13	0.15	0.17	0.23	0.23	0.22	0.29	0.18	0.13	0.12	0.05	0.03	0.28
resveratrol	0.50	0.54	0.61	0.97	1.02	0.95	1.30	0.88	0.65	0.70	0.31	0.23	1.54
<i>Dimers</i>													
ampelopsin A	0.11	0.14	0.16	0.21	0.21	0.20	0.24	0.18	0.22	0.29	0.16	0.11	0.11
ampelopsin F	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	0.13	0.18	0.36	0.41	0.36	0.43	0.03
pallidol	0.04	0.04	0.05	0.07	0.07	0.07	0.10	0.11	0.08	0.08	NQ	NQ	0.08
parthenocissin A	NQ	NQ	NQ	NQ	0.03	0.04	0.09	0.12	0.20	0.24	0.15	0.12	0.05
ϵ -viniferin	0.21	0.20	0.20	0.46	0.40	0.37	0.66	0.34	0.30	0.28	0.07	0.08	0.99
ω -viniferin	0.01	0.01	0.02	0.03	0.04	0.04	0.08	0.04	0.04	0.04	NQ	0.25	0.07
<i>Trimer</i>													
miyabenol C	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	NQ	0.04	0.03	NQ	NQ	NQ	NQ	0.08
<i>Tetramers</i>													
viniferol E	0.03	0.02	0.03	0.06	0.05	0.06	0.07	0.06	0.14	0.11	NQ	NQ	0.08
hopeaphenol	0.07	0.06	0.06	0.13	0.14	0.14	0.24	0.20	0.34	0.32	0.16	0.11	0.28
isohopeaphenol	0.04	0.03	0.03	0.06	0.06	0.06	0.10	0.07	0.12	0.10	0.05	NQ	0.09
ampelopsin H	0.04	0.03	0.01	0.05	0.02	0.03	0.06	0.03	0.04	NQ	NQ	NQ	0.09
vitisin A	NQ	NQ	NQ	0.02	0.03	0.03	0.08	0.05	0.06	0.01	NQ	NQ	0.05
vitisin B	0.01	0.01	0.01	0.05	0.04	0.02	0.08	0.02	NQ	NQ	NQ	NQ	0.34
TOTAL	1.24	1.29	1.40	2.39	2.41	2.28	3.62	2.56	2.74	2.77	1.36	1.40	4.20

ND means not detected. NQ means detected but not quantified because of low levels.

Using the optimal subcritical water conditions that we found, i.e. 160 °C at 5 min, resveratrol was extracted at 1.30 g/kg dry mass and ϵ -viniferin at 0.66 g/kg dry mass, which are values in the same range as those of the control. Similar results have already been reported with extraction from grapevine cane of resveratrol at 1.95 g/kg dry mass and ϵ -viniferin at 0.49 g/kg dry mass at 160 °C with water and ethanol as co-solvent (7.4 %) (Karacabey et al., 2012). Furthermore, the extraction of several compounds such as ampelopsin F, parthenocissin A and vitisin A was difficult at 100 and 130 °C, with low yields from cane. However, the increasing temperature and extraction time allowed to improve the extractability of the complex stilbenes such as the dimers ampelopsin F and parthenocissin A as well as the tetramers hopeaphenol and isohopeaphenol (**Table 1**).

Grapevine wood extracted by hydroalcoholic solution was also found to be a source of resveratrol (2.35 g/kg dry mass) and ϵ -viniferin (2.72 g/kg dry mass), as well as tetrameric stilbenes such as vitisin B (0.96 g/kg dry mass) and isohopeaphenol (0.87 g/kg dry mass) (**Table 2**). Subcritical water (160 °C, 5 min) made it possible to extract resveratrol at 2.11 g/kg dry mass and ϵ -viniferin at 1.83 g/kg dry mass, confirming previous results on canes. In addition, subcritical water (190 °C and 5 min) strongly extracted polar dimers from wood such as ampelopsin F (1.61 g/kg dry mass) and parthenocissin A (1.4 g/kg dry mass), values 10- and 5-fold higher than with the control (0.12 and 0.23 g/kg dry mass, respectively). Regarding the more complex stilbenes, isohopeaphenol was extracted almost 2-fold more (1.45 g/kg dry mass) with subcritical water (160 °C, 30 min) than in conventional conditions (**Table 2**). However, vitisin B was extracted much less (0.12 g/kg dry mass). In fact, vitisin B was the most nonpolar stilbene in this study, highlighting the potential limitations of a method using water exclusively as solvent. Furthermore, as previously mentioned, low temperatures like 100 °C seemed to be less efficient than the highest temperatures such as 160 °C, with a 3-fold lower yield.

Table 2. Stilbene content (g/kg dry mass) obtained in grapevine wood by subcritical water procedure.

	100° 5'	100° 15'	100° 30'	130° 5'	130° 15'	130° 30'	160° 5'	160° 15'	160° 30'	190° 5'	190° 15'	190° 30'	Control
<i>Monomers</i>													
piceid	0.07	0.11	0.12	0.18	0.15	0.16	0.18	0.18	0.20	0.19	0.16	0.12	0.09
piceatannol	0.01	NQ	NQ	NQ	NQ	0.02	0.10	0.08	0.07	0.08	0.04	NQ	0.07
resveratrol	0.57	0.78	0.85	1.69	1.45	1.50	2.11	1.84	1.57	1.61	1.08	0.69	2.35
<i>Dimers</i>													
ampelopsin A	0.22	0.29	0.32	0.57	0.50	0.52	0.56	0.51	0.37	0.32	0.25	0.31	0.42
ampelopsin F	0.05	0.08	0.08	0.18	0.18	0.25	0.41	0.85	1.35	1.61	1.53	1.12	0.12
pallidol	0.16	0.22	0.26	0.53	0.48	0.50	0.65	0.67	0.67	0.63	0.51	0.33	0.40
parthenocissin A	0.08	0.11	0.13	0.30	0.30	0.39	0.62	0.95	1.20	1.43	1.20	0.66	0.23
ϵ -viniferin	0.31	0.40	0.39	1.25	1.12	1.12	1.83	1.53	0.96	0.72	0.40	0.26	2.72
ω -viniferin	0.05	0.07	0.07	0.22	0.20	0.19	0.33	0.29	0.23	0.18	NQ	NQ	0.37
<i>Trimer</i>													
miyabenol C	0.02	0.03	0.02	0.09	0.07	0.08	0.14	0.12	0.09	0.07	NQ	NQ	0.20
<i>Tetramers</i>													
viniferol E	0.08	0.09	0.09	0.19	0.18	0.19	0.24	0.34	0.34	0.32	0.25	0.18	0.22
hopeaphenol	0.14	0.16	0.15	0.43	0.37	0.40	0.61	0.77	0.80	0.76	0.86	0.60	0.69
isohopeaphenol	0.24	0.30	0.29	0.78	0.71	0.79	1.13	1.36	1.45	1.27	1.33	0.95	0.87
ampelopsin H	0.03	0.03	0.04	0.08	0.07	0.09	0.14	0.14	0.17	0.22	0.26	0.14	0.18
vitisin A	0.01	0.02	0.02	0.07	0.08	0.08	0.16	0.18	0.13	0.07	0.03	0.06	0.24
vitisin B	0.03	0.03	0.03	0.12	0.10	0.07	0.12	0.07	0.02	0.02	0.02	NQ	0.96
TOTAL	2.07	2.74	2.87	6.66	5.97	6.34	9.32	9.88	9.60	9.50	7.93	5.43	10.14

ND means not detected. NQ means detected but not quantified because of low levels.

Concerning roots, they are known to be a rich source of oligomers of stilbenes and especially tetramers (Gabaston et al., 2017). The control allowed us to extract mainly vitisin B (8.33 g/kg dry mass), vitisin A (2.11 g/kg dry mass) and hopeaphenol (1.52 g/kg dry mass) (**Table 3**). Subcritical water extraction provided 2.14 g/kg dry mass (160 °C and 5 min) of vitisin A and 2.23 g/kg dry mass (190 °C and 15 min) of hopeaphenol, showing yields were similar between subcritical water and organic solvents. Concordant results were obtained on grape seeds from winery by-products with high yields of flavanol dimers and trimers at 150 °C, underlining the efficacy of subcritical water for compounds that have a high degree of polymerization (García-Marino et al., 2006). Unfortunately, the extraction of vitisin B with subcritical water (1.64 g/kg dry mass) was 5-fold lower than with the hydroalcoholic extract (**Table 3**). However, the amount of vitisin A and vitisin B decreased from 160 °C to 190 °C while the yield of an uncommon tetramer increased, so vitisin A and vitisin B may have been transformed at high temperature and with a long extraction time.

Table 3. Stilbenes content (g/kg dry mass) obtained in grapevine root by subcritical water procedure.

	100° 5'	100° 15'	100° 30'	130° 5'	130° 15'	130° 30'	160° 5'	160° 15'	160° 30'	190° 5'	190° 15'	190° 30'	Control
<i>Monomers</i>													
piceid	0.07	0.10	0.11	0.15	0.13	0.16	0.21	0.20	0.21	0.19	0.20	0.15	0.10
piceatannol	0.03	0.04	0.05	0.07	0.05	0.06	0.09	0.08	0.08	0.07	0.04	0.00	0.08
resveratrol	0.13	0.18	0.19	0.38	0.27	0.33	0.52	0.44	0.43	0.42	0.30	0.19	0.57
<i>Dimers</i>													
ampelopsin A	0.25	0.43	0.44	0.60	0.72	0.72	1.10	0.61	0.43	0.35	0.23	0.21	0.58
ampelopsin F	0.05	0.09	0.09	0.14	0.21	0.31	0.41	0.45	0.48	0.57	0.67	0.46	0.13
pallidol	0.02	0.05	0.05	0.08	0.08	0.09	0.15	0.13	0.13	0.12	0.11	0.09	0.09
parthenocissin A	0.04	0.08	0.08	0.15	0.25	0.30	0.60	0.52	0.60	0.71	0.63	0.36	0.17
ε-viniferin	0.06	0.08	0.07	0.18	0.16	0.17	0.35	0.22	0.15	0.15	0.08	0.04	0.51
<i>Trimer</i>													
ampelopsin E	0.02	0.02	0.02	0.05	0.07	0.04	0.12	0.05	0.02	0.00	0.00	0.00	0.28
<i>Tetramers</i>													
viniferol E	0.13	0.18	0.17	0.31	0.34	0.36	0.77	0.82	1.12	0.00	0.00	0.00	0.51
hopeaphenol	0.33	0.44	0.39	0.82	0.88	0.85	1.93	1.48	1.76	2.09	2.23	1.35	1.52
isohopeaphenol	0.11	0.14	0.13	0.29	0.31	0.30	0.57	0.42	0.38	0.35	0.37	0.23	0.45
ampelopsin H	0.06	0.07	0.06	0.15	0.14	0.15	0.31	0.23	0.25	0.27	0.30	0.15	0.30
vitisin A	0.15	0.22	0.22	0.50	0.77	0.68	2.14	1.18	0.65	0.78	0.36	0.15	2.11
vitisin B	0.26	0.36	0.32	0.73	0.77	0.44	1.64	0.46	0.28	0.28	0.37	0.11	8.33
vitisin F	NQ	NQ	NQ	NQ	0.13	0.29	1.16	1.75	3.07	3.84	4.14	2.28	ND
TOTAL	1.72	2.49	2.38	4.60	5.30	5.24	12.1	9.03	10.0	10.2	10.0	5.78	15.73

ND means not detected. NQ means detected but not quantified because of low levels.

3.4. Subcritical water marker compound

This study led to the identification of a compound present only in subcritical water conditions in roots (**Figure 2**). A molecular formula of $C_{56}H_{42}O_{12}$ was determined by UHPLC-DAD-QTOF. Optic rotation showed $[\alpha]_D + 153.6^\circ$ (MeOH; c 0.1) by polarimetry. The negative-mode HRMS spectrum exhibited a quasi-molecular $[M - H]^-$ ion at m/z 905.2624 with $\Delta ppm = 2.49$ (predicted: 905.2676). The MS/MS fragmentation pattern showed main fragments at m/z 811, 799, 545, 450 and 359, suggesting a stilbene tetramer. Its structure was elucidated by using mono- and bi-dimensional NMR (COSY, ROESY, HSQC, HMBC) spectra (**Table 4**, **Supplementary data, Figure S1**). The NMR data were corroborated with a tetrameric stilbene obtained by biosynthetic reactions (Takaya et al., 2002). This uncommon tetramer was derived from vitisin A by applying an acid-catalyzed reaction using sulfuric acid in methanol on pure vitisin A. These results seemed to be in agreement with our findings. Indeed, we found that vitisin A was mainly extracted at 160 °C and 5 min (2.14 g/kg dry mass) but decreased when the temperature increased to 190 °C and 15 min (0.36 g/kg dry mass). Conversely, the uncommon tetramer was increasingly extracted from roots at 1.75 g/kg dry mass (160 °C, 15 min), 3.07 g/kg dry mass (160 °C, 30 min), 3.84 g/kg dry mass (190 °C, 5 min) and 4.14 g/kg dry mass (190 °C, 15 min) (**Table 3**). High temperature and pressure associated with long contact time seemed to give rise to this compound by transformation of vitisin A. In addition, it is likely that this tetramer is derived from vitisin B. In fact, vitisin B was already found to be transformed into vitisin when in contact with organic solvent (Keylor et al., 2015). Therefore, the decrease in vitisin B was thought to be due to its conversion to vitisin A, which then became the uncommon tetramer. Thus, this is the first time that this uncommon tetramer, which we call vitisin F, has been obtained from a natural matrix. Furthermore, this surprising finding strongly suggested that stilbene transformation can be obtained by an eco-friendly sustainable system like subcritical water instead of using chemical reactions established with base or acid. To test this hypothesis, experiments were performed on pure vitisin A at the subcritical conditions of 190 °C and 15 min contact time. As predicted, some of the pure vitisin A was converted into vitisin F, as well as other minor products, thus confirming the potential of subcritical water for ecological transformation (**Supplementary data, Figure S2**).

Table 4. NMR data of vitisin F obtained from grapevine root by subcritical water procedure (*d*₄-methanol).

No.	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1a		130
2a,6a	7.15 d (8.5)	129.4
3a, 5a	6.73 d (8.5)	114.7
4a		157.3
7a	5.59 d (12.0)	87.3
8a	4.02 d (12.0)	47.7
9a		140.4
10a	5.85 d (2.0)	105.5
11a		155.2
12a	5.64 d (2.0)	100.4
13a		nd
14a		119.7
1b		135
2b, 6b	7.01 d(8.5)	128.3
3b, 5b	6.61 d (8.5)	114.0
4b		154.2
7b	5.30 d (4.2)	40.0
8b	5.45 d (4.2)	40.5
9b		140.8
10b		119.0
11b		158.9
12b	6.06 d (2.0)	94.8
13b		156.8
14b	6.04 d (2.0)	108.9
1c		130.3
2c	6.98 dd (8.5, 2.0)	125.5
3c	6.79 d (8.5)	114.0
4c		154.5
5c		134.2
6c	5.91 d (2.0)	132.2
7c	3.72 d (2.0)	44.8
8c	3.17 d (2.0)	58.1
9c		145.8
10c	6.20 d (2.1)	103.2
11c		156.7
12c	5.95 d (2.1)	100.2
13c		156.2
14c		112.0
1d		135.2
2d, 6d	6.70 d (8.5)	128.6
3d, 5d	6.56 d (8.5)	113.8
4d		154.2
7d	2.80 br s	49.2
8d	3.99 br s	47.2
9d		145.7
10d	6.37 d (2.3)	105.1
11d		155.3
12d	5.85 d (2.3)	100.4
13d		nd
14d		112.1

nd = not determined

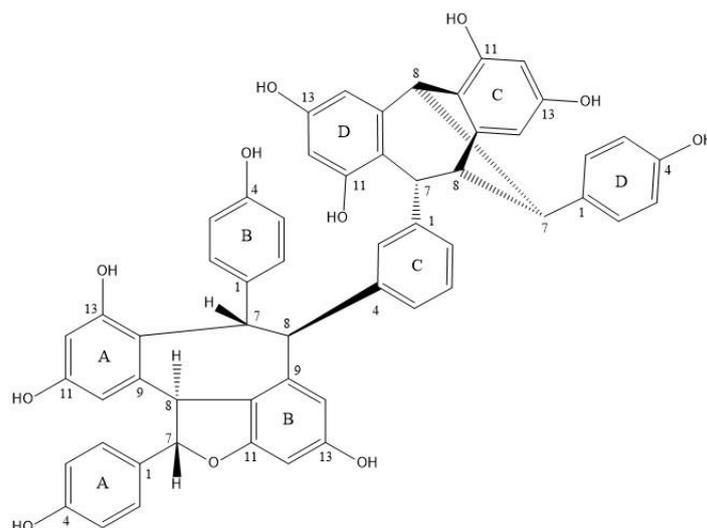


Figure 2. Structure of uncommon stilbene named vitisin F obtained from grapevine root by subcritical water procedure.

4. Conclusions

Stilbenes present in grapevine by-products were preferentially extracted under subcritical water conditions at 160 °C with a contact time between water and plant material of 5 min. This innovative extraction method was used to extract monomeric, dimeric, trimeric and tetrameric stilbenes in the same order of magnitude as conventional organic solvents. Conditions of subcritical water can also be modulated in order to target some specific compounds. Indeed, to maximize the concentration of total stilbenes in the different co-products as well as enrich extracts in vitisins A and B from grapevine roots, temperature at 160 °C and extraction time at 5 min should be performed. However, if the interest is to obtain an extract with high concentration of polymers such as hopeaphenol and isohopeaphenol, 160 °C and 30 min might be recommended for canes and wood, and 190 °C and 15 min for root. Furthermore, the application of a high temperature (190 °C) and a long extraction time could lead to the modification or degradation of stilbenes. Subcritical water is a promising method for extracting complex stilbenes and is a step forward in the search for alternatives to organic solvents.

Acknowledgements

We thank Eric Pedrot for his NMR technical assistance and Michaël Jourdes for LC-HRMS analyses. We also thank Ray Cooke for revising the manuscript.

Funding

Research support was provided by the French Ministry of Higher Education and Research. The work was also supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

REFERENCES

- ADEME, 2009. Biomasse forestière, populicole et bocagère disponible pour l'énergie à l'horizon 2020. <http://www.ademe.fr/biomasse-forestiere-populicole-bocagere-disponible-lenergie-a-lhorizon-2020>. (accessed October , 2018).
- ATLAS, 2017. Projet biomasse vitivinicole. <http://www.vignevin.com/recherche/territoires/valorisation-biomasse-vitivinicole.html>. (accessed October, 2018).
- Aliakbarian, B., Fathi, A., Perego, P., Dehghani, F., 2012. Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. *J. Supercrit. Fluids*. 65, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.02.022>

- Biais, B., Krisa, S., Cluzet, S., Da Costa, G., Waffo-Teguo, P., Waffo-Teguo, P., Mérillon, J.M., Richard, T., 2017. Antioxidant and cytoprotective activities of grapevine stilbenes. *J. Agric. Food Chem.* 65, 4952–4960. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01254>
- Billet, K., Houillé, B., Besseau, S., Mélin, C., Oudin, A., Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., Giglioli-Guivarc'h, N., Lanoue, A., 2018. Mechanical stress rapidly induces *E*-resveratrol and *E*-piceatannol biosynthesis in grape canes stored as a freshly-pruned byproduct. *Food Chem.* 240, 1022–1027. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.105>
- Cebrián-Tarancón, C., Sánchez-Gómez, R., Salinas, M.R., Alonso, G.L., Oliva, J., Zalacain, A., 2018. Toasted vine-shoot chips as enological additive. *Food Chemistry.* 263, 96–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.105>
- Choi, M.P.K., Chan, K.K.C., Leung, H.W., Huiea, C.W., 2003. Pressurized liquid extraction of active ingredients (ginsenosides) from medicinal plants using non-ionic surfactant solutions, *Journal of Chromatography A.* 983, 153–162.
- Davidov-Pardo, G., Navarro, M., Arozarena, I., Marin-Arroyo, M.R., 2014. Obtaining polyphenolic extracts from wine by-products, food and beverage consumption and health. Nova Biomedical, New York.
- European Parliament. Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council on waste and repealing certain directives. *Off. J. Eur. Union* 2008, 3–4.
- European Parliament. Directive 67/548/EEC and 1999/45/EC of the European Parliament and of the Council on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing. *Off. J. Eur. Union* 2008, 1-1355.
- Eurostat, 2017. http://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=apro_cpb_wine&lang=fr. (accessed June, 2018)
- Feinberg, M., 2001. L'assurance qualité dans les laboratoires agroalimentaires et pharmaceutiques. *Tec & Doc (Editions)*, Paris, 348 p.
- FranceAgriMer, 2016. L'observatoire national des ressources en biomasse. Evaluation des ressources disponibles en France. <http://www.franceagrimer.fr/Stockage-Actualites/Archives/2016/Observatoire-national-des-ressources-en-biomasse-evaluation-desressources>. (accessed October, 2018).
- Gabaston, J., Cantos-Villar, E., Biais, B., Waffo-Teguo, P., Renouf, E., Corio-Costet, M.-F., Richard, T., Mérillon, J.-M., 2017. Stilbenes from *Vitis vinifera* L. waste: a sustainable tool for controlling *Plasmopara viticola*. *J. Agric. Food Chem.* 65, 2711–2718. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00241>
- Gabaston, J., El Khawand, T., Waffo-Teguo, P., Decendit, A., Richard, T., Mérillon, J.-M., Pavela, R., 2018. Stilbenes from grapevine root: a promising natural insecticide against *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Pest Sci.* 91, 897-906. <https://doi.org/10.1007/s10340-018-0956-2>
- García-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J.C., Ibáñez, E., García-Moreno, C., 2006. Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Anal. Chim. Acta.* 563, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.054>
- Gorena, T., Saez, V., Mardones, C., Vergara, C., Winterhalter, P., von Baer, D., 2014. Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chem.* 155, 256–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.073>
- Jéandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., Adrian, M., 2002. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2731–2741. <https://doi.org/10.1021/jf011429s>
- Ju, Z., Howard, L.R., 2006. Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. *J. Food Sci.* 70, S270–S276. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07202.x>
- Kanmaz, E.Ö., 2014. Subcritical water extraction of phenolic compounds from flaxseed meal sticks using accelerated solvent extractor (ASE). *Eur. Food Res. Technol.* 238, 85–91. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2088-5>

- Karacabey, E., Mazza, G., Bayındırlı, L., Artık, N., 2012. Extraction of bioactive compounds from milled grape canes (*Vitis vinifera*) using a pressurized low-polarity water extractor. *Food Bioprocess Technol.* 5, 359–371. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0286-8>
- Keylor, M.H., Matsuura, B.S., Stephenson, C.R.J., 2015. Chemistry and biology of resveratrol-derived natural products. *Chem. Rev.* 115, 8976–9027. <https://doi.org/10.1021/cr500689b>
- Lambert, C., Bisson, J., Waffo-Téguo, P., Papastamoulis, Y., Richard, T., Corio-Costet, M.-F., Mérillon, J.-M., Cluzet, S., 2012. Phenolics and their antifungal role in grapevine wood decay: focus on the Botryosphaeriaceae family. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11859–11868. <https://doi.org/10.1021/jf303290g>
- Lambert, C., Richard, T., Renouf, E., Bisson, J., Waffo-Téguo, P., Bordenave, L., Ollat, N., Mérillon, J.-M., Cluzet, S., 2013. Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 61, 11392–11399. <https://doi.org/10.1021/jf403716y>
- Liazid, A., Palma, M., Brigui, J., Barroso, C.G., 2007. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A.* 1140, 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.040>
- Merken, H.M., Beecher, G.R., 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J. Agric. Food Chem.* 48, 577–599. <https://doi.org/10.1021/jf990872o>
- Moss, R., Mao, Q., Taylor, D., Saucier, C., 2013. Investigation of monomeric and oligomeric wine stilbenoids in red wines by ultra-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry: study of wine stilbenoids in red wines by UPLC/ESI-QTOFMS. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27, 1815–1827. <https://doi.org/10.1002/rcm.6636>
- Pavela, R., Waffo-Teguo, P., Biaï, B., Richard, T., Mérillon, J.-M., 2017. *Vitis vinifera* canes, a source of stilbenoids against *Spodoptera littoralis* larvae. *J. Pest Sci.* 90, 961–970. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0836-1>
- Pawlus, A.D., Waffo-Téguo, P., Shaver, J., Mérillon, J.-M., 2012. Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a review. *OENO One.* 46, 57–111. <https://doi.org/10.20870/oenone.2012.46.2.1512>
- Raposo, R., Chinnici, F., Ruiz-Moreno, M.J., Puertas, B., Cuevas, F.J., Carbú, M., Guerrero, R.F., Ortíz-Somovilla, V., Moreno-Rojas, J.M., Cantos-Villar, E., 2018. Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots: impact on the wine quality. *Food Chem.* 243, 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.111>
- Richard, T., Abdelli-Belhad, A., Vitrac, X., Waffo Tegu, P., Mérillon, J.-M., 2016. *Vitis vinifera* canes, a source of stilbenoids against downy mildew. *OENO One.* 50, 3, 137–143. <https://doi.org/10.20870/oenone.2016.50.4.1178>
- Rivière, C., Pawlus, A.D., Mérillon, J.-M., 2012. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Nat. Prod. Rep.* 29, 1317. <https://doi.org/10.1039/c2np20049j>
- Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G.L., Salinas, M.R., 2014. Vine-shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: phenolic, volatile, and mineral compounds. *J. Agric. Food Chem.* 62, 10861–10872. <https://doi.org/10.1021/jf503929v>
- Schnee, S., Queiroz, E.F., Voinesco, F., Marcourt, L., Dubuis, P.-H., Wolfender, J.-L., Gindro, K., 2013. *Vitis vinifera* canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 5459–5467. <https://doi.org/10.1021/jf4010252>
- Takaya, Y., Yan, K.-X., Terashima, K., He, Y.-H., Niwa, M., 2002. Biogenetic reactions on stilbenetetramers from Vitaceaeous plants. *Tetrahedron.* 58, 9265–9271. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(02\)01191-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(02)01191-2)
- Valls, J., Agnolet, S., Haas, F., Struffi, I., Ciesa, F., Robatscher, P., Oberhuber, M., 2017. Valorization of Lagrein grape pomace as a source of phenolic compounds: analysis of the contents of anthocyanins, flavanols and antioxidant activity. *Eur. Food Res. Technol.* 243, 2211–2224. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2923-1>
- Vergara, C., von Baer, D., Mardones, C., Wilkens, A., Wernekinck, K., Damm, A., Macke, S., Gorena, T., Winterhalter, P., 2012. Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *J. Agric. Food Chem.* 60, 929–933. <https://doi.org/10.1021/jf204482c>

Supporting Information

Subcritical water extraction of stilbenes from grapevine by-products: a new green chemistry approach

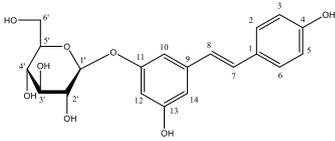
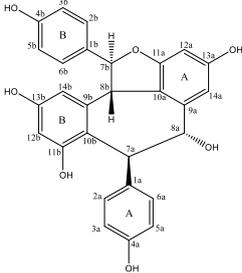
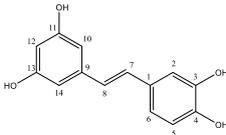
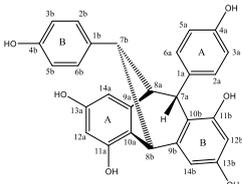
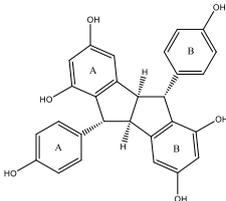
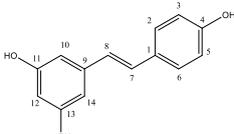
Julien Gabaston,^a Cécile Leborgne,^a Josep Valls,^a Elodie Renouf,^b Tristan Richard,^a Pierre Waffo-Teguo,^a Jean-Michel Méryllon^{ab*}

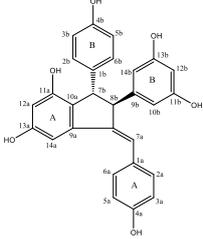
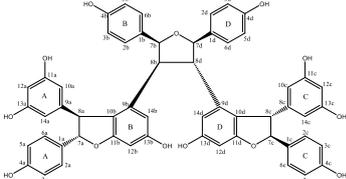
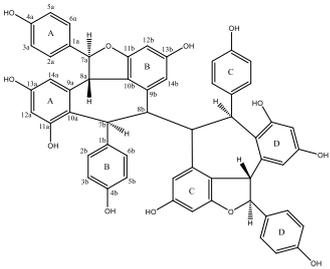
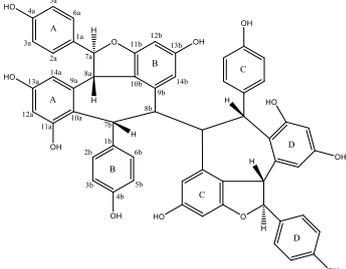
^aUniv. Bordeaux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de Recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique (Gesvab) - ISVV, 33882 Villenave d'Ornon cedex, France

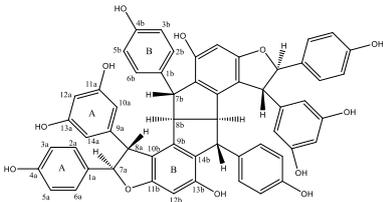
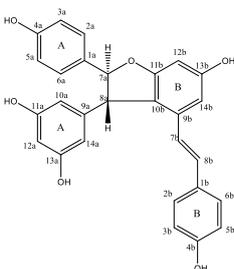
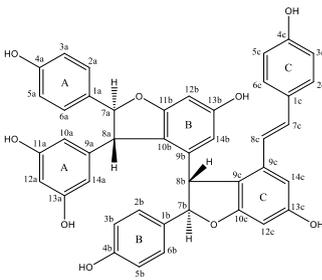
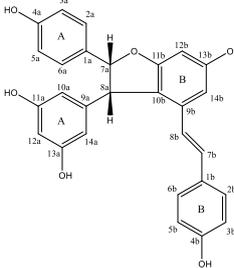
^bPolyphénols Biotech (Technology Transfer Unit), ISVV, 33882 Villenave d'Ornon cedex, France

*Corresponding author: jean-michel.merillon@u-bordeaux.fr

Table S1. Name, structure, retention time, UV data (λ_{\max} in nm), MS data (molecular ion, negative mode), and ^1H NMR data of stilbenes identified in grapevine by-products.

compounds	t_R (min)	λ_{\max}	(m/z)	δ_H
<i>E</i> -piceid 	2.7	320	389	^1H NMR (CD_3OD) δ 7.37 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H10a+H14a), 7.02 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, H8a), 6.85 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, H7a), 6.79 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H, H2a), 6.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H11a+H13a), 6.61 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H, H6a), 6.44 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H4a), 4.89 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, Glc H1'), 3.93 (dd, $J = 2.3, 12.1$ Hz, 1H, Glc H6'), 3.71 (dd, $J = 6.0, 12.1$ Hz, 1H, Glc H6'), 3.49-3.36 (m, 4H, Glc H2'+H3'+H4'+H5').
ampelopsin A 	3.5	283	469	^1H NMR (CD_3OD) δ 7.02 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.82 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, H2a+H6a), 6.69 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.58 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H3a+5a), 6.52 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H14a), 6.31 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12b), 6.11 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H14b), 6.10 (d, $J = 1.3$ Hz, 1H, H12a), 5.70 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, H7b), 5.38 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, H7a), 5.36 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, H8a), 4.02 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H, H8b).
<i>E</i> -piceatannol 	3.5	324	243	^1H NMR (CD_3OD) δ 6.97 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H2a), 6.88 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H7a), 6.83 (dd, $J = 2.0, 8.1$ Hz, 1H, H6a), 6.74 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H8a), 6.72 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H5a), 6.42 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H10a+H14a), 6.10 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12a).
ampelopsin F 	4.2	282	453	^1H NMR (CD_3OD) δ 7.01 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2a+H6a), 6.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.68 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.50 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H3b+5b), 6.37 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14a), 6.34 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14b), 6.07 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12b), 6.00 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12a), 4.08 (br s, 1H, H7a), 4.01 (br s, 1H, H8b), 3.55 (br s, 1H, H7b), 3.24 (br s, 1H, H8a).
pallidol 	4.4	282	453	^1H NMR (CD_3OD) δ 6.92 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, H2a+H6a+H2b+H6b), 6.65 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, H3a+H5a+H3b+H5b), 6.52 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H14a+H14b), 6.10 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H12a+H12b), 4.46 (s, 2H, H7a+H7b), 3.72 (s, 2H, H8a+H8b).
<i>E</i> -resveratrol 	4.9	306	227	^1H NMR (CD_3OD) δ 7.35 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2a+H6a), 6.95 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, H7a), 6.80 (d, $J = 16.3$ Hz, 1H, H8a), 6.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.44 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H10a+H14a), 6.15 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12a).

compounds	t_R (min)	λ_{max}	(m/z)	δ_H
<i>E</i>-parthenocissin A 	5.1	320	453	1H NMR (CD_3OD) δ 7.08 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2a+H6a), 7.03 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.96 (br s, 1H, H7a), 6.69 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14a), 6.67 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.57 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.18 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12a), 6.06 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H10b+H14b), 6.04 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H, H12b), 4.17 (br s, 1H, H7b), 4.05 (br s, 1H, H8b).
viniferol E 	5.9	283	923	1H NMR (CD_3OD) δ 6.84 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2a+H6a), 6.77 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2d+H6d), 6.76 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.66 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H2c+H6c), 6.65 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.64 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.56 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H3d+H5d), 6.52 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H14d), 6.50 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, H3c+5c), 6.23 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12c), 6.19 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12a), 6.16 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12d), 6.14 (d, $J = 2.0$ Hz, 4H, H10a+H14a+H10c+H14c), 5.87 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12b), 5.56 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14b), 5.20 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H7a), 5.02 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H7c), 4.99 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, H7d), 4.67 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, H7b), 3.94 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H8a), 3.86 (dd, $J = 9.7, 12.1$ Hz, 1H, H8b), 3.72 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H8c), 3.48 (dd, $J = 9.7, 12.1$ Hz, 1H, H8d).
Hopeaphenol 	6.4	282	905	1H NMR (CD_3OD) δ 7.09 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, H2b+H6b+H2c+H6c), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H2a+H6a+H2d+H6d), 6.72 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H, H3b+H5b+H3c+H5c), 6.54 (d, $J = 8.7$ Hz, 4H, H3a+H5a+H3d+H5d), 6.35 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H12b+H12c), 6.20 (br s, 2H, H14b+H14c), 5.80 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H, H7b+H7c), 5.75 (br s, 2H, H12a+H12d), 5.72 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H14a+H14d), 5.06 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H7a+H7d), 4.12 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H, H8b+H8d), 3.85 (br s, 2H, H8a+H8d).
Isohopeaphenol 	6.6	284	905	1H NMR (CD_3OD) δ 7.52 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H2a+H6a+H2d+H6d), 6.98 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H3a+H5a+H3d+H5d), 6.34 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H2b+H6b+H2c+H6c), 6.32 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H3b+H5b+H3c+H5c), 6.30 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H12a+H2d), 6.19 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H14a+H14d), 5.80 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H12b+H12c), 5.57 (d, $J = 10.2$ Hz, 2H, H7a+H7d), 5.42 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H14b+H14c), 5.37 (d, $J = 10.2$ Hz, 2H, H8a+H8d), 5.04 (br s, 2H, H7b+H7c), 3.36 (br s, 2H, H8b+H8c).

compounds	t_R (min)	λ_{max}	(m/z)	δ_H
ampelopsin H 	6.9	285	905	1H NMR (CD_3OD) δ 7.11 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H2a+H6a+H2d+H6d), 6.74 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H3a+H5a+H3d+H5d), 6.74 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H2b+H6b+H2c+H6c), 6.55 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, H3b+H5b+H3c+H5c), 6.30 (t, $J = 2.0$ Hz, 2H, H12a+H12d), 6.27 (d, $J = 2.0$ Hz, 4H, H10a+H14a+H10d+H14d), 6.20 (s, 2H, H12b+H12c), 5.30 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H7a+H7d), 4.30 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, H8a+H8d), 4.28 (s, 2H, H7b+H7c), 3.96 (s, 2H, H8b+H8c).
<i>E</i> - ϵ -viniferin 	7.2	323	453	1H NMR (CD_3OD) δ 7.14 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H2a+H6a), 7.04 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.82 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, H7b), 6.77 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.65 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.63 (s, 1H, H14b), 6.57 (d, $J = 16.4$ Hz, 1H, H8b), 6.25 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12b), 6.18 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12a), 6.16 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H, H10a+H14a), 5.36 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H7a), 4.34 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H8a).
<i>E</i> -miyabenol C 	7.5	323	679	1H NMR ($CO(CD_3)_2$) δ 7.16 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2a+H6a), 7.11 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2c+H6c), 6.88 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H7c), 6.80 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3a+H5a), 6.72 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3c+H5c), 6.65 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H14c), 6.61 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H, H8c), 6.54 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.48 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.33 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, H12c), 6.28 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12b), 6.21 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12a), 6.15 (br s, 2H, H10a+H14a), 6.06 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H14b), 5.37 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H7a), 5.19 (br s, 1H, H7b), 4.63 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H, H8a), 4.09 (br s, 1H, H8b).
<i>E</i> - ω -viniferin 	7.7	312	453	1H NMR (CD_3OD) δ 7.12 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2b+H6b), 6.97 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, H2a+H6a), 6.86 (d, $J = 16.1$ Hz, 1H, H7b), 6.68 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, H3b+H5b), 6.66 (d, $J = 16.1$ Hz, 2H, H8b), 6.63 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H14b), 6.55 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H3a+H5a), 6.31 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H12b), 5.92 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H, H12a), 5.83 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H7a), 5.76 (br s, 2H, H10a+H14a), 4.59 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H8a).

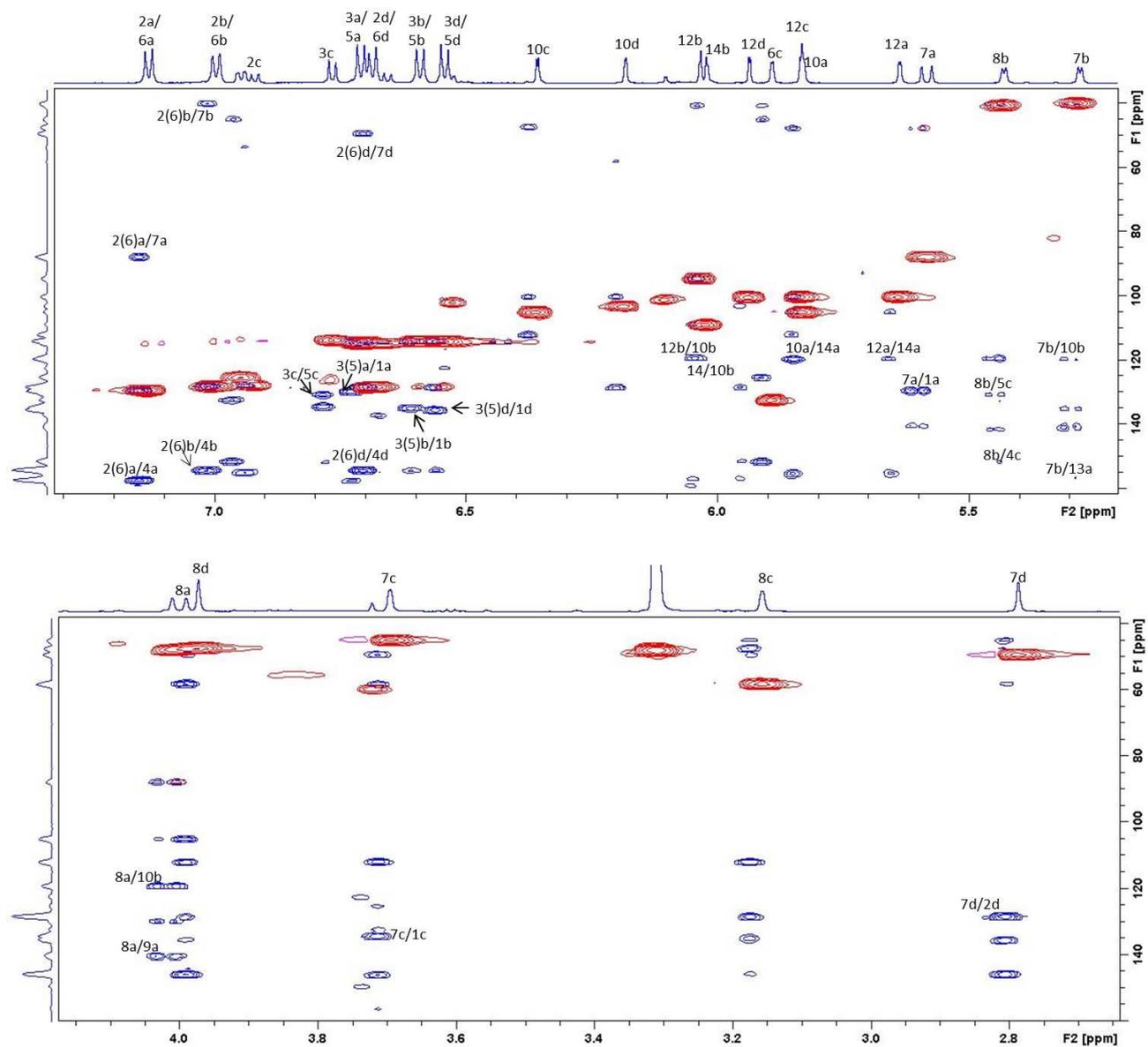


Figure S1. Bi-dimensional NMR spectra annotated of Vitisin F. HSQC in red and HMBC in blue.

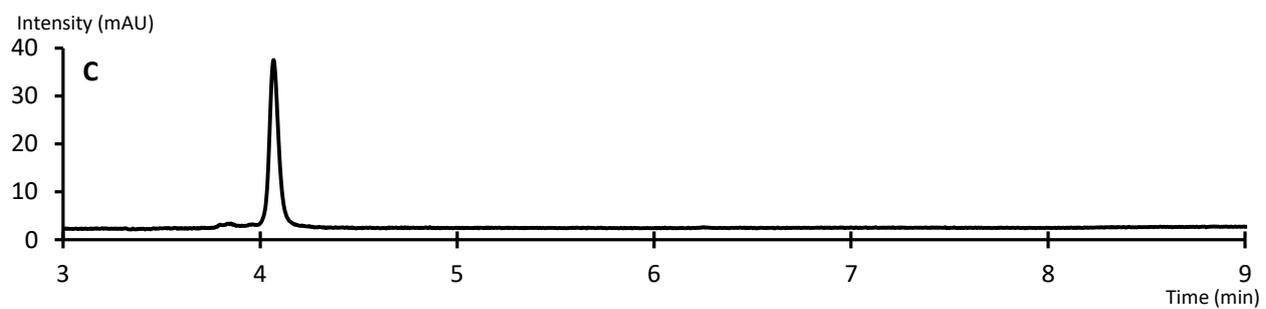
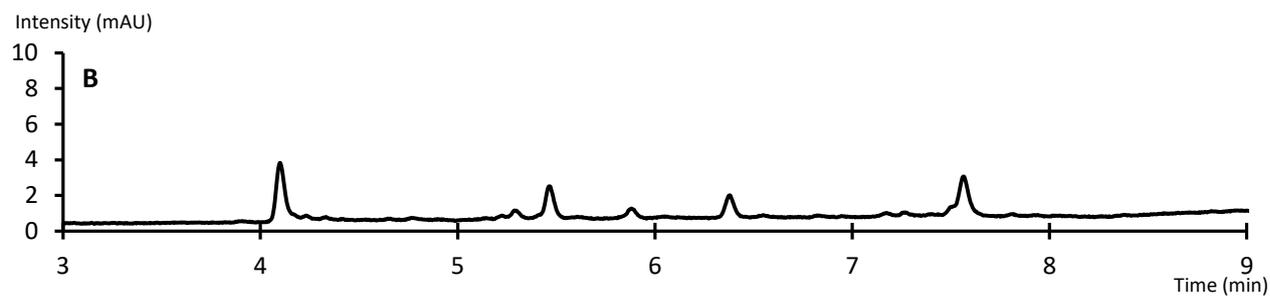
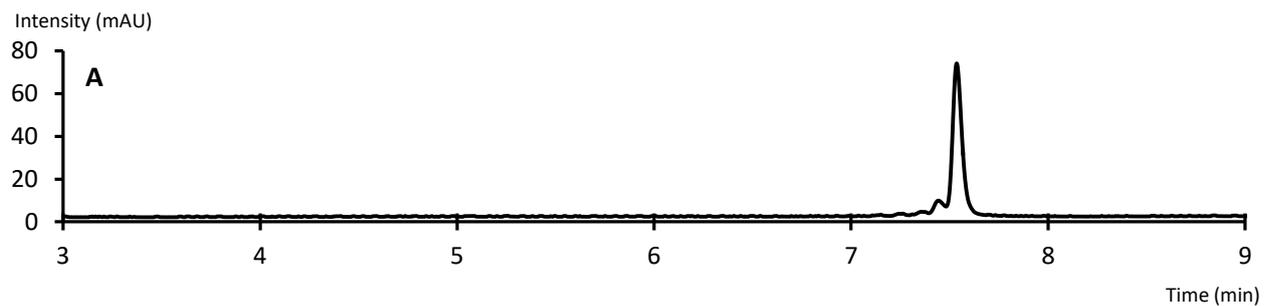


Figure S2. UHPLC-DAD chromatograms at 280 nm. (A) Pure vitisin A, (B) vitisin A transformed by subcritical water procedure, (C) Vitisin F.

Volume III.

Etude chimique et activité anti-mildiou de
coproduits issus d'essences forestières

Chapitre I. Caractérisation et activité anti-mildiou des écorces d'épicéa

A. Stratégie

Dans bien des cas, les molécules de la filière forêt-bois sont analogues à celles issues de l'agriculture mais leurs valorisations restent limitées. En effet, la matière première est abondante mais la mobilisation des composants chimiques peut se révéler difficile de par l'hétérogénéité de ses constituants ; les composés pariétaux qui constituent la paroi végétale (cellulose, lignine) ou encore les « extractibles » issus du métabolisme secondaire. La connaissance des techniques d'extraction adaptées aux divers extractibles et plus précisément des polyphénols au sein du laboratoire est un atout pour l'étude de ces composés.

L'épicéa commun (*Picea abies*), généralement utilisé en tant que bois d'œuvre, fait partie de cette filière forêt-bois générant des sous-produits tels que les nœuds ou les écorces. Habituellement, ces coproduits sont utilisés en tant que combustibles dans les industries ou simplement jetés. Cependant, à l'instar de la vigne, les écorces d'épicéa sont connues pour être riches en polyphénols et notamment en stilbènes permettant à l'arbre de se protéger contre les maladies fongiques ou les insectes. Ainsi, ces déchets font l'objet d'une recherche de valorisation à travers leur réutilisation dans d'autres domaines et notamment en santé végétale.

L'objectif de ce projet a été d'étudier l'application potentielle d'un extrait d'écorces d'épicéa comme oomycide naturel contre le mildiou de la vigne. Pour atteindre ce but, la faisabilité industrielle d'obtention d'un extrait d'écorces d'épicéa a été initiée. Un criblage phytochimique de l'extrait ainsi que la capacité d'inhibition du développement mycélien de la part de l'extrait ont jalonné cette étude.

L'hypothèse d'une composition en stilbènes différente de celle de la vigne est plausible du fait d'une phylogénie distincte, d'un écosystème singulier et de stress environnementaux différents pour l'épicéa. Une activité oomycide est également attendue de par la présence de stilbènes dans les écorces d'épicéa.

B. Design expérimental

B.1. Extraction

A l'image du processus d'extraction des coproduits viticoles, l'extrait d'écorces d'épicéa doit suivre un cahier des charges au niveau écologique et économique avec un aspect industriel prédominant. Ainsi, une extraction avec un mélange éthanol-eau, à la fois peu toxique et peu coûteux, dans un système semi-pilote est à l'étude.

Des écorces d'épicéa provenant d'une société forestière de l'est de la France ont été récupérées afin de réaliser cette étude en collaboration avec la société Actichem (Montauban, France). L'étape d'extraction se limite à la production d'un extrait brut, inspirée des extraits de ceps et racines de vigne. L'extraction a été réalisée avec un rapport poids/volume à 1/10 avec 3 kg de d'écorces et 30 litres d'un mélange éthanol – eau à 85/15 (v/v) chauffé à 60°C. L'extraction se déroule dans une cuve avec une macération de deux heures. L'extraction est suivie d'une filtration sur toile puis d'une évaporation sous vide dans un réacteur de 150 litres permettant d'éliminer l'éthanol. Un sécheur industriel permet d'éliminer l'eau afin d'obtenir un extrait sous forme de poudre homogène. Un rendement d'extraction de 6,6% a été obtenu dans ces conditions.

B.2. Purification

La caractérisation de l'extrait passe par une étude chimique approfondie de chaque composé. En ce sens, une purification des molécules est nécessaire à partir de l'extrait d'écorces d'épicéa. De plus, les molécules majoritaires, ont été isolées et testées contre le mildiou afin de corrélérer l'activité de l'extrait brut aux molécules qui le composent.

Les purifications ont été réalisées par CLHP préparative. Un système de solvant basé sur de l'eau avec 0.025% d'acide trifluoroacétique comme solvant A et de l'acétonitrile avec 0.025% d'acide trifluoroacétique a été utilisé. Un gradient adapté aux stilbènes a été développé avec un rapport solvant A/solvant B allant de 80/20 à 0/100. Un total de 19 composés ont été isolés en fonction de deux longueurs d'ondes ; 280 et 306 nm (**Figure 36**). Les composés ont été caractérisés par CLUHP-DAD, spectrométrie de masse et RMN.

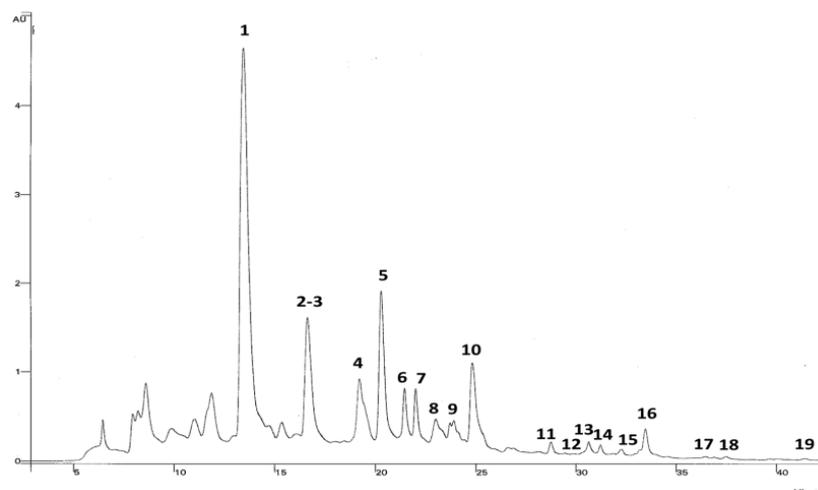


Figure 36. Chromatogramme CLHP préparative à 280 nm de l'extrait d'écorces d'épicéa.

Parmi les 19 composés purifiés, on note la présence de : **1**, (*E*)-astringine ; **2/3**, picéasides A/B ; **4**, (*E*)-picéide ; **5**, (*E*)-isorhapontine ; **6**, picéaside H ; **7**, picéaside G ; **8/9**, picéaside E/F ; **10**, (*E*)-picéatannol ; **11**, picéaside I ; **12**, (*E*)-resvératrol ; **13**, picéaside J ; **14**, picéaside K ; **15**, picéaside L ; **16**, (*E*)-isorhapontigénine ; **17**, picéaside M ; **18**, picéaside N ; **19**, cassigarol E. Ces composés servent dans la suite de l'étude comme standards pour les dosages ainsi que pour les tests antifongiques.

B.3. Analyse

L'extrait ainsi que les molécules purifiées ont été analysés par CLUHP-DAD couplée à un spectromètre de masse à trappe ionique. Cet outil a été utilisé dans le but de fragmenter les ions moléculaires et ainsi collecter les informations concernant les ions produits. Les fragments sont propres à chaque molécule et donnent des renseignements sur la structure des composés.

En outre, les composés purifiés ont été étudiés par CLUHP couplée à un spectromètre de masse Q-TOF. Ce système permet d'obtenir la masse exacte des composés ainsi que la prédiction de leurs formules brutes. Ce système à haute résolution permet donc d'accéder à des informations supplémentaires sur la structure des composés.

Enfin, les spectres de RMN mono- et bi-dimensionnelle (COSY, ROESY, HSQC, HMBC) ont servi à l'élucidation structurale des différents composés à travers les couplages proton-proton et proton-carbone.

L'association de ces trois outils analytiques permet une complémentarité des informations structurales de chaque composé. Cette orthogonalité des données a pour finalité une détermination sans ambiguïté des composés et une caractérisation précise de l'extrait.

B.4. Test anti-mildiou

Les essais antifongiques ont pour but d'étudier l'action préventive de l'extrait d'écorces d'épicéa contre le développement mycélien du mildiou. Les molécules qui composent cet extrait sont étudiées pour leurs capacités antifongiques, à travers l'inhibition de la mobilité des zoospores, ainsi que pour leurs propriétés inhibitrices de la croissance du mycélium permettant de justifier l'activité de l'extrait.

L'extrait d'écorces d'épicéa a été étudié de façon similaire aux extraits viticoles. En ce sens, une étape de dissolution de l'extrait dans une solution aqueuse à 1% d'éthanol a été réalisée suivie d'une application en fines gouttelettes sur les disques foliaires à l'aide d'un microdiffuseur sous pression. Un jour après le traitement préventif, le mildiou a été inoculé avec une concentration ajustée à 15000 sporanges/mL et un dépôt de trois gouttes de 15 µL par disque. La mise à l'obscurité des boîtes a permis l'ouverture des stomates et la pénétration des zoospores. Après l'élimination du reliquat d'eau, les boîtes ont été mises en chambre de culture durant sept jours. La notation du développement du mildiou est basée sur la sporulation du mycélium avec un score compris entre 0 et 100. La détermination du pourcentage d'inhibition a été calculée par rapport au témoin. Comme expliqué précédemment (Vol. II, Chap. I), la CI_{50} est mesurée grâce à l'équation de droite obtenue sur la courbe du pourcentage d'inhibition en fonction du \log_{10} des différentes concentrations.

Concernant les molécules pures, le test anti-mildiou a été légèrement modifié en comparaison aux molécules issues de la vigne (**Figure 37**). Les molécules pures sont directement ajoutées à l'inoculum afin de visualiser les effets directs par contact. D'une part, les molécules ont été solubilisées dans une solution aqueuse à 1% d'éthanol avec les concentrations adaptées. D'autre part, un inoculum a été préparé à 30000 sporanges/mL. Ces deux solutions ont ensuite été mélangées suivant un rapport 1/1. L'effet sur la croissance mycélienne repose sur le dépôt du mélange sur les disques foliaires (3 gouttes de 15 µL par disque). Les boîtes ont été mises en culture et l'inhibition de la croissance du mycélium a été calculée après 7 jours comme pour l'extrait. En parallèle, ce protocole offre la possibilité de visualiser l'action de chaque molécule pure sur la mobilité des zoospores. Chaque mélange molécule pure / inoculum a été déposé dans une plaque 96 puits et le nombre de zoospores mobiles a été compté après 2h par microscopie à phase inverse. Le pourcentage d'inhibition de la mobilité des zoospores a été calculé pour chaque concentration par rapport au témoin comme pour le développement mycélien avec la formule suivante : $\text{Inhibition} = (\text{Mobilité Témoin} - \text{Mobilité Extrait}) / \text{Mobilité Témoin}$

Le pourcentage d'inhibition en fonction du \log_{10} des concentrations a permis l'obtention d'une courbe dose-réponse. L'équation de la droite de la partie linéaire a permis de calculer la CI_{50} de la mobilité des zoospores.

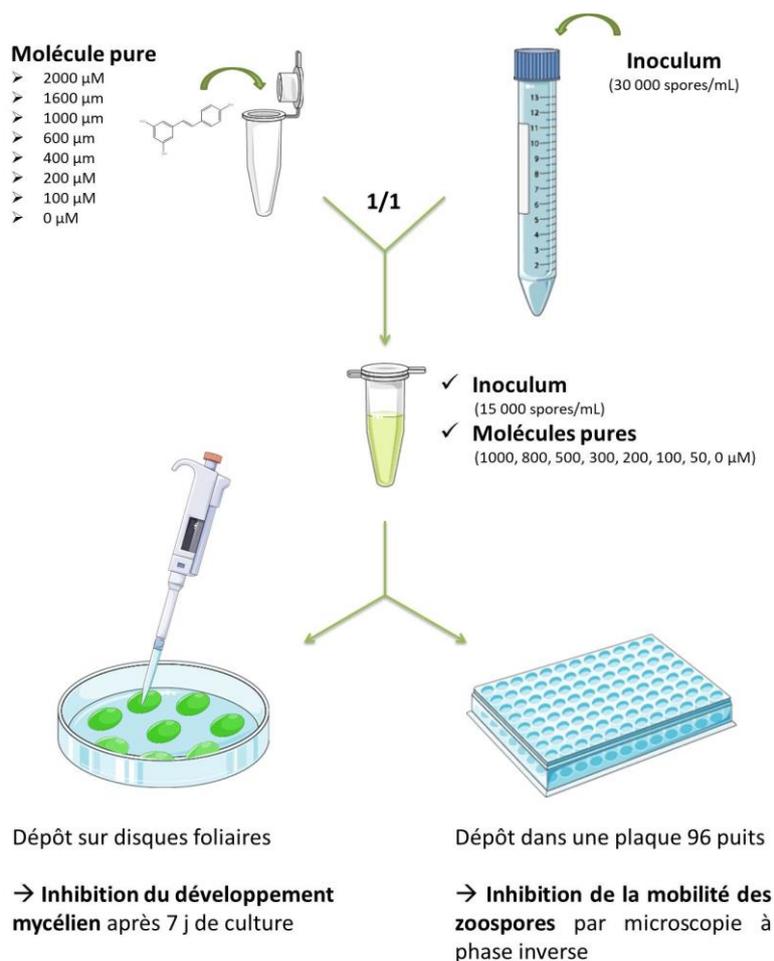


Figure 37. Procédé du test anti-oomycète à partir de molécules pures contre le mildiou de la vigne.

C. Résumé des résultats

Le criblage chimique de l'extrait d'écorces d'épicéa par CL-SM et RMN a permis de déterminer 19 stilbènes dont 13 avaient au préalable déjà été identifiés dans l'épicéa. Parmi eux, on trouve des monomères glucosylés ((*E*)-astringine, (*E*)-isorhapontine, (*E*)-picéide) ainsi que leurs formes aglycones respectives ((*E*)-picéatannol, (*E*)-isorhapontigénine, (*E*)-resvératrol). Des dimères glucosylés formés par deux entités astringine (picéasides A, B, G et H) ou une entité astringine couplée à une entité isorhapontine (picéasides E et F) ont également été retrouvés ainsi que la présence d'un dimère aglycone formé par deux entités picéatannol nommé cassigarol E.

En outre, 6 nouveaux composés ont été caractérisés pour la première fois dans le règne végétal. La RMN 1D et 2D a permis d'élucider leurs structures mettant en évidence trois dimères astringine – picéatannol (picéasides I, J et K), un dimère astringine – isorhapontigénine (picéaside L), et deux dimères isorhapontine – picéatannol (picéasides M et N).

Volume III. Etude chimique et activité anti-mildiou de coproduits issus d'essences forestières

La quantification de ces composés dans l'extrait d'écorces d'épicéa a montré la forte présence des monomères glucosylés qui représente 78.6% des stilbènes totaux. De plus, la présence avérée des dimères glucosylés à hauteur de 9.5% permet d'affirmer que les stilbènes sont stockés dans les écorces d'épicéa sous leurs formes glucosylés plutôt que leurs formes aglycones.

Le composé majoritaire est l'astringine (11.57 g/kg d'écorces) suivi par l'isorhapontine (2.59 g/kg d'écorces). Parmi les composés minoritaires, on peut noter le cassigarol E (0.04 g/kg d'écorces), le resvératrol (0.03 g/kg d'écorces) ou encore les nouveaux composés, les picéasides M et N qui n'ont pu être quantifiés car en dessous de la limite de quantification.

Les tests anti-mildiou de l'extrait d'écorces d'épicéa ont révélé une CI_{50} de 760 mg/L et une inhibition totale de la croissance mycélienne proche de 1000 mg/L révélant la capacité de l'extrait à avoir une activité oomycide.

Concernant les molécules pures, le stilbène le plus actif est le cassigarol E avec une CI_{50} de 24 μ M pour l'inhibition de la mobilité des zoospores ainsi que pour le développement mycélien. Un groupe composé de l'isorhapontigénine et des nouveaux dimères picéasides I, J et L font également partie des composés les plus toxiques avec une plage d'activité (CI_{50}) comprise entre 96 et 147 μ M pour l'inhibition de la croissance du mildiou. Parmi les composés les moins actifs, on peut mettre en évidence les stilbènes glucosylés monomériques comme l'astringine avec respectivement des CI_{50} pour l'inhibition du développement et le blocage de la mobilité des zoospores de 705 μ M et 659 μ M. Les formes glucosylées dimériques tels que les picéasides G ($CI_{50} = 677$ et 799 μ M, respectivement) et picéaside H ($CI_{50} = 551$ et 524 μ M, respectivement) sont tout aussi très peu actifs.

Ainsi, l'extrait d'écorces d'épicéa, riche en stilbènes, s'est montré actif contre le mildiou de la vigne avec une inhibition du développement mycélien. Cependant, on obtient un certain contraste entre l'activité antifongique des molécules pures et leur présence dans les écorces d'épicéa. Les composés les plus actifs sont minoritaires à l'image du cassigarol E alors que les composés majoritaires, principalement glucosylés comme l'astringine, sont les moins efficaces.

Ces résultats doivent ainsi mener à une réflexion dont le but est d'améliorer l'activité oomycide de cet extrait. On peut imaginer un enrichissement de l'extrait en stilbènes par extraction liquide-liquide à l'acétate d'éthyle afin d'éliminer certains composés très polaires et très apolaires, ou passage sur résine XAD permettant d'éliminer les molécules non aromatiques comme les sucres. Un traitement chimique ou enzymatique pour casser les liaisons entre les stilbènes et leurs sucres conjugués pourrait également enrichir l'extrait en composés aglycones et ainsi améliorer l'activité globale de l'extrait.

D. Publication

Les résultats ont été rédigés sous forme d'un article scientifique intitulé « Stilbenes from common spruce (*Picea abies*) bark as natural antifungal agent against downy mildew (*Plasmopara viticola*) », qui a été soumis le 18 Janvier 2017 dans ***Industrial Crops & Products***, accepté le 8 Avril 2017 puis publié le 26 Avril 2017.

Stilbenes from common spruce (*Picea abies*) bark as natural antifungal agent against downy mildew (*Plasmopara viticola*)

Julien Gabaston^a, Tristan Richard^a, Benoit Biais^a, Pierre Waffo-Teguo^a, Eric Pedrot^a, Michaël Jourdes^a, Marie-France Corio-Costet^b, Jean-Michel Méryllon^{a*}

^aUniversité de Bordeaux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de Recherche Œnologie EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique (Gesvab) - Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, CS 50008 - 210, chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France

^bINRA, UMR SAVE-1065, ISVV, Labex COTE, Rue Edouard Bourlaux, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon, France

*Corresponding author: jean-michel.merillon@u-bordeaux.fr

ABSTRACT

The antifungal activity of spruce bark (*Picea abies* (L.) Kars. Pinaceae) extract against downy mildew (*Plasmopara viticola*) was investigated. The analysis of the extract using UHPLC-MS allowed stilbenes to be targeted as the main components. The structure of stilbenes isolated from the hydro-alcoholic extract by preparative HPLC was determined by mass and NMR analysis. In addition to aglycone and glycosylated monomeric forms such as piceatannol, astringin, resveratrol, piceid, isorhapontigenin and isorhapontin, several stilbene glycoside dimers were also identified. Six new compounds (piceasides I-N) are reported for the first time in the literature and the plant kingdom. The extract as well as pure compounds showed significant antifungal activity with an inhibition of the zoospore mobility and mycelium growth of *P. viticola*. Our results show that spruce bark extract, which is considered as a wood industry co-product, could potentially be used as a natural fungicide against downy mildew.

Keywords: spruce bark, stilbene, NMR, downy mildew, natural fungicide

INTRODUCTION

The oomycete *Plasmopara viticola* is the cause of downy mildew which is one of the most economically important diseases in cultivated grapevines worldwide (Gessler et al., 2011). Attacking flower clusters, leaves and grape berries, this endemic disease has generally been controlled by using several fungicide applications such as “Bordeaux mixture”, which has been widely used since the late 19th century (Gessler et al., 2011; Leroux and Clerjeau, 1985). However, its extensive use causes a negative impact on the environment with the accumulation of copper in soil or metabolic deregulation in grape berries (La Torre et al., 2011; Martins et al., 2014) or the appearance of fungicide resistance (Corio-Costet, 2012). In addition, human health is concerned through the consumption of berries and wine especially with the possible presence of fungicide residues (Chen et al., 2016; Guo et al., 2016; Lagunas-Allué et al., 2012). As a consequence there is renewed interest in the search for effective ecofriendly and sustainable natural agents to control diseases and pests because of changes in environment and food safety regulations associated with consumer demand. The exploitation of plant extracts containing a wide variety of antimicrobial compounds that are less toxic and biodegradable might be a solution. Stilbenes are phenolic compounds derived from secondary plant metabolism. Despite the chemical diversity of stilbenes from monomers to octamers, the distribution of natural stilbenoids in the plant kingdom is limited (Pawlus et al., 2012; Rivière et al., 2012). They are usually associated with resistance to plant diseases and their

synthesis as phytoalexins is a response to an attack by plant pathogens. Some studies have focused on the involvement of these compounds in grapevine defense. It has been shown that resveratrol, pterostilbene (monomers) and ϵ - and δ -viniferins (dimers) from *Vitis vinifera* leaves and berries are able to inhibit *Plasmopara viticola* (downy mildew) or *Botrytis cinerea* (gray mold) (Adrian and Jeandet, 2012; Bavaresco et al., 1997; Dufour et al., 2013; Pezet et al., 2004). More complex stilbenes present in grapevine canes such as vitisin B and hopeaphenol (tetramers) have also shown significant antifungal activity against *P. viticola* (Schnee et al., 2013) and several fungi involved in wood diseases in vine (Lambert et al., 2012). In addition, grapevine cane extracts containing a wide spectrum of stilbenoid compounds have shown significant antifungal activity against *P. viticola* and are thus considered as a potential natural fungicide (Richard et al., 2016; Schnee et al., 2013).

Spruce (*Picea abies* (L.) Karst.), which is a member of the Pinaceae family, is one of the most abundant conifer species in Eurasian forests and the most promising in terms of added value. Often thrown away or burned, co-products generated by wood companies like bark are rich in stilbenes and potentially recoverable (Jyske et al., 2014; Latva-Mäenpää et al., 2014). Spruce bark is especially composed of glycosylated monomeric stilbenes such as astringin, piceid and isorhapontin. Their respective aglycone forms, i.e. piceatannol, resveratrol and isorhapontigenin, are in smaller amounts (Mulat et al., 2014). Dimeric stilbenes in spruce bark have also been identified with astringin-astringin and astringin-isorhapontin dimers named piceasides (A-H) (Li et al., 2008). Furthermore, the antifungal activity of stilbenoids from spruce bark has been investigated. Astringin, isorhapontin and isorhapontigenin have been assayed *in vitro* against conifer infecting fungi. The aglycone isorhapontigenin had the most toxic activity while the glycosylated stilbene exhibited a lower antifungal activity (Woodward and Pearce, 1988).

The aim of this study was to characterize a spruce bark extract with analytic tools (UHPLC-MS, 1D- and 2D-NMR) and to investigate its bioactivity against downy mildew (*P. viticola*). The antifungal activity of the main stilbene compounds present in the extract was also tested. The significant presence of stilbene in these co-products could allow spruce bark to be used as a new natural antifungal agent.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

For UHPLC-MS analysis, LC-MS-grade acetonitrile was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France) and formic acid from Fisher Scientific (Loughborough, U.K.). Water was purified by an Elga water purification system (Bucks, U.K.). HPLC-grade acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) were obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) for preparative HPLC. HPLC-grade methanol was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

Plant material

Grapevine plants (*Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon) provided by UMR SAVE (INRA, Villenave d'Ornon, France) were propagated in a greenhouse at 25°C with a relative humidity at 75% and 15h day / 9h night photoperiod. To perform downy mildew assays, 60-day-old seedlings with 10-12 leaves were used and the third or fourth leaves below the apex were collected.

Pathogen material

Biological tests were conducted on *Plasmopara viticola* isolate (ANN-01) collected in 2015 on *Vitis vinifera* cv. Ugni blanc in commercial vineyards located in Charente (France). The isolate was multiplied and inoculated on grapevine leaves (*V. vinifera* cv. Cabernet Sauvignon) according to the method used by Corio-Costet et al., 2011. Sporangia were collected and suspended in sterile water at 4°C and then inoculated on the abaxial face of fresh grapevine leaves with 20 droplets of 15 μ L from an inoculum at 5000 sporangia per mL. After incubation at 22°C in the dark for 24 h allowing stomata opening and zoospore penetration, the droplets were removed and Petri dishes were incubated for 7 days at 22°C with a 16 h/8 h day/night photoperiod.

Spruce bark extract

Spruce bark (*Picea abies* (L.) Kars. Pinaceae) was kindly supplied by Actichem S.A (Montauban, France). Bark was harvested from common spruce trunks in the Eastern region of France, dried for one month in the dark and then ground in a crusher. Three kilograms of spruce bark powder were extracted with 30 L of ethanol-water mixture (85/15, v/v) at 60°C for two hours. The filtrate was evaporated in a 150-L reactor/evaporator and the resulting extract was dried in a Guedu® dryer (De Dietrich SAS, Semur-en-Auxois, France) affording 200 g of spruce bark extract.

Isolation by preparative HPLC

The various stilbenes were isolated from spruce extract by preparative HPLC Varian Pro Star equipped by Agilent Zorbax SB-C18 PrepHT (250mm x 21.2mm, 7µm) column. Elution was achieved with a solvent system consisting of water acidified with 0.025% TFA (solvent A) and acetonitrile acidified with 0.025% TFA (solvent B) with a flow rate at 18 mL/min. The purification was performed with the following gradient: 20% B (from 0 to 5 min), 20 to 30% B (from 5 to 30 min), 30 to 40% B (from 30 to 35 min), 40 to 100% B (from 35 to 36 min), 100% B (from 36 to 41 min), 100 to 20% B (from 41 to 45 min).

UPLC-DAD / ESI-IT Analysis

The UPLC-DAD / ESI-IT apparatus was an Agilent 1290 Series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an UV-VIS-DAD and an Esquire 6000 ion trap (IT) mass spectrometer using an ESI source (Bruker-Daltonics, Billerica, MA). Analysis was performed on an Agilent Zorbax SB-C18 (100 mm x 2.1 mm x 1.8 µm) column. Spruce extract was dissolved in methanol-water mixture (1/1; v/v) at 1 mg/mL, filtered with 0.45 µm PTFE, and injected using 1 µL injection volumes. Elution was carried out with a solvent system consisting of solvent A (water with 0.1% formic acid) and solvent B (acetonitrile with 0.1% formic acid). Separation was performed using a flow rate of 0.4 mL/min. The run was as follows: 10% B (from 0 to 1.7 min), 10 to 20% B (from 1.7 to 3.4 min), 20 to 30% B (from 3.4 to 5.1 min), 30% B (from 5.1 to 6.8 min), 30 to 35% B (from 6.8 to 8.5 min), 35 to 60% B (from 8.5 to 11.9 min), 60 to 100% B (from 11.9 to 15.3 min), 100% B (from 15.3 to 17 min), 100 to 10% B (from 17 to 17.3 min). Mass spectrometry analyses were performed in negative mode with a range of m/z 100–1200. The drying gas used was nitrogen at 10 L/min at 365°C with nebulizer pressure at 40 psi. Capillary voltage was 3100 V. Bruker Data Analysis 3.2 software was used for data processing.

UPLC-DAD / ESI-Q-TOF Analysis

The UPLC-DAD / ESI-Q-TOF system was an Agilent 1290 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an UV-VIS-DAD and an ESI-Q-TOF mass spectrometer (Agilent 6530 Accurate Mass). Analysis was carried out on an Agilent Zorbax SB-C18 (100 mm x 2.1 mm x 1.8 µm) column. Pure compounds were dissolved at 250 µg/mL. Separation was performed with a solvent system consisting of solvent A (water with 0.1% formic acid) and solvent B (methanol with 0.1% formic acid). Separation was performed using a flow rate of 0.3 mL/min. The run was as follows: 1 to 100% B (from 0 to 5 min), 100% (from 5 to 6 min) and 100 to 1% (from 6 to 7 min). Mass spectrometry analyses were performed in negative mode. The drying gas used was nitrogen at 9 L/min at 300°C with nebulizer pressure at 25 psi. The sheath gas flow and temperature were set at 11 L/min and 350°C. Capillary voltage was 4000 V. The data was processed by Mass Hunter Qualitative Analysis software.

NMR Analysis

All ¹H and 2D NMR (COSY, ROESY, HSQC, HMBC) analyses were performed on a Bruker Ultrashield 600 MHz NMR spectrometer equipped with a cryogenic TXI probe head. NMR spectra were obtained in 3-mm tubes with *d*₄-methanol as solvent. The data were analyzed with Bruker Topspin software version 3.2.

Antifungal Assay against *Plasmopara viticola*

Spruce bark extract

After subculturing downy mildew sporangia on new grapevine leaves as described above and incubation for 7 days, the freshly inoculum was used for bioassays. For spruce extract bioassays, fresh leaves of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon were washed under water and dried between two sheets of filter paper. Leaf discs were generated with a 25-mm-wide pastry-cutter. Eight discs from eight different leaves were placed with the abaxial surface facing upward in Petri dishes containing Whatman paper soaked with 3.5 mL of sterile water. Finally, eight repetitions were carried out for each concentration. The bark extract range concentration (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.8, 1 g/L) was prepared in water with 1% of ethanol for better dissolution. Antifungal assays were performed by spraying the different dilutions with a hand-held sprayer having a pressure reserve (Ecospray®) on the several leaf discs. Control experiments were performed by applying sterile water with 1% of ethanol. After drying the surfaces for 24h, three droplets of 15 µL per disc were inoculated from an inoculum at 15×10^3 sporangia per mL. The number of sporangia was previously counted with a Malassez cell under a light microscope at x100 magnification. As described above, the Petri dishes were then incubated in a growth chamber at 22°C with a 16h light day ($35 \mu\text{m}^2/\text{s}$) for 7 days. Three independent experiments were done. Fungal mycelial growth and sporulation density were visually evaluated by scoring between 0 and 100. For each concentration, the average score was converted to a percentage of inhibition by comparison with the control disc. The dose response curve obtained by plotting inhibition scores against \log_{10} of extract concentration made it possible to determine the concentration inhibiting growth at 50% (IC_{50}).

Stilbenoids

For stilbenoid experiments, target compounds were directly added to the sporangial suspensions as described by Schnee et al., 2013. Suspensions at 30×10^3 sporangia per ml were prepared while stilbenes were prepared with a range of eight concentrations (0, 100, 200, 400, 600, 1000, 1600, 2000 µM) in sterile water with 1% of ethanol. Thus, 1 volume of sporangial suspension (15×10^3 sporangia per ml final) and 1 volume of stilbene dilution (0, 50, 100, 200, 300, 500, 800, 1000 µM final) were mixed. Control experiments were performed by mixing sterile water with 1% of ethanol with sporangial suspension. As described above, three droplets of 15 µL per disc (eight discs total) of mixed suspension were inoculated and downy mildew inhibition was measured seven days after incubation.

In addition, 100 µL of mixed suspensions were deposited in triplicate in 96-well microtiter plates and the number of mobile zoospores was counted after two hours with reverse phase microscopy.

Statistical analyses

Three independent experiments were performed for the spruce bark extract as well as for the pure compounds. Data are shown as $\text{IC}_{50} \pm$ standard deviations. The statistical analysis was carried out with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison post hoc tests by using GraphPad Prism software. Significant differences between IC_{50} values of stilbenes are represented by different letters.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of Spruce Bark Extract

Extract of spruce bark was analyzed by UHPLC-DAD/ESI-MS giving the chromatogram shown in **Fig. 1**. Nineteen compounds were recognized as stilbenes by maximum absorption at 280, 306 and 320 nm which are the UV absorption properties of stilbenes (Mulat et al., 2014). Each compound was isolated by preparative HPLC.

Compounds **1**, **4** and **5** exhibited quasi-molecular $[\text{M} - \text{H}]^-$ ions in negative mode at m/z 405, 389 and 419, respectively (**Table 1**). The fragmentation patterns of the three compounds showed the loss of hexose unit characteristic of glycosylated stilbenes. According to $^1\text{H-NMR}$ spectra obtained and literature data (Mulat et al., 2014), compound **1** was identified as *trans*-astringin, compounds **4** as *trans*-piceid and compound **5** as *trans*-isorhapontin.

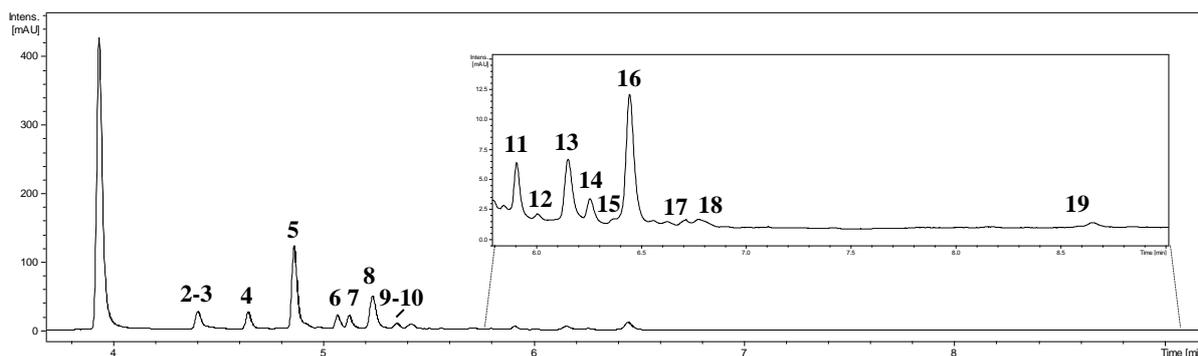


Fig. 1. UHPLC-DAD chromatogram of spruce bark extract at 320 nm. (1) *trans*-astringin, (2/3) piceasides A/B, (4) *trans*-piceid, (5) *trans*-isorhapontin, (6) piceaside H, (7) piceaside G, (8) *trans*-piceatannol, (9/10) piceaside E/F, (11) piceaside I, (12) *trans*-resveratrol, (13) piceaside J, (14) piceaside K, (15) piceaside L, (16) *trans*-isorhapontigenin, (17) piceaside M, (18) piceaside N, (19) cassigarol E.

Compounds **8**, **12**, and **16** exhibited quasi-molecular $[M - H]^-$ ions at m/z 243, 227 and 257, respectively. These molecular ions corresponded to compounds 1, 4 and 5 without the hexose unit, which means that it was probably their aglycone forms. Comparison of $^1\text{H-NMR}$ data with the literature identified compounds **8**, **12** and **16** as *trans*-piceatannol, *trans*-resveratrol and *trans*-isorhapontigenin, respectively (Mulat et al., 2014).

Compounds **2**, **3**, **6** and **7** showed a quasi-molecular $[M - H]^-$ ion at m/z 809, whereas compounds **9** and **10** exhibited a quasi-molecular $[M - H]^-$ ion at m/z 823. These data combined with MS/MS fragmentation revealed the presence of glycosylated stilbene dimers. In addition, $^1\text{H-NMR}$ and 2D-NMR (COSY, ROESY, HSQC, HMBC) spectra matched with data reported by Li et al., 2008. Compounds **2**, **3**, **6** and **7** were identified as piceasides A, B, H and G, respectively. These molecules are astringin-astringin dimers. Compounds **9** and **10** were piceasides E and F, respectively, which are astringin-isorhapontin dimers.

Compound **19** with the molecular ion $[M - H]^-$ at m/z 485 was studied by ^1H and 2D NMR. It was identified as cassigarol E, a piceatannol-piceatannol dimer (Baba et al., 1994), and was previously isolated from the bark of *Picea jezoensis* (Wada et al., 2009).

Table 1. Retention time, MS and MS/MS data of stilbenes identified in common spruce (*Picea abies*) bark by UHPLC/ESI-MS.

No.	Compound	R_t (min)	$[M - H]^-$ (m/z)	MS/MS fragments
1	<i>trans</i> -astringin	3.9	405	243
2 - 3	piceaside A / B	4.4	809	647; 485; 405; 243
4	<i>trans</i> -piceid	4.6	389	227
5	<i>trans</i> -isorhapontin	4.9	419	257
6	piceaside H	5.1	809	647; 485; 405; 243
7	piceaside G	5.1	809	647; 485; 405; 243
8	<i>trans</i> -piceatannol	5.2	243	-
9 - 10	piceaside E / F	5.3	823	661; 499; 405; 243
11	piceaside I	5.9	647	485; 405; 243
12	<i>trans</i> -resveratrol	6.1	227	-
13	piceaside J	6.2	647	485; 405; 243
14	piceaside K	6.3	647	485; 405; 243
15	piceaside L	6.4	661	499; 405; 243
16	<i>trans</i> -isorhapontigenin	6.5	257	-
17	piceaside M	6.7	661	499; 405; 243
18	piceaside N	6.7	661	499; 405; 243
19	cassigarol E	8.6	485	243

Compound **11** was obtained as a pale brown powder. Its molecular formula was determined to be $C_{34}H_{32}O_{13}$ by HRESIMS. Its negative-mode HRESIMS spectrum exhibited a quasi-molecular $[M - H]^-$ ion at m/z 647.1796 (calculated: 647.1770). Its MS/MS fragmentation pattern exhibited three main fragments at m/z 485, 405 and 243 (**Table 1**), so compound **11** is an astringin-piceatannol dimer. Its structure was elucidated using 1H -NMR and 2D-NMR (COSY, ROESY, HSQC, HMBC) spectra. NMR data are reported in **Table S1**. The NMR data indicated the presence of two ABC spin systems corresponding to the presence of 1,3,4-trisubstituted aromatic rings [δ_H 7.16 (H-2a), 6.95 (H-5a), 7.08 (H-6a) and 6.65 (H-2b), 6.64 (H-5b), 7.46 (H-6b)], two ABC spin systems associated to 1,3,5-trisubstituted aromatic rings [δ_H 6.81 (H-10a), 6.47 (H-12a), 6.64 (H-14a) and 6.11 (H-10/14b), 6.16 (H-12b)], two olefinic protons [δ_H 7.03 (H-7a) and 6.91 (H-8a)] with large coupling constant ($J = 16.3$ Hz) owing to a *trans* double bond system, a pair of AB doublets [δ_H 4.74 (H-7b) and 4.71 (H-8b)], and a glucose moiety. The presence of a dihydro-1,4-dioxin system was confirmed on the basis of the specific carbon chemical shifts of the AB system (δ_C 81.5 and 81.9) (Li et al., 2008). The connectivities between the different systems were established using HMBC and ROESY experiments (**Table S1**). Because HMBC correlations between the oxygen bridge are complicated to observe, the determination of the connections between the two piceatannol units was based on the ROESY correlation between H-2a and H-7b. This result is in agreement with literature data concerning stilbene dimers in the bark of *Picea* species (Li et al., 2008; Wada et al., 2009). The connection of the glucose unit to C-11a was based on the HMBC correlation between the anomeric proton H-1' and C-11a and was confirmed by ROESY correlations H-1'/H-10a and H-1'/H-12a. The *trans* relative configuration of C-7b and C-8b was determined from the ROESY correlations between H-7b/H10/14b, H-8b/H-2b and H-8b/H-6b and confirmed by the coupling constant between H-7b and H-8b ($J = 8.0$ Hz) (Li et al., 2008). Compound **11** was accordingly characterized as a new astringin-piceatannol dimer, and named piceaside I (**Fig. 2**).

Compounds **13** and **14** were obtained as a brown powder. They exhibited a quasi-molecular $[M - H]^-$ ion at m/z 647.1793 and 647.1787 respectively. A molecular formula of $C_{34}H_{32}O_{13}$ was determined for these two compounds, which suggests that they could be astringin-piceatannol dimers. Their structure was elucidated using 1H -NMR and 2D-NMR experiments. Data are reported in **Table S2**. NMR data suggests that the aglycone part of compounds **13** and **14** is the same as that of **11**. The only difference between these compounds and piceaside I (**11**) is the connection of the glucose unit on carbon C-11b. This connection was determined by HMBC correlation between the anomeric proton H-1' and C-11b and was confirmed by the ROESY correlations H-1'/H-10b and H-1'/H-12b. The specific connection of the two piceatannol units was based on the ROESY cross-peaks H-2a/H-7b and H-5a/H-8b. The coupling constant between H-7b and H-8b ($J = 8.0$ Hz) and the ROESY correlations between H-7b/H10b, H-7b/H-14b, H-8b/H-2b and H-8b/H-6b indicated the 7b,8b-*trans* relative configuration of the two compounds. Hence compounds **13** and **14** were identified as a pair of diastereomeric astringin-piceatannol dimers, and named piceasides J and K (**Fig. 2**). Biotransformation studies of astringin by a fungus named *Ceratocystis polonica* had already allowed the formation *in vitro* of compounds **13** and **14** (Hammerbacher et al., 2013). However, to our knowledge, these two astringin-piceatannol dimers are now reported for the first time in the plant kingdom.

Compound **15** was obtained as a brown powder with a quasi-molecular ion $[M - H]^-$ at m/z 661.1936 giving a molecular formula of $C_{35}H_{34}O_{13}$. The structure was identified by 1H -NMR and 2D NMR. NMR data are reported in **Table S1**. Comparison of their NMR data with those of piceaside I (**11**) indicated that the only difference between the two compounds was the presence of an *O*-methyl group on position C-3b. As for compound **11**, ROESY correlations indicated the *trans* relative configuration of C-7b and C-8b. These data are consistent with another type of stilbene dimer formed by the conjugation of an astringin unit and an isorhapontigenin unit. Hence compound **15** was accordingly characterized as a new stilbene dimer and named piceaside L (**Fig. 2**).

Compounds **17** and **18** were obtained as a brown powder and their molecular formula of $C_{35}H_{34}O_{13}$ was determined by the presence of a quasi-molecular ion $[M - H]^-$ at m/z 661.1961 and 661.1955, respectively. As for piceaside L (**15**), examination of their NMR data (**Table S3**) indicated that the basic skeleton of compounds **17** and **18** was the same as that of **13** and **14**. The only difference between the two pairs of compounds was the presence of an *O*-methyl group on position C-3b. Compounds **17** and **18** were identified as a new pair of diastereomeric isorhapontin-piceatannol dimers, named piceasides M and N, respectively (**Fig. 2**).

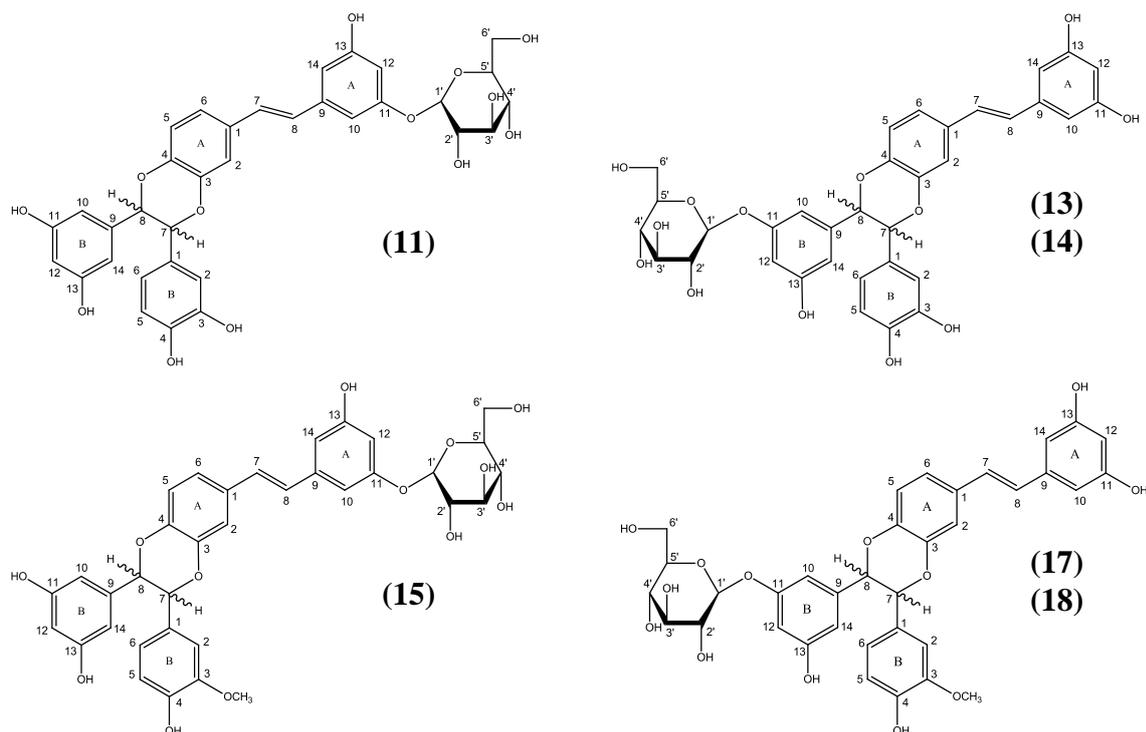


Fig. 2. Chemical structure of new dimers isolated from spruce bark extract.

Quantification of Stilbenes in Spruce Bark Extract

Stilbenes were quantified in spruce trunk bark by UHPLC-DAD with standards isolated in laboratory from spruce bark extract. The calibration curves were carried out in the range of five concentrations (0-100 $\mu\text{g/mL}$) in quintuplicate according to Feinberg (2001). Each compound was quantified with its own calibration equation except piceaside H, which was quantified by piceaside G, piceaside J and K quantified by piceaside I and piceaside M and N quantified by piceaside L. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) as well as the determination coefficient R^2 were determined for each compound (**Table 2**).

The main compounds were the glycosylated stilbenes astringin (11.57 g/kg spruce barks) and isorhapontin (2.59 g/kg spruce barks) (**Table 2**). Their aglycons form piceatannol (0.89 g/kg spruce barks) and isorhapontigenin (0.45 g/kg spruce barks) were respectively the third and sixth most present components. From dimers, the most abundant were the astringin-astringin dimers such as piceaside G (0.59 g/kg spruce barks), piceaside H (0.56 g/kg spruce barks) and the mixture piceasides A/B (0.41 g/kg spruce barks). Some dimeric stilbenes as isorhapontin-piceatannol dimers (piceasides M and N) were unable to be quantified as they are below to the LOQ score. Finally, the total content of stilbenes quantified amounted to 18.45 g/ kg of spruce barks.

The relative abundance of each stilbene in spruce trunk bark revealed the huge presence of monomeric stilbenes which represented 86.07% of stilbenes against 13.93% for dimeric stilbenes. Astringin alone accounted for 62.71% of stilbene total followed by isorhapontin with 14.04% of stilbene total (**Table 2**). Thus, only two stilbenes on nineteen identified represented three-quarters of the spruce bark stilbenes.

Literature data was in agreement with our observations. Angelis et al. (2016) reported that astringin was the major stilbene in spruce trunk bark followed by isorhapontin. In bark of spruce root, the opposite was revealed. Mulat et al. (2014) found respectively 29.5 g/kg dry mass and 10.7 g/kg dry mass for isorhapontin and astringin. Concerning dimer content in spruce bark, no data have been reported in the literature to our knowledge.

Table 2. Quantification of stilbenoids in spruce bark (*Picea abies*).

No.	Compound	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	Concentration (g/kg bark)	Proportion (%)
1	astringin	0.02	0.21	11.57	62.7
2/3	piceaside A / B	0.04	0.40	0.41	2.2
4	piceid	0.17	0.68	0.35	1.9
5	isorhapontin	0.03	0.31	2.59	14.0
6	piceaside H ^a	0.04	0.40	0.56	3.0
7	piceaside G	0.04	0.40	0.59	3.2
8	piceatannol	0.01	0.25	0.89	4.8
9/10	piceaside E / F	0.02	0.16	0.21	1.1
11	piceaside I	0.05	0.26	0.21	1.1
12	resveratrol	0.06	0.38	0.03	0.2
13	piceaside J ^b	0.05	0.26	0.35	1.9
14	piceaside K ^b	0.05	0.26	0.12	0.7
15	piceaside L	0.04	0.36	0.08	0.4
16	isorhapontigenin	0.04	0.31	0.45	2.4
17	piceaside M ^c	0.04	0.36	NQ	NQ
18	piceaside N ^c	0.04	0.36	NQ	NQ
19	cassigarol E	0.06	0.49	0.04	0.2
	Total			18.45	100

^aPiceaside G (7) was used for quantification of Piceaside H (6). ^bPiceaside I (11) was used for quantification of piceaside J (13) and K (14). ^cPiceaside L (15) was used for quantification of piceaside M (17) et N (18). NQ means detected but not quantified because under LOQ score.

Downy mildew assays

After completing characterization, the antifungal activity of spruce bark extract was investigated. As winemakers need to use antifungal products upstream of infection, i.e. for the purpose of prevention, spruce bark extract was sprayed onto the leaves before inoculation of *P. viticola*. Downy mildew development was evaluated by visual scoring seven days after infection to determine the inhibition potential of spruce bark extract.

A wide range of concentrations was performed (0.05-1 g/L) to observe the different levels of inhibition and obtain more precise information on IC₅₀ evaluation (concentration which inhibits 50% of pathogen development). Spruce bark extract had an IC₅₀ at 0.76 g/L (Table 3A) and totally inhibited the development of downy mildew approximately at 1 g/L (Fig. 3). *P. viticola* has already been the subject of antifungal tests by natural stilbene-enriched extracts with *Vitis vinifera* cane extracts (Schnee et al., 2013). Crude extract was tested at only 1 g/L and led to two classifications: "Fungitoxicity (+) / No fungitoxicity (-)". Stilbene-enriched extracts of cane were toxic on *P. viticola* at 1 g/L.

The main stilbenes of spruce bark extract were then isolated by preparative HPLC and tested on *P. viticola*. Ten major stilbenes were purified in sufficient quantity to allow bioassays (astringin, isorhapontin, piceatannol, isorhapontigenin, piceaside G, H, I, J, L and cassigarol E). To understand the mechanisms of action of stilbenes on downy mildew, zoospore mobility and mycelium development were investigated. Thus, stilbenes and zoospores were prepared in mixture and then added onto grapevine leaves or to 96-well microtiter plates.

Stilbenes with the highest activity against zoospore mobility and downy mildew development were the piceatannol-piceatannol dimer, also named cassigarol E (24 μM for both) (Table 3B). A slightly lower efficacy was found for the aglycone monomers isorhapontigenin (76 μM and 116 μM , respectively) as well as the new dimers piceaside J (109 μM and 96 μM , respectively), piceaside L (142 μM and 145 μM , respectively) and piceaside I (225 μM and 147 μM , respectively). To our knowledge, this is the first time that IC₅₀ values are reported for these stilbenes. Interestingly, IC₅₀ values of zoospore mobility and downy mildew development were similar, so they are correlated. As mentioned by Pezet et al., 2004, stilbenes were able to inhibit the movement of the zoospores, preventing their input in leaves via stomata and therefore blocking infection. At the

cellular level, stilbenes may exert their antifungal activities via many modes of action such as the generation of ROS leading to apoptosis (Kim et al., 2013), and also a plasma membrane disruption effect with the leakage of the cellular content (Jian et al., 2015; Koh et al., 2016).

Table 3. A: Concentration inhibiting 50% of *P.viticola* development by spruce bark extract (g/L) \pm standard deviation; **B:** Concentration inhibiting 50% of zoospore mobility and *P. viticola* development by stilbenes (μ M) \pm standard deviation.

A	Mildew development	
	IC ₅₀	R ²
spruce bark extract	0.76 \pm 0.12	1

B compounds	Mildew development		Zoospore mobility	
	IC ₅₀	R ²	IC ₅₀	R ²
astringin	705 \pm 101 ^e	1	659 \pm 127 ^c	0.985
isorhapontin	272 \pm 34 ^c	1	228 \pm 38 ^c	0.997
piceatannol	254 \pm 35 ^c	1	249 \pm 95 ^c	0.974
isorhapontigenin	116 \pm 26 ^b	0.994	76 \pm 2 ^b	0.992
piceaside G	677 \pm 76 ^c	0.982	799 \pm 142 ^e	0.977
piceaside H	551 \pm 76 ^d	1	524 \pm 133 ^d	1
piceaside I	147 \pm 20 ^b	1	225 \pm 18 ^c	1
piceaside J	96 \pm 27 ^b	1	109 \pm 32 ^b	0.957
piceaside L	145 \pm 6 ^b	1	142 \pm 1 ^b	1
cassigarol E	24 \pm 2 ^a	1	24 \pm 2 ^a	1

Letters indicate significant difference between IC₅₀ values of stilbenes according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls multiple comparison post hoc tests.

Among the lowest active compounds against *P. viticola*, the glycosylated monomers astringin and glycosylated diastereomeric dimers piceaside G and piceaside H were respectively three and five times less efficient than their aglycone forms piceatannol and piceaside I or piceaside J dimers. Our data are in agreement with those of Woodward and Pearce (1988) reporting that the antifungal activity against conifer infecting fungi of aglycone stilbenes was six times greater than that of glycosylated stilbenes. Piceid was also tested but showed no activity against downy mildew (data not shown).

The anti-mildew activities of stilbenes and their quantification in the spruce bark were different. Indeed, while the piceatannol-piceatannol dimer was the most active compound, it was the least present in bark. On the contrary, while the glycoside stilbenes astringin, and astringin-astringin dimers (piceasides G and H) were the major compounds, they had the lowest activities. Thus, enriching the extract in aglycone stilbenes by a chemical or enzymatic treatment to remove the sugars could increase its antifungal potential.

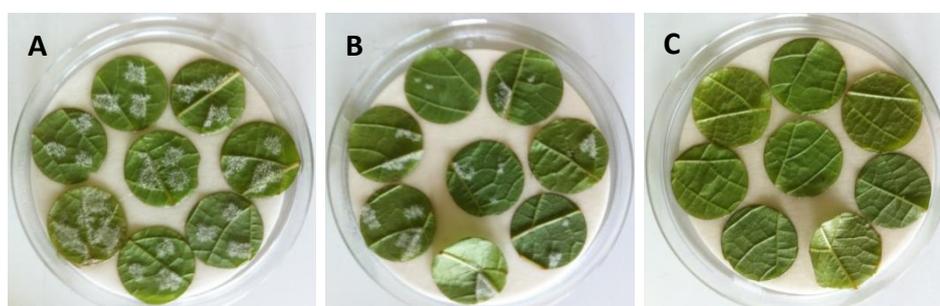


Figure 3. Fungal mycelial development of *P. viticola* after addition of spruce bark extract. (A) control with aqueous solution at 1% of ethanol, (B) inhibition of downy mildew at 50 % (IC₅₀ = 0.76 g/L of spruce bark extract), (C) inhibition of downy mildew at 100 % (total inhibition = 1 g/L of spruce bark extract).

CONCLUSION

In summary, nineteen stilbenes were identified in spruce bark extract including six new compounds (piceasides I-N). In addition, spruce bark extract and pure compounds showed an antifungal activity against *P. viticola*, which is responsible for downy mildew. The aglycone forms (cassigarol E, isorhapontigenin, piceatannol, piceasides I, J and L) showed a better activity than their glucoside. Hence, these results suggest that spruce bark, which is a co-product from the wood industry, could potentially be used as a natural fungicide against downy mildew. Biodegradable and less toxic than fungicides, spruce bark waste could reduce the amount of chemical products used in the field and thus promote more sustainable agriculture.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully thank Actichem (Montauban, France) for supplying spruce bark. We are also grateful to S. Gambier for providing the plants. The authors wish to thank the *Conseil Regional d'Aquitaine* for their financial support in this research. The work was supported by the ANR LabCom program (the Stilbene Innovation project, ANR-14-LAB5-0005-01), the Bordeaux Metabolome Facility, and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

REFERENCES

- Adrian, M., Jeandet, P., 2012. Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia* 83, 1345–1350.
- Angelis, A., Hubert, J., Aligiannis, N., Michalea, R., Abedini, A., Nuzillard, J.-M., Gangloff, S., Skaltsounis, A.-L., Renault, J.-H., 2016. Bio-guided isolation of methanol-soluble metabolites of common spruce (*Picea abies*) bark by-products and investigation of their dermo-cosmetic properties. *Molecules* 21, 1586.
- Baba, K., Kido, T., Taniguchi, M., Kozawaqa, M., 1994. Stilbenoids from *Cassia garrettiana*. *Phytochemistry* 36, 1509–1513.
- Bavaresco, L., Petegolli, D., Cantu, E., Fergoni, M., Chiusa, G., Trevisan, M., 1997. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *VITIS-J. Grapevine Res.* 36, 77.
- Chen, B., Wu, F., Wu, W., Jin, B., Xie, L., Feng, W., Ouyang, G., 2016. Determination of 27 pesticides in wine by dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Microchem. J.* 126, 415–422.
- Corio-Costet, M.F., 2012. Fungicide resistance in *Plasmopara viticola* in France and anti-resistance measures., in: Thind, T.S. (Ed.), *Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management*. CABI, Wallingford, pp. 157–171.
- Corio-Costet, M.-F., Dufour, M.-C., Cigna, J., Abadie, P., Chen, W.-J., 2011. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *Eur. J. Plant Pathol.* 129, 315–329.
- Dufour, M.C., Lambert, C., Bouscaut, J., Mérillon, J.M., Corio-Costet, M.F., 2013. Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*: *Elicitation and grapevine responses to mildews*. *Plant Pathol.* 62, 370–382.
- Feinberg, M., 2001. L'assurance qualité dans les laboratoires agroalimentaires et pharmaceutiques.
- Gessler, C., Pertot, I., Perazzolli, M., 2011. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathol. Mediterr.* 50, 3–44.
- Guo, T., Fang, P., Jiang, J., Zhang, F., Yong, W., Liu, J., Dong, Y., 2016. Rapid screening and quantification of residual pesticides and illegal adulterants in red wine by direct analysis in real time mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1471, 27–33.
- Hammerbacher, A., Schmidt, A., Wadke, N., Wright, L.P., Schneider, B., Bohlmann, J., Brand, W.A., Fenning, T.M., Gershenson, J., Paetz, C., 2013. A common fungal associate of the spruce bark beetle metabolizes the stilbene defenses of Norway spruce. *PLANT Physiol.* 162, 1324–1336.
- Jian, W., He, D., Xi, P., Li, X., 2015. Synthesis and biological evaluation of novel fluorine-containing stilbene derivatives as fungicidal agents against phytopathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.* 63, 9963–9969.

- Jyske, T., Laakso, T., Latva-Mäenpää, H., Tapanila, T., Saranpää, P., 2014. Yield of stilbene glucosides from the bark of young and old Norway spruce stems. *Biomass Bioenergy* 71, 216–227.
- Kim, N., Kim, J.-K., Hwang, D., Lim, Y.-H., 2013. The possible mechanism of rhapontigenin influencing antifungal activity on *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 51, 45–52.
- Koh, J.C., Barbulescu, D.M., Salisbury, P.A., Slater, A.T., 2016. Pterostilbene is a potential candidate for control of blackleg in canola. *PLoS One*, 11(5), e0156186.
- La Torre, A., Pompei, V., Mandalà, C., Cioffi, C., 2011. Grapevine downy mildew control using reduced copper amounts in organic viticulture. *Comm Appl Biol Sci* 728–736.
- Lagunas-Allué, L., Sanz-Asensio, J., Martínez-Soria, M.T., 2012. Comparison of four extraction methods for the determination of fungicide residues in grapes through gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1270, 62–71.
- Lambert, C., Bisson, J., Waffo-Téguo, P., Papastamoulis, Y., Richard, T., Corio-Costet, M.-F., Mérillon, J.-M., Cluzet, S., 2012. Phenolics and their antifungal role in grapevine wood decay: focus on the Botryosphaeriaceae family. *J. Agric. Food Chem.* 60, 11859–11868.
- Latva-Mäenpää, H., Laakso, T., Sarjala, T., Wähälä, K., Saranpää, P., 2014. Root neck of Norway spruce as a source of bioactive lignans and stilbenes. *Holzforschung* 68, 1–7.
- Leroux, P., Clerjeau, M., 1985. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. and *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. and de Toni to fungicides in French vineyards. *Crop Prot.* 4, 137–160.
- Li, S.-H., Niu, X.-M., Zahn, S., Gershenzon, J., Weston, J., Schneider, B., 2008. Diastereomeric stilbene glucoside dimers from the bark of Norway spruce (*Picea abies*). *Phytochemistry* 69, 772–782.
- Martins, V., Teixeira, A., Bassil, E., Blumwald, E., Gerós, H., 2014. Metabolic changes of *Vitis vinifera* berries and leaves exposed to Bordeaux mixture. *Plant Physiol. Biochem.* 82, 270–278.
- Mulat, D.G., Latva-Mäenpää, H., Koskela, H., Saranpää, P., Wähälä, K., 2014. Rapid chemical characterisation of stilbenes in the root bark of Norway spruce by off-line HPLC/DAD-NMR. *Phytochem. Anal.* 25, 529–536.
- Pawlus, A.D., Waffo-Téguo, P., Shaver, J., Merillon, J.-M., 2012. Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a review. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 46, 57–111.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., Richter, H., 2004. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *VITIS-J. Grapevine Res.* 43, 145.
- Richard, T., Abdelli-Belhad, A., Vitrac, X., Waffo-Téguo, P., Mérillon, J.-M., 2016. *Vitis vinifera* canes, a source of stilbenoids against downy mildew. *OENO One* 50.
- Rivière, C., Pawlus, A.D., Mérillon, J.-M., 2012. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Nat. Prod. Rep.* 29, 1317.
- Schnee, S., Queiroz, E.F., Voinesco, F., Marcourt, L., Dubuis, P.-H., Wolfender, J.-L., Gindro, K., 2013. *Vitis vinifera* canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 5459–5467.
- Wada, S., Yasui, Y., Tokuda, H., Tanaka, R., 2009. Anti-tumor-initiating effects of phenolic compounds isolated from the bark of *Picea jezoensis* var. *jezoensis*. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 6414–6421.
- Woodward, S., Pearce, R.B., 1988. The role of stilbenes in resistance of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) to entry of fungal pathogens. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 33, 127–149.

Supporting Information

Stilbenes from common spruce (*Picea abies*) bark as natural antifungal agent against downy mildew (*Plasmopara viticola*)

Julien Gabaston^a, Tristan Richard^a, Benoit Biais^a, Pierre Waffo-Teguo^a, Eric Pedrot^a, Michaël Jourdes^a, Marie-France Corio-Costet^b, Jean-Michel Méryllon^{a*}

^aUniversité de Bordeaux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de Recherche Œnologie EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique (Gesvab) - Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, CS 50008 - 210, chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France

^b INRA, UMR SAVE-1065, ISVV, Labex COTE, Rue Edouard Bourlaux, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon, France

*Corresponding author: jean-michel.merillon@u-bordeaux.fr

Tables

Table S1. NMR data of dimers **11** and **15** isolated from spruce bark extract.

No.	Compound 11			Compound 15		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	HMBC (H \rightarrow C)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	HMBC (H \rightarrow C)
a1	-	132.4	-	-	132.5	-
a2	7.16 d (2.0)	115.6	a4, a6, a7	7.18 d (2.0)	115.8	a4, a6, a7
a3	-	145.2	-	-	145.2	-
a4	-	145.0	-	-	145.0	-
a5	6.95 d (8.3)	118.1	a1, a3, a6	6.95 d (8.3)	118.1	a1, a3, a6
a6	7.08 dd (2.0, 8.3)	121.0	a2, a4, a5, a7	7.09 dd (2.0, 8.3)	121.1	a2, a4, a7
a7	7.03 d (16.3)	129.7	a2, a6, a8, a9	7.03 d (16.3)	129.2	a2, a6, a8, a9
a8	6.91 d (16.3)	128.2	a1, a7, a10, a14	6.92 d (16.3)	128.2	a1, a7, a10, a14
a9	-	140.9	-	-	140.9	-
a10	6.81 t (1.6)	107.2	a8, a11, a12, a14	6.81 t (1.8)	107.3	a8, a11, a12, a14
a11	-	160.3	-	-	160.6	-
a12	6.47 t (1.6)	104.4	a10, a13, a14	6.47 t (1.8)	104.4	a10, a11, a13, a14
a13	-	159.9	-	-	159.3	-
a14	6.64 t (1.6)	109.5	a8, a10, a12	6.64 t (1.8)	108.6	a8, a10, a12, a13
b1	-	129.4	-	-	129.3	-
b2	6.65 d (2.0)	115.8	b3, b4, b6, b7	6.63 d (1.9)	112.4	b4, b6, b7
b3	-	146.0	-	-	148.5	-
b4	-	146.4	-	-	147.8	-
b5	6.64 d (8.1)	108.5	b1, b3	6.70 d (8.0)	115.8	b1, b3
b6	6.46 dd (2.0, 8.1)	120.5	b2, b4, b5, b7	6.66 dd (1.9, 8.0)	121.4	b2, b4, b7
b7	4.71 d (8.0)	81.9	b1, b2, b6, b8	4.81 d (8.0)	81.7	b1, b2, b6, b8
b8	4.74 d (8.0)	81.5	b1, b9, b10/14	4.72 d (8.0)	82.3	b7, b9, b10/14
b9	-	142.2	-	-	139.5	-
b10	6.11 d (2.2)	107.5	b8, b11, b12	6.10 d (2.2)	107.4	b8, b11, b12
b11	-	159.0	-	-	159.4	-
b12	6.16 t (2.2)	103.6	b10/14, b11/13	6.17 t (2.2)	103.5	b10/14, b11/b13
b13	-	159.0	-	-	159.4	-
b14	6.11 d (2.2)	107.5	b8, b12, b13	6.10 d (2.2)	107.4	b8, b12, b13
1'	4.90 d (7.3)	102.5	b11, 2'	4.90 d (7.3)	102.4	b11, 2'
2'	3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	74.9		3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	74.9	
3'	3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	78.0		3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	78.1	
4'	3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	71.5		3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	71.5	
5'	3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	78.0		3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	78.1	
6'	3.92 dd (12.0, 2.0)	62.4	4', 5'	3.93 dd (12.3, 2.1)	62.4	4', 5'
	3.72 dd (12.0, 5.6)		4', 5'	3.71 dd (12.3, 5.6)		4', 5'
OCH3				3.72 (3H, s)	56.4	b3

Table S2. NMR data of dimers **13** and **14** isolated from spruce bark extract.

No.	Compound 13		Compound 14		HMBC (H→C)
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	
a1	-	132.9	-	132.5	-
a2	7.14 d (2.0)	115.6	7.13 d (2.0)	115.6	a4, a6, a7
a3	-	145.3	-	145.3	-
a4	-	145.0	-	145.0	-
a5	6.95 d (8.3)	118.0	6.95 d (8.3)	118.0	a1, a3, a6
a6	7.08 dd (2.0, 8.3)	121.0	7.06 dd (2.0, 8.3)	121.0	a2, a4, a5, a7
a7	6.97 d (16.2)	128.8	6.96 d (16.2)	128.9	a2, a6, a8, A9
a8	6.87 d (16.2)	128.4	6.86 d (16.2)	128.4	a1, a7, a10/14
a9	-	140.8	-	140.8	-
a10	6.46 d (2.0)	105.5	6.48 d (2.2)	105.8	a1, a8, a11, a12
a11	-	159.7	-	-	-
a12	6.16 t (2.0)	102.6	6.20 t (2.0)	103.0	a10, a11/13, a10/14
a13	-	159.7	-	-	-
a14	6.46 d (2.0)	105.5	6.48 d (2.2)	105.8	a8, a10, a12
b1	-	129.3	-	129.5	-
b2	6.66 d (2.0)	115.9	6.69 d (2.0)	116.0	b4, b6, b7
b3	-	146.3	-	146.3	-
b4	-	146.7	-	146.6	-
b5	6.63 d (8.0)	116.1	6.67 d (8.0)	116.3	b1, b3
b6	6.48 dd (2.0, 8.0)	120.8	6.45 dd (2.0, 8.0)	121.0	b2, b4, b7
b7	4.77 d (8.0)	81.7	4.70 d (8.0)	82.1	b1, b2, b6, b8, b9
b8	4.81 d (8.0)	81.9	4.81 d (8.0)	82.0	b1, b7, b9, b10, b14
b9	-	140.5	-	139.7	-
b10	6.25 t (1.8)	108.8	6.23 t (1.8)	108.6	b8, b12, b11, b14
b11	-	159.8	-	159.8	-
b12	6.47 t (1.8)	105.2	6.44 t (1.8)	105.5	b10, b11, b14
b13	-	159.2	-	159.6	-
b14	6.45 t (1.8)	110.5	6.43 t (1.8)	109.6	b8, b10, b12, b13
1'	4.76 d	102.8	4.49 d (7.3)	102.7	b11, 2'
2'	3.35-3.45 (overlap)	74.9	3.35-3.45 (overlap)	74.9	
3'	3.35-3.45 (overlap)	77.9	3.35-3.45 (overlap)	78.0	
4'	3.35-3.45 (overlap)	71.5	3.35-3.45 (overlap)	71.5	
5'	3.35-3.45 (overlap)	78.0	3.35-3.45 (overlap)	78.0	
6'	3.87 dd (12.0, 2.2)	62.2	3.86 dd (12.0, 2.3)	62.6	4', 5'
	3.72 dd (12.0, 4.9)		3.70 dd (12.0, 5.1)		4', 5'

Table S3. NMR data of dimers **17** and **18** isolated from spruce bark extract.

No.	Compound 17		Compound 18		HMBC (H→C)
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	
a1	-	132.7	-	132.9	-
a2	7.16 d (2.0)	115.0	7.16 d (2.0)	116.7	a4, a6, a7
a3	-	145.2	-	145.3	-
a4	-	145.0	-	145.1	-
a5	6.95 d (8.3)	118.0	6.97 d (8.3)	118.1	a1, a3, a6
a6	7.07 dd (2.0, 8.3)	121.1	7.08 dd (2.0, 8.3)	121.2	a2, a4, a7
a7	6.97 d (16.2)	128.9	6.97 d (16.2)	128.8	a2, a6, a8, a9
a8	6.86 d (16.2)	129.6	6.87 d (16.2)	128.6	a1, a7, a10/14
a9	-	140.7	-	141.0	-
a10	6.47 d (2.2)	105.9	6.47 d (2.0)	105.8	a8, a11/13, a12
a11	-	159.7	-	159.7	-
a12	6.18 t	103.3	6.18 t	103.1	a10/14
a13	-	159.7	-	159.7	-
a14	6.47 d (2.2)	105.9	6.47 d (2.0)	105.8	a8, a11/13, a12
b1	-	129.2	-	129.2	-
b2	6.68 d (1.8)	112.8	6.70 d (1.9)	112.5	b4, b6, b7
b3	-	148.5	-	148.6	-
b4	-	148.0	-	147.8	-
b5	6.69 d (8.0)	116.0	6.71 d (8.0)	115.9	b1, b3
b6	6.66 dd (1.8, 8.0)	121.7	6.62 dd (1.9, 8.0)	121.8	b2, b4, b7
b7	4.86 d (7.9)	81.8	4.78 d (7.9)	82.0	b1, b2, b6, b8
b8	4.82 d (7.9)	82.0	4.82 d (7.9)	82.2	b7, b9, b10
b9	-	140.2	-	140.1	-
b10	6.27 t	110.5	6.21 t	108.4	b8, b11, b12, b14
b11	-	159.9	-	160.0	-
b12	6.49 t	105.9	6.44 t	105.2	b10, b11, b13, b14
b13	-	159.4	-	-	-
b14	6.47 t	109.7	6.41 t	103.5	b8, b10, b12, b13
1'	4.75 d (7.6)	102.6	4.45 d (7.7)	102.3	b11, 2'
2'	3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	74.9	3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	74.8	
3'	3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	77.8	3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	77.9	
4'	3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	71.5	3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	71.5	
5'	3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	78.0	3.35-3.45 (<i>overlap</i>)	78.0	
6'	3.86 dd (12.0, 2.2)	62.5	3.85 dd (12.0, 2.3)	62.4	4', 5'
	3.72 dd (12.0, 5.1)		3.67 dd (12.0, 5.5)		4', 5'
OCH3	3.74 (3H, s)	56.5	3.75 (3H, s)	56.4	b3

Chapitre II. Caractérisation et activité anti-mildiou des nœuds de pin

A. Stratégie

A l'instar de l'épicéa, le pin maritime (*Pinus pinaster*) fait partie intégrante de la filière forêt-bois, généralement utilisé pour la fabrication de pâte et de papier. La présence de nœuds, qui correspondent à l'insertion des branches dans le tronc, généralement très concentrés en composés résineux, n'est pas souhaitée dans le procédé de transformation. Ainsi, les industries papetières sont aujourd'hui une source importante de nœuds de pin en France avec plusieurs dizaines de tonnes générées par jour.

Outre la présence de composés lipophiles, les nœuds de pin sont connus pour leur profil polyphénolique très varié avec des lignanes, des flavonoïdes, des stilbènes ou des acides phénoliques. Ces familles de polyphénols sont reconnues dans la littérature comme possédant des activités antifongiques et antibactériennes. S'appuyant sur ces caractéristiques antimicrobiennes, nous nous sommes intéressés à cette biomasse comme source de composés polyphénoliques aux potentielles applications dans le domaine phytosanitaire et plus précisément en tant qu'agent oomycide en viticulture.

La stratégie d'étude a été d'optimiser le processus d'extraction des polyphénols à partir de nœuds de pin et d'évaluer le pouvoir oomycide des différents extraits contre le mildiou de la vigne. Ainsi, plusieurs méthodes d'extraction et de fractionnement ont été étudiées. Un screening phytochimique des extraits de nœuds de pin ainsi que le dosage des composés majoritaires ont permis de régir nos choix d'optimisation. Enfin, des essais « antifongiques » préventifs sur disque foliaires de nos extraits ont permis de juger leurs propriétés anti-mildiou.

On peut s'attendre à une composition polyphénolique diversifiée au sein des extraits de nœuds de pin. Malgré une classification dans la même famille (*Pinacées*) avec l'épicéa commun, le genre *Pinus* est connu pour posséder des enzymes caractéristiques notamment au niveau des stilbènes (pinosylvine synthase), qui sont différentes du genre *Picea*. Une activité anti-mildiou est également attendue de par les propriétés antifongiques de certains composants des nœuds de pin.

B. Design expérimental

B.1. Extraction

Le procédé d'extraction sur les nœuds de pin est inspiré des précédentes méthodes utilisées pour les coproduits viticoles ou les écorces d'épicéa. L'utilisation d'éthanol et d'eau comme solvants est conservée de par leurs aspects économiques accessibles et peu polluants pour l'environnement. Une adaptation du protocole sera effectuée afin de gérer la partie lipophile des nœuds de pin.

Ainsi, des nœuds de pin issus d'une société papetière du sud-ouest de la France ont été récupérés afin de réaliser cette étude. L'extraction a été effectuée avec une proportion massique de 1/10 soit 1 kg de nœuds de pin et 10 litres d'un mélange éthanol – eau à 85/15 (v/v) chauffé à 60°C. L'extraction se déroule dans une cuve avec un agitateur à hélice à régulation mécanique pendant deux heures suivie d'une filtration sur coton. Deux extractions successives de deux heures sont réalisées afin d'épuiser le matériel végétal en composés d'intérêts. Les filtrats sont mélangés et une évaporation sous vide est réalisée. La lyophilisation permet d'obtenir 135 g d'un extrait brut à l'aspect résineux (cas n°1).

La forte présence en composés apolaires, sous forme de résine, rend difficile la manipulation de l'extrait. Ainsi, le choix d'éliminer une partie de cette phase lipophile passe par la réalisation d'une phase de décantation et de séparation de phase lors de la concentration de l'extrait. Techniquement, après extraction dans les mêmes conditions, le volume d'extrait est réduit à environ 1 L lors de l'évaporation puis le mélange est disposé dans une ampoule à décanter permettant d'obtenir un surnageant contenant nos molécules d'intérêt et une phase résineuse à éliminer. Le surnageant est récupéré, concentré puis mis à lyophiliser afin d'obtenir 75 g d'une poudre de couleur ocre (cas n°2).

Une méthode plus drastique a également été utilisée afin d'éliminer la quasi-totalité de la résine. Dans les mêmes conditions que le cas n°2, les phases de décantation et de séparation sont accélérées par l'ajout d'eau dans les mêmes proportions que l'extrait (environ 1 L). Cette méthodologie favorise ainsi la précipitation des composés apolaires sous forme de résine. Le surnageant est récupéré, concentré suivi d'une lyophilisation permettant l'obtention de 18 g d'extrait sous forme de poudre homogène blanchâtre (cas n°3).

Ces trois procédés diffèrent par leurs capacités à éliminer la partie résineuse des extraits de nœuds de pin. La caractérisation des extraits et l'activité antifongique permettra de sélectionner le meilleur procédé d'extraction.

B.2. Purification

L'isolement des molécules présentes dans l'extrait de nœud de pin a deux vocations ; d'une part, permettre la caractérisation de chaque molécule purifiée par CL-SM et RMN afin de faire une analyse précise de l'extrait et d'autre part, tester les molécules contre le mildiou afin d'expliquer l'activité de l'extrait brut. La purification des polyphénols de l'extrait de nœuds de pin ont été réalisées par CLHP préparative en fonction de deux longueurs d'ondes (280 et 306 nm) (**Figure 38**). Un total de 10 composés ont été isolés.

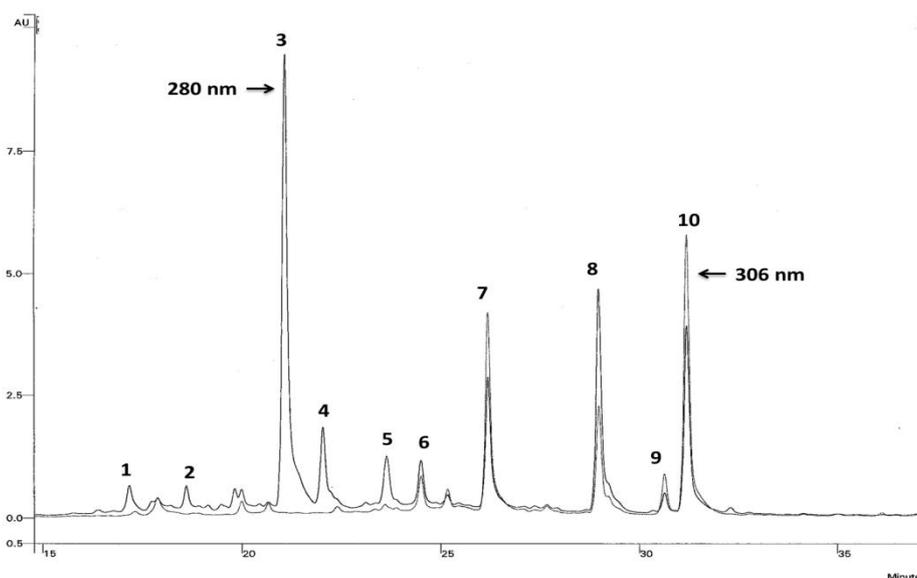


Figure 38. Chromatogrammes CLHP préparative à 280 et 306 nm de l'extrait de nœuds de pin.

Parmi les 10 composés purifiés, on note la présence de : **1**, isolaricirésinol ; **2**, sécoisolaricirésinol ; **3**, nortrachélogénine ; **4**, pinorésinol ; **5**, matairésinol ; **6**, pinobanksine, **7**, pinosylvine ; **8**, pinocembrine ; **9**, ptérostilbène ; **10**, pinosylvine monométhyléther.

D'autre part, par comparaison avec des standards commerciaux, 4 autres composés ont été mis en évidence : l'acide caféique, l'acide férulique, la taxifoline et le dihydrokaempférol. Ces composés servent dans la suite de l'étude comme standards pour les dosages ainsi que pour les tests antifongiques.

B.3. Test anti-mildiou

Les tests antifongiques reposent sur l'étude des extraits de nœuds de pin en application préventive sur des disques foliaires et leurs capacités à empêcher le développement du mildiou. Les molécules isolées sont également testées sur l'inhibition de la mobilité des zoospores et du développement mycélien afin d'expliquer les mécanismes d'action et justifier l'activité de l'extrait.

Volume III. Etude chimique et activité anti-mildiou de coproduits issus d'essences forestières

Les tests antifongiques ont été élaborés au sein de l'UMR SAVE de l'INRA en suivant le même protocole que pour l'extrait d'écorces d'épicéa et ses principaux composants (Vol. III, Chap. I.)

Brièvement, les extraits de nœud de pin ont été dissous dans une solution aqueuse à 1% d'éthanol puis les différentes dilutions ont été vaporisées sur les disques foliaires (huit par concentration) à l'aide d'un Ecospray. Après 24 h, le mildiou a été déposé avec 3 gouttes de 15 μ L par disque à partir d'un inoculum ajusté à 15000 sporanges/mL. Après élimination des traces d'eau persistantes issues de l'inoculation, les boîtes sont mises en chambre de culture durant sept jours. Le développement du mycélium est évalué visuellement avec un score attribué pour chaque spot entre 0 et 100. Le pourcentage d'inhibition de chaque concentration est calculé par rapport au témoin avec la formule préalablement citée (Vol. II, Chap. I).

D'autre part, chaque molécule isolée a été étudiée en mélangeant directement les différentes dilutions à l'inoculum. Cela permet d'étudier l'activité antifongique des molécules pures à la fois au niveau du développement mycélien et sur l'inhibition de la mobilité des zoospores. En ce sens, chaque molécule est solubilisée dans une solution aqueuse à 1% d'éthanol suivi d'un ajustement des concentrations souhaitées alors qu'un inoculum de mildiou est préparé à 30000 sporanges/mL. Un volume de molécule pure est ajouté à un volume d'inoculum, 1/1.

Chaque mélange (200 μ L) est déposé en triplicata dans une plaque 96 puits afin d'évaluer le nombre de zoospores mobiles par microscopie à phase inverse après 2h de contact. Le pourcentage d'inhibition de la mobilité des zoospores est calculé pour chaque concentration par rapport au témoin. En parallèle, 3 gouttes de 15 μ L de chaque solution sont déposées par disque foliaire. Les boîtes sont mises culture après 24h et l'inhibition du développement du mycélium est calculée après 7 jours.

C. Résumé des résultats

L'analyse phytochimique de l'extrait de nœuds de pin a mis en évidence 14 composés phénoliques ; 10 identifiés par RMN après leur isolement par CLHP préparative et 4 après comparaison avec des standards commerciaux par CLUHP-DAD-SM. Ces 14 polyphénols sont répartis en quatre classes distinctes mettant en exergue l'hétérogénéité chimique dans les nœuds de pin :

- Lignanes : isolaricirésinol, sécoisolaricirésinol, nortrachélogénine, pinorésinol, matairésinol
- Stilbènes : pinosylvine, pinosylvine monométhyl éther, ptérostilbène
- Flavonoïdes : taxifoline, dihydrokaempférol, pinocembrine, pinobanksine
- Acides phénoliques : acide caféique, acide férulique

Volume III. Etude chimique et activité anti-mildiou de coproduits issus d'essences forestières

Le dosage de ces composés dans les différents extraits de nœuds de pin a mis en lumière une forte disparité entre les méthodes d'extraction utilisées (**Tableau 5**). L'extraction simple sans purification (cas n°1) permet d'obtenir un extrait avec 19,50% de polyphénols, l'extraction avec purification par simple décantation (cas n°2) permet un extrait avec 27,55% de polyphénols alors que l'extraction suivie d'une purification par décantation avec ajout d'eau (cas n°3) permet un extrait avec 39,31% de polyphénols. L'élimination progressive de la résine permet ainsi d'enrichir les extraits en polyphénols.

Tableau 5. Dosage des polyphénols dans les extraits de nœuds de pin selon différentes méthodes d'extraction (% m polyphénols / m extrait).

Composés	Cas n°1 (% m/m)	Cas n°2 (% m/m)	Cas n°3 (% m/m)
acide férulique	0,03	0,05	0,16
acide caféique	0,03	0,04	0,23
isolaricirésinol	0,30	0,53	1,71
sécoisolaricirésinol	0,51	0,63	1,56
nortrachélogénine	6,62	11,32	24,06
pinorésinol	1,14	1,74	2,16
matairésinol	0,79	0,88	1,75
pinobanksine	1,31	1,61	1,63
pinocembrine	3,64	4,23	1,97
taxifoline	0,04	0,08	0,24
dihydrokaempférol	0,09	0,31	0,78
pinosylvine	1,84	2,67	1,80
pinosylvine monométhyléther	3,00	3,27	1,20
ptérostilbène	0,16	0,19	0,06
Total	19,50	27,55	39,31

Concernant la composition des extraits, une forte présence de nortrachélogénine est mise en évidence dans les trois cas (**Tableau 5**). La pinocembrine, la pinosylvine monométhyl éther et la pinosylvine sont également très présentes notamment dans les cas n°1 et n°2. Cependant, il est important de noter que l'élimination de la résine permet d'enrichir les extraits en nortrachélogénine et autres lignanes mais à l'inverse d'appauvrir l'extrait en pinocembrine et pinosylvines.

En se focalisant sur les rendements d'extraction des polyphénols dans les nœuds de pin, le cas n°1 et le cas n°2 ont montré des teneurs proches en polyphénols totaux avec 26,32 et 20,67 g/kg de nœuds de pin respectivement (**Tableau 6**). A l'inverse, l'élimination de la résine par l'ajout d'eau (cas n°3) paraît négative avec un rendement en polyphénols totaux de 6.29 g/kg de nœuds de pin soit inférieur d'un facteur quatre par rapport aux autres méthodes. L'addition d'eau semble faire précipiter les molécules d'intérêt qui sont ensuite éliminées avec les composés lipophiles.

Volume III. Etude chimique et activité anti-mildiou de coproduits issus d'essences forestières

Tableau 6. Dosage des polyphénols dans les nœuds de pin selon différentes méthodes d'extraction (g/kg nœuds de pin).

Composés	Cas n°1 (g/kg nœud de pin)	Cas n°2 (g/kg nœud de pin)	Cas n°3 (g/kg nœud de pin)
acide férulique	0,04	0,04	0,03
acide cafféique	0,04	0,03	0,04
isolaricirésinol	0,41	0,40	0,27
sécoisolaricirésinol	0,69	0,48	0,25
nortrachélogénine	8,94	8,49	3,85
pinorésinol	1,53	1,31	0,35
matairésinol	1,07	0,66	0,28
pinobanksine	1,77	1,21	0,26
pinocembrine	4,91	3,17	0,32
taxifoline	0,05	0,06	0,04
dihydrokaempférol	0,13	0,23	0,12
pinosylvine	2,48	2,00	0,29
pinosylvine monométhyléther	4,05	2,45	0,19
ptérostilbène	0,21	0,14	0,01
Total	26,32	20,67	6,29

(Quantité d'extrait obtenue en g/kg nœud de pin : cas n°1 = 135 ; cas n°2 = 75 ; cas n°3 = 18)

On peut ainsi déduire de ces résultats que l'extraction avec purification par décantation (cas n°2) permet l'obtention d'un extrait riche en polyphénols mais que l'extraction simple sans purification (cas n°1) permet un meilleur rendement d'extraction. En outre, l'extraction suivie d'une purification par décantation avec ajout d'eau (cas n°3) permet d'obtenir l'extrait le plus riche en polyphénols mais avec un rendement d'extraction très faible.

Les tests anti-mildiou réalisés avec les extraits de nœuds de pin ont montré des CI_{50} similaires pour les cas n°1 et n°2 avec respectivement 62 et 76 mg/L et une inhibition totale identique de 500 mg/L (**Tableau 7**). Au contraire, le cas n°3 a montré une CI_{50} de 210 mg/L et une CI_{100} de 800 mg/L, synonymes d'extrait moins actif, malgré sa richesse en polyphénols.

Tableau 7. Inhibition du mildiou par les extraits de nœuds de pin.

	CI_{50} (mg/L)	CI_{100} (mg/L)
cas n°1	62 ± 20	500
cas n°2	76 ± 19	500
cas n°3	210 ± 71	800

Volume III. Etude chimique et activité anti-mildiou de coproduits issus d'essences forestières

Au niveau des molécules pures, les polyphénols les plus toxiques pour le développement du mildiou et la mobilité des zoospores sont la pinocembrine, la pinosylvine monométhyl éther et la pinosylvine avec des CI_{50} faibles (entre 18 et 34 μM) synonymes d'une forte activité (**Tableau 8**). Parmi les composés les moins actifs, on note la nortrachélogénine avec des valeurs de CI_{50} de 256 et 264 μM pour le développement du mildiou et la mobilité des zoospores.

Ces résultats permettent donc de corrélérer l'activité des extraits de nœuds de pin à leur composition. Le cas n°3, très riche en nortrachélogénine mais appauvri en pinocembrine et pinosylvines, est moins efficace que les cas n°1 et n°2 qui eux sont enrichis en composés les plus actifs.

Tableau 8. Inhibition du mildiou par les polyphénols (purs) des nœuds de pin.

Composés	développement du mildiou	mobilité des zoospores
	CI_{50} (μM)	CI_{50} (μM)
pinosylvine	23	34
pinosylvine monométhyl éther	18	23
pinocembrine	19	22
pinobanksine	137	141
matairésinol	101	81
nortrachélogénine	259	264
pinorésinol	269	296
isolaricirésinol	551	223

En résumé, l'extraction simple (cas n°1) et l'extraction avec purification par décantation (cas n°2) ont montré des similitudes au niveau de leur composition et du rendement d'extraction en polyphénols, avec en parallèle une activité oomycide similaire. Une potentielle application industrielle s'orienterait donc vers une utilisation préférentielle des extraits des cas n°1 et n°2, tandis que l'extrait du cas n°3 n'a pas d'intérêt de par les faibles rendements d'extraction et la faible activité biologique. L'extraction simple sans purification (cas n°1) permettant d'obtenir 135 g d'extrait/kg de nœuds de pin (contre 75 pour le cas n°2), apparaît la plus attractive, mais la présence de résine en quantité importante pourra rendre difficile la formulation de l'extrait

D. Publication

Les résultats obtenus pour l'extraction suivie d'une purification par décantation (cas n°2) ont été sélectionnés pour la rédaction d'un article scientifique intitulé « *Pinus pinaster* knot : a source of polyphenols against *Plasmopara viticola* », qui a été soumis le 4 Septembre 2017 dans *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, accepté le 19 Septembre 2017 et publié le 11 Octobre 2017.

Volume III. Etude chimique et activité anti-mildiou de coproduits issus d'essences forestières

Par ailleurs, ces travaux ont fait l'objet d'un dépôt de brevet le 15 Juin 2017 qui a été suivi par un projet de maturation financé par la SATT Aquitaine impliquant une entreprise régionale (demande de brevet n° FR1755428 : "Extrait de noeuds d'arbres appartenant au genre *Pinus* comme fongicide").

Pinus pinaster* Knot: A Source of Polyphenols Against *Plasmopara viticola

Julien Gabaston,[†] Tristan Richard,[†] Stéphanie Cluzet,[†] Antonio Palos Pinto,[†] Marie-Cécile Dufour,[‡] Marie-France Corio-Costet,[‡] Jean-Michel Méryllon^{†*}

[†]Université de Bordeaux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de Recherche Œnologie EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique (Gesvab) - Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, CS 50008 - 210, chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France

[‡]INRA, UMR SAVE 1065, ISVV, Labex Cote, CS 20032, Rue Edouard Bourlaux, 33882 Villenave d'Ornon, France

*Corresponding author (Tel: +33 5 57 57 59 50; E-mail: jean-michel.merillon@u-bordeaux.fr)

ABSTRACT

Pine knot extract from *Pinus pinaster* by-products was characterized by UHPLC-DAD-MS and NMR. Fourteen polyphenols divided in four classes were identified as follows: lignans (nortrachelogenin, pinoresinol, matairesinol, isolariciresinol, secoisolariciresinol), flavonoids (pinocembrin, pinobanksin, dihydrokaempferol, taxifolin), stilbenes (pinosylvin, pinosylvin monomethyl ether, pterostilbene) and phenolic acids (caffeic acid, ferulic acid). The antifungal potential of pine knot extract, as well as the main compounds, was tested *in vitro* against *Plasmopara viticola*. The ethanolic extract showed a strong anti-mildew activity. In addition, pinosylvins and pinocembrin demonstrated significant inhibition of zoospore mobility and mildew development. These findings strongly suggest that pine knot is a potential biomass that could be used as a natural antifungal product.

Keywords: pine knot, polyphenols, UHPLC-MS, NMR, downy mildew

INTRODUCTION

Pinus pinaster, also known as maritime pine, is a conifer widespread in Europe, especially in the Atlantic and Mediterranean regions.¹ Its transformation into pulp and paper generates several by-products such as pine knots, which are undesirable owing to their content of lipophilic constituents.² For example, a French paper factory uses between 1000 and 2000 tons of wood pine per day generating 1-2% of pine knots that represents a biomass of 10-40 tons of knots per day.³ Pine knots are generally used as a combustible fuel in factories, even though they are known to be rich in polyphenols such as lignans, flavonoids and stilbenes and have potential as a biomass.

Lignans are phenolic compounds arising from a secondary plant metabolism with a (C6-C3)₂ structure that results from the oxidative dimerization of two phenylpropanoid units.⁴ Lignans are particularly known for their bioactivity in human health with anticancer properties, anti-inflammatory activity and an antioxidant effect.⁵⁻⁷ In addition, some lignans exhibit antibacterial activities against Gram-positive bacteria and antifungal activities against fungi of white rotting and wood staining.⁸ Flavonoids from the phenylpropanoid pathway are secondary metabolites with a C6-C3-C6 structure. Present in the *Pinus* genus and especially in *Pinus pinaster*, flavonoids such as pinocembrin and pinobanksin have demonstrated antioxidant, anti-inflammatory, anticancer and neuroprotective activities.⁹⁻¹¹ Furthermore, flavonoids have been found to have antimicrobial properties against bacteria, yeasts and filamentous fungi.¹² Stilbenes, which are also known as pinosylvins in *Pinus* genus, are formed by a C6-C2-C6 skeleton and are known for their antifungal properties. A previous study demonstrated inhibition of *Candicans albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* by pinosylvin and its methyl derivative while

another work reported the efficacy of pinosylvins against white-rot and brown-rot fungi.¹³⁻¹⁴ Thus, the range of polyphenols contained in pine and especially in the knots exhibits a wide spectrum of antifungal activities.

One of the most devastating diseases in cultivated grapevines is caused by *Plasmopara viticola*, an oomycete responsible for downy mildew. *Plasmopara viticola* is an obligate biotroph which develops its mycelium in host tissues and emits through stomata arbuscles called sporangiophores that have sporangia containing mobile zoospores at their extremities. At maturity, these zoospores are released allowing rapid dissemination of *P. viticola*.¹⁵ Particularly suited to rainy and humid conditions, the disease attacks flowers, leaves and berries. Currently, the main anti-mildew agent is “Bordeaux mixture”, a preventive contact product containing copper.^{15,16} Despite its wide range of actions, its intensive use has several negative effects on the environment such as accumulation in the soil and metabolic disorders in berries.^{17,18} Chemical products with a good bioavailability are also efficient at low doses, but they generally suffer from problems of resistance.¹⁹ Consequently, the development of alternative or complementary strategies to pesticide treatments is a major economic challenge for agriculture and viticulture in particular. The use of natural plant extracts might be a solution owing to the huge availability of such compounds which are less toxic than traditional phytosanitary products and are biodegradable.

The purpose of this study was to characterize *Pinus pinaster* knot extract and to evaluate *in vitro* its ability to inhibit *Plasmopara viticola* growth. The antifungal property of the main compounds of extract was also tested. The results provide new insights into the fight against downy mildew, potentially leading to the development of natural and sustainable anti-downy mildew products.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and Standards

For analysis, LC-MS-grade acetonitrile (VWR, Fontenay-Sous-Bois, France), formic acid (Fisher Scientific, Loughborough, U.K.), HPLC-grade acetonitrile, trifluoroacetic acid (TFA) and HPLC-grade methanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) were purchased. Water was purified by an Elga water purification system (High Wycombe, U.K.).

Ferulic acid, caffeic acid, taxifolin, dihydrokaempferol and pterostilbene were bought (Sigma Aldrich, St Louis, MO). Other standards were isolated and purified in our laboratory (isolariciresinol, secoisolariciresinol, nortrachelogenin, pinosresinol, matairesinol, pinocembrin, pinobanksin, pinosylvin, pinosylvin monomethyl ether) from pine knot extract. The identity and purity of these compounds were analyzed by UV/Vis diode-array detector (DAD), LC-MS and NMR. Purity of compounds was estimated $\geq 90\%$.

Biological material

Grapevine plants of *Vitis vinifera* cv. Cabernet-Sauvignon, supplied by UMR SAVE (INRA, Villenave d’Ornon, France), were cultivated from wood cuttings in a greenhouse. Rooted cuttings were potted after 21 d in a sandy soil and were grown under controlled conditions (25 °C d / 20 °C night temperatures with relative humidity at 75% and a 15 h light / 9h dark photoperiod). Two-month-old plants with 10-12 leaves were used for bioassays by picking the fourth leaf below the apex. Downy mildew isolate (ANN-01) was harvested on *Vitis vinifera* cv. Ugni blanc in a commercial vineyard located in Charente (France) in 2015. As previously described in literature, *Plasmopara viticola* isolate was multiplied every week by inoculation of 15 μ L drops of a 15000 sporangia/mL inoculum on grapevine leaves cv. Cabernet Sauvignon.²⁰ After 7 d of incubation in a growth chamber (22 °C, 16h d / 8h night photoperiod), the inoculum was suitable for bioassays.

Pine knot extract

Pine knots (*Pinus pinaster*) were collected in the South-West region of France (Gironde), crushed to a powder and dried at room temperature. Extraction was performed on 1 kg of pine knot with 10L ethanol/water (85:15; v/v) under agitation at 60 °C. The filtrate was concentrated *in vacuo* to one-tenth (ca. 1 L) followed by decantation in order to obtain two phases, one comprising a supernatant and the other comprising apolar compounds. The supernatant was recovered, concentrated and then lyophilized to obtain 75 g of a purified extract.

Characterization by UHPLC-DAD-MS

The apparatus was a 1290 Series UHPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) with an UV-Vis diode-array detector (DAD). The column used was a 100 mm x 2.1 mm i.d., 1.8 μm , Zorbax SB-C18, with a 2.1 mm x 5 mm i.d. guard column of the same material (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The chromatographic parameters were as follows: solvent A, water acidified with 0.1% formic acid; solvent B, acetonitrile acidified with 0.1% formic acid; flow rate, 0.4 mL/min; solvent gradient, 0-1.7 min, 10% B; 1.7-3.4 min, 10-20% B; 3.4-5.1 min, 20-30% B; 5.1-6.8 min, 30% B; 6.8-8.5 min, 30-35% B; 8.5-11.9 min, 35-60% B; 11.9-15.3 min, 60-100% B; 15.3-17 min, 100% B; 17-17.3 min, 100-10% B. An Esquire 6000 ion trap (IT) mass spectrometer using an ESI source (Bruker Daltonics, Billerica, MA) was coupled to the UHPLC apparatus. Mass spectrometry parameters were programmed as previously mentioned in literature data.²¹ Pine knot extract was dissolved in methanol/water (1:1, v/v) at 1 mg/mL, filtered on 0.45 μm PTFE and injected at 1 μL . Analyses were performed in triplicate. Standards were injected at several concentrations (0, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) in independent quintuplicate to obtain calibration and equation curves. Bruker Data Analysis 3.2 software was used.

Polyphenol purification by preparative HPLC

The apparatus was a Varian Pro Star HPLC equipped with a UV/Vis diode-array detector (DAD). The column used was a 250 mm x 21.2 mm i.d., 7 μm , Zorbax SB-C18 PrepHT, with a 50 mm x 20 mm i.d. guard column of the same material (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Pine knot extract was dissolved at 50 mg/mL in methanol-water (50:50; v/v) and filtered on PTFE 0.45 μm . The chromatographic parameters were as follows: solvent A, water acidified with 0.025% TFA; solvent B, acetonitrile acidified with 0.025% TFA; flow rate, 19 mL/min; solvent gradient, 0-3 min, 25% B; 3-33 min, 25-60% B; 33-34 min, 60-100% B; 34-39 min, 100% B; 39-40 min, 100-25% B; 40-43 min, 25% B.

NMR Experiments

¹H and 2D nuclear magnetic resonance (COSY, ROESY, HSQC, HMBC) analyses were carried out on a Bruker Ultrashield 600 MHz NMR spectrometer (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) equipped with a cryogenic TXI probe head. All isolated polyphenols were dissolved in 3-mm tubes with *d*₄-methanol as solvent. Bruker Topspin software version 3.2 was used for analysis of NMR spectra.

Bioassays against *Plasmopara viticola*

Pine knot extract

Pine knot extract was prepared with a range of eight concentrations (0, 50, 100, 200, 300, 500, 800, 1000 mg/L) in water with 1% of ethanol for better dissolution. In parallel, leaves of *Vitis vinifera* (cv. Cabernet Sauvignon) were collected in greenhouse, washed under water and dried with filter paper. Foliar discs were obtained with a 25-mm-wide pastry-cutter and eight heterogenic discs were randomly deposited in Petri dishes containing Whatman paper humidified with 3.5 mL of sterile water. Dilutions of pine knot extract were sprayed on the foliar discs. Negative controls were prepared by applying sterile water with 1% of ethanol while Dithane NeoTec 75 WG (Dow AgroSciences, Sophia Antipolis, France) containing mancozeb at 75% was used as positive control with a range of eight concentrations (0, 10, 20, 30, 50, 100, 200, 500 mg/L). Inoculation of *Plasmopara viticola* isolate was performed 1 d later with 3 droplets of 15 μL /disc from an inoculum at 15000 sporangia/mL. Petri dishes were incubated for 7 d in a growth chamber at 22 °C with a photoperiod of 16h light d (35 $\mu\text{m}^2/\text{s}$). Three independent experiments were performed. Mildew development, i.e. mycelial growth and sporulation density, was evaluated by visual scoring and converted to a percentage of inhibition by comparison with the control disc. Dose-response curves were obtained by plotting inhibition scores and log₁₀ of extract concentration. The regression equation generated on the linear part of the sigmoid curve expressed the concentration inhibiting growth at 50% (IC₅₀).^{20,22}

Pure compounds

As previously described in literature, pure compounds were directly added to the inoculums.²³ A final concentration of sporangial suspension at 15000 sporangia/mL final was coupled to different polyphenol dilution (0, 50, 100, 200, 300, 500, 800, 1000 μM). Positive control (Dithane NeoTec 75 WG) and negative control

(water with 1% of ethanol) experiments were carried out by mixing preparations with sporangial solution. As described above, 3 droplets of 15 μ L/disc of mixed solution were deposited on foliar discs. After 7 d incubation, percentage of inhibition of *P. viticola* was determined. Furthermore, zoospore mobility was investigated by disposing 100 μ L of mixed suspensions in 96-well microtiter plates. Mobile zoospores were counted after 2 h with reverse phase microscopy (magnification x20) on five representative fields in triplicate.

Statistical analyses

Three independent experiments were carried out for the pine knot extract and pure compounds. Statistical analysis was performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls multiple comparison post hoc tests. GraphPad Prism software version 5.03 (La Jolla, CA) was used. Significant differences between IC₅₀ values of polyphenols are represented by different letters.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization of pine knot extract

Analysis of pine knot extract by UHPLC-DAD-MS revealed 14 polyphenols (**Figure 1**). Five lignans (isolariciresinol, secoisolariciresinol, nortrachelogenin, pinoresinol, matairesinol), four flavonoids (pinocembrin, pinobanksin, taxifolin, dihydrokaempferol), three stilbenes (pinosylvin, pinosylvin monomethyl ether, pterostilbene) and two phenolic acids (ferulic acid, caffeic acid) were determined by comparison to standards, UV data (λ_{\max}) and mass spectrometric data (**Table 1**). Pinosylvin, pinosylvin monomethyl ether, pterostilbene, ferulic acid and caffeic acid showing λ_{\max} between 306 and 325 nm were correlated with the presence in their structure of one double bond in *E*-configuration. In contrast, isolariciresinol, secoisolariciresinol, nortrachelogenin, pinoresinol, matairesinol, pinocembrin, pinobanksin, taxifolin and dihydrokaempferol showed λ_{\max} between 281 and 290 nm, suggesting the absence of conjugation between aromatic rings.²⁴ In addition, the structural discriminating properties of NMR were necessary for the unambiguous identification of the polyphenols. All compounds were isolated by preparative HPLC and subjected to NMR analysis. Structures of polyphenols in pine knot extract as well as ¹H NMR data presented in **Table 1** were in agreement with those described by other authors.²⁵⁻³¹ This is the first time that pterostilbene has been clearly identified in the *Pinus* genus. A previous study revealed the presence of hydroxy-monomethylpinosylvin which could be pterostilbene but the absence of NMR data did not make it possible to confirm the correspondence.¹ In addition, the lignan matairesinol present in the *Pinus* genus is now reported for the first time in maritime pine (*P. pinaster*).

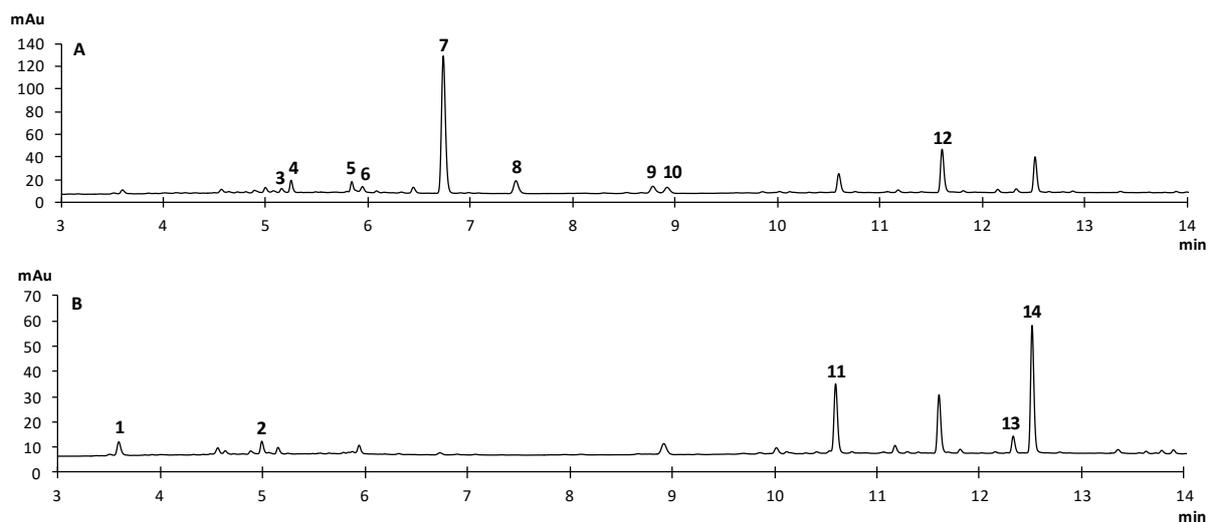
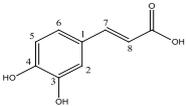
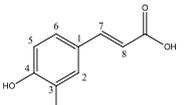
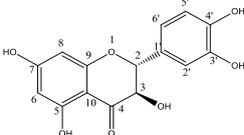
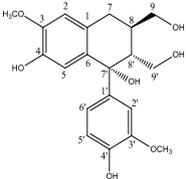
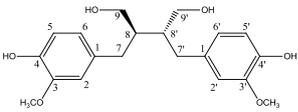
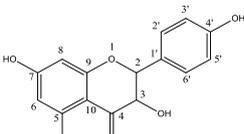
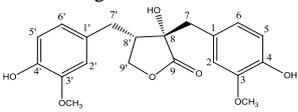
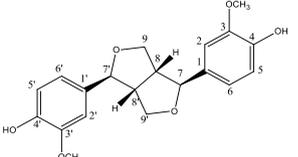
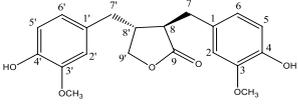
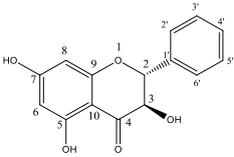
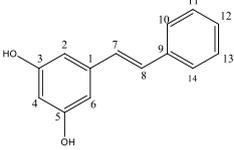
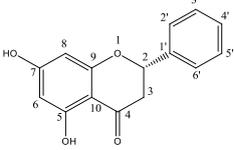
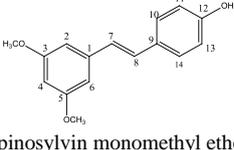
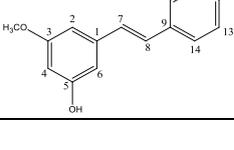


Figure 1. UHPLC-DAD chromatograms of pine knot extract at (A) 280 nm and (B) 320 nm. **1**, caffeic acid; **2**, ferulic acid; **3**, taxifolin; **4**, isolariciresinol; **5**, secoisolariciresinol; **6**, dihydrokaempferol; **7**, nortrachelogenin; **8**, pinoresinol; **9**, matairesinol; **10**, pinobanksin; **11**, pinosylvin; **12**, pinocembrin; **13**, pterostilbene; **14**, pinosylvin monomethyl ether.

Table 1. Name, Peak Number, Structure, Retention Time, UV Data (λ_{\max} in nm), MS Data (Molecular Ion, Negative Mode), and ^1H NMR (in *d*4-methanol) Data of Polyphenols Identified in Pine Knot Extract (*Pinus pinaster*).

Compounds	t_{R} (min)	λ_{\max}	(m/z)	δ_{H}
caffeic acid 1	3.6	325	179	7.52 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.03 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.93 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6), 6.77 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.21 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8)
				
ferulic acid 2	5.0	325	193	7.59 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7), 7.19 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 7.06 (1H, dd, $J = 2.0, 8.0$ Hz, H-6), 6.81 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.31 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8), 3.89 (3H, s, 3-OCH ₃)
				
taxifolin 3	5.2	289	303	6.96 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.84 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 6.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 5.92 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.88 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 4.91 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-2), 4.50 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-3)
				
isolariciresinol 4	5.3	285	359	6.74 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.67 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.65 (1H, s, H-5), 6.61 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 6.17 (1H, s, H-2), 3.80 (1H, br s, H-7'), 3.80 (3H, s, 3-OCH ₃), 3.77 (3H, s, 3'-OCH ₃), 3.70 (1H, dd, $J = 11.0, 4.8$ Hz, H-9'a), 3.66 (2H, m, H-9), 3.40 (1H, d, $J = 11.0, 4.0$ Hz, H-9'b), 2.78 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-7), 2.00 (1H, m, H-8), 1.76 (1H, m, H-8')
				
secoisolariciresinol 5	5.9	281	361	6.65 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5, 5'), 6.58 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2, 2'), 6.54 (2H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6, 6'), 3.73 (6H, s, 3, 3'-OCH ₃), 3.60 (2H, dd, $J = 11.0, 4.9$ Hz, H-9b, 9b'), 3.56 (2H, dd, $J = 11.0, 5.1$ Hz, H-9a, 9a'), 2.66 (2H, dd, $J = 14.0, 6.9$ Hz, H-7b, 7b'), 2.55 (2H, dd, $J = 14.0, 7.8$ Hz, H-7a, 7a'), 1.90 (2H, m, H-8, 8')
				
dihydrokaempferol 6	6.0	290	287	7.35 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-2', H-6'), 6.83 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, H-3', H-5'), 5.92 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 5.88 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 4.98 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-2), 4.54 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-3)
				
nortrachegenin 7	6.8	281	373	6.70 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.69 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.68 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.67 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.59 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6), 6.57 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 3.98 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-9'), 3.81 (3H, s, OCH ₃), 3.78 (3H, s, OCH ₃), 3.12 (1H, d, $J = 13.6$ Hz, H-7), 2.84 (1H, d, $J = 13.6$ Hz, H-7), 2.78 (1H, dd, $J = 13.6, 5.1$ Hz, H-7'), 2.47 (1H, m, H-7'), 2.42 (1H, m, H-8')
				
pinoresinol 8	7.5	281	357	6.94 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2, 2'), 6.81 (2H, dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, H-6, 6'), 6.76 (2H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5, 5'), 4.70 (2H, d, $J = 4.4$ Hz, H-7, 7'), 4.23 (2H, m, H-9b, 9b'), 3.85 (6H, s, 3, 3'-OCH ₃), 3.83 (2H, dd, $J = 9.2, 3.6$ Hz, H-9a, 9a'), 3.14 (2H, m, H-8, 8')
				
matairesinol 9	8.8	282	357	6.70 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.68 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5'), 6.67 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.58 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6), 6.56 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.51 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6'), 4.16 (1H, dd, $J = 9.1, 7.3$ Hz, H-9'b), 3.93 (1H, dd, $J = 9.1, 7.8$ Hz, H-9'a), 3.79 (3H, s, OCH ₃), 3.78 (3H, s, OCH ₃), 2.88 (1H, dd, $J = 14.1, 5.5$ Hz, H-7b), 2.82 (1H, dd, $J = 14.1, 7.0$ Hz, H-7a), 2.66 (1H, m, H-8), 2.53 (2H, m, H-7'), 2.49 (1H, m, H-8')
				

pinobanksin 10	9.0	289	271	7.54 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 7.43 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H-3', 5'), 7.39 (1H, t, $J = 6.9$ Hz, H-4'), 5.94 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-8), 5.91 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-6), 5.08 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-2), 4.55 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-3)
				
pinosylvin 11	10.6	306	211	7.51 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-10, 14), 7.33 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-11, 13), 7.22 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-12), 7.04 (1H, d, $J = 16.3$ Hz, H-8), 6.99 (1H, d, $J = 16.3$ Hz, H-7), 6.48 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2, 6), 6.19 (1H, t, $J = 2.2$ Hz, H-4)
				
pinocembrin 12	11.7	289	255	7.50 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-2', 6'), 7.42 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H-3', 5'), 7.36 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-4'), 5.93 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-8), 5.90 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-6), 5.46 (1H, dd, $J = 12.8, 3.1$ Hz, H-2), 3.10 (1H, dd, $J = 17.1, 12.8$ Hz, H-3a), 2.77 (1H, dd, $J = 17.1, 3.2$ Hz, H-3b)
				
pterostilbene 13	12.4	320	255	7.38 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-10, 14), 7.05 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-8), 6.89 (1H, d, $J = 16.4$ Hz, H-7), 6.77 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H-11, 13), 6.66 (2H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2, 6), 6.35 (1H, t, $J = 2.2$ Hz, H-4), 3.79 (6H, s, 3, 5-OCH ₃)
				
pinosylvin monomethyl ether 14	12.6	306	225	7.52 (2H, d, $J = 8.0$ Hz, H-10, 14), 7.33 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H-11, 13), 7.23 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, H-12), 7.09 (1H, d, $J = 16.3$ Hz, H-8), 7.04 (1H, d, $J = 16.3$ Hz, H-7), 6.61 (1H, t, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.59 (1H, t, $J = 1.8$ Hz, H-4), 6.28 (1H, t, $J = 1.8$ Hz, H-2), 3.79 (3H, s, 3-OCH ₃)
				

Quantitation of polyphenols from pine knot extract

To determine the polyphenol concentrations with reliability, calibration curves were plotted with purchased standard and isolated pure compounds. A range of five concentrations (0-100 $\mu\text{g/mL}$) was used in quintuplicate for each compound to obtain regression equation and assess response linearity (R^2), limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ).³² Each compound was quantitated by UV/Vis diode-array detector (DAD) at its maximum wavelength for better accuracy.

In pine knot extract, the main compounds were the lignan nortrachelogenin (11.3%, w/w), followed by the flavonoid pinocembrin (4.2%, w/w), then the stilbenes pinosylvin monomethyl ether and pinosylvin (3.3% and 2.7%, w/w respectively) (**Figure 2**). Among the minority compounds, the phenolic acids (caffeic acid and ferulic acid) and the flavonoid taxifolin represented 0.1% (w/w). By class of polyphenols, lignans were the major compounds with 15%, followed by stilbenes and flavonoids, which both exhibited 6.2%. The minor class was the phenolic acids with 0.2%. Thus, polyphenols represented 27.6% (w/w) of pine knot extract. These data are in agreement with the literature. A previous study reported the lignan content in acetone/water extract to be between 11.1 and 21.7%, stilbene concentration up to 3.3% and flavonoid content between 1.1 and 26.6%.¹ The low level of phenolic acids in our study (0.2%) is also in agreement with the data found in that study (0.09-0.29%).

The data concerning the contents of these polyphenols in pine knot are fundamental for industrial applications (**Figure 2**). Six of the 14 polyphenols, nortrachelogenin, pinocembrin, pinosylvin monomethyl ether, pinosylvin, pinoresinol and pinobanksin with 8.49, 3.17, 2.45, 2.00, 1.31 and 1.21 g/kg of pine knot, respectively, together represented 90% of the total polyphenols isolated (20.66 g/kg of pine knot). The total polyphenol content for each class is consistent with the existing findings.¹ Indeed, by calculating their reported average yields of extract per kg of pine knot, their lignan levels ranged from 6.32 to 12.40 g/kg of pine knot while our content was 11.3 g/kg of knot. They reported flavonoid concentrations in a wide range between 0.62 and 15.2 g/kg of knot while

we found 4.67 g/kg of knot. In addition, phenolic acids ranged from 0.05 to 0.16 g/kg of knot in their study while the concentration was 0.07 g/kg of knot in ours. The content of stilbenes was 4.59 g/kg of knot in our study, a value higher than theirs which ranged from 0.22 to 1.88 g/kg of knot. The different methods of extraction together with different samples of pine knot could explain this discrepancy.

The quantitative and qualitative heterogeneity of the polyphenols we found in pine knot extract, especially the high stilbene content, strongly suggest that it can potentially be used for the biological control against *Plasmopara viticola*. The anti-mildew activities of the main compounds were also tested.

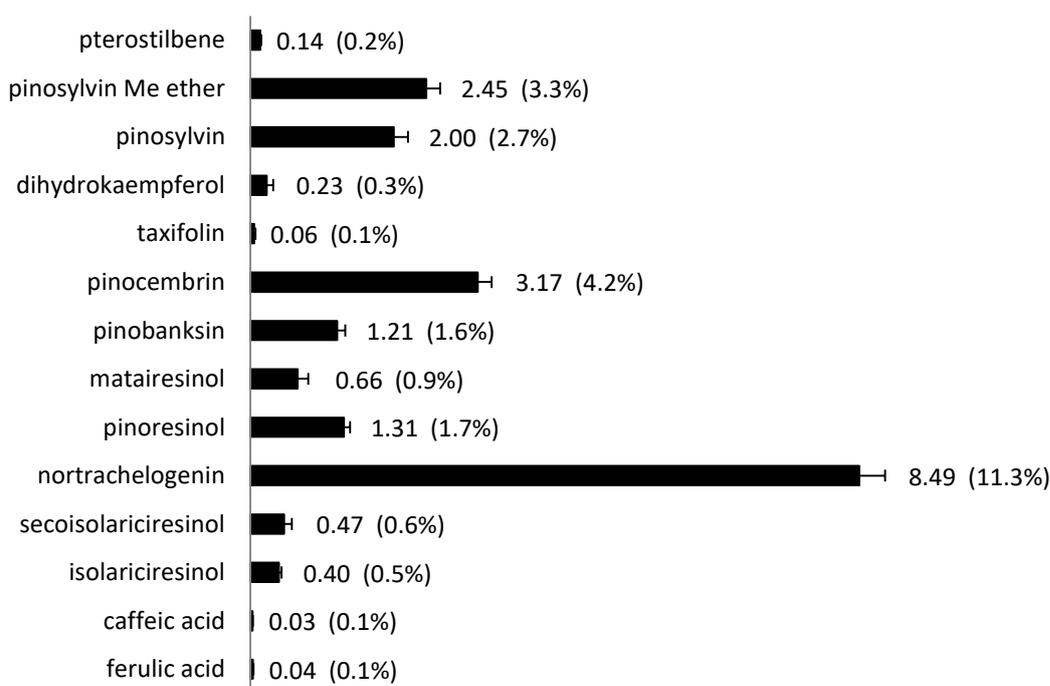


Figure 2. Polyphenol concentrations in pine knot (g / kg knot). Contents in pine knot extract (% m/m) between brackets. pinosylvin Me ether = pinosylvin monomethyl ether.

Anti-mildew bioassays

Extract of *Pinus pinaster* knot was applied before inoculation of *Plasmopara viticola* in order to study its preventive effect. The development of mildew, i.e. mycelium density and sporulation site, was measured by visual scoring to define the inhibitory properties of pine knot extract.²⁰ Several concentrations were tested (0.05-1 g/L) to visualize its inhibitory potential as a sigmoid curve. At 50 and 100 mg/L, pine knot extract had an inhibition percentage of 21.3 and 69.6% respectively (data not shown). The regression equation of the linear part of the sigmoid curve allowed us to measure the IC₅₀ values (concentration that inhibits 50% of mildew development). The extract had an IC₅₀ value of 76 mg/L and provided total inhibition at 500 mg/L (**Table 2**). Previous studies have demonstrated the antifungal activities of natural plant extracts against *P. viticola*. For example, an experiment on *Picea abies* bark, another conifer, revealed an IC₅₀ value of 760 mg/L, so pine extract seems to be 10-fold more powerful.²³ A study in which 3000 extracts from 800 plants and 100 fungi were screened against downy mildew showed a strong antifungal activity of *Juncus effusus* extract with an IC₅₀ value of 123 mg/L, which is still less active than pine extract.³³ Furthermore, extracts of vine by-products such as grapevine cane, wood and root showed IC₅₀ values of 210, 60 and 120 mg/L respectively.³⁴ Therefore, like vine wood extract, pine knot extract could become a very important natural antifungal agent. In addition, a comparison with a commercial fungicide (Dithane NeoTec 75 WG) that provides total inhibition at 200 mg/L suggests that the anti-mildew activity of pine knot extract is comparable (**Table 2**). Thus, to reduce chemical

inputs, the extract of pine knot could constitute a complementary strategy to the use of pesticides against downy mildew.

Table 2. Inhibition (IC₅₀ and IC₁₀₀) of Downy Mildew (*Plasmopara viticola*) Development by Pine Knot Extract (*Pinus pinaster*) (mg/L).

	Mildew development		
	IC ₅₀	IC ₁₀₀	R ²
negative control ^a	- ^c	-	-
positive control ^b	15	200	0.985
pine knot extract	76	500	1

^anegative control = water with 1% of ethanol.

^bpositive control = Dithane NeoTec 75 WG (mancozeb at 75%).

^cabsence of inhibition.

To explain its antifungal activity, the main compounds of pine knot extract were tested against downy mildew. Four lignans (nortrachelogenin, pinoresinol, matairesinol, isolariciresinol), two flavonoids (pinocembrin, pinobanksin) and two stilbenes (pinosylvin, pinosylvin monomethyl ether) were prepared with mildew zoospores to investigate their impact on zoospore mobility and mildew development. The compounds with the greatest ability to block zoospore mobility and inhibit mildew development (IC₅₀ values) were pinosylvin monomethyl ether (23 and 18 μM respectively), pinosylvin (34 and 23 μM respectively) and pinocembrin (22 and 19 μM respectively) (**Figure 3**). These results are in agreement with those described by other authors. Indeed, the pinosylvins from *Pinus* trees have already shown significant antifungal activities against white rot and brown rot fungi.¹⁴ The flavonoid pinocembrin also possesses antifungal properties against *Penicillium italicum* (green mold) and *Candida albicans*.^{11,35} Moreover, these low IC₅₀ values, meaning high antifungal activity, are similar in efficacy against downy mildew to the most active natural compounds reported in the literature such as pterostilbene, δ-viniferin and vitisin B with IC₅₀ which have values of 12, 14 and 13 μM respectively.^{36,37} Among the least effective compounds, lignans such as nortrachelogenin, pinoresinol and isolariciresinol showed IC₅₀ values greater than 220 μM. These results are consistent with the literature in which the antimicrobial activities (*Aspergillus fumigatus* and *Penicillium brevicompactum*) of pine extracts were correlated with the presence of stilbenes while the activity of lignans was shown to be more marginal.¹²

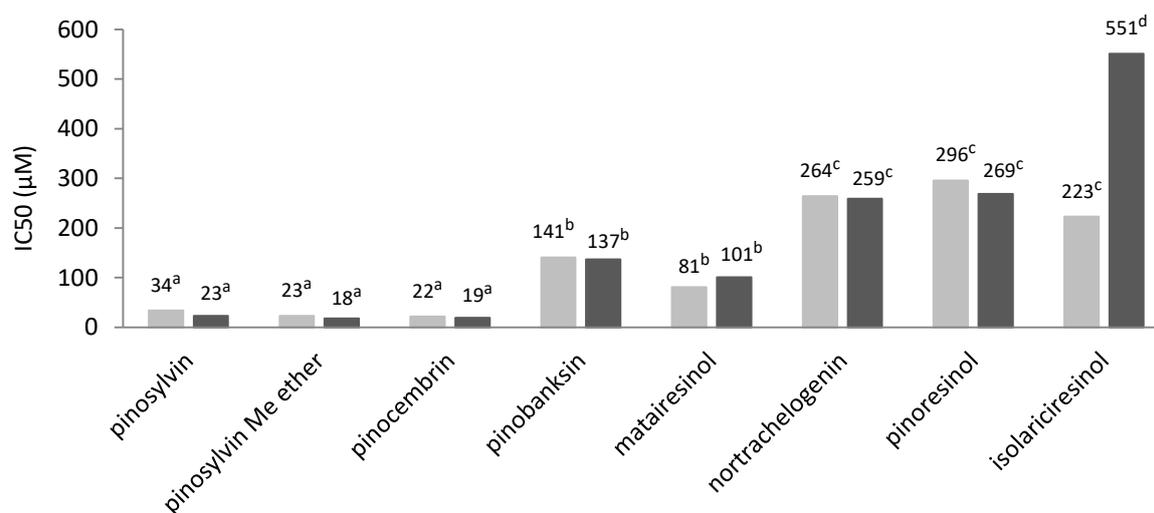


Figure 3. IC₅₀ values of zoospore mobility and downy mildew development for pure compounds (μM). Light gray bar = zoospore mobility; dark gray bar = mildew development. pinosylvin Me ether = pinosylvin monomethyl ether. Different letters indicate significant difference between IC₅₀ values of polyphenols according to one-way ANOVA followed by Newman Keuls multiple comparison post hoc tests.

In conclusion, we report the strong antifungal activity of *Pinus pinaster* knot extract against *Plasmopara viticola*. The high concentrations of pinosylvin, pinosylvin monomethyl ether and pinocembrin that it contains could contribute to this effect. Indeed, bioassays with pure compounds showed the very promising antimildew properties of these three molecules. The present findings therefore show that *Pinus pinaster* by-products such as knot could be used in viticulture to control *Plasmopara viticola*. As a source of biodegradable, less toxic and bioactive compounds, pine knot represents a valuable biomass with a very promising economic potential. The search for alternative strategies to the use of synthetic pesticides by developing natural plant extracts such as pine knot extract is now paving the way for major steps to be made in sustainable viticulture.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Jean-Michel Méryllon: phone, +33 5 57 57 59 50; email, jean-michel.merillon@u-bordeaux.fr

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project). We kindly thank Gérard Fondeville and Eric Pedrot for their technical assistance. We are also grateful to S. Gambier for providing the plants (INRA, UMR SAVE).

REFERENCES

1. Conde, E.; Fang, W.; Hemming, J.; Willför, S.; Dominguez, H.; Parajo, J.C. Recovery of bioactive compounds from *Pinus pinaster* wood by consecutive extraction stages. *Wood Sci Technol.* **2014**, *48*, 311–323.
2. Holmbom, B.; Eckerman, C.; Eklund, P.; Hemming, J.; Nisula, L.; Reunanen, M.; Sjöholm, R.; Sundberg, A.; Sundberg, K.; Willför, S. Knots in trees—A new rich source of lignans. *Phytochem. Rev.* **2003**, *2*, 331–340.
3. Celhay, C. Fractionnement de coproduits de pin maritime (*Pinus pinaster*) et de peuplier (*Populus tremula*) pour l'obtention d'extraits polyphénoliques à activité antioxydante: procédé d'extraction aqueuse en extracteur bi-vis et étude des conditions subcritiques. *PhD Thesis*, University of Toulouse (France) **2013**, 317 p.
4. Conde, E.; Hemming, J.; Smeds, A.; Reinoso, B.D.; Moure, A.; Willför, S.; Domínguez, H.; Parajo, J.C. Extraction of low-molar-mass phenolics and lipophilic compounds from *Pinus pinaster* wood with compressed CO₂. *J. Supercrit. Fluids* **2013**, *81*, 193–199.
5. Peuhu, E.; Paul, P.; Remes, M.; Holmbom, T.; Eklund, P.; Sjöholm, R.; Eriksson, J.E. The antitumor lignan nortrachelogenin sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced cell death by inhibition of the Akt pathway and growth factor signaling. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *86*, 571–583.
6. Laavola, M.; Leppänen, T.; Eräsalo, H.; Hämäläinen, M.; Nieminen, R.; Moilanen, E. Anti-inflammatory effects of nortrachelogenin in murine J774 macrophages and in carrageenan-induced paw edema model in the mouse. *Planta Med.* **2016**, *83*, 519–526.
7. Pietarinen, S.P.; Willför, S.M.; Ahotupa, M.O.; Hemming, J.E.; Holmbom, B.R. Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *J. Wood Sci.* **2006**, *52*, 436–444.
8. Cespedes, C.L.; Avila, J.G.; Garcia, A.M.; Becerra, J.; Flores, C.; Aqueveque, P.; Bittner, M.; Hoeneisen, M.; Martinez, M.; Silva, M. Antifungal and antibacterial activities of *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch heartwood lignans. *Z. Naturforsch.* **2006**, *61*, 35–43.
9. Neacsu, M.; Eklund, P.C.; Sjöholm, R.E.; Pietarinen, S.P.; Ahotupa, M.O.; Holmbom, B.R.; Willför, S.M. Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen. *Holz Roh- Werkst.* **2007**, *65*, 1–6.
10. Soromou, L.W.; Chu, X.; Jiang, L.; Wei, M.; Huo, M.; Chen, N.; Guan, S.; Yang, X.; Chen, C.; Feng, H.; Deng, X. In vitro and in vivo protection provided by pinocembrin against lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *Int. Immunopharmacol.* **2012**, *14*, 66–74.

11. Rasul, A. ; Millimouno, F.M.; Ali Eltayb, W. ; Ali, M. ; Li, J. ; Li, X. Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed Res. Int.* **2013**, 1–9.
12. Valimaa, A.; Honkalampihamalainen, U.; Pietarinen, S.; Willfor, S.; Holmbom, B.; Vonwright, A. Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *115*, 235–243.
13. Lee, S.K.; Lee, H.J.; Min, H.Y.; Park, E.J.; Lee, K.M.; Ahn, Y.H.; Cho, Y.J.; Pyee, J.H. Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. *Fitoterapia* **2005**, *76*, 258–260.
14. Celimene, C.C.; Micales, J.A.; Ferge, L.; Young, R.A. Efficacy of pinosylvins against white-rot and brown-rot fungi. *Holzforschung* **1999**, *53*, 491–497.
15. Gessler, C.; Pertot, I.; Perazzolli, M. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathol. Mediterr.* **2011**, *50*, 3–44.
16. Leroux, P.; Clerjeau, M. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. and *Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl. and de Toni to fungicides in French vineyards. *Crop Prot.* **1985**, *4*, 137–160.
17. La Torre, A. ; Pompi, V.; Mandalà, C. ; Cioffi, C. Grapevine downy mildew control using reduced copper amounts in organic viticulture. *Commun Agric Appl Biol Sci.* **2011**, 728–736.
18. Martins, V.; Teixeira, A.; Bassil, E.; Blumwald, E.; Gerós, H. Metabolic changes of *Vitis vinifera* berries and leaves exposed to Bordeaux mixture. *Plant Physiol. Biochem.* **2014**, *82*, 270–278.
19. Corio-Costet, M.F. Fungicide resistance in *Plasmopara viticola* in France and anti-resistance measures. in *Fungicide resistance in crop protection: risk and management.* ed. Thind, T. S. CABI **2012**, 157–171.
20. Corio-Costet, M.-F.; Dufour, M.-C.; Cigna, J.; Abadie, P.; Chen, W.-J. Diversity and fitness of *Plasmopara viticola* isolates resistant to QoI fungicides. *Eur. J. Plant Pathol.* **2011**, *129*, 315–329.
21. Lambert, C.; Richard, T.; Renouf, E.; Bisson, J.; Waffo-Tégou, P.; Bordenave, L.; Ollat, N.; Mérillon, J.-M.; Cluzet, S. Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11392–11399.
22. Sombardier, A.; Dufour, M.-C.; Blancard, D.; Corio-Costet, M.-F. Sensitivity of *Podosphaera aphanis* isolates to DMI fungicides: distribution and reduced cross-sensitivity. *Pest Manage. Sci.* **2010**, *66*, 35–43.
23. Gabaston, J.; Richard, T.; Biais, B.; Waffo-Teguo, P.; Pedrot, E.; Jourdes, M.; Corio-Costet, M.-F.; Mérillon, J.-M. Stilbenes from common spruce (*Picea abies*) bark as natural antifungal agent against downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Ind. Crops Prod.* **2017**, *103*, 267–273.
24. Mattivi, F.; Vrhovsek, U.; Malacarne, G.; Masuero, D.; Zulini, L.; Stefanini, M.; Moser, C.; Velasco, R.; Guella, G. Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid *Vitis vinifera* (Merzling × Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 5364–5375.
25. Li, A. ; Xuan, H.; Sun, A. ; Liu, R. ; Cui, J. Preparative separation of polyphenols from water-soluble fraction of Chinese propolis using macroporous absorptive resin coupled with preparative high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2016**, *1012–1013*, 42–49.
26. Xiang, M. ; Su, H. ; Hu, J. ; Yan, Y. Isolation, identification and determination of methyl caffeate, ethyl caffeate and other phenolic compounds from *Polygonum amplexicaule* var. *sinense*. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 1685–1691.
27. Ekman, R.; Willför, S.; Sjöholm, R.; Reunanen, M.; Mäki, J.; Lehtilä, R.; Eckerman, C. Identification of the lignan nortrachelogenin in knot and branch heartwood of scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Holzforschung* **2002**, *56*, 253–256.
28. Yi, B.; Hu, L.; Mei, W.; Zhou, K.; Wang, H.; Luo, Y.; Wei, X.; Dai, H. Antioxidant phenolic compounds of Cassava (*Manihot esculenta*) from Hainan. *Molecules* **2011**, *16*, 10157–10167.
29. Rimando, A.M.; Pezzuto, J.M.; Farnsworth, N.R.; Santisuk, T.; Reutrakul, V. Revision of the NMR assignments of pterostilbene and of dihydrodehydrodiconiferyl alcohol: cytotoxic constituents from *Anogeissus acuminata*. *Nat. Prod. Lett.* **1994**, *4*, 267–272.

30. Ngo, K.-S.; Brown, G.D. Stilbenes, monoterpenes, diarylheptanoids, labdanes and chalcones from *Alpinia katsumadai*. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1117–1123.
31. Rahman, M.M.A.; Dewick, P.M.; Jackson, D.E.; Lucas, J.A. Lignans of *Forsythia intermedia*. *Phytochemistry* **1989**, *29*, 1971–1980.
32. Feinberg, M. L'assurance qualité dans les laboratoires agroalimentaires et pharmaceutiques. *Tec & Doc (Editions)*, Paris, **2001**, 348 p.
33. Thuerig, B.; Ramseyer, J.; Hamburger, M.; Oberhänsli, T.; Potterat, O.; Schärer, H.-J.; Tamm, L. Efficacy of a *Juncus effusus* extract on grapevine and apple plants against *Plasmopara viticola* and *Venturia inaequalis*, and identification of the major active constituent. *Pest Manage. Sci.* **2016**, *72*, 1718–1726.
34. Gabaston, J.; Cantos-Villar, E.; Biais, B.; Waffo-Teguo, P.; Renouf, E.; Corio-Costet, M.-F.; Richard, T.; Mérillon, J.-M. Stilbenes from *Vitis vinifera* L. waste: a sustainable tool for controlling *Plasmopara viticola*. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 2711–2718.
35. Peng, L.; Yang, S.; Cheng, Y.J.; Chen, F.; Pan, S.; Fan, G. Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Sci. Biotechnol.* **2012**, *21*, 1533–1539.
36. Pezet, R.; Gindro, K.; Viret, O.; Richter, H. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *J. Grapevine Res.* **2004**, *43*, 145.
37. Schnee, S.; Queiroz, E.F.; Voinesco, F.; Marcourt, L.; Dubuis, P.-H.; Wolfender, J.-L.; Gindro, K. *Vitis vinifera* canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 5459–5467.

Volume IV.

Etude chimique et activité insecticide d'un
coproduit viticole

Chapitre I. *Leptinotarsa decemlineata*, ravageur de la pomme de terre : Point bibliographique

A. Biologie de *L. decemlineata*

Leptinotarsa decemlineata, également appelé doryphore de la pomme de terre, est une espèce d'insecte de l'ordre de Coléoptères et de la famille des Chrysomélidés. Il s'agit d'un ravageur de la famille des Solanacées, s'attaquant aux plants de tomates, d'aubergines, de poivrons et surtout de pommes de terre (Hitchner et al. 2008).

A.1. Cycle biologique

Le cycle de vie de *L. decemlineata* est composé de quatre phases principales; une phase de l'œuf, une phase larvaire marqué par quatre stades, une phase pupale et une phase adulte (**Figure 39**).

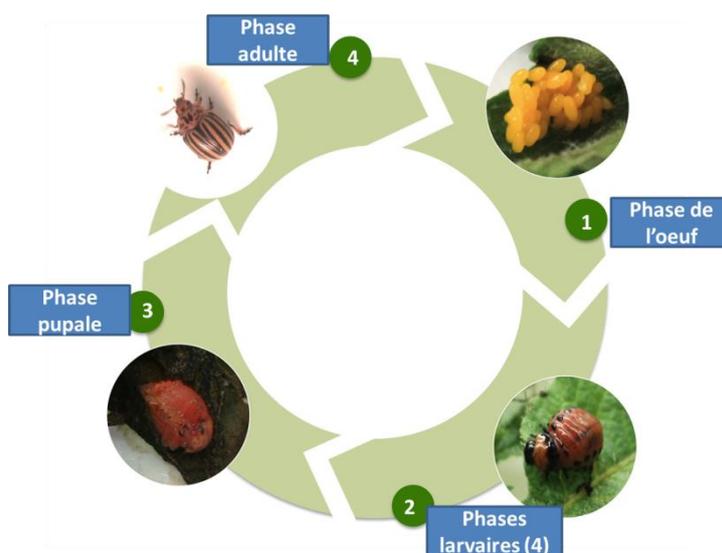


Figure 39. Cycle de développement de *Leptinotarsa decemlineata*, le doryphore de la pomme de terre.

D'après Maharijaya & Vosman 2015.

Au niveau de la reproduction, *L. decemlineata* est une espèce pouvant s'accoupler plusieurs fois par an avec des partenaires différents. Après 5 à 10 jours, les femelles commencent à déposer entre 20 et 60 œufs de couleur jaune-orangé sur les faces inférieures des feuilles de leurs plantes hôtes (Hare 1990). Une femelle peut produire jusqu'à trois générations par an, ce qui équivaut sur une vie entière à la ponte de plus de 800 œufs (Ferro et al. 1985). Cette première phase de l'œuf dure entre 4 et 12 jours selon la température avant une éclosion simultanée de tous les œufs.

Dès leur émergence, les larves commencent à se nourrir immédiatement des feuilles. Cette phase larvaire, qui dure généralement entre 10 et 20 jours, se divise en 4 stades marqués par trois mues qui permettent aux larves de se développer. La proportion de feuillage consommée par stade est relativement constante entre les espèces hôtes. Les premiers stades sont responsables d'environ 3% de la consommation totale de feuilles, les deuxièmes stades d'environ 5% et les troisièmes stades d'environ 15%; environ 77% de la consommation totale de feuilles se produit au quatrième stade (Hare 1990).

Après que la larve du quatrième stade cesse de se nourrir, elle s'enfonce dans le sol et s'enterre à environ 10 cm, au-dessous de sa plante hôte. Il s'agit de la phase pupale où la larve se métamorphose en adulte. Cette phase s'étend sur une période de 5 à 10 jours avant l'émergence de l'insecte adulte (Maharijaya & Vosman 2015).

La quatrième phase du cycle biologique est celle de l'adulte. Cette nouvelle génération émerge du sol, se dirige vers son hôte le plus proche et commence à se nourrir. En fonction d'un certain nombre de facteurs, notamment la température, la photopériode et l'état de la plante hôte, les adultes peuvent s'accoupler et commencer une autre génération, migrer ou cesser de s'alimenter et entrer en diapause en attendant des conditions climatiques meilleures (Hare 1990).

A.2. Ecologie de *L. decemlineata*

De nombreux facteurs vont intervenir dans la vie des insectes, dans notre cas de *L. decemlineata*, affectant leur comportement, leur mode de vie, ou encore les interactions avec leur milieu. En ce sens, l'identification des plantes hôtes par les adultes de *L. decemlineata* est influencée par la dissémination de composés volatiles produits par les espèces des Solanacées (Sablon et al. 2012). Une étude a premièrement mis en évidence que les doryphores adultes étaient attirés par les odeurs libérées par les plantes hôtes potentielles telles que la pomme de terre, la tomate, l'aigre-douce, la morelle noire et le céleri. Au contraire, ces insectes étaient indifférents à l'aulne et étaient repoussés par les odeurs de l'herbe et du pissenlit (Wilde et al. 1969). Cette étude mettait en évidence pour la première fois la sensibilité de *L. decemlineata* à dissocier des odeurs de différentes plantes. Les travaux de Visser (1979) ont permis de caractériser certains de ces composés organiques volatils présents dans les feuilles de pommes de terre avec la présence du (*E*)-2-hexen-1-ol, (*Z*)-3-hexen-1-ol, 1-hexanol, (*E*)-2-hexenal, hexanal et (*Z*)-3-hexenylacétate.

Dickens (2000) a également démontré l'importance de la maturité sexuelle pour la reconnaissance et l'attraction de la plante. En effet, la sensibilité des antennes de *L. decemlineata* aux composés volatiles de la pomme de terre augmente avec le nombre de jours après la phase pupale et la maturation sexuelle. Cette étude a ainsi mis en évidence l'impact des composés volatils tels que les hexanals précédemment cités, des aldéhydes aliphatiques (heptanal, octanal, nonanal, décane), des monoterpènes (cinéole, limonène, linalool, myrcène, α -pinène), des sesquiterpènes (β -caryophyllène, α -humulène, longifolène, β -selinène) et d'autres composés (salicylate de méthyle, indole). En outre, les feuilles endommagées peuvent augmenter l'attrait de la plante hôte pour les doryphores adultes car les blessures déclenchent la libération de ces composés volatils. En effet, une infection de larves de *L. decemlineata* permet une augmentation d'un facteur 7 à 10 de la quantité de composés volatils (Bolter et al. 1997). Ainsi, une infection primaire par *L. decemlineata* va augmenter l'attraction de ces plants pour les insectes environnants, entraînant une destruction rapide de ces cultures.

Outre l'aspect olfactif, des stimuli visuels peuvent jouer un rôle dans la localisation des plantes hôtes. En effet, les insectes sont sensibles à certaines longueurs d'ondes pouvant être attractives ou répulsives (Fernandez & Hilker 2007). Ainsi, des travaux ont mis en exergue la forte préférence de *L. decemlineata* pour des couleurs jaune, vert clair et l'association de rayures jaunes et noires (Szentesi et al. 2002). Ainsi, on peut conclure que les réponses aux planches jaunes, vert-jaune et vert clair sont équivalentes aux réponses au feuillage des plantes sur lesquelles *L. decemlineata* se déplace le plus fréquemment. Les couleurs jaune et noir à rayures renvoient aux couleurs des adultes de *L. decemlineata* qui permettent d'attirer les populations à proximité des plants de pomme de terre.

Hormis les facteurs jouant sur la reconnaissance des plantes, certains signaux vont impacter sur le comportement alimentaire des insectes. Certains composés vont agir comme stimulateurs alimentaires pour *L. decemlineata* tels que des acides aminés (alanine, sérine), des sucres (saccharose), des acides (acide gamma aminobutyrique, acide chlorogénique), et différents phospholipides (Hare 1990; Mitchell 1988). Récemment, des extractions sur des feuilles de pommes de terre ont mis en exergue qu'une fraction composée de stérols (cholestérol, β -sitostérol et stigmastérol) agissait comme phagostimulant sur les larves de *L. decemlineata* (Szafrank et al. 2008). A l'inverse, certains composés présents dans une fraction dichlorométhane sont dissuasifs, avec la présence de cires cuticulaires, sesquiterpènes, hydrocarbures et alcools. Cependant, la présence naturelle de ces composés semble trop faible pour avoir un réel impact sur l'inhibition alimentaire.

Face à cet insecte qui possède un cycle biologique rapide, flexible avec des outils performants de détection des plantes hôtes, différents moyens de lutte sont développés afin de limiter sa propagation.

B. Moyens de lutte

B.1 Les pesticides

La principale stratégie de contrôle de *L. decemlineata*, par le passé et encore à l'heure actuelle, reste l'utilisation de pesticides. La recherche de produits chimiques a tout d'abord débuté dès le milieu du 19^{ème} siècle avec le développement d'insecticide à base d'arsenic (Alyokhin 2009). Au milieu du 20^{ème} siècle, les produits à base de DichloroDiphénylTrichloroéthane (DDT) étaient les produits chimiques de référence pour les cultivateurs de pomme de terre. Ce puissant insecticide permettait l'ouverture des canaux sodiques des neurones entraînant une mort rapide de l'insecte. Sa toxicité environnementale et sanitaire ont aujourd'hui interdit son exploitation (Alyokhin et al. 2008). De nos jours, une grande diversité de composés chimiques est utilisée. Par exemple, les produits à base de carbamates ou d'organophosphates permettent l'inhibition de l'acétylcholine estérase. Les pyréthroïdes et pyréthrines vont moduler l'ouverture des canaux sodiques alors que les néonicotinoïdes vont impacter les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (Alyokhin et al. 2008). Cependant, malgré le fait que l'utilisation des insecticides chimiques permet une réduction significative de la population de *L. decemlineata*, le développement de résistance à ces produits est aujourd'hui un problème majeur dans la gestion de ce ravageur.

En effet, à travers son adaptation génétique, *L. decemlineata* est devenu résistant à de nombreux insecticides mis sur le marché. Szendrei et al. (2012) révèlent une résistance croissante entre 1998 et 2009 de *L. decemlineata* contre les néonicotinoïdes et plus précisément l'imidaclopride aux Etats-Unis. Stankovic et al. (2012) met en lumière des résistances de ces insectes aux néonicotinoïdes, pyréthroïdes et néreïstoxines, alors que Stankovic et al. (2004) révèlent des résistances aux carbamates et aux organophosphates.

Ces résistances peuvent s'expliquer par plusieurs facteurs. L'utilisation exclusive de pesticides dans le management de *L. decemlineata* favorise l'adaptation physiologique de ces insectes à ces produits. De plus, l'apparition de symptômes de résistance engendre généralement un sur-dosage de ces insecticides chimiques augmentant ainsi le développement de résistance (Maharijaya & Vosman 2015). En outre, la haute fécondité de ces coléoptères augmente la possibilité de mutations aléatoires et ainsi permet de construire des résistances aux différents insecticides (Alyokhin et al. 2008). La présence importante de glycoalcaloïdes toxiques dans le feuillage des pommes de terre a également permis à *L. decemlineata* de co-évoluer avec ces composés, augmentant ainsi sa capacité physiologique à tolérer ou détoxifier des composés toxiques (Alyokhin 2009).

B.2. Le biocontrôle

Des outils plus soucieux de l'environnement ont été développés dans le but de limiter l'impact de ce ravageur à travers des contrôles biologiques. Ainsi, l'application de prédateurs naturels de *L. decemlineata* a été rapportée. L'utilisation de *Pterostichus melanarius*, un insecte de l'ordre des Coléoptères et de la famille des Carabidées, a permis de mettre en évidence la capacité de ce prédateur à s'attaquer aux œufs et aux larves de *L. decemlineata*. Un adulte de *P. melanarius* peut consommer 61 œufs et 24 larves de *L. decemlineata* en 24 heures, permettant d'envisager cet insecte comme un agent de biocontrôle intéressant (Alvarez et al. 2013). En outre, une autre étude portant sur des larves de *Chrysoperla carnea*, un insecte de l'ordre des Névroptères et de la famille des Chrysopidés a été réalisée dans le but de contrôler *L. decemlineata*. Egalement appelé la chrysope verte, cet insecte prédateur a la capacité de consommer environ 7 œufs, 9 larves de premier stade, 4 larves de second stade et moins de 1 larve de troisième et quatrième stades en 24 heures. Ces résultats suggèrent ainsi un potentiel de cet insecte à contrôler notre insecte d'intérêt seulement aux stades immatures (Sablon et al. 2013).

Par ailleurs, un procédé utilisant des bactéries comme outil insecticide a été étudié. Le genre *Bacillus*, à travers l'isolement de quatre espèces telles que *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium* et *Bacillus cereus*, a été évalué via la pulvérisation de ces bactéries sur des larves et adultes de *L. decemlineata* présents sur des feuilles de pomme de terre. Il en résulte une mortalité des larves et adultes de 95,7% et 26,7% causée par *B. pumilus*, de 74,5% et 23,3% causée par *B. sphaericus*, de 51,1% et 10% pour *B. cereus* et de 29,7% et 10% pour *B. megaterium*. Cette étude permet donc d'envisager l'utilisation de *B. pumilus* ou *B. sphaericus* comme outil de biocontrôle (Ertürk et al. 2008). Une étude antérieure portant sur l'utilisation de *Bacillus turingiensis* avait également mis en exergue la capacité insecticide du genre *Bacillus* (Whalon & Wingerd 2003).

L'utilisation d'un champignon parasite, *Beauveria bassiana*, a également été étudiée contre *L. decemlineata*. Une application répétée par spray, basée sur trois traitements en pots, permet une réduction moyenne de 80% (entre 58 et 93%) de la population de *L. decemlineata* adulte de 1^{ère} génération alors qu'une seule application permet une réduction moyenne de 60% (entre 36 et 75%). L'impact de ce traitement sur le stade larvaire est quant à lui peu efficace. Ces résultats indiquent que l'application foliaire de *B. bassiana* peut s'intégrer dans un programme de biocontrôle notamment pour les stades matures de *L. decemlineata* (Wraight & Ramos 2015).

Ces différents exemples non exhaustifs montrent des résultats prometteurs concernant l'application de méthode de biocontrôle pour limiter l'impact de *L. decemlineata*. Cependant, l'utilisation exclusive de contrôle biologique n'est pas capable de réduire la densité de la population de ce ravageur, notamment à cause de sa forte reproduction. En ce sens, augmenter la population d'un ennemi naturel pour contrôler *L. decemlineata* est peu envisageable du fait d'une nécessité d'un élevage massif de prédateurs et le coût que cela engendre (Ferro et al. 1985). En outre, les composés toxiques présents dans les bactéries ou champignons utilisés en biocontrôle doivent faire face aux conditions du terrain où leur photosensibilité engendre généralement une accélération de la dégradation (Maharijaya & Vosman 2015). Ainsi, il est préférable d'utiliser une méthodologie de contrôle biologique en association avec d'autres outils afin de réaliser un meilleur contrôle de cet insecte.

B.3. Les pratiques culturales

Une stratégie basée sur l'utilisation de différentes pratiques culturales communes est un outil complémentaire pour moduler la population de *L. decemlineata*. Une des méthodes les plus employées et efficaces est la rotation des cultures. Une étude démontre que la plantation de pomme de terre après un cycle de culture de seigle ou de blé permet une réduction de 95,8% de la densité de population de *L. decemlineata* (Wright 1984). Cependant, la mobilité efficace des coléoptères par vol ou par marche nécessite une distance de 0,3 à 0,9 km entre les cultures en rotation afin de maximiser l'efficacité de cette méthode (Sexson & Wyman 2005).

L'utilisation de pièges qui attire les insectes est également un outil de lutte efficace. Des composés chimiques attractifs tels que des phéromones issues d'insectes ou des kairomones végétales, sont des possibilités. Ces molécules libérées dans l'environnement vont notamment déclencher une réponse comportementale chez une autre espèce, générant ainsi un bénéfice pour cette dernière. En ce sens, une étude portant sur l'utilisation dans des pièges de trois composés volatils ((*Z*)-3-hexenyl acétate, linalool et méthyl salicylate) issus de végétaux montre une plus grande présence d'œufs, de larves et d'adultes de *L. decemlineata* dans les pièges présentant ces composés attractifs par rapport aux pièges sans traitement. De plus, les plants de pomme de terre avec des pièges sans traitement ont davantage d'insectes aux différents stades que les plants avec des pièges contenant des composés volatils. Il en résulte un meilleur rendement en pomme de terre dans cette dernière condition avec traitement, similaire aux pratiques conventionnelles avec insecticide, par rapport au témoin sans traitement (Martel et al. 2005).

Des méthodologies physiques ont également été employées afin de contrôler la population de *L. decemlineata*. Des barrières physiques telles que des couches de paille, appelé paillage, ou la présence de bâches en plastique peuvent être déposées au sol afin de protéger les plants de pomme de terre. Cela permet d'augmenter le temps requis aux insectes pour trouver les plants et favorise la proportion des insectes à quitter les lieux de culture (Stoner 1997). Une étude rapporte notamment une décroissance de la défoliation de plant de pomme de terre d'un facteur compris entre 2,5 et 5 lors de l'application de paille de blé (Brust 1994). Cependant, ce procédé tend à être limité par la taille des zones de culture, et est ainsi plus adapté à une application locale sur champs de petite taille ou des cultures en pot.

Une approche mécanique via l'utilisation d'une machine permettant de souffler de l'air a été étudiée. Il s'agit d'un prototype pneumatique-thermique monté sur un tracteur permettant à une vitesse au sol de 5 km/h, sur 1,5 hectare durant 1 heure, de déloger respectivement 95% et 85% des adultes et larves de *L. decemlineata* pour une vitesse de l'air d'environ 30 m/s (Derafshi 2006). Néanmoins, ce procédé est peu sélectif et entraîne la fuite ou la mort d'insectes potentiellement bénéfiques pour les cultures.

B.4. Plants résistants

Actuellement, les cultivars commerciaux de pommes de terre sur le marché ne possèdent pas un fort niveau de résistance face à *L. decemlineata*. Pour pallier à ce manque, le développement de variétés résistantes à travers des programmes génétiques utilisant des espèces natives peut être envisagé. Plusieurs facteurs de résistance ont ainsi été identifiés et peuvent être exploités.

Les trichomes glandulaires sont de fines excroissances ou appendices présentes chez certaines plantes prenant un aspect de poils au niveau de feuilles, tiges ou racines. Les trichomes de type B sont des trichomes avec une glande ovoïde à leurs pointes qui sécrètent continuellement un liquide visqueux. Les trichomes de type A sont des petits trichomes avec une glande liée à une membrane à quatre lobes au niveau de son apex (Maharijaya & Vosman 2015). Généralement, les insectes touchent les trichomes de type B, s'enduisant de liquide collant, avant d'être immobilisés par les trichomes de type A, puis de mourir par le manque de nourriture (Gregory et al. 1986). Ces trichomes glandulaires sont ainsi présents chez certaines espèces sauvages des Solanacées et notamment *Solanum berthaultii*, *Solanum tarijense* ou *Solanum neocardenasii* (Pelletier & Dutheil 2006; Pelletier et al. 1999). Ces espèces peuvent facilement s'hybrider avec l'espèce cultivée (*Solanum tuberosum*) et donc s'implanter dans des programmes de croisement génétique. Un autre facteur de résistance présent dans les espèces natives est la production de glycoalcaloïdes, une famille de composés toxiques formés d'un alcaloïde stéroïdique lié à un sucre. Parmi ces composés, les leptines et leptinines présentes chez *Solanum*

chacoense ont démontré des activités insecticides contre les larves de *L. decemlineata* (Lorenzen et al. 2001). D'autres glycoalcaloïdes tels que la solanidine présent chez *Solanum okadae* ou la tomatine ont également montré un effet négatif sur *L. decemlineata* (Barbour & Kennedy 1991; Kowalski et al. 1999; Pelletier et al. 2001).

Une des limites de cette méthodologie repose, d'une part, sur l'ignorance de l'impact des glycoalcaloïdes sur la santé humaine. Par exemple, la limite recommandée par le département d'agriculture des USA est de 200 mg/kg MF ou 1000 mg/kg MS. Des glycoalcaloïdes, principalement représentés par l'alpha-solanine (aglycone=solanidine) et l'alpha-chaconine, sont généralement présents chez la pomme de terre (feuilles et tubercules), à hauteur de quelques dizaines de mg/kg MF dans les tubercules, principalement concentrés dans la "peau". Ces alcaloïdes pourraient faire l'objet d'une augmentation de concentration dans le cadre d'un programme génétique en vue d'une protection contre *L. decemlineata*. Cependant, la conséquence pourrait être un dépassement du seuil recommandé dans les tubercules, ce qui entraînerait des symptômes d'intoxication, comme des sensations de brûlure dans la gorge et la bouche, ainsi que de la fièvre et des troubles gastro-intestinaux (Dinkins & Peterson 2008).

En outre, une des contraintes de cette méthodologie repose sur la difficulté de croisement génétique chez la pomme de terre. La faible capacité de transmission transversale d'une espèce à une autre, la stérilité hybride lors de croisement interspécifique due notamment aux problèmes d'appariement chromosomique ou encore la persistance de traits agronomiques indésirables sont autant de limites à l'utilisation des programmes de croisement génétique (Maharijaya & Vosman 2015). Cependant, aujourd'hui la recherche offre de nouvelles solutions pour contourner ces problèmes d'interspécificité tel que le « sauvetage d'embryons », technique basée sur le prélèvement d'embryons immatures et de leur culture sur un milieu nutritif afin de permettre le développement de la plante (Mallikarjuna 1999).

B.5. Programme de lutte intégrée

Chacune de ces méthodes présente des avantages dans la gestion de la population de *L. decemlineata* et des limites à leur utilisation tels que le développement de résistance pour les pesticides, l'élevage en masse d'ennemi naturel pour le biocontrôle, la non-sélectivité de certaines méthodes culturales ou encore certaines difficultés techniques dans l'élaboration de croisement génétique.

Aujourd'hui, il est indispensable de respecter une agriculture raisonnée et d'évaluer les options de management à disposition pour contrôler les ravageurs. Ainsi, une approche intégrée des différents moyens de lutte précédemment évoqués pourrait constituer un programme de contrôle de *L.*

decemlineata (Figure 40). Certaines pratiques culturales en association avec l'utilisation de plants résistants pourraient prévenir l'infection par ces ravageurs. L'utilisation raisonnée de pesticides et de méthode de biocontrôle faciliteraient la suppression du développement de *L. decemlineata* (Maharijaya & Vosman 2015).

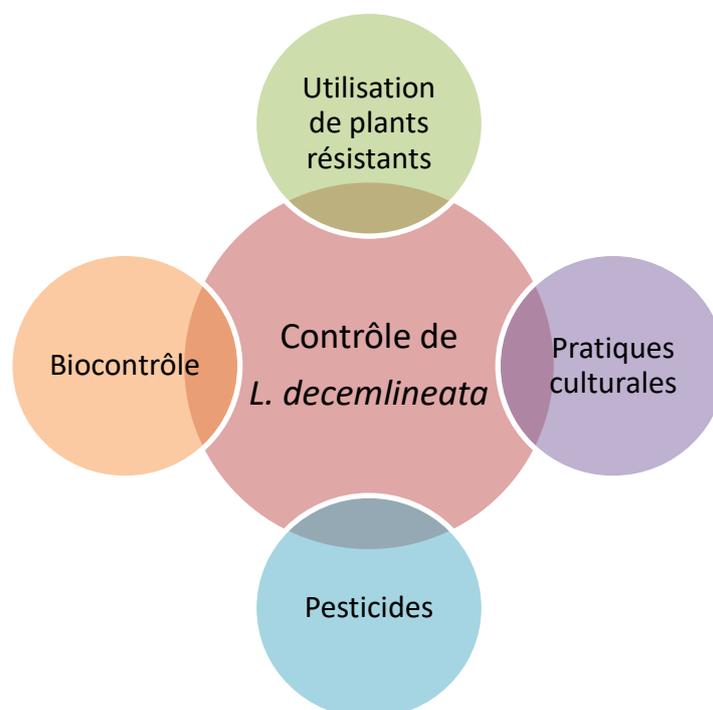


Figure 40. Illustration d'une approche intégrée des différents moyens de luttés contre *L. decemlineata*.
D'après Maharijaya et Vosman, 2015.

Outre ces méthodes conventionnelles décrites dans la littérature depuis plusieurs dizaines d'années, certaines stratégies innovantes apparaissent aujourd'hui comme complémentaires ou alternatives à ces pratiques. Parmi celles-ci, l'utilisation d'« insecticides végétaux » continue d'attirer de plus en plus l'attention de la part des exploitants et agriculteurs du monde entier car ils sont considérés comme une alternative appropriée aux insecticides synthétiques.

C. Les insecticides végétaux

Cette dénomination d'insecticide végétal fait référence à l'utilisation d'extrait naturel de plantes comme agent actif contre les insectes. Ce concept se base notamment sur l'exploitation d'extraits riches en composés issus du métabolisme secondaire des végétaux, comme par exemple les huiles essentielles (Isman 2015). Ces extraits de plantes s'appuient sur des composés généralement impliqués dans la défense des plantes. Ainsi, ces produits naturels sont peu néfastes pour l'environnement, ont

l'avantage d'être biodégradables, et ont également un spectre d'action large dû à la complexité de ces extraits (Isman 2006). La recherche s'est donc récemment focalisée sur la prospection de nouveaux insecticides végétaux afin d'apporter des solutions dans la lutte contre les insectes, et dans notre cas contre *L. decemlineata*.

C.1. Cas de *L. decemlineata*

Au début des années 2000, une des premières études portait sur l'exploitation d'extraits de plantes de la famille des Pipéracées, avec *Piper tuberculatum* et *Piper nigrum*, aussi connu comme le poivrier noir (Scott et al. 2003). Ces plantes sont connues pour être riches en métabolites secondaires et notamment en alcaloïdes avec les pipéramides (pipérine, pipericide), desquelles découlent des activités neurotoxiques de par leur fonction amide et des activités inhibitrices de la chaîne respiratoire par leur fonction méthylènedioxyphényl. Ces extraits ont montré une forte inhibition des larves de *L. decemlineata* sur des souches sensibles et résistantes aux pesticides avec seulement un facteur 2 d'inhibition entre les deux contre un facteur 22 pour l'application d'un insecticide chimique. La dose causant 50% de mortalité est de 0,064% pour l'extrait de *P. tuberculatum* et de 0,05% pour l'extrait de *P. nigrum*, ce dernier étant le plus actifs des deux extraits.

Une autre étude portant également sur des extraits riches en métabolites secondaires (stéroïdes, alcaloïdes, stilbènes) a été initiée avec *Veratrum album* (vétrate blanc, Liliacées) (Aydin et al. 2014). Des extraits obtenus selon différents procédés (ammoniaque/benzène, chloroforme, acétone) ont été testés contre *L. decemlineata*. La mesure des CI_{50} révèle que l'extrait obtenu par un mélange ammoniaque/benzène a une valeur de 25 mg/L, similaire à un insecticide chimique, synonyme d'une forte activité insecticide de l'extrait.

De nos jours, des screenings d'activités permettent de sélectionner les extraits les plus efficaces parmi un large choix de plantes. Ainsi, Pavela (2010) révèle une forte sensibilité de *L. decemlineata* aux extraits testés (75 au total) avec notamment 42 extraits possédant une activité de dissuasion alimentaire supérieure à 50% dont 23 extraits avec une activité au-delà de 95%. Parmi eux, trois extraits, *Angelica archangelica* (Apiacées), *Grindelia camporum* et *Inula auriculata* (Astéracées,) ont montré les plus fortes activités avec des doses efficaces inférieures à 1 µg/cm².

En outre, l'utilisation d'huile essentielle comme produit insecticide naturel a également été investiguée dans la littérature. L'huile essentielle issue de sauge, *Salvia officinalis*, de la famille des Lamiacées a été testée contre *L. decemlineata* à travers sa toxicité et sa capacité de dissuasion alimentaire (Kostić et al. 2007). Il en résulte une mortalité de 29% pour les larves et 21% pour les adultes alors que la perte d'appétit causée par l'huile essentielle est significative sur les larves mais peu efficace sur les adultes.

D'autres travaux portaient sur des huiles essentielles de Lamiacées différentes telles que *Satureja hortensis* (sariette) et *Thymus vulgaris* (thym) (Pavela et al. 2009). Les composés majoritaires sont des terpénoïdes avec le γ -terpinène et carvacrol dans la sariette et le *p*-cymène, γ -terpinène et le thymol dans le thym. Ces deux extraits ont démontré des activités toxiques et de dissuasion alimentaire contre *L. decemlineata*. L'utilisation des huiles essentielles est donc une voie d'exploitation en tant qu'insecticide végétal.

Certaines études se sont plutôt focalisées sur l'efficacité de molécules pures. Une étude a été réalisée sur un métabolite secondaire présent dans le mangoustanier (*Garcinia mangostana*), l' α -mangostine, un dérivé xanthonoïde (Kim & Lan 2011). Ce composé phénolique est un inhibiteur de protéine porteuse de stérol, dont la fonction est l'absorption et le trafic intracellulaire du cholestérol chez les insectes. Ces travaux ont ainsi montré que l' α -mangostine était toxique contre les larves, inhibait le développement de *L. decemlineata*, et entraînait une perte d'appétit significative chez les adultes.

Une expérimentation a été réalisée sur des flavonoïdes tels que la taxifoline (=dihydroquercétine) et, la quercétine, dont l'activité porte sur l'inhibition d'enzymes de détoxification (glutathion S-transférase et estérases), responsables de la résistance aux insecticides (Wang et al. 2016). Ces métabolites secondaires ont montré une mortalité croissante des larves de *L. decemlineata* après 48h. D'un point de vue mécanistique, la taxifoline génère une inhibition *in vitro* et *in vivo* des enzymes estérases et glutathion S-tansférase, synonyme de potentiel insecticide naturel.

Des terpènes issus d'huiles essentielles ont également été investigués pour leur capacité à induire la perte d'appétit sur *L. decemlineata*. Un total de 24 composés issus de plantes aromatiques méditerranéennes ont été testés, comprenant 8 hydrocarbures monoterpéniques, 9 monoterpènes oxygénés, 2 monoterpènes estérifiés, 3 hydrocarbures sesquiterpéniques et 2 sesquiterpènes oxygénés (Ortiz de Elguea-Culebras et al. 2017). Le sesquiterpène oxygéné, α -bisabolol, s'est montré le plus actif avec 96,3% d'inhibition suivi par le carvacrol, le terpinen-4-ol et le thymol avec respectivement, 90,9%, 87,1% et 81,5% d'inhibition. Ces différents résultats suggèrent la potentialité d'utilisation des composés purs comme insecticides végétaux.

Cependant, les extraits de plantes présentent généralement des activités plus complexes avec une multitude de composés, par rapport à des composés individuels. De plus, il existe des preuves que les constituants mineurs peuvent agir en synergie, améliorant ainsi l'effet des constituants majeurs à travers une variété de mécanismes. Les effets synergiques des mélanges complexes sont donc considérés comme importants dans la défense naturelle des plantes contre les ravageurs (Akhtar &

Isman 2013; Ioset et al. 2001). Ainsi, il est préférable de se tourner vers l'utilisation d'extraits de plantes plutôt que de composés purifiés.

C.2. Les stilbènes comme insecticide végétal

Ce projet s'intéressant globalement à l'activité antiparasitaire des stilbènes présents dans des extraits végétaux naturels, il est nécessaire de faire un état de l'art concernant l'activité insecticide de ces composés et sa potentielle application en tant qu'insecticide végétal.

Des études se sont focalisées sur la mise en évidence des activités insecticides de stilbènes purifiés. Un des premiers travaux porte sur des stilbènes prénylés isolés de *Lonchocarpus chiricanus*, un arbre endémique du Panama de la famille des Fabacées (Ioset et al. 2001). Le 3,5-diméthoxystilbène, les longistylinés C et D et les chiricanines A-E ont été testés contre les larves de *Aedes aegypti*, un moustique vecteur de maladies comme la fièvre jaune, la dengue ou le chikungunya. Le stilbène 3,5-diméthoxystilbene est le composé le plus toxique pour les larves (3 ppm), similaire à la roténone qui est le composé de référence, suivie par le longistylène C et le chiricacine A (6 ppm).

Une étude similaire portant sur l'action de stilbènes issus de l'arachide (cacahuète), *Arachis hypogaea*, contre le moustique *A. aegypti* a été réalisée (Sobolev et al. 2011). Certains composés comme le (*E*)-5-méthoxy-4'-stilbénol, le (*E*)-3-stibénol, la 3,5-*O*-diméthylpinosylvine, la 3-*O*-méthylpinosylvine et le ptérostilbène ont montré des activités larvicides avec une mortalité totale entre 23 et 64 µg/mL mais qui restent inférieures à l'insecticide de synthèse, le perméthrine (0,0056 µg/mL).

Des travaux portant sur l'étude de stilbènes contre *Drosophila melanogaster* ont mis en évidence la capacité de ces composés à agir comme perturbateurs de la mue de cet insecte via la modulation de récepteur des stéroïdes (Harmatha & Dinan 2003). Parmi les stilbènes les plus actifs, on note le resvératrol, l'ampélopsine B, l' α -viniférine et le miyabénol C ou encore le miyabénol A.

En outre, la combretastatine A-4, un stilbène composé de 4 fonctions méthoxy, a montré des activités insecticides contre le lépidoptère *Spodoptera litura* (Lv et al. 2014). Ce composé cause un retard de développement, une dissuasion alimentaire, et une mortalité totale à 500 mg/kg. Une étude préalable sur l'action de 25 stilbènes contre *Brontispa longissima*, un coléoptère ravageur des cocotiers et palmiers, avait déjà mis en évidence la forte activité insecticide de la combretastatine A-4 ainsi que de deux autres dérivés (Liu et al. 2013).

Ainsi, une grande diversité de stilbènes a montré des activités insecticides contre plusieurs ordres d'insectes (Coléoptères, Lépidoptères, Diptères). L'enjeu est également de voir si des extraits riches en stilbènes ont aussi la capacité à moduler la vie des insectes.

Un extrait méthanolique d'écorces de *Yucca periculosa* (Asparagacées), un arbre endémique du Mexique, riche en stilbènes a été étudié pour ses actions insecticides contre *Spodoptera frugiperda*, un lépidoptère ravageur de culture de maïs, mil, sorgho et coton (Torres et al. 2003). Les stilbènes mis en évidence sont le 4,4'-dihydroxystilbène, le resvératrol et le 3,3',5,5'-tétrahydroxy-4-méthoxystilbène. Les résultats montrent une mortalité larvaire supérieure à 60% dès 10 ppm (mg/L) et totale à 25 ppm pour l'extrait de *Y. periculosa*. L'inhibition de la pupation et de l'émergence des larves en adultes par l'extrait est totale à 50 ppm.

Une étude récente porte sur l'utilisation d'un extrait de sarment de vigne (*Vitis vinifera*) comme source de stilbènes pour lutter contre *Spodoptera littoralis*, un lépidoptère ravageur des Légumineuses et du coton (Pavela et al. 2017). L'extrait est majoritairement composé de l'*E-ε*-viniférine (11,8%), de vitisine B (5,9%) et de resvératrol (4,8%). Cet extrait de sarment montre une mortalité chronique de 57,3% pour une dose de 300 µg/cm² et une CI₅₀ de 164 µg/cm². Cependant, l'extrait ne montre pas d'activité de dissuasion alimentaire. Parmi les composés les plus actifs, on trouve la vitisine B avec une valeur de CI₅₀ pour la mortalité larvaire de 134 µg/cm². Ces travaux mettent également en évidence un effet de synergie entre la vitisine B et l'*E-ε*-viniférine et entre l'*E-ε*-viniférine et l'isohopéaphénol, mettant à nouveau en exergue la nécessité d'utiliser des extraits complexes plutôt que des molécules pures comme agent actif.

Ces deux études mettent ainsi en évidence la possibilité d'application d'extraits riches en stilbènes pour contrôler certains insectes. Ce projet va ainsi s'intéresser à la capacité d'un extrait de racine de vigne riche en stilbènes complexes à contrôler *L. decemlineata*.

Chapitre II. Caractérisation et activité insecticide de racines de vigne

A. Stratégie

Les études précédentes ont démontré la capacité d'extraits riches en polyphénols issus de coproduits viticoles et sylvicoles à inhiber le développement mycélien du mildiou de la vigne. Ces travaux ont ainsi montré la sensibilité que possède le pathogène *P. viticola* aux stilbènes, notamment les formes tétramériques de la vigne, ainsi que certains flavonoïdes du pin, ouvrant la possibilité à une valorisation de ces coproduits comme agent oomycide naturel.

A partir de ces résultats, l'idée d'une application diversifiée vers d'autres pathogènes peut être considérée. La sensibilité de certains ravageurs tels que les insectes aux stilbènes a permis d'envisager une étude d'investigation des capacités insecticides de ces composés. Une première approche de l'influence d'un extrait de sarment contre un insecte (*S. littoralis*), fruit d'une collaboration avec le Crop Research Institute (Roman Pavela, République Tchèque), a mis en exergue les aptitudes des stilbènes à perturber le développement de ce ravageur (Pavela et al. 2017). Les tétramères, peu présents dans les sarments, se sont ainsi révélés être les composés les plus toxiques, faisant écho à leurs propriétés antifongiques précédemment démontrées.

Afin de poursuivre dans ce sens, un nouveau projet basé sur l'application d'un extrait de vigne enrichi en stilbènes tétramériques contre un autre insecte, *L. decemlineata*, a été mis en place. L'objectif de cette étude repose sur l'élaboration d'un extrait riche en stilbènes complexes à partir de racine de vigne, connu pour être riche en tétramères, puis d'évaluer sa capacité à moduler la physiologie de ce ravageur des Solanacées. Des tests biologiques en laboratoire sur disques foliaires de pomme de terre permettront d'évaluer la toxicité, la capacité à inhiber le développement larvaire ainsi que la perte d'appétit causée par l'extrait et les molécules pures. Des essais en extérieur, s'apparentant à des tests sous serre, permettront de juger la capacité insecticide de l'extrait sur des plants entiers.

B. Design expérimental

B.1. Extraction

Le procédé d'extraction utilisé s'inspire de la méthodologie appliquée dans la précédente collaboration avec un mélange acétone-eau à 60/40 (v/v). Ce système avec un solvant plus apolaire (acétone) que

l'éthanol mais avec un volume d'eau plus important tend à être similaire aux précédents procédés utilisant l'éthanol-eau à 85/15 (v/v).

L'extraction a été réalisée sur 4 kg de racine de vigne avec un rapport poids massique de 1/10 générant un volume d'extraction de 40 L. Après concentration des solvants et lyophilisation de la phase aqueuse, un extrait brut est obtenu. Le dosage des stilbènes révélera une concentration dans l'extrait de 14% (m/m). Cet extrait était nettement moins riche en stilbènes totaux que l'extrait de sarment (27%) utilisé comme insecticide lors de la précédente collaboration.

Ainsi, la nécessité d'enrichir l'extrait a été adoptée à travers l'utilisation d'une colonne XAD. Ce système permet de retenir sur une résine les composés portant des noyaux aromatiques tels que les polyphénols au détriment d'autres composés comme les sucres ou les lipides. Techniquement, l'extrait est dissous dans un mélange méthanol-eau à 30/70 (v/v) puis déposé sur la résine XAD. La proportion massique d'extrait par rapport à la résine est de 1/40 soit par exemple 1g d'extrait pour 40 g de résine. Un lavage à l'eau permet d'éliminer les composés non retenus sur la résine. Une élution de nos composés d'intérêt a ensuite été réalisée avec l'acétone. L'extrait est à nouveau concentré puis lyophilisé permettant l'obtention d'un extrait enrichi en stilbènes.

B.2. Test insecticide

Différents tests biologiques ont été mis en place au sein de l'équipe de recherche du Crop Research Institute (République Tchèque) et plus particulièrement dans l'équipe Biologically Active Substances in Crop Protection, sous la direction du Dr. Roman Pavela.

Trois tests en laboratoire ont été réalisés avec pour vocation d'évaluer la capacité de l'extrait à causer une toxicité chronique chez les larves de *L. decemlineata*, à inhiber leur développement, ainsi qu'à générer une perte d'appétit.

- Le test de toxicité repose dans un premier temps sur l'application de l'extrait ou des molécules pures à une forte concentration donnée (100 µg/cm²) sur un disque foliaire de pomme de terre placé dans une boîte de Petri. Dix larves sont déposées et la mortalité est mesurée après 5 j de contact. Dans un deuxième temps, les composés causant une mortalité supérieure à 50% font l'objet d'une étude plus précise avec la détermination des doses létales à 50% et 90%. En ce sens, une gamme de concentration de l'extrait et des composés pures est réalisée permettant d'obtenir les données de toxicité chronique.

- Le test d'activité anti-appétence ou perte d'appétit repose à nouveau dans un premier temps sur l'application d'une dose unique permettant de sélectionner les molécules exposant une activité supérieure à 50%. Les gammes de concentrations permettent ensuite d'évaluer les concentrations provoquant 50% et 90% de dissuasion alimentaire. Le test est basé sur l'application de l'extrait ou des molécules pures sur un disque foliaire sur lequel trois larves sont déposées. Lorsque le témoin a consommé 90% du disque, le test se termine avec la mesure de l'aire des disques foliaires traités qui sont consommés par les larves. La comparaison des données permet d'établir un indice dissuasif d'alimentation et d'évaluer la perte d'appétit causée par l'extrait et les molécules pures.
- Le test d'inhibition de la croissance larvaire repose sur le même principe avec en premier lieu une application d'une dose fixe permettant d'évaluer la capacité globale de l'extrait et des composés à inhiber le développement. Pour cela, cinq larves sont pesées puis sont déposées sur le disque foliaire durant 5 j. Les larves sont à nouveau pesées en fin d'expérimentation et les résultats sont comparés au témoin, permettant d'obtenir un pourcentage d'inhibition du développement. La réalisation d'une gamme de concentration permet ensuite d'évaluer les concentrations causant 50% et 90% d'inhibition de la croissance larvaire (**Figure 41**).



Figure 41. Test insecticide : évaluation de l'inhibition de la croissance larvaire de *L. decemlineata* par un extrait enrichi en stilbènes de racine de vigne. Photos du Dr. Roman Pavela (Crop Research Institute, Prague, République Tchèque).

En outre, un test en condition semi-contrôlée a été initié afin d'évaluer la capacité de l'extrait à protéger des plants entiers de pomme de terre (**Figure 42**). Pour cela, une expérimentation en pot a été mise en place avec la mise en terre de plants de pomme de terre d'une trentaine de centimètres sur lesquels sont appliqués l'extrait à différentes concentrations. Cinquante larves sont déposées sur

chaque plant avec un temps de contact de 11 j. Afin d'éviter que la pluie ne perturbe l'expérimentation, des films transparents recouvrent les différents pots. Deux mesures sont effectuées avec la mortalité des larves après 10 j ainsi que l'aire des feuilles consommées permettant de révéler les dommages sur les plants.



Figure 42. Test insecticide : évaluation de la mortalité de *L. decemlineata* par un extrait enrichi en stilbènes de racine de vigne dans une expérimentation en pot. Photos du Dr. Roman Pavela (Crop Research Institute, Prague, République Tchèque).

Par ailleurs, un test de toxicité de l'extrait sur un organisme non-ciblé du sol a été mis en place. Le choix de l'organisme s'est porté sur le ver de terre (*Eisenia fetida*) avec la préparation d'un sol artificiel comprenant différentes concentrations d'extrait. Dix vers de terre adultes ont été déposés. La mortalité des vers est mesurée après 3, 7 et 14 j d'incubation permettant de visualiser l'effet de l'extrait au cours du temps sur ces organismes non ciblés.

C. Résumé des résultats

L'extrait de racine de vigne a été analysé par CLUHP-DAD-SM avec comme référence la banque de données du laboratoire constituée des stilbènes isolés et identifiés dans les précédents travaux. Ainsi, 12 stilbènes ont été dosés (picéide, picéatannol, resvératrol, ampélopsine A, pallidol, ϵ -viniférine, ω -viniférine, miyabénol C, hopéaphénol, isohopéaphénol, vitisine A, vitisine B) permettant d'estimer une concentration à 25% des stilbènes dans l'extrait. Les composés majoritaires sont la vitisine B (11,68%), la vitisine A (4,45%) et l'hopéaphénol (3,29%). Ainsi, comme souhaité, les tétramères sont les stilbènes principaux de cet extrait de racines de vigne enrichi et permet d'envisager une activité insecticide significative.

Les tests en laboratoire effectués en boîte de Petri sur disques foliaires de pomme de terre ont été une première approche pour évaluer les aptitudes de l'extrait de racine de vigne ainsi que les molécules pures (vitisine A, vitisine B, hopéaphénol, ϵ -viniférine, ampélopsine A et resvératrol) à moduler la physiologie des larves de *L. decemlineata*.

La première étape de ces tests constituait l'application d'une dose unique de 100 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ permettant d'apprécier globalement l'activité de l'extrait et des molécules pures. Concernant l'extrait, cette forte concentration permet de causer une mortalité de 100% des larves de *L. decemlineata*, une inhibition de croissance de 68% et un indice de dissuasion alimentaire de 44%. La recherche des concentrations efficaces a montré que l'extrait cause 50% et 90% de mortalité à 48,7 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et 144,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivement, et une inhibition du développement de 50% et 90% à 50,1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ et 161,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ respectivement. L'activité anti-appétente étant faible, les concentrations efficaces pour l'extrait n'ont pas été déterminées.

Concernant les molécules pures, l'application d'une forte concentration met en évidence une mortalité larvaire entre 88 et 100% pour la vitisine A, la vitisine B, l'hopéaphénol et l' ϵ -viniférine. L'inhibition de croissance n'a pu être déterminée pour la vitisine A et vitisine B du fait de la forte mortalité observée lors de ce test, alors que les autres composés oscillent entre 50 et 75% d'inhibition. Enfin, la dissuasion alimentaire est comprise entre 70 et 93% pour les différentes molécules pures, excepté le resvératrol à 36%. Globalement, les stilbènes tétramériques et dimériques sont actifs contre *L. decemlineata*. Dans un second temps, la détermination des doses efficaces a notamment permis de mettre en exergue la forte activité insecticide de deux molécules, la vitisine A et la vitisine B. La vitisine A cause 50% de mortalité larvaire, d'inhibition du développement et de dissuasion alimentaire entre 18 et 24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, puis à 90% entre 32 et 70 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. La vitisine B cause, quant à elle, 50% de mortalité larvaire, d'inhibition du développement et de dissuasion alimentaire entre 19 et 35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, puis à 90% entre 48 et 147 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. L'activité de ces deux tétramères aux aptitudes insecticides avérées, et qui sont les deux composés majoritaires de l'extrait, permet d'expliquer l'activité de l'extrait de racine de vigne contre cet insecte ravageur.

Les tests en pots extérieurs visaient à explorer la capacité de l'extrait à protéger des plants de pomme de terre entiers face à une cinquantaine de larves. Les résultats montrent que l'extrait ajusté à une concentration de 3% cause une mortalité larvaire proche de 50% au bout de 5 j, et supérieure à 80% après 10 j. De plus, l'extrait à 3% permet de contenir les dommages causés par les larves sur les feuilles avec une limitation de l'aire consommée à moins de 15%. Ces résultats sont similaires à un insecticide commercial permettant de mettre en lumière la forte activité insecticide de l'extrait.

Enfin, le test de toxicité de l'extrait sur les vers de terre visait à montrer un potentiel impact sur des organismes non ciblés du sol. Ainsi, aucun effet toxique n'a été mis en évidence. Au contraire, un produit commercial a révélé une mortalité totale des vers de terre après 14 j. En ce sens, l'extrait de racine de vigne ne semble pas avoir d'effets secondaires sur l'écosystème du sol au contraire de produits déjà sur le marché.

L'ensemble de ces résultats tendent à montrer l'efficacité de l'extrait de racine de vigne riche en stilbènes complexes contre un ravageur comme *L. decemlineata*. Présentant des caractéristiques toxiques contre les stades larvaires de cet insecte ainsi qu'une absence d'effets indésirables sur un organisme non ciblé du sol, cet extrait possède des caractéristiques intéressantes en vue d'une valorisation en tant qu'insecticide naturel.

D. Publication

Les résultats ont été rédigés sous forme d'un article scientifique intitulé « Stilbenes from grapevine root : a promising natural insecticide against *Leptinotarsa decemlineata* », qui a été soumis le 2 Octobre 2017 dans *Journal of Pest Science*, puis accepté le 23 Janvier 2018 et publié le 1 Février 2018.

Stilbenes from grapevine root: a promising natural insecticide against *Leptinotarsa decemlineata*

Julien Gabaston^a, Toni El Khawand^a, Pierre Waffo-Teguo^a, Alain Decendit^a, Tristan Richard^a,
Jean-Michel Mérillon^{a*}, Roman Pavela^b

^aUniversité de Bordeaux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de Recherche Œnologie EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique (Gesvab) - Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, CS 50008 - 210, chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France

^bCrop Research Institute, Research Team – Biologically Active Substances in Crop Protection, Drnovska 507, 161 06 Prague 6 Ruzyně, Czech Republic

*Corresponding author: jean-michel.merillon@u-bordeaux.fr

ABSTRACT

Stilbenes are phenolic compounds which are produced in large amounts in vine and are involved in plant defense as phytoalexins. Oligomeric forms have recently proven to be the most active compounds against a wide range of parasites such as fungi, bacteria or algae. The aim of this study was to investigate the activity of a grapevine root extract which is a stilbene oligomer pool against *Leptinotarsa decemlineata*, a major pest of Solanaceae crops. Analysis by UHPLC-DAD-MS of the stilbene-enriched extract obtained from grapevine root (Riparia Gloire de Montpellier rootstock) highlighted twelve stilbenes at 25 % (w/w). The major stilbenes found in root extract were isolated such as the tetramers vitisin B, vitisin A and hopeaphenol; the dimers ampelopsin A and *E*- ϵ -viniferin and the monomer *E*-resveratrol. The insecticidal effects of this extract as well as the main compounds were investigated against *L. decemlineata* larvae. The extract caused chronic toxicity, inhibited larval development and, to a lesser extent, inhibited food intake. The high concentrations of vitisin A and vitisin B in grapevine root contributed to this effect as they are the most toxic compounds. Outdoor pot experiments revealed the efficacy of stilbene-enriched extract with high mortality of *L. decemlineata* and protection of potato plants. The extract also revealed an absence of toxicity against non-targeted organisms such as earthworms (*Eisenia fetida*). Thus, these results strongly suggest that grapevine roots are a promising source of bioactive stilbenes for the development of natural insecticides.

Keywords: Botanical insecticide, Solanaceae, Colorado potato beetle, vine root extract, stilbene, vitisins

Key message:

- Stilbene-enriched extract from grapevine root was found to contain twelve stilbenes, mainly tetramers as vitisin A and vitisin B.
- Root extract exhibited chronic toxicity, antifeedant ability and growth inhibition in *Leptinotarsa decemlineata* larvae. The most active compounds are vitisin A and vitisin B.
- Root extract showed insecticidal activity against *L. decemlineata* larvae in pot experiments as well as an absence of effect on non-targeted organisms such as earthworms.
- Grapevine root is an inexpensive source of bioactive stilbenes and holds promising potential for developing a natural safe insecticide.

INTRODUCTION

Grapevine is one of the most widely cultivated plants in the world, producing nearly 80 million tons of berries that are used for making wine, juice, table grapes and dried fruit. Grape berries are known to be rich in polyphenols that have organoleptic properties, can be used for coloring food and are beneficial for health (Xia et al. 2010; Giovinazzo and Grieco 2015) Among the different classes of polyphenols, stilbenes have been particularly studied since the 1990s for their presence in wine and their potential role in reducing coronary heart disease (Renaud and De Lorgeril 1992). They are also claimed to have anticancer, neuroprotective and anti-aging effects (González-Sarrías et al. 2011; Richard et al. 2011; Soeur et al. 2015).

Stilbenes are non-flavonoid polyphenolic compounds with a characteristic C6-C2-C6 structure allowing *cis* and *trans* isomeric forms to be generated (Pawlus et al. 2012; Rivière et al. 2012). They are present in grape berries at a concentration close to a few milligrams per kilogram, predominantly in monomeric forms (Ali and Strommer 2003; Vitrac et al. 2005). Recent metabolomic studies have demonstrated the presence of the oligomeric forms in smaller amounts than the monomeric ones (Flamini et al. 2013). Besides their presence in berries, they are mostly present in the vegetative parts of the grapevine such as leaves, canes, wood and roots (Mattivi et al. 2011; Gabaston et al. 2017). Indeed, the average stilbene concentration in the whole plant is close to a few grams per kilogram, i.e. about 1000-fold more than in berries (Lambert et al. 2013)

Stilbenes are known to play a key role in plant defense as phytoalexins against the attack of several pathogens. Recent studies have reported the strong bioactivities of complex stilbenes. Indeed, the tetramers vitisin B and hopeaphenol from grapevine cane extract have an antifungal action against *Plasmopara viticola* (Schnee et al. 2013). Oligomeric forms such as miyabenol C (trimer) and isohopeaphenol (tetramers) have been reported to act as stress metabolites in fungi-infected leaves (Mattivi et al. 2011). In addition, miyabenol C, isohopeaphenol, vitisin A and vitisin B have demonstrated a strong reduction of the fungal growth responsible for grapevine wood decay (Lambert et al. 2012). These various results therefore demonstrate the high value of complex stilbenes and underline the importance of finding sustainable sources of them. A recent study has shown that grapevine root and wood are an important pool of tetramers such as vitisin A, vitisin B or hopeaphenol and have strong antifungal activities, demonstrating the potential of these resources (Gabaston et al. 2017).

As many vineyard practices are required on grapevine such as pruning and stock replacement, a very large amount of by-products is generated. For example, France generates about 400,000 tons of grapevine wood and roots each year (FranceAgriMer 2012). Usually neglected or burned as an energy source, these non-negligible resources of bioactive compounds could be valorized as natural pesticides.

Chemical insecticides have been used for several decades without any long-term vision of their potential harm. Indeed, such synthetic insecticides have led to the development of resistance, a negative impact on the ecosystems and on human health (Pavela 2016). According to the World Health Organization (WHO), the use of synthetic pesticides causes nearly 3 million cases of poisoning with 250 000 deaths each year (Stoytcheva 2011). Consequently, there is a new impetus for research to find alternatives and develop products that are environmentally friendly and safe to humans, such as botanical insecticides (BIs). These natural products most often involved in plant defenses are less toxic and are biodegradable with a wide range of actions, suggesting a promising strategy for plant protection (Isman 2015). Among these natural products, stilbenes have already shown their insecticidal activities and could constitute a potential source of bioactive compounds for use as natural insecticides (Torres et al. 2003; Lv et al. 2014; Pavela et al. 2017).

The aim of this work was to investigate the activity of a stilbene-enriched extract obtained from grapevine root as well as its major compounds against *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae). *L. decemlineata*, also known as Colorado potato beetle, infests plants of the Solanaceae family exclusively and is a major phytophagous pest of potato crops. Having a damaging effect in the larval and adult stages and a high fecundity, it can destroy an entire crop of potatoes (Alyokhin et al. 2008; Pavela 2010). Since it is known to develop resistance to chemical insecticides, alternative or complementary strategies to manage it need to be developed by using secondary plant metabolites such as stilbenes from natural extracts. Thus, we explored the chronic toxicity, antifeedant ability and growth inhibition of the extract as well as mortality in pot experiments and toxicity to a non-target organism.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Grapevine roots were collected in the “Château Rochemorin” vineyard in the region of Bordeaux (44°43'17"N 0°33'45"W, Martillac, France) in January 2017 with an amount estimated at 100 kg. They were obtained from Riparia Gloire de Montpellier rootstocks which were planted in 1985. Root specimens were deposited in the Molécules d'Intérêt Biologique (MIB-GESVAB) laboratory at ISVV (Villenaved'Ornon, France).

Stilbene-enriched extract

Roots were ground and dried for one month in an oven at 30 °C. Extraction was performed on 4 kilograms with acetone/water mixture (6:4; v/v) twice at room temperature for a total volume of 40 L. After filtration, acetone was removed by evaporation under reduced pressure and the aqueous phase was lyophilized to produce 515 g of brown powder. The crude extract was deposited on an Amberlite XAD-7 column and washed with water. The column was then eluted with acetone to obtain 220 g of a stilbene-enriched fraction.

Chemicals and Standards

LC-MS-grade acetonitrile (VWR, Fontenay-sous-bois, France) and formic acid (Fisher Scientific, Loughborough, U.K.) were used for LC-MS analysis. For isolation, HPLC-grade acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO). Water was purified using an Elga water purification system (High Wycombe, U.K.). HPLC-grade methanol was obtained from Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

Stilbenes were isolated and purified as standards from stilbene-enriched extract: *E*-piceid, ampelopsin A, *E*-piceatannol, pallidol, *E*-resveratrol, *E*-parthenocissin A, hopeaphenol, isohopeaphenol, *E*- ϵ -viniferin, *E*- ω -viniferin, *E*-miyabenol C, vitisin A and vitisin B. The preparative HPLC was a Varian Pro Star equipped with an Agilent Zorbax SB-C18 PrepHT column (250 mm x 21.2 mm, 7 μ m). Root extract was solubilized at 50 mg mL⁻¹ in MeOH-H₂O (50/50; v/v) and filtered on PTFE 0.45 μ m. Extract was eluted with a flow rate of 17 mL min⁻¹ with water acidified with 0.025% TFA (solvent A) and acetonitrile acidified with 0.025% TFA (solvent B) with the following gradient: 20% B (0–5 min), 20 to 45% B (5–35 min), 45 to 55% B (35–38 min), 55 to 100% B (38–40 min), 100% B (40–45 min) 100 to 40% B (45–48 min). Chromatographic peaks were manually collected just after the UV detector. Purity of these compounds was measured by UHPLC-DAD and was estimated to be \geq 90%. All purified standards were characterized by NMR and the data were compared with those of the laboratory library.

UHPLC-MS analysis

The UHPLC apparatus was an Agilent 1290 Series from Agilent Technologies (Santa Clara, CA). It was equipped with an auto sampler module, a binary pump with a degasser, a column heater/selector, an Agilent Zorbax SB-C18 (100 mm x 2.1 mm x 1.8 μ m) column and an UV-VIS-DAD. Samples were eluted at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹ with water acidified with 0.1% formic acid (solvent A) and acetonitrile acidified with 0.1% formic acid (solvent B) using the following gradient: 17% B (0–0.4 min), 17 to 30% B (0.4–4.4 min), 30 to 38% B (4.4–7.4 min), 38 to 50% B (7.4–9.0 min), 50 to 100% B (9.0–10.0 min), 100% B (10.0–11.0 min), 100 to 17% B (11.0–11.2 min). The UHPLC apparatus was coupled with an Esquire 6000 ion trap mass spectrometer using an ESI source (Bruker-Daltonics, Billerica, MA). Alternating negative and positive mode was performed for analysis. Grapevine root extract was dissolved in MeOH-H₂O mixture (1/1, v/v) at 1 mg mL⁻¹. Analyses were conducted in triplicate. Standards isolated by preparative HPLC were injected with a concentration range of 1, 5, 20, 50, 100 μ g mL⁻¹ in quintuplicate to obtain calibration and equation curves. Bruker Data Analysis 3.2 software was used to study data.

Test organisms

The second instar larvae of Colorado potato beetle – *L. decemlineata* were obtained from a colony reared on potato (*Solanum tuberosum*) in an environmental chamber (L16:D8, 24 \pm 1 °C). The colony was established from eggs collected from a potato field at a locality in Prague, Czech Republic.

Adult earthworms *Eisenia fetida* Savigny (Oligochaeta, Lumbricidae) weighing 350–500 mg and with well-developed clitella were obtained from an established laboratory colony (>20 generations; out-crossed once) at the Crop Research Institute, Czech Republic. They were kept in artificial soil according to OECD guidelines (OECD 1984) at room temperature (20 ± 1 °C). The soil was composed of (dry weight) 10% ground sphagnum peat (<0.5 mm), 20% kaolinite clay (>50% kaolinite), and 70% fine sand. The pH of the soil was adjusted to 6.0 ± 0.5 using a small amount of calcium carbonate. The soil was mixed with decayed plant residues and decomposed pig manure. Soil maximum water-holding capacity (35%) was monitored every week.

Bioassays

Toxicity

The toxicity of the extract or stilbenes, measured as mortality after 5 days, was determined by ingestion to early second instar larvae of *L. decemlineata*. The highest tested concentration of $100 \mu\text{g cm}^{-2}$ was applied using an electronic micropipette onto the potato leaf discs with the extract or tested compounds dissolved in methanol (1 mg in 100 μL MeOH). The obtained stock solutions of the extract or substances were applied using an electronic pipette, uniformly at the concentration of $10 \mu\text{L cm}^{-2}$ of the disc area, corresponding approximately to $100 \mu\text{g cm}^{-2}$ of the extract or substances. After the solvent evaporated, the potato discs were placed in Petri dishes (6 cm in diameter) with an agar bottom layer (height 3 mm) to maintain stable moisture, and subsequently, always 10 newly ecdysed second instar larvae of *L. decemlineata* were transferred to the leaf discs. The larvae were thus fed on contaminated food *ad libitum* for 5 days. Larval mortality was determined after 5 days. The compounds that caused >50% mortality were chosen to determine lethal concentrations. Diets contaminated with extracts or stilbenes in 5 concentrations (200, 150, 80, 50 and $30 \mu\text{g cm}^{-2}$ – only for ampelopsin A, for others 90, 70, 50, 30 and $15 \mu\text{g cm}^{-2}$) were administered to *L. decemlineata* larvae to determine lethal concentrations. The diet was prepared identically as described above. The experiment was repeated three times (30 larvae were tested per concentration). The experiment was placed in a growth chamber (L16:D8, 24 ± 1 °C). When the larvae did not respond to prodding with forceps, they were considered dead.

Antifeedant activity

The no-choice test was used to determine antifeedant activity, since its design most closely approximates a practical application. The stilbene extract dissolved in methanol as described above was applied to the potato leaf discs (1 cm in diameter). The concentration equivalent to an application of $100 \mu\text{g cm}^{-2}$ was used as the highest tested concentration. After drying, one contaminated disc was placed on moist filter paper in a Petri dish (6 cm in diameter). Subsequently, three *L. decemlineata* recently moulted second instar larvae were placed at the centre of every Petri dish. Discs to which only the solvent had been applied were used as control. The entire experiment was done five times. The experiment was terminated when the control larvae had consumed approximately 90% of the leaf discs (about 6 hours). The Petri dishes were placed in a growth chamber (L16:D8, 25 ± 1 °C). The area of the leaf discs consumed by the larvae was then assessed and compared with control discs using a screener software program (unpublished) to determine antifeedant activity.

Feeding Deterrence Index (FDI) was calculated:

$\text{FDI (in \%)} = [(C-T)/(C + T)] * 100$, where C and T are the control and treated leaves consumed by the insect (Pavela 2011).

Compounds that caused >50% FDI were chosen to determine effective concentrations. Leaf discs contaminated with extracts or stilbenes in five concentrations ($100, 80, 50, 30$ and $15 \mu\text{g cm}^{-2}$) were administered to *L. decemlineata* larvae using the same method as described for the highest tested concentration.

Larval growth inhibition

Second instar larvae of *L. decemlineata* were fed on leaf discs (prepared using the same method as described in “Toxicity”) contaminated with various concentrations of the extract or pure substances ($100, 70, 40, 20$ and $10 \mu\text{g cm}^{-2}$). Five larvae were placed in a Petri dish (6 cm in diameter) with a 3-mm agar layer to maintain a stable moisture level. The larvae were thus fed on contaminated food *ad libitum* for 5 days. Before conducting the experiment and 5 days later, larval weight was determined and the growth inhibition index was calculated according to the determined weight increments using the formula: $\text{GI (\%)} = 100 - [(T/C) * 100]$, where C and T

are weight increments of the larvae that consumed the control and contaminated diets, respectively. The entire experiment was done five times. The Petri discs were placed in a growth chamber (L16:D8, 25 ± 1 °C).

Pot experiment

To verify the potential of utilizing the extract for potato protection against *L. decemlineata* larvae, we tested its efficacy on larval mortality and plant damage in an outdoor pot experiment. Potato plants were planted in pots 30 cm in diameter and 45 cm tall, with standard peat substrate at pH 6.5. The plants were placed on outdoor experimental beds at the Crop Research Institute, Czech Republic. Plants 25-35 cm high with 3-4 shoots were used for the experiment. Immediately before the experiment, the beds were covered with transparent foil to make sure that rain did not affect it. Mean daily temperature during the experiment (July) ranged between 14.4 °C and 24.8 °C, soil moisture was 30.1% – 34.5% and mean daily air humidity ranged from 57.9% to 80.1%. The experiment lasted 11 days.

Fifty second instar larvae of *L. decemlineata* were transferred to every plant using a fine brush 3 to 5 hours before application. The extract was dissolved in water to obtain 3.0%, 1.0% and 0.5% (w/v) of the solution. The commercial insecticide Vaztak (active substance – *alpha*-cypermethrin 50 g L⁻¹, BASF, Czech Republic) was used as positive control at a concentration of 0.1% (v/v), equivalent to 0.005% (w/v) of the active substance *alpha*-cypermethrin. Fifty mL of the application liquid were applied per m⁻², approximately equivalent to 500 L ha⁻¹. Negative control was treated only with water. On day 10, the number of larvae on the plants was counted and plant damage by feeding was estimated. The following scale was used to evaluate plant damage in terms of consumed area of leaves: 1 = up to 15%, 2 = from 15 to 25%, 3 = from 25 to 50%, 4 = from 50 to 75%, 5 = more than 75%.

Earthworm acute toxicity test

A standard test to determine the toxicity of extract and compounds to *Eisenia fetida* in artificial soil according to OECD methods (1984) was used to determine the effect of the extract on a non-targeted soil organism. The soil was prepared by adding different concentrations of the extract (1000, 500 and 250 mg kg⁻¹ of dry weight basis soil) and the commercial insecticide Vaztak (active ingredient: *alpha*-cypermethrin 50 g L⁻¹, BASF, Czech Republic) was used as positive control at the concentrations of 1000, 500 and 250 µL kg⁻¹ (v/v), equivalent to *alpha*-cypermethrin 50.0, 25.0 and 12.5 mg kg⁻¹ of dry weight basis soil. The relevant amount of the extract or insecticide was carefully mixed into the soil as an aqueous solution (only water as control) to obtain the working concentration of the pesticide, and the soil was transferred into glass jars.

Ten adult earthworms were placed in glass containers (1 L) filled with the test substrate (650 g) and the test containers were enclosed with a polythene sheet with integrated gauze to prevent the worms from escaping and to ensure optimal ventilation. After 3, 7 and 14 days of incubation, living worms were sorted by hand; the test endpoint was mortality. The tests were repeated four times. The glass containers were placed in a growth chamber in an artificial climate (L16:D8, 20 ± 1 °C).

Statistical analysis

When the mortality of control reached 20%, the observed mortality was corrected using Abbott's formula (Abbott 1925). Probit analysis of lethal concentrations for mortality or effective concentrations for FDI or GI data was conducted to estimate the LC₅₀₍₉₀₎ and EC₅₀₍₉₀₎ values and associated 95% confidence limits for each treatment (Finney 1971). The Shapiro-Wilks test to detect all departures from normality was used before ANOVA test. Percentages were transformed using the arcsine–square-root (arcsine[√]) transformation before running an ANOVA (Gomez and Gomez 1984). Treatment differences were determined by Tukey's test ($P \leq 0.05$).

RESULTS

Characterization of stilbene-enriched extract

Stilbene-enriched extract from grapevine root was characterized by UHPLC-DAD-MS. Twelve stilbenes were identified: *E*-piceid, ampelopsin A, *E*-piceatannol, pallidol, *E*-resveratrol, hopeaphenol, isohopeaphenol, *E*-ε-viniferin, *E*-miyabenol C, *E*-ω-viniferin, vitisin A and vitisin B (**Figure 1, Supplementary data**).

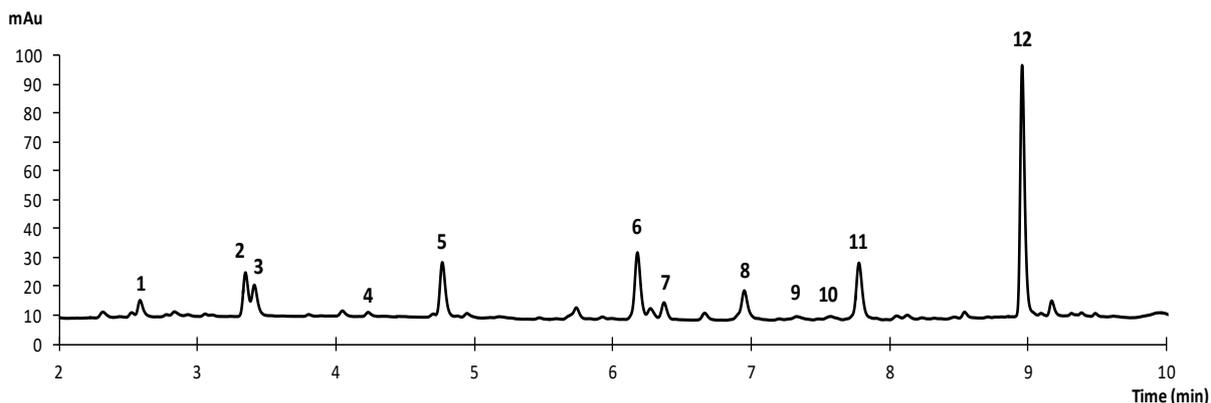


Fig. 1 UHPLC-DAD chromatogram of stilbene-enriched extract at 280 nm. (1) *E*-piceid, (2) ampelopsin A, (3) *E*-piceatannol, (4) pallidol, (5) *E*-resveratrol, (6) hopeaphenol, (7) isohopeaphenol, (8) *E*- ϵ -viniferin, (9) *E*-miyabenol C, (10) *E*- ω -viniferin, (11) vitisin A, (12) vitisin B.

The main compounds were the tetramers vitisin B (11.68 %, w/w), vitisin A (4.45 %, w/w) and hopeaphenol (3.29 %, w/w). Dimeric stilbenes such as ampelopsin A (1.71%, w/w) and *E*- ϵ -viniferin (0.91 %, w/w) were also present to a lesser extent. The stilbene-enriched extract contained 25.03 % (w/w) of total stilbenes (**Table 1**).

Table 1 UHPLC-MS data and stilbene concentrations in grapevine root extract.

peaks	compounds	t_R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS fragments	Concentration w / w (in %)
1	<i>E</i> -piceid	2.6	389	227	0.26
2	ampelopsin A	3.4	469	451, 375, 363, 357, 347, 281	1.71
3	<i>E</i> -piceatannol	3.5	243	225, 201, 183, 175, 157, 141	0.89
4	pallidol	4.3	453	435, 404, 359, 265	0.24
5	<i>E</i> -resveratrol	4.8	227	185, 143	0.58
6	hopeaphenol	6.2	905	811, 717, 611, 451, 357	3.29
7	isohopeaphenol	6.4	905	811, 717, 675, 611, 421, 357	0.86
8	<i>E</i> - ϵ -viniferin	7.0	453	435, 411, 369, 359, 347, 265	0.91
9	<i>E</i> -miyabenol C	7.4	679	661, 637, 573, 479, 451, 345	0.12
10	<i>E</i> - ω -viniferin	7.6	453	435, 411, 395, 369, 359, 347, 333	0.04
11	vitisin A	7.8	905	811, 799, 454, 451, 439, 359	4.45
12	vitisin B	9.0	905	887, 811, 799, 557, 545, 451, 439, 359, 347	11.68
Total					25.03%

Toxicity

Extract and major stilbenes obtained from grapevine root demonstrated chronic toxicity against *L. decemlineata* larvae. Extract as well as the main compounds (vitisin A, vitisin B, hopeaphenol and *E*- ϵ -viniferin) produced mortality between 88 and 100% at 100 $\mu\text{g cm}^{-2}$. Measurement of lethal concentrations causing 50 and 90% of larval mortality exhibited that vitisin A (22.4 and 42.9 $\mu\text{g cm}^{-2}$, respectively) and vitisin B (19.2 and 48.7 $\mu\text{g cm}^{-2}$, respectively) were the most active compounds (**Table 2**).

Table 2 Chronic toxicity of an extract and major stilbenes obtained from grapevine root on *Leptinotarsa decemlineata* 2nd instar

Compounds	Mortality (%) 100 µg cm ⁻² *	LC ₅₀ (µg cm ⁻²)	CI ₉₅	LC ₉₀ (µg cm ⁻²)	CI ₉₅	Chi
vitisin A	100.0±0.0	22.4	17.2-28.6	42.9	38.7-46.8	0.072
vitisin B	100.0±0.0	19.2	15.1-25.5	48.7	39.9-52.3	1.216
<i>E-ε</i> -viniferin	100.0±0.0	42.1	35.6-45.8	72.1	65.9-83.5	0.639
hopeaphenol	88.3±1.8	46.7	42.9-58.7	125.2	118.7-132.2	2.586
ampelopsin A	46.7±2.9	102.9	86.8-122.8	218.7	182.6-239.7	0.217
<i>E</i> -resveratrol	32.7±5.3	>200				
extract	100.0±0.0	48.7	31-9-52.3	144.3	112.5-159.8	1.555
control	0.0±0.0					

*Average mortality achieved on 5th day after application of highest test concentration (100 µg cm⁻²). Concentrations - LC₅₀ (LC₉₀) in µg cm⁻² causing 50% (90%) mortality of larvae on 5th day after application. CI₉₅—95% confidence intervals, activities of extract and compounds are considered significantly different when 95% CI fails to overlap. Chi-squared value, significant at P<0.05 level.

Antifeedant activity

Grapevine root extract and all tested stilbenes caused inhibition of food intake. Vitisin A, vitisin B, *E-ε*-viniferin, hopeaphenol and ampelopsin A showed a feeding deterrent index (FDI) between 70 and 93 % while extract exhibited values less than 50%. Based on the effective concentrations, vitisin A with EC₅₀ and EC₉₀ at 23.7 and 69.5 µg cm⁻², respectively, and vitisin B with EC₅₀ and EC₉₀ at 34.5 and 104.6 µg cm⁻², respectively, were the most antifeedant substances (**Table 3**).

Table 3 Feeding deterrent index (FDI) of an extract and major stilbenes obtained from grapevine root for *Leptinotarsa decemlineata* 2nd instars

Compounds	FDI (%) 100 µg cm ⁻² *	EC ₅₀ (µg cm ⁻²)	CI ₉₅	EC ₉₀ (µg cm ⁻²)	CI ₉₅	Chi
vitisin A	92.3±3.2	23.7	18.9-29.7	69.5	62.3-83.5	5.509
vitisin B	91.6±4.3	34.5	29.9-42.3	104.6	97.8-144.5	3.772
<i>E-ε</i> -viniferin	73.5±5.2	62.9	55.4-72.7	177.9	147.7-215.6	0.575
hopeaphenol	70.9±3.7	49.1	41.7-58.6	216.7	148.3-233.3	1.176
ampelopsin A	78.4±3.30	42.1	36.3-49.2	171.7	158.2-212.7	0.370
<i>E</i> -resveratrol	35.8±2.6	>100				
extract	44.2±5.2	>100				

*Average feeding deterrent index (in %) after application of highest test concentration (100 µg cm⁻²). Effective concentration - EC₅₀ (EC₉₀) in µg cm⁻² causing 50% (90%) feeding deterrence of *L. decemlineata* larvae. CI₉₅—95% confidence intervals, activities of extract and compounds are considered significantly different when 95% CI fails to overlap. Chi-squared value, significant at P<0.05 level.

Larval growth inhibition

Both the stilbene-enriched extract and pure compounds inhibited larval growth (GI) by > 50%. Owing to the high mortality of the larvae at the fixed concentration (100 µg cm⁻²) of vitisin A and vitisin B, it was not possible to measure a percentage of growth inhibition on the 5th day. Concerning the effective concentrations, the most significant compound was vitisin A, for which EC₅₀ and EC₉₀ values were 18.2 and 32.5 µg cm⁻², respectively (**Table 4**).

Table 4 Growth inhibition of an extract and major stilbenes obtained from grapevine root on *Leptinotarsa decemlineata* 2nd instars

Compounds	GI (%) 100 µg cm ⁻² *	EC ₅₀ (µg cm ⁻²)	CI ₉₅	EC ₉₀ (µg cm ⁻²)	CI ₉₅	Chi
vitisin A	ND	18.2	16.5-20.3	32.5	27.9-39.9	2.065
vitisin B	ND	33.4	26.1-36.9	146.7	121.3-155.6	0.661
<i>E-ε</i> -viniferin	73.5±4.2	69.4	60.2-83.1	178.5	135.4-198.5	3.584
hopeaphenol	62.3±3.2	90.9	82.3-132.3	478.2	395.8-501.5	0.021
ampelopsin A	52.3±5.2	93.6	82.9-123.8	623.4	523.8-711.9	0.262
<i>E</i> -resveratrol	62.6±3.1	75.1	65.5-89.5	218.7	162.8-251.8	0.047
extract	68.4±3.2	50.1	48.6-67.8	161.8	154.9-175.5	2.317

*Average growth inhibition (in %) on 5th day after application of highest test concentration (100 µg cm⁻²). ND = could not be determined owing to high mortality of larvae. Effective concentrations - EC₅₀ (EC₉₀) in µg cm⁻² causing 50% (90%) growth inhibition of *L. decemlineata* larvae compared to control. CI₉₅—95% confidence intervals, activities of extract and compounds are considered significantly different when 95% CI fails to overlap. Chi-squared value, significant at P<0.05 level.

Pot experiment

The stilbene-enriched extract at 3% caused > 50% of *L. decemlineata* larvae mortality at day 5 and up to 80% at day 10, values similar to those of the commercial insecticide (positive control). The leaf damage, i.e. consumed area, caused by larvae was limited to 15% by extract at 3%, which is more powerful than the positive control (**Table 5**). No changes in color or any degradation in plant tissues that could be considered as a sign of phytotoxicity after application of the extracts were found during the experiment.

Table 5 Effect of grapevine root extract on plant damage and mortality of *Leptinotarsa decemlineata* larvae in pot experiment

variant	Average number of larvae per plant			Mortality (% cor. by Abbott)		Leaf damage by larvae		
	Before treatment	5 th day	10 th day	5 th day	10 th day	Before treatment	5 th day	10 th day
extract 3%	50.0±0.0	24.5±2.2 ^b	7.9±3.2 ^a	50.2±4.7 ^c	82.8±6.9 ^c	1.0±0.0	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a
extract 1%	50.0±0.0	35.0±2.5 ^c	16.7±3.6 ^b	28.9±5.1 ^b	63.9±7.9 ^b	1.0±0.0	1.3±0.4 ^a	1.5±0.5 ^a
extract 0.5%	50.0±0.0	42.5±3.2 ^d	33.0±2.3 ^c	13.7±5.7 ^a	28.9±5.4 ^a	1.0±0.0	1.5±0.5 ^a	2.0±0.7 ^a
positive control	50.0±0.0	7.1±3.3 ^a	5.7±2.4 ^a	85.7±6.8 ^d	87.5±5.4 ^c	1.0±0.0	1.3±0.4 ^a	1.5±0.5 ^a
negative control	50.0±0.0	49.2±0.8 ^e	46.5±1.1 ^d	(1.6±1.4)*	7.0±2.0)*	1.0±0.0	3.0±0.0 ^b	4.0±0.7 ^b
ANOVA*	NS	4, 15;	4, 15;	3, 12;	3, 12;	NS	4, 15;	4, 15;
<i>Df</i> ; <i>p</i> ; <i>F</i>		0.000;	0.000;	0.000;	0.000;		0.000;	0.000;
		120.37	122.11	98.89	49.43		15.45	13.75

Mean data (± S.D.) within a column followed by same letter do not differ significantly according to least significant difference (Tukey's) test at P < 0.05. (% = arc sine transformed data). *ANOVA parameters; *Df* - total degrees of freedom; *F*-value; *p*-significantly level. Negative control = water; positive control = Vaztak (active substance – *alpha*-cypermethrin 50 g L⁻¹).

*Mortality observed in negative control.

Earthworm acute toxicity

After 3, 7 and 14 days, no toxic effects were observed in *Eisenia fetida* by extracts at 250, 500 and 1000 mg kg⁻¹. On the contrary, the commercial active *alpha*-cypermethrin used as a positive control caused 100% of mortality after 14th days (**Table 6**).

Table 6 *Eisenia fetida* mortality after treatment with grapevine root extract and *alpha*-cypermethrin

	3 rd day*	7 th day*	14 th day*
Extract 1000 mg kg ⁻¹	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Extract 500 mg kg ⁻¹	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Extract 250 mg kg ⁻¹	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
<i>alpha</i> -cypermethrin 50 mg kg ⁻¹	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0
<i>alpha</i> -cypermethrin 25 mg kg ⁻¹	95.1±7.3	100.0±0.0	100.0±0.0
<i>alpha</i> -cypermethrin 12.5 mg kg ⁻¹	56.9±12.3	92.7±6.2	100.0±0.0
Control	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0

*Average percent mortality of *Eisenia fetida* 3rd, 7th and 14th day after treatment of artificial soil.

Vaztak: active ingredient, *alpha*-cypermethrin 50 g L⁻¹.

DISCUSSION

UHPLC-DAD-MS analysis of a stilbene-enriched extract obtained from grapevine root (Riparia Gloire de Montpellier rootstock) highlighted twelve stilbenes representing 25 % (w/w) of extract. The main stilbenes were the tetramers vitisin B followed by vitisin A and hopeaphenol, which is in agreement with the literature (Korhammer et al. 1995; Oshima et al. 1995; Gabaston et al. 2017).

The grapevine root extract caused chronic toxicity in the larval development of *L. decemlineata* and to a lesser extent the inhibition of food intake. These results on the insecticidal effects of extract containing stilbenes are in agreement with results of previous studies. The application of *Yucca periculosa* extract as well as the main stilbenes obtained from it (4,4'-dihydroxystilbene, resveratrol and 3,3',5,5'-tetrahydroxy-4-methoxystilbene) caused mortality of *Spodoptera frugiperda* larvae (Torres et al. 2003) while an extract rich in polyphenols from *Reynoutria* spp. plants inhibited the growth of *Spodoptera littoralis* (Pavela et al. 2008). Stilbenes are known to cause selective effects on the pre-emergence metabolism of the insect that lead to sclerotization, molting disturbance and reproductive disruption (Harmatha and Dinan 2003; Torres et al. 2003).

The tetramers vitisin A and vitisin B were the most toxic compounds for *L. decemlineata* larvae. Similar antifeedant activities were observed with combretastatin A-4, a natural monomer *cis*-stilbene composed of four methoxy functions, on *Spodoptera litura* (Lv et al. 2014) and for 25 synthesized stilbene analogs against *Brontispa longissima* (Liu et al. 2013). Regarding the mechanisms of action, the toxicity of stilbenes may be due to their ability to inhibit tyrosinase, one of the most important key enzymes in the insect molting process (Shimizu et al. 2000). Stilbenes may also act as ligands on the ecdysteroid receptor and play a major role in disturbing ecdysis (Harmatha and Dinan 2003). Moreover, it has been shown that stilbenes can induce oxidative stress in insects and enhance the activity of detoxifying enzymes such as superoxide dismutase, catalase, carboxyl esterase and glutathione-S-transferase, thereby restricting the feeding activities of insects (Sambangi and Rani 2016). The potential synergistic effect that may occur between stilbenes could also explain the insecticidal activities of root extract. It was recently shown that the association of vitisin B and ϵ -viniferin resulted in a significant rise in insecticide activity (Pavela et al. 2017).

Furthermore, stilbenes obtained from *Vitis vinifera* cane were recently tested against *Spodoptera littoralis*, with vitisin B the most insecticidal stilbene, which is in agreement with our results (Pavela et al. 2017). Grapevine cane extract demonstrated chronic toxicity with LC₅₀ values of 134 $\mu\text{g cm}^{-2}$, which is less active than grapevine root extract (48.7 $\mu\text{g cm}^{-2}$), while no antifeedant efficacy was shown by cane extract. The difference could be due to the low abundance of vitisin B in grapevine cane from various *Vitis vinifera* cultivars, contrary to grapevine root which is an important source of vitisins (Lambert et al. 2013; Guerrero et al. 2016; Gabaston et al. 2017). The difference in the sensitivity of insects to extract and stilbenes could also be an important factor. Indeed, *S. littoralis* targets a wide range of crops such as cotton, maize, rice, tobacco and eggplant, and can adapt to numerous plant chemicals. On the other hand, *L. decemlineata*, which develops only on Solanaceae crops, has a narrower range of resistance (Pavela 2010). Therefore, the development of a stilbene-enriched extract from grapevine root unrelated to *L. decemlineata* would enhance sensitivity and limit the appearance of resistance.

Outdoor pot experiments showed insect mortality close to 83% after day 10 by the root extract at 3% which was similar to that of the positive control, a commercial chemical insecticide. This insecticidal effect was confirmed by the limitation or absence of consumption of plant leaves by the beetle thanks to the efficacy of root extract. These controlled experiments on potato plants, similar to greenhouse conditions, were an important step to validate the bioinsecticide efficacy against *L. decemlineata* of stilbene-enriched extract.

In addition, as stilbenes may be considered as active ingredients for botanical insecticides, it was important to evaluate the impact of stilbene-enriched extract on non-targeted organisms (Pavela 2016). Thus, root extract at different concentrations was mixed with an artificial soil and earthworm mortality was evaluated. After 3, 7 and 14 days, *alpha*-cypermethrin, used as positive control showed strong toxicity against earthworm while no toxic effects were evidenced by root extract, suggesting an absence of side effects. However, polyphenols are known to play a role in soil microbiota through their beneficial or inhibitory effects on microorganisms and by regulating the availability of nutrients. Mycelium biomass of an ericoid mycorrhiza was limited by phenol acids but was stimulated by a mixture of polyphenols obtained from shoot extract of *Caluna vulgaris*, meaning that different polyphenols could have opposite effects (Leake and Rend 1989). Indeed, the *Rhizobium* species, a symbiotic bacteria, was inhibited by monohydroxyl phenolics whereas di- or polyhydroxyl compounds enhanced its activity (Kuiters 1990). Polyphenols can also influence nutrient cycling by retaining inorganic cations (calcium, manganese or potassium) and maintaining the availability of phosphate and metal micronutrients such as iron or copper (Hättenschwiler and Vitousek 2000). The development of a stilbene-enriched extract from grapevine root is a step forward in filling the knowledge gap concerning the impact of stilbenes on soil microbiota.

CONCLUSION

Stilbene-enriched extract from grapevine root showed chronic toxicity, antifeedant abilities and growth inhibition against *Leptinotarsa decemlineata* larvae in artificial conditions. Moreover, the extract exhibited a strong insecticidal activity against it in outdoor pot experiments. The high concentrations of vitisin A and vitisin B in grapevine root could contribute to this effect. In fact, the tetramers vitisin A and vitisin B are the most toxic compounds for insect larvae. In addition, the absence of toxicity against untargeted organisms like earthworm suggests that root extract could be a promising botanical insecticide (BI). The present findings suggest that waste from wine-growing such as grapevine root could be used as a cheap source of bioactive stilbenes to develop a natural insecticide.

ACKNOWLEDGEMENTS: Dr. Pavela would like to thank the Ministry of Agriculture in the Czech Republic for financial support of botanical pesticide and basic substance research. Financial support for this work was provided by project No. QJ1610082.

Author contributions: RP, PWT and JMM conceived the project. JG, TK, TR, AD and RP performed the experiments. JG, JMM and RP wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Funding The authors also wish to thank the Conseil Regional d'Aquitaine for their financial support in this research. The work was supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

Conflict of Interest The authors declare no competing interests.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

REFERENCES

Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18,:265–267.

- Ali A, Strommer J (2003) A simple extraction and chromatographic system for the simultaneous analysis of anthocyanins and stilbenes of *Vitis* species. *J. Agric. Food Chem.* 51:7246–7251. <https://doi.org/10.1021/jf030435g>
- Alyokhin A, Baker M, Mota-Sanchez D, Dively G, Grafius E (2008) Colorado potato beetle resistance to insecticides. *Am. J. Potato Res.* 85:395–413. <https://doi.org/10.1007/s12230-008-9052-0>
- Finney DJ (1971) Probit analysis. Cambridge University Press, London
- Flamini R, De Rosso M, De Marchi F, Dalla Vedova A, Panighel A, Gardiman M, Maoz I, Bavaresco L (2013) An innovative approach to grape metabolomics: stilbene profiling by suspect screening analysis. *Metabolomics* 9. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0530-0>
- FranceAgriMer (2012) L'observatoire national des ressources en biomasse. Évaluation des ressources disponibles en France. <http://www.franceagrimer.fr/Stockage-Actualites/Archives/2012/Observatoire-national-des-ressources-en-biomasse-evaluation-desressources>
- Gabaston J, Cantos-Villar E, Biais B, Waffo-Teguo P, Renouf E, Corio-Costet MF, Richard T, Mérillon JM (2017) Stilbenes from *Vitis vinifera* L. waste: a sustainable tool for controlling *Plasmopara Viticola*. *J. Agric. Food Chem.* 65:2711–2718. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00241>
- Giovinazzo G, Grieco F (2015) Functional properties of grape and wine polyphenols. *Plant Foods Hum. Nutr.* 70:454–462. <https://doi.org/10.1007/s11130-015-0518-1>
- Gomez KA, Gomez AA (1984) Statistical procedures for agricultural research. John Wiley & Sons.
- González-Sarriás A, Gromek S, Niesen D, Seeram NP, Henry GE (2011) Resveratrol oligomers isolated from *Carex* species inhibit growth of human colon tumorigenic cells Mediated by Cell Cycle Arrest. *J. Agric. Food Chem.* 59:8632–8638. <https://doi.org/10.1021/jf201561e>
- Guerrero RF, Biais B, Richard T, Puertas B, Waffo-Teguo P, Merillon JM, Cantos-Villar E (2016) Grapevine cane's waste is a source of bioactive stilbenes. *Ind. Crops Prod.* 94:884–892. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.055>
- Harmatha J, Dinan L (2003) Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant-insect chemical interactions. *Phytochem. Rev.* 2:321–330. <https://doi.org/10.1023/b:phyt.0000045494.98645.a3>
- Hättenschwiler S, Vitousek PM (2000) The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Tree* 15:238–243. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01861-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01861-9)
- Isman MB (2015) A renaissance for botanical insecticides: a renaissance for botanical insecticides. *Pest Manag. Sci.* 71:1587–1590. <https://doi.org/10.1002/ps.4088>
- Korhammer S, Reniero F, Mattivi F (1995) An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochemistry* 38:1501–1504. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00811-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00811-7)
- Kuiters AT (1990) Role of phenolic substances from decomposing forest litter in plant-soil interactions. *Acta Bot. Neerlandica* 39:329–348.
- Lambert C, Bisson J, Waffo-Téguo P, Papastamoulis Y, Richard T, Corio-Costet MF, Mérillon JM, Cluzet S (2012) Phenolics and their antifungal role in grapevine wood decay: focus on the *Botryosphaeriaceae* family. *J. Agric. Food Chem.* 60:11859–11868. <https://doi.org/10.1021/jf303290g>
- Lambert C, Richard T, Renouf E, Bisson J, Waffo-Téguo P, Bordenave L, Ollat N, Mérillon JM, Cluzet S (2013) Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 61:11392–11399. <https://doi.org/10.1021/jf403716y>
- Leake JR, Rend DJ (1989) The effects of phenolic compounds on nitrogen mobilisation by ericoid mycorrhizal systems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 29:225–236. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(90\)90281-h](https://doi.org/10.1016/0167-8809(90)90281-h)
- Liu YQ, Li XJ, Zhao CY, Lu Y, Li WQ, Liu ZL, Feng G, Yang L (2013) Synthesis and insect antifeedant activity of stilbene derivatives against *Brontispa longissima* larvae. *Med. Chem. Res.* 22:2196–2206. <https://doi.org/10.1007/s00044-012-0212-x>
- Lv XQ, Feng G, Liu YQ, Nan X, Yang L (2014) CA-4, a natural cis-stilbene compound with potential insecticidal activity. *Med. Chem. Res.* 23:3347–3352. <https://doi.org/10.1007/s00044-014-0917-0>
- Mattivi F, Vrhovsek U, Malacarne G, Masuero D, Zulini L, Stefanini M, Moser C, Velasco R, Guella G (2011) Profiling of resveratrol oligomers, important stress metabolites, accumulating in the leaves of hybrid *Vitis vinifera* (Merzling × Teroldego) genotypes infected with *Plasmopara viticola*. *J. Agric. Food Chem.* 59:5364–5375. <https://doi.org/10.1021/jf200771y>

- OECD (1984) OECD Guideline for testing of chemicals: earthworm, acute toxicity tests. 207
- Oshima Y, Kamijou A, Ohizumi Y, Niwa M, Ito J, Hisamichi K, Takeshita M (1995) Novel oligostilbenes from *Vitis coignetiae*. *Tetrahedron* 51:11979–11986. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00757-y](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00757-y)
- Pavela R, Waffo-Teguo P, Biais B, Richard T, Mérillon JM (2017) *Vitis vinifera* canes, a source of stilbenoids against *Spodoptera littoralis* larvae. *J. Pest Sci.* 90:961–970. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0836-1>
- Pavela R (2016) History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects – a review. *Plant Prot. Sci.* 52:229–241. <https://doi.org/10.17221/31/2016-PPS>
- Pavela R (2011) Antifeedant and larvicidal effects of some phenolic components of essential oils lasp lines of introduction against *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *J. Essent. Oil Bear. Plants* 14:266–273. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2011.10643932>
- Pavela R (2010) Antifeedant activity of plant extracts on *Leptinotarsa decemlineata* Say. and *Spodoptera littoralis* Bois. larvae. *Ind. Crops Prod.* 32:213–219. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.04.010>
- Pavela, R, Vrchotová N, Šerá B (2008) Growth inhibitory effect of extracts from *Reynoutria* sp. plants against *Spodoptera littoralis* larvae. *Agrociencia* 42:573–584. ISSN 1405-3195
- Pawlus AD, Waffo-Teguo P, Shaver J, Merillon JM (2012) Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a review. *J. Int. Sci. Vigne Vin* 46:57–111.
- Renaud S, De Lorgeril M (1992) Wine alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, Prentice Hall endocrinology series. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91277-f](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91277-f)
- Richard T, Poupard P, Nassra M, Papastamoulis Y, Iglésias ML, Krisa S, Waffo-Teguo P, Mérillon JM, Monti JP (2011) Protective effect of ϵ -viniferin on β -amyloid peptide aggregation investigated by electrospray ionization mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem.* 19:3152–3155. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.04.001>
- Rivière C, Pawlus AD, Mérillon JM (2012) Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in *Vitaceae*. *Nat. Prod. Rep.* 29:1317. <https://doi.org/10.1039/c2np20049j>
- Sambangi P, Rani PU (2016) Physiological effects of resveratrol and coumaric acid on two major groundnut pests and their egg parasitoid behavior: effect of phenolics on *S. litura* and *A. albistriga*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 91:230–245. <https://doi.org/10.1002/arch.21320>
- Schnee S, Queiroz EF, Voinesco F, Marcourt L, Dubuis PH, Wolfender JL, Gindro K (2013) *Vitis vinifera* Canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* 61:5459–5467. <https://doi.org/10.1021/jf4010252>
- Shimizu K, Kondo R, Sakai K (2000) Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substituted resorcinols: structure-activity investigations. *Planta Med.* 66:11–15. <https://doi.org/10.1055/s-2000-11113>
- Soeur J, Eilstein J, Léreaux G, Jones C, Marrot L (2015) Skin resistance to oxidative stress induced by resveratrol: from Nrf2 activation to GSH biosynthesis. *Free Radic. Biol. Med.* 78:213–223. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.510>
- Stoytcheva M (2011) Pesticides in the modern world: effects of pesticides exposure. Intech, Croatia.
- Torres P, Guillermo Avila J, Romo de Vivar A, García AM, Marín J.C, Aranda E, Céspedes CL (2003) Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. *Phytochemistry* 64:463–473. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00348-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00348-0)
- Vitrac X, Bornet A, Vanderlinde R, Valls J, Richard T, Delaunay JC, Mérillon JM, Teissédre PL (2005) Determination of stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines. *J. Agric. Food Chem.* 53:5664–5669. <https://doi.org/10.1021/jf050122g>
- Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li, HB (2010) Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.* 11:622–646. <https://doi.org/10.3390/ijms11020622>

Supporting Information

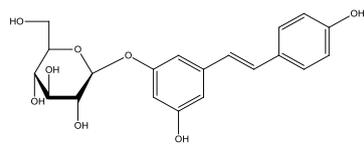
Stilbenes from grapevine root: a promising natural insecticide against *Leptinotarsa decemlineata*

Julien Gabaston^a, Toni El Khawand^a, Pierre Waffo-Teguo^a, Alain Decendit^a, Tristan Richard^a,
Jean-Michel Mérillon^{a*}, Roman Pavela^b

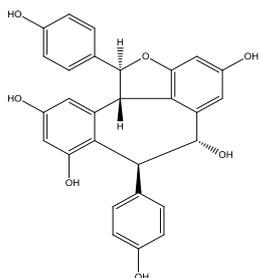
^aUniversité de Bordeaux, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Unité de Recherche Œnologie EA 4577, USC 1366 INRA, Equipe Molécules d'Intérêt Biologique (Gesvab) - Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, CS 50008 - 210, chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France

^bCrop Research Institute, Research Team – Biologically Active Substances in Crop Protection, Drnovska 507, 161 06 Prague 6 Ruzyně, Czech Republic

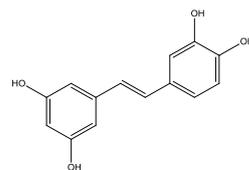
*Corresponding author: jean-michel.merillon@u-bordeaux.fr



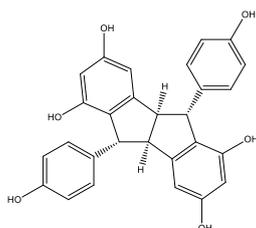
E-piceid (1)



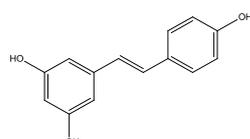
(+)-ampelopsin A (2)



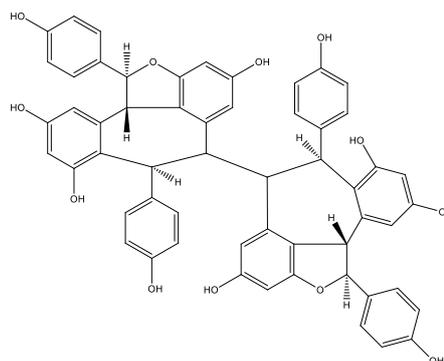
E-piceatannol (3)



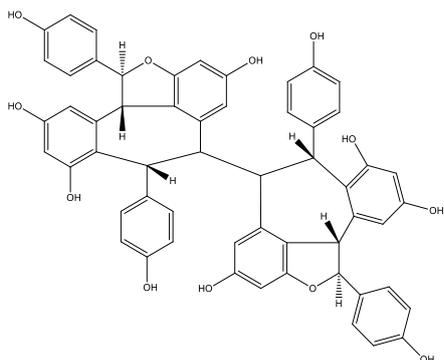
pallidol (4)



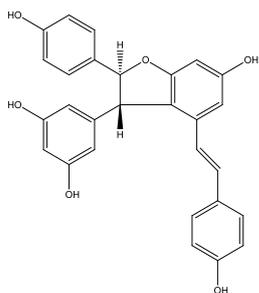
***E*-resveratrol (5)**



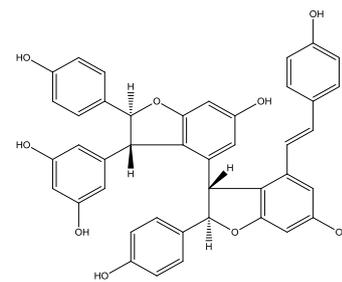
hopeaphenol (6)



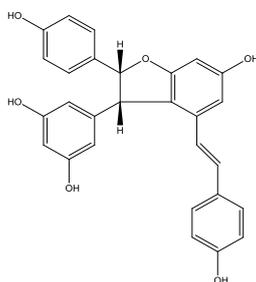
isohopeaphenol (7)



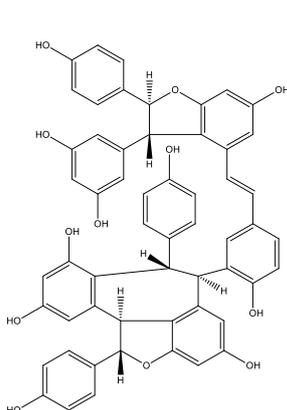
***E*-E-viniferin (8)**



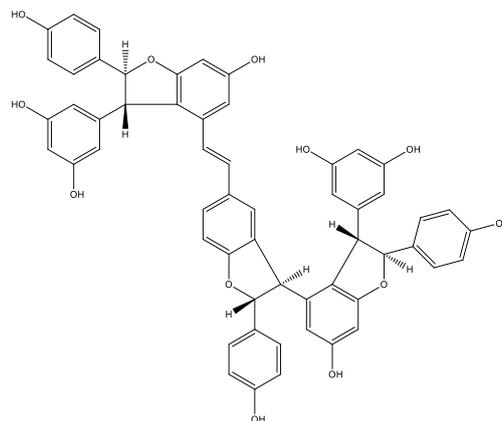
E-miyabenol C (9)



E- ω -viniferin (10)



vitisin A (11)



vitisin B (12)

Fig S1. Structure of stilbenes identified in grapevine root extract. Compounds isolated for bioassays were indicated in bold.

Volume V.

Discussions, Conclusions et Perspectives

Chapitre I. Discussion générale

Dans les circonstances actuelles, une valorisation d'extraits de plantes en santé végétale est-elle possible ?

Cette question tend dans un premier temps à faire l'état des lieux des réglementations et contraintes auxquelles doivent faire face les agriculteurs et la potentialité d'utiliser des extraits végétaux comme agents antimicrobiens.

De nos jours, en termes de traitements antimicrobiens, le secteur d'activité de l'agriculture, et plus particulièrement de la viticulture, est dominé par l'utilisation d'intrants chimiques. Ces produits sont généralement basés sur la chimie de synthèse ou l'application de formulations à base de cuivre dans le cadre de la viticulture. Cependant, les agriculteurs sont actuellement confrontés à diverses législations portant sur la réduction des intrants chimiques. En effet, plusieurs plans nationaux et/ou européens ont vu le jour ces dernières années tels que le plan Ecophyto en France. Renommé plan Ecophyto II en 2015 à la suite d'une première phase (2009-2014), ce dernier vise à diminuer de 25% le recours aux produits phytosanitaires d'ici 2020 et jusqu'à 50% à l'horizon de 2025 (Plan Ecophyto II 2015). De plus, le cuivre qui est le principal traitement anti-mildiou en viticulture, est actuellement en cours de discussion pour valider sa ré-approbation en tant que substance active dans les produits de protection des plantes au niveau européen (Commission Européen, Règlement d'exécution (UE) 2018/84, 2018). De cette décision peut découler une ré-approbation totale en laissant les différents Etats membres fixer les limites, un ré-approbation sous conditions avec vraisemblablement une diminution de la quantité appliquée ou alors une absence d'approbation entraînant l'arrêt de l'utilisation du cuivre. Actuellement, l'utilisation du cuivre est limitée à 6 kg/ha/an dans la plupart des pays européens (France, Italie, Espagne) et pourrait être abaissée à 3-4 kg/ha/an (Dagostin et al. 2011). En ce sens, la baisse à court ou moyen terme de l'utilisation du cuivre et de « fongicide » de synthèse implique le besoin de développer d'autres produits pour remplacer ou compléter ce traitement cuprique.

Ainsi, le domaine agricole est, de nos jours, enclin au développement de nouvelles stratégies pour faire face à ces changements historiques de traitements. Nos différentes études visent à proposer de nouvelles solutions et plus particulièrement la valorisation d'extraits de plantes contenant une large gamme de composés antimicrobiens. Nous nous sommes focalisés plus particulièrement sur des coproduits issus de la viticulture et d'exploitations forestières avec une réflexion sur leurs activités anti-mildiou.

Quels extraits de plantes étudiés sont les plus actifs contre le mildiou de la vigne ?

A notre disposition figuraient cinq coproduits végétaux issus de la vigne (sarment, cep et racine), de l'épicéa commun (écorce) et du pin maritime (nœud). Un criblage phytochimique de chacun de ces extraits a mis en lumière des disparités qualitatives au sein des molécules en présence. Les extraits de vigne ont montré une composition principalement formée de stilbènes aglycones avec un degré de polymérisation variable allant du monomère au tétramère. L'extrait d'écorce d'épicéa est majoritairement composé de stilbènes glucosylés monomériques et dimériques. L'extrait de nœud de pin possède quant à lui une diversité chimique notable avec quatre classes polyphénoliques identifiées avec des lignanes, des flavonoïdes, des stilbènes et des acides phénoliques.

Cette variabilité phytochimique des extraits a permis de mettre en exergue des disparités au niveau de leurs activités biologiques et plus particulièrement dans leurs capacités à inhiber l'infection causée par le mildiou de la vigne. Les différents résultats sont récapitulés ci-dessous (**Tableau 9**) :

Tableau 9. Récapitulatif des activités anti-mildiou des extraits de plante étudiés.

Extrait	CI ₅₀ (mg/L)	Inhibition totale (mg/L)
Sarment de vigne	210	800
Racine de vigne	120	500
Cep de vigne	60	500
Ecorce d'épicéa	760	>1000
Nœud de pin	76	500

Il se déduit de ces résultats que les extraits de ceps de vigne, de nœuds de pin et de racines de vigne sont les extraits les plus toxiques pour le développement de *P. viticola*. A l'inverse les extraits de sarments de vigne et d'écorces d'épicéa apparaissent comme les extraits les moins actifs.

La paternité des activités oomycides des extraits étudiés repose essentiellement sur les composés polyphénoliques en présence, et plus particulièrement les stilbènes. Ces derniers sont capables d'une part, d'inhiber la croissance mycélienne et d'autre part de moduler le mouvement des zoospores, empêchant ainsi leur entrée dans les feuilles via les stomates, et donc de bloquer l'infection causée par le mildiou (Pezet et al. 2004). Au niveau cellulaire, les stilbènes peuvent exercer leurs activités anti-mildiou via de nombreux mécanismes d'action et notamment un effet de perturbation des membranes cellulaires. Plus précisément, les stilbènes peuvent provoquer une désorganisation rapide de la membrane plasmique et des membranes des organelles telles que le réticulum endoplasmique, le noyau et les mitochondries (Alonso-Villaverde et al. 2011). Certains auteurs ont également noté que

l'application d'un extrait de stilbènes issus de sarments de vigne menait à la coagulation du matériel cytoplasmique et à une perturbation des organites cellulaires de *P. viticola* (Schnee et al. 2013). Au niveau moléculaire, peu d'études rapportent les effets des polyphénols, et plus particulièrement des stilbènes vis-à-vis du mildiou et des oomycètes. Nous pouvons toutefois faire l'hypothèse que les stilbènes peuvent générer une production de ROS engendrant des dommages membranaires et provoquant l'apoptose comme cela a été décrit pour la rhapontigénine vis-à-vis du champignon *Candida albicans* (Kim et al. 2013). En outre, il est rapporté que les stilbènes peuvent générer une cessation complète de la respiration chez *Botrytis cinerea* via la modulation des processus de respiration mitochondriale (Pezet & Pont 1990). La mise en évidence de l'inhibition de la chaîne respiratoire chez les oomycètes, même évoquée, demeure encore non démontrée.

Peut-on définir une relation structure-activité des composés étudiés contre le mildiou de la vigne ?

Au sein de la vigne, les stilbènes ont été identifiés sous des formes monomériques, dimériques, trimériques et tétramériques. L'activité oomycide de ces composés a été testée en vue de corrélérer leurs toxicités à celles des extraits globaux. Il en résulte que les tétramères (vitisine A, vitisine B, isohopéaphénol, hopéaphénol) ont été les composés les plus actifs, suivis dans un ordre décroissant par les trimères (miyabénol C), les dimères (ϵ -viniférine) et enfin les monomères (resvératrol). Ainsi, plus le degré de polymérisation des stilbènes est grandissant, plus la toxicité contre le mildiou est importante. On peut donc en déduire une relation positive entre la structure complexe des stilbènes de la vigne et l'activité anti-mildiou de ceux-ci. Cette connexion structure-activité des stilbènes va notamment expliquer les disparités d'activité oomycide des extraits viticoles. En effet, un phénomène d'oligomérisation croissante des stilbènes a été mis en évidence des parties aériennes vers les parties souterraines. En ce sens, l'extrait de sarment est majoritairement composé de monomères et dimères, l'extrait de cep est dominé par les dimères et tétramères alors que l'extrait de racine est formé principalement par des tétramères. La présence notable de formes polymérisées dans les extraits de cep et racine de vigne explique ainsi leur forte toxicité contre le mildiou de la vigne.

Concernant les écorces d'épicéa, l'extraction hydro-alcoolique a mis en exergue une forte présence de stilbènes glycosylés sous leurs formes monomériques (astringine, isorhapontine) et dimériques (picéasides). Dans une moindre mesure, les formes aglycones sont présentes comme les monomères (picéatannol, isorhapontigénine) et les dimères (cassigarol E). L'évaluation de l'activité anti-mildiou des molécules pures a mis en évidence une faible toxicité des stilbènes glycosylés alors que les formes aglycones ont montré une forte activité oomycide. Ainsi, une relation négative est mise en évidence

entre la présence d'unité osidique sur des structures stilbéniques et leurs activités anti-mildiou. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature selon lesquels la biotransformation enzymatique des stilbènes glycosylés en leurs formes aglycones entraînait une amélioration de leurs activités biologiques (Lee et al. 2012; Park et al. 2014). En ce sens, la faible activité anti-mildiou de l'extrait d'écorces d'épicéa est due à la toxicité limitée des stilbènes glycosylés dont la concentration est prédominante dans les écorces alors que les stilbènes aglycones, pourtant très actifs à l'image du cassigarol E, sont trop peu présents.

Dans les nœuds de pin, une plus grande diversité de composés a été mise en évidence avec des lignanes, des flavonoïdes, des stilbènes et des acides phénoliques. La mesure de l'activité oomycide des différentes molécules polyphénoliques a exhibé une forte toxicité des stilbènes que sont la pinosylvine et la pinosylvine monométhyl éther ainsi que de la pinocembrine qui est un flavonoïde (flavanone). Dans une moindre mesure, la pinobanksine (flavanonol) et le matairésinol, un lignane, sont également actifs contre le mildiou. Si nous comparons, d'une part la pinocembrine à la pinobanksine et d'autre part le matairésinol à la nortrachélogénine, nous observons qu'une seule différence structurale, la présence d'une fonction alcool au niveau du C3 de la pinocembrine et du C8 de la nortrachélogénine, entraîne une diminution notable de l'activité de ces dernières. L'extrait de nœud de pin a montré des teneurs élevées en lignanes mais également en pinocembrine et pinosylvines. La forte activité oomycide de ces derniers permet d'expliquer la forte inhibition du mildiou par l'extrait global.

Comme mentionné précédemment, les composés phénoliques vont moduler principalement le mildiou à travers la désorganisation des membranes cellulaires. Les différentes caractéristiques structurales des polyphénols vont notamment jouer un rôle majeur dans ces activités anti-mildiou. En effet, il est notable que l'augmentation de l'hydrophobicité des composés va être un atout dans leurs interactions avec les membranes lipophiles. Ainsi, on peut déduire que l'assemblage de cycles phénoliques va permettre une multiplication de doubles liaisons augmentant ainsi la lipophilicité des composés (Kim et al. 2013). A l'image des stilbènes oligomériques comme les vitisines, l'augmentation de la polymérisation engendrerait un accroissement de leurs hydrophobicité et donc de leurs activités perturbatrices des membranes cellulaires. De même, le procédé de méthylation va améliorer la pénétration des composés à travers la membrane via l'augmentation de leur hydrophobicité, à l'instar de l'isorhapontigénine dans les écorces d'épicéa ou la pinosylvine monométhyl éther dans les nœuds de pin (Koh et al. 2016). A l'inverse, la présence de sucre va augmenter l'hydrophilie des composés, diminuant leurs capacités à traverser les membranes (Scalbert & Williamson 2000). Ainsi, cela explique la faible toxicité des stilbènes glycosylés présent dans les écorces d'épicéa contre le mildiou de la vigne.

En outre, l'ensemble des polyphénols possèdent dans leurs structures des fonctions phénols pouvant interférer avec les protéines. Il en résulte une déstabilisation et la destruction des membranes cellulaires pouvant impacter d'une part, la respiration mitochondriale et d'autre part, l'intégrité cellulaire (Pont & Pezet 1990).

Les polyphénols sont donc un compromis entre des noyaux aromatiques contenant des doubles liaisons et/ou des fonctions au caractère lipophile et des fonctions hydroxyles hydrophiles. Il semble que l'équilibre de ces différentes structures au sein des molécules ait un impact important sur l'activité oomycide de ces composés.

Les extraits de vigne peuvent-ils être applicables contre d'autres pathogènes ?

Les extraits viticoles ont démontré une activité oomycide contre *P. viticola* avec la mise en lumière d'une forte toxicité des stilbènes complexes. Afin d'évaluer plus globalement le spectre d'action de ces extraits et de ces composés, d'autres pathogènes ont fait l'objet d'une étude et plus particulièrement les insectes. Fort des résultats précédents, ce travail s'est focalisé sur l'application d'un extrait de racine de vigne riche en stilbènes complexes contre *L. decemlineata*, un ravageur des Solanacées. Un double objectif avait été formulé avec d'une part, l'évaluation du caractère insecticide de l'extrait et d'autre part, la relation structure-activité des composés stilbéniques.

Les expérimentations en laboratoire ont ainsi démontré la capacité de l'extrait de racine de vigne à moduler la physiologie de ce coléoptère à travers l'inhibition du développement larvaire, une dissuasion alimentaire et une toxicité chronique. Des tests en pots sur plante entière ont par la suite validé le caractère insecticide de l'extrait de racine de vigne. Ces résultats démontrent ainsi la possibilité d'application des extraits viticoles en tant qu'insecticides naturels.

En outre, les stilbènes ont été testés individuellement contre *L. decemlineata*. Il en résulte que les tétramères tels que la vitisine A, la vitisine B et dans une moindre mesure l'hopéaphénol ont été les composés les plus toxiques, suivis par les dimères (ϵ -viniférine, ampélopsine A) et enfin le monomère resvératrol. En écho aux précédentes observations faites avec le mildiou, plus le degré de polymérisation des stilbènes est croissant, plus l'activité insecticide est importante. A nouveau, il peut être déduit de ces résultats une corrélation positive entre la structure polymérisée des stilbènes de la vigne et l'activité insecticide. Ainsi, la richesse en stilbènes complexes et plus particulièrement en tétramères de l'extrait de racine de vigne permet d'expliquer l'activité insecticide de l'extrait global.

Au niveau de leurs champs d'actions, les stilbènes semblent avoir des effets négatifs sur le développement larvaire avec une interférence dans la mue de l'insecte (pouvant également être appelée ecdysis ou exuviation). Ce phénomène correspond à la production d'une nouvelle cuticule et le rejet de l'ancienne permettant à l'insecte de grandir. Les stilbènes vont plus particulièrement perturber la structuration et la solidification de la nouvelle cuticule, phénomène également appelé sclérotisation (Harmatha & Dinan 2003; Torres et al. 2003). Au niveau des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu, la littérature rapporte que les stilbènes ont la capacité à inhiber une enzyme, la tyrosinase, qui est prédominante dans le processus de mue des insectes (Shimizu et al. 2000). Les stilbènes agissent également comme des ligands sur les récepteurs d'ecdystéroïde jouant un rôle important dans la perturbation de la mue (Harmatha & Dinan 2003).

En outre, comme observé chez les champignons, les stilbènes ont la capacité d'induire la production de ROS chez les insectes et ainsi stimuler l'activité d'enzymes de détoxification (carboxylestérase, glutathione-S-transférase). Cette stimulation physiologique va notamment provoquer un effet de perte d'appétit chez les insectes (Sambangi & Rani 2016). De plus, de potentiels effets synergiques entre les stilbènes peuvent expliquer les activités insecticides de l'extrait de racine. Il a été récemment montré que l'association de la vitisine B et de l' ϵ -viniférine ou encore de l'isohopéphénol et l' ϵ -viniférine entraînait une augmentation significative de l'activité insecticide (Pavela et al. 2017).

Ainsi, en réponse à la question initiale sur la potentialité d'application des extraits viticoles à d'autres pathogènes, cette étude tend à répondre par l'affirmative avec une activité insecticide notable contre *L. decemlineata* de la part d'un extrait de racines de vigne riche en stilbènes complexes.

Les coproduits viticoles sont-ils être une source de stilbènes stable et invariable ?

Le postulat est désormais établi que les extraits viticoles possèdent des activités oomycides et insecticides grâce à leurs richesses en stilbènes complexes. Dans un but de valorisation, il est important de savoir si la composition phytochimique de la vigne est relativement constante d'un point de vue qualitatif et quantitatif ou si la nature et les teneurs en stilbènes peuvent varier au gré des cépages et porte-greffes utilisés en France. L'activité biologique des coproduits viticoles pourraient alors en pâtir.

Une première approche a ainsi été d'étudier la distribution qualitative des stilbènes au sein de vignes issues de différents cépages et porte-greffes afin de vérifier si les différences de degré d'oligomérisation préalablement mis en lumière en fonction des organes était généralisable. En ce sens, une segmentation en plusieurs parties des parties végétatives de la vigne a été réalisée afin d'en

étudier la composition phytochimique précise. Ces travaux ont permis de généraliser le phénomène de polymérisation croissante des stilbènes des parties aériennes vers les parties racinaires quelque soit l'origine géographique de la vigne ou l'origine génétique du greffon et/ou du porte-greffe. Ainsi, nous pouvons sans doute émettre une règle générale selon laquelle les sarments de vigne sont principalement composés de stilbènes monomériques et dimériques, que les ceps de vigne sont constitués de stilbènes dimériques et tétramériques alors que les racines de vigne contiennent majoritairement des stilbènes tétramériques. Ces données qualitatives permettent d'affirmer que la vigne, selon les organes considérés, possède une certaine stabilité phytochimique dans la composition en stilbènes.

Une deuxième approche a été d'évaluer les concentrations en stilbènes dans les différents organes de la vigne provenant de différents cépages/porte-greffes. Ces travaux ont permis de mettre évidence des disparités de teneurs en stilbènes avec des cépages (Merlot, Tannat, Gamay noir) et porte-greffes (Gravesac, 3309C) plus productifs que d'autres, sachant que d'autres facteurs peuvent sans doute être impliqués (géographique, âge...). Ces résultats permettent d'affirmer qu'une variabilité quantitative des stilbènes est présente au sein de la vigne.

Cette interrogation sur le sourcing en coproduits viticoles a permis de valider une certaine constance dans la composition en stilbènes dans les différents organes de la vigne mais a également souligné une fluctuation des teneurs selon les cépages et porte-greffes utilisés. Dans un objectif de valorisation et selon les stilbènes souhaités, certains cépages et porte-greffes peuvent être priorisés pour leurs concentrations alors que certains organes peuvent être privilégiés pour la nature de leurs composés.

Peut-on envisager un développement de nos extraits végétaux d'un point de vue industriel ?

La production à grande échelle d'extraits végétaux est une étape clé dans le processus de valorisation où différents paramètres et/ou contraintes doivent être appréhendés et maîtrisés tels que le sourcing, le procédé d'extraction ou le volume important de solvants utilisés.

Un approvisionnement en matière première abondant, disponible et économique est un des premiers enjeux du développement industriel. Dans notre cas, les matières brutes sont des coproduits issus de la viticulture et la sylviculture, généralement non valorisées ou parfois exploitées comme source d'énergie en tant que combustible. Il en résulte que ces coproduits représentent une biomasse importante et disponible sur les sites de production. De plus, le prix de ces coproduits est généralement

avantageux puisqu'ils sont générés par mécanisation avec une faible intervention de main d'œuvre ouvrière. Dans le cadre des coproduits viticoles, la biomasse disponible est de 1,8 millions de tonnes par an alors que les coproduits sylvicoles sont respectivement de 112000 et 36000 tonnes par an pour les écorces d'épicéa et les nœuds de pin. Le sourcing important de ces coproduits en France est donc un atout notable dans un objectif de valorisation industrielle.

Le procédé d'extraction est également un outil prédominant, généralement optimisé, permettant d'extraire et épuiser les composés d'intérêt du matériel végétal. Nos travaux se sont principalement focalisés sur un mélange hydro-alcoolique avec de l'éthanol et de l'eau à une proportion de 85/15 (v/v). L'éthanol est peu toxique, relativement peu coûteux et d'une polarité adaptée à l'extraction de stilbènes. Ponctuellement, un mélange acétone-eau à 60/40 (v/v) a été utilisé lors de l'extraction de stilbènes de racine de vigne contre *L. decemlineata*. Globalement, ces deux méthodes ont été concluantes pour l'extraction de stilbènes complexes aboutissant à la mise en évidence d'activité oomycide et insecticide. Ainsi, nos différentes études, en adéquation avec la littérature, suggèrent une utilisation préférentielle de l'éthanol comme solvant d'extraction (Billet et al. 2018; Vergara et al. 2012).

Cependant, l'emploi massif de solvant organique s'accompagne généralement d'une législation stricte pour les industriels. En effet, un règlement européen nommé REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals), entré en vigueur en 2007, vise à sécuriser l'utilisation des substances chimiques via un système d'enregistrement, d'évaluation et d'autorisation des produits chimiques dans l'Union Européenne. Cette directive oblige les industriels (producteurs ou importateurs) à déclarer les produits utilisés dans leur entreprise lors de quantités supérieures à une tonne par an ou lors de l'emploi de substances CMR. L'absence d'enregistrement conduit à la non-autorisation de production (Parlement Européen, Règlement (CE) N°1907/2006, 2006). Ainsi, REACH permet, d'une part, de faire un inventaire des produits chimiques utilisés ou vendus sur le marché européen et d'autre part, vise à connaître la toxicité et les conséquences sur la santé humaine et sur l'environnement (McKee et al. 2018).

En outre, en fonction des quantités et des types de produits dangereux utilisés, les industriels peuvent être soumis à la « directive Seveso ». Il s'agit de directives européennes dont l'objectif est d'identifier les sites industriels s'exposant à des risques d'accidents majeurs et d'y associer un haut niveau de prévention (Pintarič 2007). Cela se traduit notamment par des études de dangerosité basées sur des scénarios potentiels d'accidents, des conséquences possibles, d'une politique d'informations internes et externes ou encore d'une structuration adaptée de l'entreprise (Parlement Européen, Directive 2012/18/UE, 2012).

Dans l'optique d'utiliser des solvants organiques à un volume important pour des fins d'extraction de principes actifs, l'ensemble de ces règles peuvent constituer un frein pour un industriel. Ainsi, cela amène les industriels à imaginer d'autres moyens d'extraction, plus respectueux de l'environnement, moins contraignants sur le plan législatif, sans pour autant perdre leur efficacité et leur productivité.

Un de nos objectifs a donc été d'appréhender ces potentielles limitations à travers la proposition de nouvelles solutions d'extraction basées sur la chimie verte, autrement dit, plus respectueuses de l'environnement. Nous nous sommes ainsi focalisés sur l'utilisation exclusive de l'eau comme solvant dans des conditions dites sous-critiques. Cette méthode est basée sur l'application d'une haute température et d'une haute pression permettant de modifier les propriétés physico-chimiques de l'eau, diminuant ainsi sa polarité et offrant la possibilité d'extraire des composés plus apolaires comme les stilbènes.

Une première partie de perfectionnement de la méthode a été réalisée, permettant de mettre en évidence une extraction optimale des stilbènes à 160 °C et un temps d'extraction de 5 minutes. Une extraction à une température supérieure (190 °C) a mis en exergue une dégradation de certains composés alors qu'un temps d'extraction allongé de 15 ou 30 minutes ne permet pas d'augmenter les rendements. Certaines conditions peuvent être préférées afin d'extraire spécifiquement certains composés.

Le but de cette étude était surtout d'évaluer la potentialité d'utiliser cette méthodologie pour extraire les stilbènes complexes à partir de coproduits de la vigne (sarment, cep, racine). Il en résulte que les stilbènes polymérisés sont autant voir mieux extraits par l'eau sous-critique que dans un mélange hydro-alcoolique classique. Les stilbènes oligomériques les plus bioactifs comme l'hopéaphénol, l'isohopéaphénol ou la vitisine A sont bien extraits, à l'inverse de la vitisine B dont le rendement est plutôt limité. Il convient toutefois de noter que cette méthodologie doit être adaptée à l'industrie afin d'évaluer sa réelle capacité d'utilisation à grande échelle. Malgré tout, cette première approche est positive et ouvre le champ à des alternatives aux solvants organiques dans l'avenir.

Ainsi, dans une optique de valorisation à grande échelle, la présence de sourcings conséquents et la potentialité d'utiliser des procédés d'extractions classiques ou alternatifs offrent à nos extraits végétaux un réel potentiel industriel.

Chapitre II. Conclusions et perspectives

A. Conclusions générales

- Les présents résultats suggèrent fortement que les coproduits viticoles, et plus particulièrement les ceps et les racines de vigne, pourraient être utilisés comme des sources de stilbènes bioactifs pour le développement d'oomycides naturels. En effet, les ceps et les racines de vigne contiennent à des niveaux élevés des stilbènes complexes très actifs contre le mildiou de la vigne avec la vitisine A, la vitisine B, l'hopéaphénol et l'isohopéaphénol.
- Les coproduits viticoles, illustrés par un extrait de racines de vigne riches en stilbènes oligomérisés, pourraient également faire l'objet d'une valorisation comme insecticide naturel. La présence significative de vitisine A et vitisine B permet une forte toxicité de l'extrait de racine contre les larves de *L. decemlineata*, un ravageur des Solanacées.
- Un phénomène d'oligomérisation des stilbènes des parties aériennes vers les parties racinaires a été généralisé chez la vigne expliquant qualitativement la richesse en stilbènes complexes des ceps et racines de vigne. Quantitativement, les teneurs en stilbènes peuvent varier en fonction du type de cépages et de porte-greffes utilisés.
- Généralement obtenus par des solvants organiques tels que l'éthanol ou l'acétone, les stilbènes complexes peuvent également être extraits par une méthode alternative basée sur l'utilisation d'eau en condition sous-critique. Ce procédé s'intégrant dans un principe de « chimie verte » est une nouvelle approche permettant d'appréhender les défis de demain en matière d'extraction.
- Des coproduits sylvicoles tels que les nœuds de pin et les écorces d'épicéa pourraient également être une biomasse intéressante à valoriser comme oomycide naturel. La présence de stilbènes et/ou de flavonoïdes dans les extraits issus de ces essences forestières permet à ces derniers d'être actifs contre *P. viticola*.
- Face au défi de la réduction des intrants chimiques, une stratégie alternative basée sur l'utilisation d'extraits naturels de plantes possédant une large gamme de composés antimicrobiens est une solution. La valorisation de coproduits viticoles et sylvicoles riches en polyphénols bioactifs ouvre la voie à des avancées majeures en matière d'agriculture durable.

B. Perspectives

Nos travaux donnent lieu à un champ d'investigation plus large en matière d'utilisation d'extraits végétaux comme oomycide et insecticide naturel. En effet, les différents tests ont été réalisés sur disques foliaires pour l'activité anti-mildiou et jusqu'aux plants entiers en pots pour l'activité insecticide. Naturellement, une validation de ces activités biologiques en serre dans un premier temps, puis en champ dans un second temps, est nécessaire. Dans le cadre du brevet portant sur l'activité anti-mildiou d'extraits de nœuds de pin, un projet de maturation impliquant un industriel a été déposé par notre laboratoire auprès d'Aquitaine Sciences Transfert (SATT Aquitaine) avec notamment l'évaluation de l'activité anti-mildiou de ces extraits en vignoble. Ce projet a maintenant commencé. Ces étapes s'accompagnent généralement d'un développement de formulations des différents extraits afin de favoriser la dispersion de l'extrait tout en limitant les contraintes environnementales telles que le lessivage par la pluie ou la dégradation par les UV.

En se focalisant sur les maladies du vignoble, nos extraits peuvent également faire l'objet d'étude élargie contre d'autres pathogènes de la vigne comme *Botrytis cinerea* (agent responsable de la pourriture grise), *Erysiphe necator* (agent responsable de l'oïdium) ou encore *Guignardia bidwellii* (agent responsable du black-rot). Nous envisageons également d'étudier l'activité de ces extraits contre des insectes du vignoble, comme la cicadelle.

En outre, lors des traitements anti-mildiou et insecticides, trois acteurs majeurs que sont les molécules antimicrobiennes, le pathogène et la plante interagissent ensemble ouvrant la voie à des investigations plus fondamentales. D'une part, si des travaux ont rapporté certains mécanismes d'action des stilbènes sur les pathogènes étudiés, des zones d'ombre persistent et des études mécanistiques supplémentaires permettraient d'enrichir les connaissances dans le domaine des interactions molécules-pathogènes. D'autre part, les pathogènes ont, depuis la nuit des temps, co-évolués avec leurs plantes hôtes développant ainsi un arsenal d'adaptation aux composés antimicrobiens produits. Toutefois, les extraits et plus précisément les molécules étudiées tels que les stilbènes complexes ou les flavonoïdes, ne sont pas présents ou en faibles quantités dans les feuilles ou les baies. Si la probabilité d'adaptation déjà mise en place dans les pathogènes semble limitée, il serait intéressant d'évaluer le devenir des composés vis-à-vis de ces pathogènes à travers de potentielles métabolisations. Enfin, le troisième acteur qu'est la plante subit également des modifications suite à l'application des extraits. La perception de molécules, même naturelles, peut entraîner des réactions de défenses au coût énergétique certain. L'évaluation des modifications tant sur le métabolisme primaire (sucres, acides, acide aminés) que sur le métabolisme secondaire (polyphénols) sont des éléments à connaître pour appréhender de potentiels effets non-désirés.

Références

Références bibliographiques :

- ADEME. 2009. Biomasse forestière, populicole et bocagère disponible pour l'énergie à l'horizon 2020. *Rapport d'étude*. 1–105
- ADEME. 2015. Etat de l'art sur la production de molécules chimiques issues du bois en France. *Rapport d'étude*. 1–147
- Adlercreutz H. 2007. Lignans and human health. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 44(5–6):483–525
- Akhtar Y, Isman MB. 2013. Plant natural products for pest management: the magic of mixtures. In *Advanced Technologies for Managing Insect Pests*, pp. 231–47. Ishaaya I, Palli S., Horowitz A. (eds). Springer, Dordrecht ed.
- Ali-Shtayeh M., Yaghmour RM., Faidi Y., Salem K, Al-Nuri M. 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology*. 60(3):265–71
- Allègre M, Daire X, Héloir M-C, Trouvelot S, Mercier L, et al. 2007. Stomatal deregulation in *Plasmopara viticola*-infected grapevine leaves. *New Phytologist*. 173(4):832–40
- Alonso-Villaverde V, Voinesco F, Viret O, Spring JL, Gindro K. 2011. The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49(3):265–74
- Alvarez JM, Srinivasan R, Cervantes FA. 2013. Occurrence of the carabid beetle, *Pterostichus melanarius* (Illiger), in potato ecosystems of Idaho and its predatory potential on the Colorado potato beetle and aphids. *American Journal of Potato Research*. 90(1):83–92
- Alyokhin A. 2009. Colorado potato beetle management on potatoes: current challenges and future prospects. *Fruit, Vegetable Cereal Sci Biotechnol*. 3:10–19
- Alyokhin A, Baker M, Mota-Sanchez D, Dively G, Grafius E. 2008. Colorado potato beetle resistance to insecticides. *American Journal of Potato Research*. 85(6):395–413
- Amalfitano C, Agrelli D, Arrigo A, Mugnai L, Surico G, Evidente A. 2011. Stilbene polyphenols in the brown red wood of *Vitis vinifera* cv. Sangiovese affected by “esca proper.” *Phytopathologia Mediterranea*. 50(4):224–235
- Anatole-Monnier L. 2014. Effets de la contamination cuprique des sols viticoles sur la sensibilité de la vigne à un cortège de bio-agresseurs. *Thèse*. 1–199
- Andersen ØM, Markham KR, eds. 2006. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. Boca Raton, FL: CRC, Taylor & Francis
- Andreu V, Levert A, Amiot A, Cousin A, Aveline N, Bertrand C. 2018. Chemical composition and antifungal activity of plant extracts traditionally used in organic and biodynamic farming. *Environmental Science and Pollution Research*. 1–12
- Angelis A, Hubert J, Aligiannis N, Michalea R, Abedini A, et al. 2016. Bio-guided isolation of methanol-soluble metabolites of common spruce (*Picea abies*) bark by-products and investigation of their dermo-cosmetic properties. *Molecules*. 21(11):1–15
- Asha Devi S, Sagar Chandrasekar BK, Manjula KR, Ishii N. 2011. Grape seed proanthocyanidin lowers brain oxidative stress in adult and middle-aged rats. *Experimental Gerontology*. 46(11):958–64
- ATLAS. 2017. Projet biomasse vitivinicole. *Institu Francais de la Vigne et du Vin*. 1-64
- Aydin T, Cakir A, Kazaz C, Bayrak N, Bayir Y, Taşkesenligil Y. 2014. Insecticidal metabolites from the rhizomes of *Veratrum album* against adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Chemistry & Biodiversity*. 11(8):1192–1204

- Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bézier A, et al. 2003. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16(12):1118–28
- Aziz A, Trotel-Aziz P, Dhuicq L, Jeandet P, Couderchet M, Vernet G. 2006. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology*. 96(11):1188–94
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, et al. 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 148(2–3):187–97
- Baptista C, Robert D, Duarte AP. 2008. Relationship between lignin structure and delignification degree in *Pinus pinaster* kraft pulps. *Bioresource Technology*. 99(7):2349–56
- Barbour JD, Kennedy GG. 1991. Role of steroidal glycoalkaloid α -tomatine in host-plant resistance of tomato to Colorado potato beetle. *Journal of Chemical Ecology*. 17(5):989–1005
- Barreca D, Gattuso G, Bellocco E, Calderaro A, Trombetta D, et al. 2017. Flavanones: *Citrus* phytochemical with health-promoting properties. *BioFactors*. 43(4):495–506
- Bellin D, Peressotti E, Merdinoglu D, Wiedemann-Merdinoglu S, Adam-Blondon AF, et al. 2009. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine ‘Bianca’ is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theoretical and Applied Genetics*. 120(1):163–76
- Bellow S, Latouche G, Brown SC, Poutaraud A, Cerovic ZG. 2018. In vivo localization at the cellular level of stilbene fluorescence induced by *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. *Journal of Experimental Botany*. 63(10):3697–3708
- Bianchi S, Gloess AN, Krosiakova I, Mayer I, Pichelin F. 2014. Analysis of the structure of condensed tannins in water extracts from bark tissues of Norway spruce (*Picea abies* [Karst.]) and silver fir (*Abies alba* [Mill.]) using MALDI-TOF mass spectrometry. *Industrial Crops and Products*. 61:430–37
- Billet K, Houillé B, Besseau S, Mélin C, Oudin A, et al. 2018. Mechanical stress rapidly induces *E*-resveratrol and *E*-piceatannol biosynthesis in grape canes stored as a freshly-pruned byproduct. *Food Chemistry*. 240:1022–27
- Blasi P, Blanc S, Wiedemann-Merdinoglu S, Prado E, Rühl EH, et al. 2011. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of Rpv8, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theoretical and Applied Genetics*. 123(1):43–53
- Bolter CJ, Dicke M, Van Loon JJA, Visser JH, Posthumus MA. 1997. Attraction of Colorado potato beetle to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination. *Journal of Chemical Ecology*. 23(4):1003–23
- Borochoy-Neori H, Judeinstein S, Greenberg A, Volkova N, Rosenblat M, Aviram M. 2015. Antioxidant and antiatherogenic properties of phenolic acid and flavonol fractions of fruits of ‘Amari’ and ‘Hallawi’ date (*Phoenix dactylifera* L.) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(12):3189–95
- Boubakri H, Hadj-Brahim A, Schmitt C, Soustre-Gacougnolle I, Mliki A. 2015. Biocontrol potential of chenodeoxycholic acid (CDCA) and endophytic *Bacillus subtilis* strains against the most destructive grapevine pathogens. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 43(4):261–74
- Boubakri H, Wahab MA, Chong J, Gertz C, Gandoura S, et al. 2013. Methionine elicits H₂O₂ generation and defense gene expression in grapevine and reduces *Plasmopara viticola* infection. *Journal of Plant Physiology*. 170(18):1561–68

- Branas J. 1984. Histoire et fonction du cuivre dans la viticulture de qualité. *Le Progrès Agricole et Viticole*. 22:521–23
- Britsch L, Heller W, Grisebach H. 1981. Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol and flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 36(9–10):742–50
- Brust GE. 1994. Natural enemies in straw-mulch reduce Colorado potato beetle populations and damage in potato. *Biological Control*. 4:163–69
- Burrano S. 2000. The life-cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine. *Mycologist*. 14(4):179–82
- Cacaj I, Kelmendi B, Hajdari A, Shala N. 2014. The efficacy of spraying programmes and treatment methods against downy mildew in two grapevine cultivars in Kosovo. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*. 47(4):407–16
- Celhay C. 2013. Fractionnement de coproduits de pin maritime (*Pinus pinaster*) et de peuplier (*Populus tremula*) pour l'obtention d'extraits polyphénoliques à activité antioxydante : procédé d'extraction aqueuse en extracteur bi-vis et étude des conditions subcritiques. *Thèse*. pp 1-320
- Celimene CC, Micales JA, Ferge L, Young RA. 1999. Efficacy of pinosylvins against white-rot and brown-rot fungi. *Holzforschung*. 53(5):491–97
- Céspedes CL, Avila JG, García AM, Becerra J, Flores C, et al. 2006. Antifungal and antibacterial activities of *Araucaria araucana* (Mol.) K. Koch heartwood lignans. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 61(1–2):35–43
- Chadefaud M. 1972. Les cycles des Champignons comparés à ceux des Algues. *Bulletin de la Société Botanique de France*. 119(sup1):333–68
- Co M, Fagerlund A, Engman L, Sunnerheim K, Sjöberg PJR, Turner C. 2012. Extraction of antioxidants from spruce (*Picea abies*) bark using eco-friendly solvents. *Phytochemical Analysis*. 23(1):1–11
- Cohen Y, Wang W, Ben-Daniel BH, Ben-Daniel Y. 2006. Extracts of *Inula viscosa* control downy mildew of grapes caused by *Plasmopara viticola*. *Phytopathology*. 96(4):417–24
- Commission Européenne. 2018. Règlement d'exécution (UE) 2018/84 de la commission européenne modifiant le règlement d'exécution (UE) n° 540/2011 en ce qui concerne la prolongation de la période d'approbation des substances actives «chlorpyrifos», «chlorpyrifos-méthyl», «clothianidine», «composés de cuivre», «dimoxystrobine», «mancozèbe», «mécoprop-P», «métirame», «oxamyl», «pethoxamid», «propiconazole», «propinèbe», «propryzamide», «pyraclostrobine» et «zoxamide». *Off. J. Eur. Union*. 1-3.
- Conde E, Fang W, Hemming J, Willför S, Domínguez H, Parajó JC. 2014. Recovery of bioactive compounds from *Pinus pinaster* wood by consecutive extraction stages. *Wood Science and Technology*. 48(2):311–23
- Conde E, Fang W, Hemming J, Willför S, Moure A, et al. 2013a. Water-soluble components of *Pinus pinaster* wood. *BioResources*. 8(2):2047–63
- Conde E, Hemming J, Smeds A, Reinoso BD, Moure A, et al. 2013b. Extraction of low-molar-mass phenolics and lipophilic compounds from *Pinus pinaster* wood with compressed CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*. 81:193–99
- Cook JD, Reddy MB, Hurrell RF. 1995. The effect of red and white wines on nonheme-iron absorption in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 61(4):800–804

- Corio-Costet MF. 2012. Fungicide resistance in *Plasmopara viticola* in France and anti-resistance measures. In *Fungicide Resistance in Crop Protection: Risk and Management*, ed. TS Thind, pp. 157–71. Wallingford: CABI
- Corio-Costet MF. 2015. Monitoring resistance in obligate pathogens by bioassays relating to field use: grapevine powdery and downy mildews. In *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*, eds. H Ishii, DW Hollomon, pp. 251–79. Tokyo: Springer Japan
- Creasy GL, Creasy LL. 2009. *Grapes*. Nosworthy Way, Wallingford, Oxfordshire OX10 8DE UK. CABI ed.
- Cvikrová M, Malá J, Hrubcová M, Eder J. 2006. Soluble and cell wall-bound phenolics and lignin in *Ascocalyx abietina* infected Norway spruces. *Plant Science*. 170(3):563–70
- Dagostin S, Formolo T, Giovannini O, Pertot I, Schmitt A. 2010. *Salvia officinalis* extract can protect grapevine against *Plasmopara viticola*. *Plant Disease*. 94(5):575–80
- Dagostin S, Schärer H, Pertot I, Tamm L. 2011. Are there alternatives to copper for controlling grapevine downy mildew in organic viticulture? *Crop Protection*. 30(7):776–88
- D'Archivio M, Filesi C, Benedetto RD, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. 2007. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. 43(4):348–61
- De Pascual-Teresa S, Sanchez-Ballesta MT. 2008. Anthocyanins: from plant to health. *Phytochemistry Reviews*. 7(2):281–99
- De Pascual-Teresa S, Sanchez-Ballesta MT, García-Viguera C. 2013. Anthocyanins. In *Natural Products*, eds. KG Ramawat, J-M Mérillon, pp. 1803–19. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Derafshi MH. 2006. Design and construction of a pneumatic-thermal machine for controlling Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Journal of Applied Sciences*. 6(4):919–25
- Dickens JC. 2000. Sexual maturation and temporal variation of neural responses in adult Colorado potato beetles to volatiles emitted by potato plants. *Journal of Chemical Ecology*. 26(5):1265–79
- Dinkins CLP, Peterson RKD. 2008. A human dietary risk assessment associated with glycoalkaloid responses of potato to Colorado potato beetle defoliation. *Food and Chemical Toxicology*. 46(8):2837–40
- Dufour MC, Corio-Costet MF. 2013. Variability in the sensitivity of biotrophic grapevine pathogens (*Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*) to acibenzolar-S methyl and two phosphonates. *European Journal of Plant Pathology*. 136(2):247–59
- Dufour MC, Lambert C, Bouscalt J, Mérillon JM, Corio-Costet MF. 2013. Benzothiadiazole-primed defence responses and enhanced differential expression of defence genes in *Vitis vinifera* infected with biotrophic pathogens *Erysiphe necator* and *Plasmopara viticola*: elicitation and grapevine responses to mildews. *Plant Pathology*. 62(2):370–82
- El-Naggar MA, Alkahtani MDF, Yassin MA, Morsy KM. 2012. New approach to acquired resistance enhancement against *Plasmopara viticola* using different biotic inducers. *Journal of Plant Sciences*. 7(2):67–77
- El-Seedi HR, El-Said AMA, Khalifa SAM, Göransson U, Bohlin L, et al. 2012. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(44):10877–95
- Engelbrecht AM, Mattheyse M, Ellis B, Loos B, Thomas M, et al. 2007. Proanthocyanidin from grape seeds inactivates the PI3-kinase/PKB pathway and induces apoptosis in a colon cancer cell line. *Cancer Letters*. 258(1):144–53

- Ertürk Ö, Yaman M, Aslan İ. 2008. Effects of four *Bacillus* spp. of soil origin on the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Entomological Research*. 38(2):135–38
- Esatbeyoglu T, Ewald P, Yasui Y, Yokokawa H, Wagner AE, et al. 2016. Chemical characterization, free radical scavenging, and cellular antioxidant and anti-inflammatory properties of a stilbenoid-rich root extract of *Vitis vinifera*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016:1–11
- Falk SP, Pearson RC, Gadoury DM, Seem RC, Sztejnberg A. 1996. *Fusarium proliferatum* as a biocontrol agent against grape downy mildew. *Biological Control*. 86(10):1010–17
- Farhadi K, Esmaeilzadeh F, Hatami M, Forough M, Molaie R. 2016. Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province, Iran. *Food Chemistry*. 199:847–55
- Farlow WG. 1882. American Grape Mildew in Europe. *Botanical Gazette*. 7(3):30–31
- FCBA. 2016. Mémento 2016. *Institution Technologique*. pp 1–48
- Fernandez P, Hilker M. 2007. Host plant location by Chrysomelidae. *Basic and Applied Ecology*. 8(2):97–116
- Ferro DN, Logan JA, Voss RH, Elkinton JS. 1985. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) temperature-dependent growth and feeding rates. *Environmental Entomology*. 14(3):343–48
- Flamini R, Mattivi F, Rosso M, Arapitsas P, Bavaresco L. 2013. Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(10):19651–69
- Flemming CA, Trevors JT. 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air, and Soil Pollution*. 44(1–2):143–58
- Fournioux JC, Adrian M. 2011. *Morphologie et Anatomie de La Vigne*. Féret ed.
- FranceAgriMer. 2016. L’observatoire national des ressources en biomasse. Evaluation des ressources disponibles en France. *Rapport d’étude*. 1–126
- Fujii F, He YH, Terashima K, Takaya Y, Niwa M. 2005. Three new stilbeneoligomers from the roots of *Vitis vinifera* ‘Kyohou.’ *Heterocycles*. 65(10):2461–69
- Furuya S, Mochizuki M, Aoki Y, Kobayashi H, Takayanagi T, et al. 2011. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases. *Biocontrol Science and Technology*. 21(6):705–20
- Garde-Cerdán T, Mancini V, Carrasco-Quiroz M, Servili A, Gutiérrez-Gamboa G, et al. 2017. Chitosan and laminarin as alternatives to copper for *Plasmopara viticola* control: effect on grape amino acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65(34):7379–86
- Gessler C, Pertot I, Perazzolli M. 2011. *Plasmopara viticola*: a review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. *Phytopathologia Mediterranea*. (50):3–44
- Ghiselli A, Nardini M, Baldi A, Scaccini C. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(2):361–67
- Gisi U, Sierotzki H. 2008. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *European Journal of Plant Pathology*. 122(1):157–67
- Gisi U, Sierotzki H, Cook A, McCaffery A. 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to Qo inhibitor fungicides. *Pest Management Science*. 58(9):859–67
- Gobbin D. 2004. Redefining *Plasmopara viticola* epidemiological cycle by molecular genetics. *Thèse*. pp 1–154

- Goleniowski M, Bonfill M, Cusido R, Palazón J. 2013. Phenolic Acids. In *Natural Products*, eds. KG Ramawat, J-M Mérillon, pp. 1951–73. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- González-Muñoz MJ, Alvarez R, Santos V, Parajó JC. 2012. Production of hemicellulosic sugars from *Pinus pinaster* wood by sequential steps of aqueous extraction and acid hydrolysis. *Wood Science and Technology*. 46(1–3):271–85
- Gregory P, Tingey WM, Ave DA, Bouthyette PY. 1986. Potato glandular trichomes: a physicochemical defense mechanism against insects. In *Natural Resistance of Plants to Pests*, Vol. 296, eds. MB Green, PA Hedin, pp. 160–67. Washington, DC: American Chemical Society
- Guerrero RF, Biais B, Richard T, Puertas B, Waffo-Teguo P, et al. 2016. Grapevine cane's waste is a source of bioactive stilbenes. *Industrial Crops and Products*. 94:884–92
- Hagerman AE. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry*. 256(9):4494–97
- Hammerbacher A, Schmidt A, Wadke N, Wright LP, Schneider B, et al. 2013. A common fungal associate of the spruce bark beetle metabolizes the stilbene defenses of Norway spruce. *Plant Physiology*. 162(3):1324–36
- Hao Z, Van Tuinen D, Wipf D, Fayolle L, Chataignier O, et al. 2017. Biocontrol of grapevine aerial and root pathogens by *Paenibacillus* sp. strain B2 and paenimyxin in vitro and in planta. *Biological Control*. 109:42–50
- Hare JD. 1990. Ecology and management of the Colorado potato beetle. *Annu. Rev. Entomol.* (35):81–100
- Harm A, Kassemeyer HH, Seibicke T, Regner F. 2011. Evaluation of chemical and natural resistance inducers against downy mildew (*Plasmopara viticola*) in grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 62(2):184–92
- Harmatha J, Dinan L. 2003. Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant-insect chemical interactions. *Phytochemistry Reviews*. 2(3):321–30
- Hitchner EM, Kuhar TP, Dickens JC, Youngman RR, Schultz PB, Pfeiffer DG. 2008. Host plant choice experiments of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in Virginia. *Journal of Economic Entomology*. 101(3):859–65
- Holmbom B, Eckerman C, Eklund P, Hemming J, Nisula L, et al. 2003. Knots in trees – a new rich source of lignans. *Phytochemistry Reviews*. 2(3):331–40
- Hostetler GL, Ralston RA, Schwartz SJ. 2017. Flavones: food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 8(3):423–35
- Huang YL, Tsai WJ, Shen CC, Chen CC. 2005. Resveratrol derivatives from the roots of *Vitis thunbergii*. *Journal of Natural Products*. 68(2):217–20
- Hubert J, Angelis A, Alianni N, Rosalia M, Abedini A, et al. 2016. In vitro dermo-cosmetic evaluation of bark extracts from common temperate trees. *Planta Medica*. 82(15):1351–58
- Huxley RR, Neil HAW. 2003. The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57(8):904–8
- Ioset JR, Marston A, Gupta MP, Hostettmann K. 2001. Five new prenylated stilbenes from the root bark of *Lonchocarpus chiricanus*. *Journal of Natural Products*. 64(6):710–15
- Isman MB. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*. 51(1):45–66
- Isman MB. 2015. A renaissance for botanical insecticides? *Pest Management Science*. 71(12):1587–90

- Jaganathan SK, Mandal M. 2009. Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2009:1–13
- Jang M. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 275(5297):218–20
- Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Bessis R, Debord S, Sbaghi M, Adrian M. 2002. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(10):2731–41
- Jermi M, Blaise P, Gessler C. 2010. Quantitative effect of leaf damage caused by downy mildew (*Plasmopara viticola*) on growth and yield quality of grapevine “Merlot” (*Vitis vinifera*). *Vitis*. 49(2):77–85
- Jiang N, Doseff A, Grotewold E. 2016. Flavones: from biosynthesis to health benefits. *Plants*. 5(2):27
- Jyske T, Laakso T, Latva-Mäenpää H, Tapanila T, Saranpää P. 2014. Yield of stilbene glucosides from the bark of young and old Norway spruce stems. *Biomass and Bioenergy*. 71:216–27
- Keller M. 2015. *The Science of Grapevines*. Elsevier Science
- Kent AD, Triplett EW. 2002. Microbial Communities and Their Interactions in Soil and Rhizosphere Ecosystems. *Annual Review of Microbiology*. 56(1):211–36
- Khadem S, Marles RJ. 2010. Monocyclic Phenolic Acids; Hydroxy- and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies. *Molecules*. 15(11):7985–8005
- Khan MK, Zill-E-Huma, Dangles O. 2014. A comprehensive review on flavanones, the major *Citrus* polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*. 33(1):85–104
- Kiefer B, Riemann M, Büche C, Kassemeyer HH, Nick P. 2002. The host guides morphogenesis and stomatal targeting in the grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *Planta*. 215(3):387–93
- Kim MS, Lan Q. 2011. Larvicidal activity of α -mangostin in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Pesticide Science*. 36(3):370–75
- Kim N, Kim JK, Hwang D, Lim YH. 2013. The possible mechanism of rhapontigenin influencing antifungal activity on *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 51(1):45–52
- Kim YM, Lee EW, Eom SH, Kim TH. 2014. Pancreatic lipase inhibitory stilbenoids from the roots of *Vitis vinifera*. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 65(1):97–100
- Klarzynski O, Fritig B. 2001. Stimulation des défenses naturelles des plantes. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*. 324(10):953–63
- Koh JCO, Barbulescu DM, Salisbury PA, Slater AT. 2016. Pterostilbene is a potential candidate for control of blackleg in canola. *Plos One*. 11(5):1–17
- Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*. 64(5):923–33
- Korhammer S, Reniero F, Mattivi F. 1995. An oligostilbene from *Vitis* roots. *Phytochemistry*. 38(6):1501–4
- Kortekamp A. 1997. *Epicoccum nigrum* link: a biological control agent of *Plasmopara viticola* (Berk. et Curt.) Berl. et De Toni. 36(4):215–16
- Kostić M, Dražić S, Popović Z, Stanković S, Sivčev I, Živanović T. 2007. Developmental and feeding alternations in *Leptinotarsa decemlineata* Say. (Coleoptera: Hymenoptera) caused by *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 21(4):426–30
- Kowalski SP, Domek JM, Deahl KL, Sanford L. 1999. Performance of Colorado potato beetle larvae, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), reared on synthetic diets supplemented with *Solanum* glycoalkaloids. *Amer J of Potato Res*. (76):305–12

- Kreps F, Burčová Z, Jablonský M, Ház A, Frečer V, et al. 2017. Bioresource of antioxidant and potential medicinal compounds from waste biomass of spruce. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 5(9):8161–70
- Kulik T, Buško M, Pszczółkowska A, Perkowski J, Okorski A. 2014. Plant lignans inhibit growth and trichothecene biosynthesis in *Fusarium graminearum*. *Letters in Applied Microbiology*. 59(1):99–107
- Laavola M, Leppänen T, Eräsalo H, Hämäläinen M, Nieminen R, Moilanen E. 2016. Anti-inflammatory effects of nortrachelogenin in murine J774 macrophages and in carrageenan-induced paw edema model in the mouse. *Planta Medica*. 83(06):519–26
- Lambert C, Bisson J, Waffo-Téguo P, Papastamoulis Y, Richard T, et al. 2012. Phenolics and their antifungal role in grapevine wood decay: focus on the *Botryosphaeriaceae* family. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(48):11859–68
- Lambert C, Richard T, Renouf E, Bisson J, Waffo-Téguo P, et al. 2013. Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(47):11392–99
- Lamichhane JR, Osdaghi E, Behlau F, Köhl J, Jones JB, Aubertot JN. 2018. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 38(28):1–18
- Landete JM. 2012. Plant and mammalian lignans: a review of source, intake, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International*. 46(1):410–24
- Lattanzio V. 2013. Phenolic compounds: introduction. In *Natural Products*, eds. KG Ramawat, JM Mérillon, pp. 1543–80. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Latva-Mäenpää H, Laakso T, Sarjala T, Wähälä K, Saranpää P. 2013. Variation of stilbene glucosides in bark extracts obtained from roots and stumps of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.). *Trees*. 27(1):131–39
- Latva-Mäenpää H, Laakso T, Sarjala T, Wähälä K, Saranpää P. 2014. Root neck of Norway spruce as a source of bioactive lignans and stilbenes. *Holzforschung*. 68(1):1–7
- Lee HS, Kim JK, Park KT, Lim YH. 2012. Rhapontigenin converted from rhapontin purified from *Rheum undulatum* enhances the inhibition of melanin synthesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 76(12):2307–9
- Lee SK, Lee HJ, Min HY, Park EJ, Lee KM, et al. 2005. Antibacterial and antifungal activity of pinosylvin, a constituent of pine. *Fitoterapia*. 76(2):258–60
- Li SH, Niu XM, Zahn S, Gershenzon J, Weston J, Schneider B. 2008. Diastereomeric stilbene glucoside dimers from the bark of Norway spruce (*Picea abies*). *Phytochemistry*. 69(3):772–82
- Li Z, Pan Q, Jin Z, Mu L, Duan C. 2011. Comparison on phenolic compounds in *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon wines from five wine-growing regions in China. *Food Chemistry*. 125(1):77–83
- Liang C, Zang C, McDermott MI, Zhao K, Yu S, Huang Y. 2016. Two imide substances from a soil-isolated *Streptomyces atratus* strain provide effective biocontrol activity against grapevine downy mildew. *Biocontrol Science and Technology*. 26(10):1337–51
- Lin SY, Huang GC, Hsieh YY, Lin YS, Han CH, et al. 2015. *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* extracts and purified compounds ameliorate obesity in high-fat diet-induced obese mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63(42):9286–94

- Liu YQ, Li XJ, Zhao CY, Lu Y, Li WQ, et al. 2013. Synthesis and insect antifeedant activity of stilbene derivatives against *Brontispa longissima* larvae. *Medicinal Chemistry Research*. 22(5):2196–2206
- Lorenzen JH, Balbyshev NF, Lafta AM, Casper H, Tian X, Sagredo B. 2001. Resistant potato selections contain leptine and inhibit development of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology*. 94(5):1260–67
- Lowry B, Lee D, Hébant C. 1980. The origin of land plants: a new look at an old problem. *Taxon*. 29(2/3):183–97
- Lutzoni F, Kauff F, Cox CJ, McLaughlin D, Celio G, et al. 2004. Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*. 91(10):1446–80
- Lv XQ, Feng G, Liu YQ, Nan X, Yang L. 2014. CA-4, a natural cis-stilbene compound with potential insecticidal activity. *Medicinal Chemistry Research*. 23(7):3347–52
- Maharajaya A, Vosman B. 2015. Managing the Colorado potato beetle; the need for resistance breeding. *Euphytica*. 204(3):487–501
- Maimoona A, Naeem I, Saddiqe Z, Jameel K. 2011. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 133(2):261–77
- Mallikarjuna N. 1999. Ovule and embryo culture to obtain hybrids from interspecific incompatible pollinations in chickpea. *Euphytica*. (110):1–6
- Mandal SM, Chakraborty D, Dey S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior*. 5(4):359–68
- Marè C, Aprile A, Roncaglia E, Tocci E, Corino LG, et al. 2013. Rootstock and soil induce transcriptome modulation of phenylpropanoid pathway in grape leaves. *Journal of Plant Interactions*. 8(4):334–49
- Marel AK, Lizard G, Izard JC, Latruffe N, Delmas D. 2008. Inhibitory effects of trans-resveratrol analogs molecules on the proliferation and the cell cycle progression of human colon tumoral cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. 52(5):538–48
- Marques E, Uesugi CH, Ferreira MASV. 2009. Sensitivity to copper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Trabalhos em Linguística Aplicada*. 34(6):406–11
- Martel JW, Alford AR, Dickens JC. 2005. Synthetic host volatiles increase efficacy of trap cropping for management of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Agricultural and Forest Entomology*. 7(1):79–86
- Martínez-Bracero M, Alcázar P, Velasco-Jiménez MJ, Galán C. 2018. Fungal spores affecting vineyards in Montilla-Moriles Southern Spain. *European Journal of Plant Pathology*. 1–13
- Martins V, Teixeira A, Bassil E, Blumwald E, Gerós H. 2014. Metabolic changes of *Vitis vinifera* berries and leaves exposed to Bordeaux mixture. *Plant Physiology and Biochemistry*. 82:270–78
- McKee RH, Tibaldi R, Adenuga MD, Carrillo JC, Margary A. 2018. Assessment of the potential human health risks from exposure to complex substances in accordance with REACH requirements. “White spirit” as a case study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 92:439–57
- Merdinoglu D, Blasi P, Wiedemann-Merdinoglu S, Mestre P, Peressotti E, et al. 2014. Breeding for durable resistance to downy and powdery mildew in grapevine. *Acta Horticulturae*. (1046):65–72
- Merdinoglu D, Schneider C, Prado E, Wiedeman-Merdinoglu S, Mestre P, et al. 2018. Breeding for durable resistance to downy and powdery mildew in grapevine. *Oeno one*. 52(3):189–95

- Merdinoglu D, Wiedeman-Merdinoglu S, Coste P, Dumas V, Haetty S, et al. 2003. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia*. *Acta Horticulturae*. (603):451–56
- Meyer AS, Donovan JL, Pearson DA, Waterhouse AL, Frankel EN. 1998. Fruit hydroxycinnamic acids inhibit human low-density lipoprotein oxidation in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46(5):1783–87
- Miguel MG. 2011. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 1(6):7–15
- Mitchell BK. 1988. Adult leaf beetles as models for exploring the chemical basis of host-plant recognition. *Journal of Insect Physiology*. 34(3):213–25
- Montero L, Sáez V, von Baer D, Cifuentes A, Herrero M. 2018. Profiling of *Vitis vinifera* L. canes (poly)phenolic compounds using comprehensive two-dimensional liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1536:205–15
- Mulat DG, Latva-Mäenpää H, Koskela H, Saranpää P, Wähälä K. 2014. Rapid chemical characterisation of stilbenes in the root bark of Norway spruce by off-line HPLC/DAD-NMR. *Phytochemical Analysis*. 25(6):529–36
- Mulholland DA, Thuerig B, Langat MK, Tamm L, Nawrot DA, et al. 2017. Efficacy of extracts from eight economically important forestry species against grapevine downy mildew (*Plasmopara viticola*) and identification of active constituents. *Crop Protection*. 102:104–9
- Müller C, Ullmann K, Wilkens A, Winterhalter P, Toyokuni S, Steinberg P. 2009. Potent antioxidative activity of Vineatrol®30 grapevine-shoot extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 73(8):1831–36
- Musetti R, Vecchione A, Stringher L, Borselli S, Zulini L, et al. 2006. Inhibition of sporulation and ultrastructural alterations of grapevine downy mildew by the endophytic fungus *Alternaria alternata*. *Phytopathology*. 96(7):689–98
- Nanni IM, Pironi A, Mancini D, Stammler G, Gold R, et al. 2016. Differences in the efficacy of carboxylic acid amide fungicides against less sensitive strains of *Plasmopara viticola*: Differences in the efficacy of CAA fungicides towards *P. viticola* strains. *Pest Management Science*. 72(8):1537–39
- Neacsu M, Eklund PC, Sjöholm RE, Pietarinen SP, Ahotupa MO, et al. 2007. Antioxidant flavonoids from knotwood of Jack pine and European aspen. *Holz Roh Werkst*. 65(1):1–6
- Ninomiya M, Koketsu M. 2013. Minor Flavonoids (Chalcones, Flavanones, Dihydrochalcones, and Aurones). In *Natural Products*, eds. KG Ramawat, JM Mérillon, pp. 1867–1900. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Ochssner I, Hausmann L, Töpfer R. 2016. Rpv14, a new genetic source for *Plasmopara viticola* resistance conferred by *Vitis cinerea*. *Vitis*. 55:79–81
- OIV. 2018. Elements de conjuncture mondiale. *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin*. 1-14
- Oliveira J, Mateus N, de Freitas V. 2013. Flavanols: catechins and proanthocyanidins. In *Natural Products*, eds. KG Ramawat, JM Mérillon, pp. 1753–1801. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Ollat N, Bordenave L, Tandonnet JP, Boursiquot JM, Marguerit E. 2016. Grapevine rootstocks: origins and perspectives. *Acta Horticulturae*. (1136):11–22
- Ollat N, Cookson SJ, Lauvergeat V, Marguerit E, Barrieu F, et al. 2017. Grapevine roots: the dark side. *Acta Horticulturae*. (1188):213–26

- Ortiz de Elguea-Culebras G, Sánchez-Vioque R, Berruga MI, Herraiz-Peñalver D, Santana-Méridas O. 2017. Antifeedant effects of common terpenes from mediterranean aromatic plants on *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of soil science and plant nutrition*. 17(2):475–85
- Pan H, Lundgren LN. 1995. Phenolic extractives from root bark of *Picea abies*. *Phytochemistry*. 39(6):1423–28
- Park KT, Kim JK, Lim YH. 2014. Deglycosylation of stilbene glucoside compounds improves inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and squalene synthase activities. *Food Science and Biotechnology*. 23(2):647–51
- Parlement Européen. 2006. Règlement (CE) N°1907/2006 du Parlement européen et du conseil sur l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques. *Off. J. Eur. Union*. 1-849
- Parlement Européen. 2012. Directive 2012/18/UE du Parlement européen et du conseil sur la maîtrise des dangers liés aux accidents majeurs impliquant des substances dangereuses. *Off. J. Eur. Union*. 1-37
- Patzke H, Schieber A. 2018. Growth-inhibitory activity of phenolic compounds applied in an emulsifiable concentrate - ferulic acid as a natural pesticide against *Botrytis cinerea*. *Food Research International*. 113:18–23
- Pavela R. 2010. Antifeedant activity of plant extracts on *Leptinotarsa decemlineata* Say. and *Spodoptera littoralis* Bois. larvae. *Industrial Crops and Products*. 32(3):213–19
- Pavela R, Sajfrtová M, Sovová H, Karban J, Bárnet M. 2009. The effects of extracts obtained by supercritical fluid extraction and traditional extraction techniques on larvae *Leptinotarsa decemlineata* Say. *Journal of Essential Oil Research*. 21(4):367–73
- Pavela R, Waffo-Teguo P, Biais B, Richard T, Mérillon JM. 2017. *Vitis vinifera* canes, a source of stilbenoids against *Spodoptera littoralis* larvae. *Journal of Pest Science*. 90(3):961–70
- Pawlus AD, Sahli R, Bisson J, Rivière C, Delaunay J-C, et al. 2013. Stilbenoid profiles of canes from *Vitis* and *Muscadinia* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(3):501–11
- Pawlus AD, Waffo-Tégou P, Shaver J, Mérillon JM. 2012. Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a review. *OENO One*. 46(2):57–111
- Pedneault K, Provost C. 2016. Fungus resistant grape varieties as a suitable alternative for organic wine production: benefits, limits, and challenges. *Scientia Horticulturae*. 208:57–77
- Pelletier Y, Clark C, Tai GC. 2001. Resistance of three wild tuber-bearing potatoes to the Colorado potato beetle. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 100(1):31–41
- Pelletier Y, Dutheil J. 2006. Behavioural responses of the Colorado potato beetle to trichomes and leaf surface chemicals of *Solanum tarijense*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 120(2):125–30
- Pelletier Y, Grondin G, Maltais P. 1999. Mechanism of resistance to the Colorado potato beetle in wild *Solanum* species. *Journal of Economic Entomology*. 92(3):708–13
- Perazzolli M, Dagostin S, Ferrari A, Elad Y, Pertot I. 2008. Induction of systemic resistance against *Plasmopara viticola* in grapevine by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole. *Biological Control*. 47(2):228–34
- Perazzolli M, Roatti B, Bozza E, Pertot I. 2011. *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Biological Control*. 58(1):74–82

- Peressotti E, Wiedemann-Merdinoglu S, Delmotte F, Bellin D, Di Gaspero G, et al. 2010. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety. *BMC Plant Biology*. 10(1):147
- Perez-Vizcaino F, Duarte J. 2010. Flavonols and cardiovascular disease. *Molecular Aspects of Medicine*. 31(6):478–94
- Pezet R, Gindro K, Viret O, Richter H. 2004. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis-Geilweilerhof*. 43(3):145–148
- Pezet R, Pont V. 1990. Ultrastructural observations of pterostilbene fungitoxicity in dormant conidia of *Botrytis cinerea* Pers. *Journal of Phytopathology*. 129(1):19–30
- Pietarinen SP, Willför SM, Ahotupa MO, Hemming JE, Holmbom BR. 2006. Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials. *Journal of Wood Science*. 52(5):436–44
- Pieterse CMJ, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SCM. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*. 5(5):308–16
- Pintarič ZN. 2007. Assessment of the consequences of accident scenarios involving dangerous substances. *Process Safety and Environmental Protection*. 85(1):23–38
- Plahuta P, Korošec-Koruza Z, Stanovnik P, Raspor P. 2006. Current viticulture and winemaking technology versus GMO viticulture and winemaking technology. *Journal of Wine Research*. 17(3):161–72
- Plan Ecophyto II. 2015. *Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation et Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie* (http://agriculture.gouv.fr/sites/minagri/files/151022_ecophyto.pdf). 1-67
- Ployon S, Morzel M, Belloir C, Bonnotte A, Bourillot E, et al. 2018. Mechanisms of astringency: structural alteration of the oral mucosal pellicle by dietary tannins and protective effect of bPRPs. *Food Chemistry*. 253:79–87
- Pons A, Mouakka N, Deliere L, Crachereau JC, Davidou L, et al. 2018. Impact of *Plasmopara viticola* infection of Merlot and Cabernet Sauvignon grapes on wine composition and flavor. *Food Chemistry*. 239:102–10
- Pont V, Pezet R. 1990. Relation between the chemical structure and the biological activity of hydroxystilbenes against *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*. 130(1):1–8
- Pontier D, Balagué C, Roby D. 1998. The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*. 321(9):721–34
- Puopolo G, Giovannini O, Pertot I. 2014. *Lysobacter capsici* AZ78 can be combined with copper to effectively control *Plasmopara viticola* on grapevine. *Microbiological Research*. 169(7–8):633–42
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységou L. 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*. 50(3):586–621
- Raghvendra, Sharma V, Shakya A, Hedaytullah MD, Arya GS, et al. 2011. Chemical and potential aspects of anthocyanins - a water-soluble vacuolar flavonoid pigments: a review. 6(1):28–33
- Rajeswari E, Chitra K, Seetharaman K, Sankaralingam V. 2008. Exploiting medicinal plants and phylloplane microflora for the management of grapevine downy mildew. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 41(3):213–20
- Ramawat KG, Mérillon JM. 2013a. *Natural Products. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Vol. 2. Springer ed.

- Ramawat KG, Mérillon JM. 2013b. *Natural Products. Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, Vol. 3. Springer ed.
- Rameau JC, Mansion D, Dumé G, Gauberville C. 1989. *Flore Forestière Française: Région Méditerranéenne*, Vol. 3. France. Institut pour le développement forestier ed.
- Ramseyer J, Thuerig B, De Mieri M, Schärer HJ, Oberhänsli T, et al. 2017. Eudesmane sesquiterpenes from *Verbesina lanata* with inhibitory activity against grapevine downy mildew. *Journal of Natural Products*. 80(12):3296–3304
- Raposo R, Chinnici F, Ruiz-Moreno MJ, Puertas B, Cuevas FJ, et al. 2018. Sulfur free red wines through the use of grapevine shoots: impact on the wine quality. *Food Chemistry*. 243:453–60
- Rasul A, Millimouno FM, Ali Eltayb W, Ali M, Li J, Li X. 2013. Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed Research International*. 2013:1–9
- Renaud S, de Lorgeril M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*. 339(8808):1523–26
- Renaud S, Gueguen R. 1998. The French paradox and wine drinking. *Novartis Found Symp*. (216):217–22
- Reniero F, Rudolph M, Angioni A, Bernreuther A, Cabras P, Mattivi F. 1996. Identification of two stilbenoids from *Vitis* roots. 35(3):125–27
- Repo A, Tuomi M, Liski J. 2011. Indirect carbon dioxide emissions from producing bioenergy from forest harvest residues: indirect emissions of harvest residue bioenergy. *GCB Bioenergy*. 3(2):107–15
- Ricardo-Da-Silva JM, Cheynier V, Souquet JM, Moutounet M, Cabanis JC, Bourzeix M. 1991. Interaction of grape seed procyanidins with various proteins in relation to wine fining. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 57(1):111–25
- Richard T, Abdelli-Belhad A, Vitrac X, Waffo Teguo PW, Mérillon JM. 2016. *Vitis vinifera* canes, a source of stilbenoids against downy mildew. *Oeno One*. 50(3):137–43
- Richard T, Temsamani H, Delaunay JC, Krisa S, Mérillon JM. 2014. Stilbènes : de la chimie à la neuroprotection. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*. 49(4):173–80
- Rivas S, Raspolli-Galletti AM, Antonetti C, Santos V, Parajó JC. 2016. Sustainable conversion of *Pinus pinaster* wood into biofuel precursors: a biorefinery approach. *Fuel*. 164:51–58
- Rivière C, Pawlus AD, Mérillon JM. 2012. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports*. 29(11):1317
- Rodríguez-Cabo T, Rodríguez I, Ramil M, Cela R. 2018. Assessment of alcoholic distillates for the extraction of bioactive polyphenols from grapevine canes. *Industrial Crops and Products*. 111:99–106
- Rohdewald PJ. 2005. Pycnogenol, french maritime pine bark extract. *Encyclopedia of Dietary Supplements*. 545–53
- Romain C, Gaillet S, Carillon J, Vidé J, Ramos J, et al. 2012. Vineatrol and cardiovascular disease: beneficial effects of a vine-shoot phenolic extract in a hamster atherosclerosis model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(44):11029–36
- Rossi V, Caffi T, Bugiani R, Spanna F, Valle DD. 2008. Estimating the germination dynamics of *Plasmopara viticola* oospores using hydro-thermal time. *Plant Pathology*. 57(2):216–26
- Rumbolz J, Wirtz S, Kassemeyer HH, Guggenheim R, Schäfer E, Büche C. 2002. Sporulation of *Plasmopara viticola*: differentiation and light regulation. *Plant Biology*. 4(3):413–22

- Rusjan D, Persic M, Likar M, Biniari K, Mikulic-Petkovsek M. 2017. Phenolic responses to esca-associated fungi in differently decayed grapevine woods from different trunk parts of “Cabernet Sauvignon.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65(31):6615–24
- Russell PE. 1995. Fungicide resistance: occurrence and management. *The Journal of Agricultural Science*. 124:317–23
- Sablon L, Dickens J, Haubruge É, Verheggen F. 2012. Chemical ecology of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), and potential for alternative control methods. *Insects*. 4(1):31–54
- Sablon L, Haubruge E, Verheggen FJ. 2013. Consumption of immature stages of Colorado potato beetle by *Chrysoperla Carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) larvae in the laboratory. *American Journal of Potato Research*. 90(1):51–57
- Sáez V, Gayoso C, Riquelme S, Pérez J, Vergara C, et al. 2018. C18 core-shell column with in-series absorbance and fluorescence detection for simultaneous monitoring of changes in stilbenoid and proanthocyanidin concentrations during grape cane storage. *Journal of Chromatography B*. 1074–1075:70–78
- Saigne-Soulard C, Abdelli-Belhadj A, Téléf-Micouleau M, Bouscaut J, Cluzet S, et al. 2015. Oligosaccharides from *Botrytis cinerea* and elicitation of grapevine defense. In *Polysaccharides*, eds. KG Ramawat, JM Mérillon, pp. 939–58. Cham: Springer International Publishing
- Saleem M, Kim HJ, Ali MS, Lee YS. 2005. An update on bioactive plant lignans. *Natural Product Reports*. 22(6):696–716
- Salem MZM, Elansary HO, Elkelish AA, Zeidler A, Ali HM, et al. 2016. In vitro bioactivity and antimicrobial activity of *Picea abies* and *Larix decidua* wood and bark extracts. *BioResources*. 11(4):9421–37
- Sambangi P, Rani PU. 2016. Physiological effects of resveratrol and coumaric acid on two major groundnut pests and their egg parasitoid behavior. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 91(4):230–45
- Santos-Buelga C, Scalbert A. 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7):1094–1117
- Sarni-Manchado P, Cheynier V. 2006. *Les Polyphénols En Agroalimentaire*. Tec & Doc Lavoisier Editions ed.
- Satake H, Koyama T, Bahabadi S, Matsumoto E, Ono E, Murata J. 2015. Essences in metabolic engineering of lignan biosynthesis. *Metabolites*. 5(2):270–90
- Scalbert A, Morand C, Manach C, Rémésy C. 2002. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 56(6):276–82
- Scalbert A, Williamson G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *American Society fo Nutritional Sciences*. 2073–85
- Schnee S, Queiroz EF, Voinesco F, Marcourt L, Dubuis P-H, et al. 2013. *Vitis vinifera* canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(23):5459–67
- Schwander F, Eibach R, Fechter I, Hausmann L, Zyprian E, Töpfer R. 2012. Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*. 124(1):163–76

- Scott IM, Jensen H, Scott JG, Isman MB, Arnason JT, Philogène BJR. 2003. Botanical insecticides for controlling agricultural pests: piperamides and the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae): piperamides and *L. decemlineata*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 54(4):212–25
- Seigler DS. 1998. Shikimic acid pathway. In *Plant Secondary Metabolism*. Springer, Boston, MA
- Selivanova IA, Tyukavkina NA, Kolesnik YA, Nesterov VN, Kuleshova LN, et al. 1999. Study of the crystalline structure of dihydroquercetin. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 33(4):222–24
- Sexson DL, Wyman JA. 2005. Effect of crop rotation distance on populations of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): development of areawide Colorado Potato beetle pest management Strategies. *Journal of Economic Entomology*. 98(3):716–24
- Shafizadeh S, Kavanagh JA. 2005. Pathogenicity of *Phytophthora* species and *Pythium undulatum* isolated from *Abies procera* Christmas trees in Ireland. *Forest Pathology*. 35(6):444–50
- Shen T, Xie CF, Wang XN, Lou HX. 2013. Stilbenoids. In *Natural Products*, eds. KG Ramawat, JM Mérillon, pp. 1901–49. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Shih PH, Yeh CT, Yen GC. 2005. Effects of anthocyanidin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *Food and Chemical Toxicology*. 43(10):1557–66
- Shimizu K, Kondo, and R, Sakai K. 2000. Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substituted resorcinols: structure-activity investigations. *Planta Medica*. 66(1):11–15
- Siemann EH, Creasy LL. 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 43(1):49–52
- Skrøppa T. 2003. Technical guidelines for genetic conservation and use for Norway spruce (*Picea abies*). *International Plant Genetic Resources Institute*. 1–6
- Snopek L, Mlcek J, Sochorova L, Baron M, Hlavacova I, et al. 2018. Contribution of red wine consumption to human health protection. *Molecules*. 23(7):1–16
- Sobeh M, Mahmoud MF, Abdelfattah MAO, Cheng H, El-Shazly AM, Wink M. 2018. A proanthocyanidin-rich extract from *Cassia abbreviata* exhibits antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*. 213:38–47
- Sobolev VS, Khan SI, Tabanca N, Wedge DE, Manly SP, et al. 2011. Biological activity of peanut (*Arachis hypogaea*) phytoalexins and selected natural and synthetic stilbenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(5):1673–82
- Soeur J, Eilstein J, Léreaux G, Jones C, Marrot L. 2015. Skin resistance to oxidative stress induced by resveratrol: from Nrf2 activation to GSH biosynthesis. *Free Radical Biology and Medicine*. 78:213–23
- Spilioti E, Jaakkola M, Tolonen T, Lipponen M, Virtanen V, et al. 2014. Phenolic acid composition, antiatherogenic and anticancer potential of honeys derived from various regions in Greece. *Plos One*. 9(4):1–10
- Stankovic S, Kostic M, Sivcev I, Jankovic S, Kljajic P, et al. 2012. Resistance of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to neonicotinoids, pyrethroids and nereistoxins in Serbia. *Romanian Biotechnological Letters*. 17(5):7599–7609
- Stankovic S, Zabel A, Kostic M, Manojlovic B, Rajkovic S. 2004. Colorado potato beetle [*Leptinotarsa decemlineata* (Say)] resistance to organophosphates and carbamates in Serbia. *Journal of Pest Science*. 77(1):11–15

- Stoner KA. 1997. Influence of mulches on the colonization by adults and survival of larvae of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) in eggplant. *Journal of Entomological Science*. 32(1):7–16
- Sun Q, Gates MJ, Lavin EH, Acree TE, Sacks GL. 2011. Comparison of odor-active compounds in grapes and wines from *Vitis vinifera* and non-foxy American grape species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(19):10657–64
- Suzuki S, Umezawa T. 2007. Biosynthesis of lignans and norlignans. *Journal of Wood Science*. 53(4):273–84
- Szafranek B, Synak E, Waligóra D, Szafranek J, Nawrot J. 2008. Leaf surface compounds of the potato (*Solanum tuberosum*) and their influence on Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) feeding. *Chemoecology*. 18(4):205–16
- Szendrei Z, Grafius E, Byrne A, Ziegler A. 2012. Resistance to neonicotinoid insecticides in field populations of the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Pest Management Science*. 68(6):941–46
- Szentesi A, Weber DC, Jermy T. 2002. Role of visual stimuli in host and mate location of the Colorado potato beetle. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 105(2):141–52
- Teodoro GR, Ellepola K, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY. 2015. Potential use of phenolic acids as anti-candida agents: a review. *Frontiers in Microbiology*. 6:1–11
- Teponno RB, Kusari S, Spiteller M. 2016. Recent advances in research on lignans and neolignans. *Natural Product Reports*. 33(9):1044–92
- Testai L, Calderone V. 2017. Nutraceutical value of *Citrus* flavanones and their implications in cardiovascular disease. *Nutrients*. 9(5):502
- Thuerig B, James EE, Schärer H, Langat MK, Mulholland DA, et al. 2018. Reducing copper use in the environment: the use of larixol and larixyl acetate to treat downy mildew caused by *Plasmopara viticola* in viticulture: use of larch extracts against *Plasmopara viticola*. *Pest Management Science*. 74(2):477–88
- Thuerig B, Ramseyer J, Hamburger M, Oberhänsli T, Potterat O, et al. 2016. Efficacy of a *Juncus effusus* extract on grapevine and apple plants against *Plasmopara viticola* and *Venturia inaequalis*, and identification of the major active constituent. *Pest Management Science*. 72(9):1718–26
- Toffolatti SL, Venturini G, Campia P, Cirio L, Bellotto D, Vercesi A. 2015. Sensitivity to cymoxanil in Italian populations of *Plasmopara viticola* oospores: sensitivity to cymoxanil in Italian populations of *Plasmopara viticola* oospores. *Pest Management Science*. 71(8):1182–88
- Tomas-Barberan FA, Clifford MN. 2000. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 80(7):1024–32
- Torres P, Guillermo Avila J, Romo de Vivar A, García AM, Marín JC, et al. 2003. Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. *Phytochemistry*. 64(2):463–73
- Tříška J, Vrchotová N, Balík J, Soural I, Sotolář R. 2017. Variability in the content of trans-resveratrol, trans- ϵ -viniferin and r2-viniferin in grape cane of seven *Vitis vinifera* L. varieties during a three-year study. *Molecules*. 22(928):1–10
- Unger S, Büche C, Boso S, Kassemeyer HH. 2007. The course of colonization of two different *Vitis* genotypes by *Plasmopara viticola* indicates compatible and incompatible host-pathogen interactions. *Phytopathology*. 97(7):780–86

- Valimaa A, Honkalampihamalainen U, Pietarinen S, Willför S, Holmbom B, Vonwright A. 2007. Antimicrobial and cytotoxic knotwood extracts and related pure compounds and their effects on food-associated microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 115(2):235–43
- Variyar PS, Bandyopadhyay C. 1995. Estimation of phenolic acids in cinnamon, clove, cardamom, nutmeg and mace by high performance liquid chromatography. 4(2):129–34
- Venuti S, Copetti D, Foria S, Falginella L, Hoffmann S, et al. 2013. Historical introgression of the downy mildew resistance gene Rpv12 from the Asian species *Vitis amurensis* into grapevine varieties. *Plos One*. 8(4):1–7
- Vercesi A, Tornaghi R, Sant S, Burruano S, Faoro F. 1999. A cytological and ultrastructural study on the maturation and germination of oospores of *Plasmopara viticola* from overwintering vine leaves. *Mycol. Res.* 103(2):193–202
- Vergara C, von Baer D, Mardones C, Wilkens A, Wernekinck K, et al. 2012. Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60(4):929–33
- Visser JH. 1979. Electroantennogram responses of the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, to plant volatiles. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 25(1):86–97
- Wang CK, Chen LG, Wen CL, Hou W., Hung LF, et al. 2010. Neuroprotective activity of *Vitis thunbergii* var. *taiwaniana* extracts in vitro and in vivo. *Journal of Medicinal Food*. 13(1):170–78
- Wang Z, Zhao Z, Cheng X, Liu S, Wei Q, Scott IM. 2016. Conifer flavonoid compounds inhibit detoxification enzymes and synergize insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 127:1–7
- Wei YJ, Zhao SR, Li JM, Xue B. 2016. Stilbene profiles in different tissues of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon and a comparison of their antioxidant activity: stilbene profiles of Cabernet Sauvignon vines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 22(2):226–31
- Welter LJ, Göktürk-Baydar N, Akkurt M, Maul E, Eibach R, et al. 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Molecular Breeding*. 20(4):359–74
- Whalon ME, Wingerd BA. 2003. Bt: mode of action and use. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 54(4):200–211
- Wilde J, Hille Ris Lambers-Suwerkropp K, Tol A. 1969. Responses to air flow and airborne plant odour in the Colorado beetle. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 75(1–2):53–57
- Willför S, Hemming J, Reunanen M, Holmbom B. 2003. Phenolic and lipophilic extractives in scots pine knots and stemwood. *Holzforschung*. 57(4):359–72
- Wong FP, Burr HN, Wilcox WF. 2001. Heterothallism in *Plasmopara viticola*. *Plant Pathology*. 50(4):427–32
- Woodward S, Pearce RB. 1988. The role of stilbenes in resistance of Sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) to entry of fungal pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 33(1):127–49
- Wraight SP, Ramos ME. 2015. Delayed efficacy of *Beauveria bassiana* foliar spray applications against Colorado potato beetle: impacts of number and timing of applications on larval and next-generation adult populations. *Biological Control*. 83:51–67
- Wright RJ. 1984. Evaluation of crop rotation for control of Colorado potato Beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) in commercial potato fields on long island. *Journal of Economic Entomology*. 77(5):1254–59

- Yang YX, Ahammed GJ, Wu C, Fan SY, Zhou YH. 2015. Crosstalk among jasmonate, salicylate and ethylene signaling pathways in plant disease and immune responses. *Current Protein and Peptide Sciences*. 16:450-461
- Zhang Q, Zhao X, Qiu H. 2013. Flavones and flavonols: phytochemistry and biochemistry. In *Natural Products*, eds. KG Ramawat, JM Mérillon, pp. 1821–47. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Zhang X, Zhou Y, Li Y, Fu X, Wang Q. 2017a. Screening and characterization of endophytic *Bacillus* for biocontrol of grapevine downy mildew. *Crop Protection*. 96:173–79
- Zhang Y, Yu J, Dong XD, Ji HY. 2017b. Research on characteristics, antioxidant and antitumor activities of dihydroquercetin and its complexes. *Molecules*. 23(20):1–11
- Zini E, Prazzoli ML, Lorenzi S, Eibach R, Grando MS, Letschka T. 2017. Molecular detection of disease resistance traits in grapevine accessions and populations. *Acta Horticulturae*. 1172:75–78
- Zordoky BNM, Robertson IM, Dyck JRB. 2015. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1852(6):1155–77

Site Web :

www.actichem.fr

<http://www.ecophytopic.fr/>

<http://ephytia.inra.fr>

www.legifrance.gouv.fr

<https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-75288-synthese> (*Picea abies*)

<https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-49677-synthese> (*Pinus pinaster*)

<https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-72795-synthese> (*Vitis vinifera*)

Stilbènes de la vigne et d'essences forestières (pin, épicéa) : Etude phytochimique et recherche d'activités anti-oomycète et insecticide

De nos jours, il y a une volonté générale de se tourner vers une agriculture plus respectueuse de l'environnement et du consommateur se traduisant notamment par une démarche de réduction des intrants chimiques. Dans un contexte de développement durable, la recherche de produits naturels pour lutter contre les maladies et les ravageurs suscite un regain d'intérêt. Dans cette thèse, des extraits hydro-alcooliques issus de coproduits de la vigne (sarmant, cep, racine) et d'essences forestières (écorce d'épicéa, nœud de pin) se sont révélés être une excellente source de polyphénols bioactifs, en particulier en stilbènes complexes. En effet, ces extraits ont démontré un large spectre d'activités contre différentes maladies végétales. En particulier, un potentiel oomycide contre le mildiou de la vigne et une capacité insecticide contre un parasite des Solanacées sont rapportés. En outre, la pertinence de l'utilisation de la « chimie verte » pour extraire les stilbènes comme méthode alternative aux solvants organiques a été mise en évidence. Les présents résultats renforcent une voie de recherche originale pour faire progresser une viticulture et une agriculture plus durables, en utilisant des produits de biocontrôle moins toxiques et biodégradables, constituant ainsi une solution possible et réaliste pour lutter contre les pathogènes des plantes.

Mots clés : stilbène, polyphénol, protection des plantes, oomycide, coproduit, CL-SM, RMN

Stilbenes of grapevine and forest species (pine, spruce): Phytochemical study and research of anti-oomycete and insecticide activities

Nowadays, it is a priority to turn towards a more eco- and consumer friendly agriculture resulting in the reduction of the chemical inputs. In a context of a sustainable development, the investigation of natural products to fight against diseases and pests raised a renewed interest. In this thesis, hydroalcoholic extracts derived from grapevine (cane, wood, root) and forest species (spruce bark, pine knot) by-products have demonstrated to be a great source of bioactive polyphenols, and particularly in complex stilbenes. Indeed, these extracts have proved to confer a broad spectrum of activities against different major plant diseases. In particular, an oomycide potential against downy mildew of the vine and an insecticidal capacity against Solanaceae pest were reported. Furthermore, the relevant use of "green chemistry" to extract stilbenes as an alternative method of organic solvents has been highlighted. The present findings strengthen an original line of research to advance in a more sustainable viticulture and agriculture, using less toxic and biodegradable biocontrol products, being this a possible and realistic solution to combat plant pathogens.

Keywords: stilbene, polyphenol, plant protection, oomycide, by-product, LC-MS, NMR

Unité de recherche Œnologie EA 4577, USC 1366 INRA

Axe Molécules d'Intérêt Biologique

Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon