



HAL
open science

Extraction et hémisynthèse de stilbènes de la vigne et du vin pour une application en santé humaine et végétale

Toni El Khawand

► To cite this version:

Toni El Khawand. Extraction et hémisynthèse de stilbènes de la vigne et du vin pour une application en santé humaine et végétale. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0402 . tel-03083318

HAL Id: tel-03083318

<https://theses.hal.science/tel-03083318v1>

Submitted on 19 Dec 2020

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 DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ ŒNOLOGIE

Par Toni EL KHAWAND

**Extraction et hémisynthèse de stilbènes de la vigne et du vin pour une
application en santé humaine et végétale**

Sous la direction du Dr. Alain DECENDIT

la co-direction du Pr. Tristan RICHARD et le co-encadrement du Dr. Stéphanie KRISA

Soutenue publiquement le 18 décembre 2019

Membres du jury

M. Rémy GHIDOSSI	Professeur, Université de Bordeaux	Président
Mme. Marielle ADRIAN	Professeur, Université de Bourgogne	Rapporteur
Mme. Laurence VOUTQUENNE	Professeur, Université de Reims	Rapporteur
M. Alain DECENDIT	Maître de Conférences, Université de Bordeaux	Directeur de thèse
M. Tristan RICHARD	Professeur, Université de Bordeaux	Membre invité
Mme. Stéphanie KRISA	Maître de Conférences, Université de Bordeaux	Membre invité

Extraction et hémisynthèse des stilbènes de la vigne et du vin pour une application en santé humaine et végétale

Les stilbènes sont des molécules de défense que produit la vigne pour lutter contre les agents pathogènes. Retrouvés dans le vin, ils acquièrent une valeur ajoutée pour leurs effets bénéfiques avérés en santé humaine. Sachant que l'efficacité des stilbènes contre certains oomycètes et champignons qui infectent la vigne augmente avec leur degré d'oligomérisation, cette thèse avait pour premier objectif d'optimiser et de procéder à des réactions de couplage oxydatif du resvératrol et de l' ϵ -viniférine extraits de sarments de vigne, en présence de sels de métaux, pour la production d'oligomères. Ces réactions d'hémisynthèse ont conduit d'une part à la formation de stilbènes à haut poids moléculaire, et à la production d'extraits à forte activité antifongique contre deux agents pathogènes majeurs de la vigne, *Plasmopara viticola* et *Botrytis cinerea*. D'autre part, ces réactions de couplage oxydatif appliquées au vin ont permis d'y étudier les mécanismes de la transformation oxydative du resvératrol, d'identifier les oligomères qui en découlent et de déterminer les conditions favorisant leur formation. Enfin, les effets potentiels de ces oligomères sur la santé humaine ont été étudiés, en évaluant leur niveau d'activité anti-inflammatoire *in vitro*.

Mots-clés : stilbènes ; couplage oxydatif ; vigne ; activité antimicrobienne ; vin ; activité anti-inflammatoire

Extraction and hemisynthesis of grapevine and wine stilbenes for an application in human and plant health

Stilbenes are a group of defence molecules produced by grapevine to fight against pathogens. They are consequently found in wine, where they acquire an added value through their proven positive effects on human health. Knowing that the efficacy of stilbenes against some oomycetes and fungus pathogens that attack grapevine increases with their oligomerization degree, the first objective of this thesis was to optimize and proceed to oxidative coupling reactions of resveratrol and ϵ -viniferine extracted from grapevine canes, in the presence of metal salts, in order to produce stilbene oligomers. On the one hand, these hemisynthesis reactions led to the formation of stilbenes with high molecular weight, and to the production of extracts with high antifungal activity against two major grapevine pathogens, *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea*. On the other hand, these oxidative coupling reactions carried out on wine helped study the mechanisms of the oxidative transformation of resveratrol in wine, identify the resulting oligomers and determine the conditions conducive to their formation. Finally, the potential effects of these oligomers on human health were studied, by evaluating the level of their anti-inflammatory activity.

Keywords: stilbenes; oxidative coupling; grapevine; antimicrobial activity; wine; anti-inflammatory activity

Unité de Recherche Œnologie – Axe Molécules d'Intérêt Biologique

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

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier madame Marielle Adrian, professeur de l'Université de Bourgogne, et madame Laurence Voutquenne, professeur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, de m'avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail de thèse et d'en être les rapporteurs, ainsi que monsieur Rémy Ghidossi, professeur de l'Université de Bordeaux, qui me fait l'honneur d'examiner ce travail de thèse et de présider le jury. Je les remercie de m'avoir donné l'opportunité de discuter de ce travail avec eux le jour de ma soutenance, et tiens à leur exprimer ma sincère gratitude.

Je tiens à remercier le docteur Alain Decendit, directeur de cette thèse, de sa gentillesse, de sa confiance et du niveau d'autonomie qu'il m'a accordés tout au long de ces trois années de travail, et qui m'ont poussé à m'adapter et à surmonter les difficultés de ce parcours. Je remercie particulièrement le professeur Tristan Richard, directeur de l'axe Molécules d'Intérêt Biologique (MIB), de m'avoir accueilli et donné l'opportunité de me former au sein de son équipe. Je le remercie également pour son rôle précieux de co-directeur de cette thèse, son appui scientifique, son attention et sa disponibilité. Je lui en suis profondément reconnaissant. Je tiens aussi à remercier vivement le docteur Stéphanie Krisa, co-encadrante de cette thèse, de la bienveillance et de l'engagement qu'elle a manifestés à mon égard, de ses précieux conseils et de sa contribution à mes travaux de recherche. Ce fut un honneur pour moi de réaliser cette thèse sous leur tutelle.

Aussi, j'exprime mon profond respect au professeur Philippe Darriet, directeur de l'Unité de Recherche Œnologie, en le remerciant, ainsi que l'Université de Bordeaux, l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) et l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé (EDSVS), de m'avoir accordé l'autorisation et l'appui nécessaires pour mener mes travaux de thèse au sein de leurs structures.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'équipe de l'axe MIB, pour leur contribution à mes travaux, leur soutien permanent, leur amabilité et leur bienveillance, qui ont rapidement forgé en moi un sentiment d'appartenance à l'égard de cette équipe et à celui de l'Unité de Recherche Œnologie. Je pense particulièrement aux docteurs Stéphanie Cluzet, Josep Valls-Fonayet, Arnaud Courtois et Grégory Da Costa, ainsi qu'à madame Marie-Laure Iglesias et monsieur Eric Pedrot, pour leur participation à mes travaux de recherche, mais également aux professeurs Jean-Michel Mérillon et Pierre Waffo-Teguo, aux docteurs Alain Badoc, Caroline Rouger, Ruth Hornedo, à madame Elodie Renouf et messieurs Antonio Palos Pinto et Gérard Fondeville. Je n'oublie pas mes collègues doctorants de l'axe MIB, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler : Cindy Quagliari, Julien Gabaston et Louis Gougeon à présent docteurs, ainsi qu'Aleksandra Burdziej, David Taillis, Pauline Beaumont, Inès Le Mao et Iris Aja-Perez. Je les remercie pour leur soutien, pour le climat d'entente profonde et de confiance qui régnait entre nous, et pour les nombreux moments de convivialité partagés ensemble.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres de l'Unité de Recherche Œnologie, avec qui j'ai pu entretenir des relations amicales et professionnelles solides. Je pense particulièrement aux collègues doctorantes de ma promotion 2019, Adeline Vignault, Alicia Jouin, Pauline Rousserie, Fannie Thibaud et Delphine Winstel, ainsi que mes collègues Syntia Fayad et Marie Courregelongue, le docteur Soizic Lacampagne et madame Sandra Vanbrabant. Je remercie également mes collègues Margot Berger, Justine Laboyrie et Sara Windholtz, avec qui j'ai eu la chance et le plaisir de préparer et organiser la troisième édition de la Journée des Doctorants et post-Doctorants de l'ISVV en 2018. En adressant ces remerciements, je fais part d'une pensée spéciale en souvenir du professeur Martine Mietton-Peuchot, que j'ai brièvement connue à mon arrivée à l'ISVV, mais suffisamment pour garder en mémoire sa gentillesse, sa bonté et sa rigueur scientifique.

Durant mon parcours de thèse, j'ai eu l'opportunité d'effectuer deux missions d'enseignement en tant que moniteur à l'ISVV, ainsi que l'honneur et le plaisir de travailler avec plusieurs membres de l'équipe pédagogique de l'ISVV. Je les remercie sincèrement de leur gentillesse, de leur confiance en moi et de l'expérience fort enrichissante que fut ma formation à la pédagogie universitaire à leurs côtés. Je pense notamment au professeur Gilles de Revel, aux docteurs Michaël Jourdes, Marina Bely, Natalia Quijada, Sophie Tempère, Stéphanie Marchand, Amélie Rabot, Axel Marchal et à mesdames Nathalie Alvarez et Caroline Baz. D'un autre côté, je remercie mesdames Catherine Ceyrac et Nathalie Vignais, membres du secrétariat de l'EDSVS, madame Lebna Mizani, mesdames Cécile Leffet et Judith Bacqué, ainsi que tous les membres de l'administration de l'ISVV, pour leur amabilité et leur présence auprès des étudiants.

Je tiens également à remercier vivement tous les enseignants qui ont contribué à ma formation universitaire. Je remercie particulièrement les professeurs Herminé Aydenian, Marlène Abou Jaoudé, Dolla Karam, Joseph Matta, Hayat Azouri, Marianne Abi Fadel, et les docteurs Noelle Raad et Isabelle Baglin, qui ont profondément marqué mon parcours universitaire, durant mon cursus de Pharmacie au Liban et de Master 2 en France. Ils sont toujours une source d'inspiration pour moi, par leur bienveillance, leur intégrité, leur force d'âme et leurs parcours d'excellence. Je serai toujours reconnaissant à leur égard, pour ce qu'ils m'ont apporté tant au niveau scientifique que personnel.

Enfin, je ne pourrai jamais remercier assez mes parents Kamal et Georgette, à qui je dois et dédie tous mes accomplissements et mes réussites, ainsi que mon frère Roy et ma sœur Mira. Je suis profondément reconnaissant de leurs sacrifices, leur affection, leur confiance en moi et leur soutien inconditionnel qu'ils m'ont accordé, et je tiens à leur témoigner ma plus profonde gratitude. Je remercie également mon parrain Charbel, ma marraine Nawal, mon grand-père Mtanios et ma grand-tante Mariana, ainsi que tous les membres de ma famille et mes proches à Saïdoun, mon village natal, de leurs prières, leur bienveillance et leur foi en moi. Je n'oublie pas mes amis, au Liban et en France, et les remercie de tout cœur pour les bons moments partagés ensemble, leurs encouragements et leur présence à mes côtés.

Communications scientifiques

Publications dans des journaux à comité de lecture

1. Julien Gabaston, **Toni El Khawand**, Pierre Waffo-Teguo, Alain Decendit, Tristan Richard, Jean-Michel Mérillon, Roman Pavela. Stilbenes from grapevine root: a promising natural insecticide against *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of Pest Science*, 2018, 91: 897-906 (doi: 10.1007/s10340-018-0956-2).
2. **Toni El Khawand**, Arnaud Courtois, Josep Valls, Tristan Richard, Stéphanie Krisa. A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochemistry Reviews*, 2018, 17: 1007-1029 (doi: 10.1007/s11101-018-9578-9).
3. **Toni El Khawand**, Julien Gabaston, David Taillis, Marie-Laure Iglesias, Eric Pedrot, Josep Valls Fonayet, Jean-Michel Mérillon, Stéphanie Cluzet, Alain Decendit, Tristan Richard. Stilbene extract produced by oxidative coupling as alternative to resveratrol against *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea* for vine treatments. *OenoOne*, acceptée en janvier 2020.
4. **Toni El Khawand**, David Taillis, Grégory Da Costa, Eric Pedrot, Stéphanie Cluzet, Alain Decendit, Josep Valls Fonayet, Tristan Richard. New active stilbenes against vine pathogens from oxidative coupling of grapevine extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, soumise en novembre 2019.
5. **Toni El Khawand**, Josep Valls Fonayet, Grégory Da Costa, Ruth Hornedo-Ortega, Michael Jourdes, Céline Franc, Gilles de Revel, Alain Decendit, Stéphanie Krisa, Tristan Richard. Structure and biological activities of *de novo* synthesized resveratrol derivatives generated after heat treatment in wine. *Food Research International*, acceptée en février 2020.

Communication orale

Toni El Khawand, Chrystel Faure, Stéphanie Krisa, Patrick Sauvart, Tristan Richard, Claude Atgié, Arnaud Courtois. « Bioavailability, metabolism and encapsulation of a dimer of resveratrol, ϵ -viniferin ». Symposium: 14th French-Spanish meeting CTPIOD, 27 septembre 2017, Saragosse (Espagne).

Communication par affiches

1. **Toni El Khawand**, Julien Gabaston, Josep Valls Fonayet, Pierre Waffo Teguio, Tristan Richard, Alain Decendit. « Vine stilbenes: extraction and hemisynthesis for application in plant and human health ». Journée scientifique de l'Ecole Doctorale SVS de Bordeaux, 18 avril 2018, Bordeaux (France).
2. **Toni El Khawand**, Julien Gabaston, David Taillis, Marie-Laure Iglesias, Eric Pedrot, Josep Valls Fonayet, Jean-Michel Mérillon, Alain Decendit, Stéphanie Cluzet, Tristan Richard. « A grapevine stilbene extract produced by resveratrol oxidative coupling shows high antimicrobial activity against *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea* ». Congrès: OenoIVAS, 25-28 juin 2019, Bordeaux (France).
3. **Toni El Khawand**, Josep Valls, Iris Aja-Perez, Stéphanie Krisa, Arnaud Courtois, Alain Decendit, Tristan Richard. « New stilbene derivatives produced by oxidative coupling in wine ». Congrès: OenoIVAS, 25-28 juin 2019, Bordeaux (France).

Logiciel et base de données

Base de données « Polyphenols Reference Database : Stilbenes, Viniferin, Resveratrol and derivatives » (PRDb-ISVV) – <https://mib-polyphenol.eu>

Table des matières

INTRODUCTION	1
ETAT DE L'ART	4
1. Les stilbènes : structure, biosynthèse et rôle physiologique	5
1.1. Structure	5
1.2. Biosynthèse.....	11
1.2.1. Voie des phénylpropanoïdes	11
1.2.2. Biosynthèse du resvératrol et ses dérivés	12
1.3. Rôle physiologique : les stilbènes, des phytoalexines	14
2. Stilbènes dans la vigne : nature, répartition et applications en santé végétale	15
2.1. Contexte actuel	15
2.2. Nature et répartition des stilbènes chez la vigne.....	15
2.2.1. Stilbènes dans les sarments	16
2.2.2. Stilbènes dans les ceps (charpente)	19
2.2.3. Stilbènes dans les racines	19
2.2.4. Stilbènes dans les feuilles	21
2.3. Potentiel de lutte des stilbènes contre <i>Plasmopara viticola</i> et <i>Botrytis cinerea</i>	21
2.3.1. <i>Plasmopara viticola</i> : cycle de vie et conséquences sur la vigne.....	21
2.3.2. Stilbènes contre <i>Plasmopara viticola</i>	24
2.3.2.1. Effet des sarments et des racines de vigne.....	24
2.3.2.2. Mécanismes d'action	24
2.3.3. <i>Botrytis cinerea</i> : cycle de vie et conséquences sur la vigne.....	26
2.3.4. Stilbènes contre <i>Botrytis cinerea</i> : inhibition du développement mycélien	27
2.3.5. Relation Structure-Activité	28
3. Les stilbènes dans le vin et applications en santé humaine	29
3.1. Présence des stilbènes dans le vin.....	29
3.1.1. Origine	29
3.1.2. Composition et teneur dans le vin.....	31
3.2. Applications en santé humaine	34
3.2.1. Activité antimicrobienne.....	35
3.2.2. Activité antioxydante et protection cellulaire	36
3.2.3. Activité anti-inflammatoire.....	37
3.2.4. Activité chimiopréventive et anticancéreuse.....	38
3.3. Biodisponibilité des stilbènes, facteur limitant leur application pharmacologique.....	39
4. Hémissynthèse des stilbènes	70
4.1. Peroxydation enzymatique.....	71
4.1.1. Peroxydases de raifort et du soja.....	71
4.1.2. Utilisation du sécrétome enzymatique de <i>Botrytis cinerea</i>	72
4.2. Couplage oxydatif des stilbènes catalysé par les sels de métaux	72
4.2.1. Hémissynthèse de l' ϵ -viniférine à partir du resvératrol	72
4.2.2. Hémissynthèse de la δ -viniférine à partir du resvératrol	73
4.2.3. Orientation des réactions de couplage pour l'obtention de nouveaux oligomères	74
OBJECTIFS	76

CHAPITRE I : PRODUCTION D'UN EXTRAIT ENRICHIS EN STILBENES OLIGOMERISQUES PAR HEMISYNTHESE POUR UNE APPLICATION PHYTOSANITAIRE 78

1. Stratégie.....	79
2. Présentation des travaux.....	80
2.1. Réaction de couplage : preuve de concept et application sur l'extrait de sarments	80
2.2. Identification des oligomères obtenus	81
2.3. Potentiel phytopharmaceutique	86
2.3.1. Inhibition de la sporulation de <i>Plasmopara viticola</i>	86
2.3.2. Inhibition du développement mycélien de <i>Botrytis cinerea</i>	88
3. Première publication.....	89
4. Seconde publication.....	100

CHAPITRE II : COUPLAGE OXYDATIF DU RESVERATROL DANS L'ETHANOL, APPLICATION ŒNOLOGIQUE ET EFFET SUR LA SANTE HUMAINE..... 114

1. Stratégie.....	115
2. Présentation des travaux.....	116
2.1. Réaction de couplage du resvératrol dans l'éthanol : preuve de concept.....	116
2.2. Identification des oligomères obtenus	117
2.3. Dosage des oligomères dans le vin	118
2.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire	119
3. Publication	120

DISCUSSION GENERALE DES RESULTATS 132

1. Avancées sur l'hémisynthèse des stilbènes	133
1.1. Bilan général.....	133
1.2. Mise au point des réactions de couplage oxydatif du resvératrol	133
1.3. Couplage oxydatif appliqué à une fraction d'extrait de sarment de vigne.....	134
2. Application phytosanitaire contre <i>Plasmopara viticola</i> et <i>Botrytis cinerea</i>	135
2.1. Efficacité des oligomères et des extraits obtenus	135
2.1.1. Effets des oligomères.....	135
2.1.2. Effets des extraits.....	136
2.1.3. Application à grande échelle : obstacles et stratégies	136
2.2. Relation Structure-Activité.....	138
3. Applications en œnologie et effets potentiels sur la santé.....	139
3.1. Transformation oxydative du resvératrol dans le vin.....	139
3.2. Oligomères à activité anti-inflammatoire et autres applications potentielles	141
3.2.1. Activité anti-inflammatoire.....	141
3.2.2. Applications potentielles.....	142

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... 143

1. Conclusion générale	143
-------------------------------------	------------

2. Perspectives.....	144
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	146

Liste des abréviations

AcOAg	Acétate d'argent
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AGE	Advanced Glycation End products
ATP	Adénosine Triphosphate
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice médiane
Co A	Coenzyme A
COX	Cyclooxygénase
DE ₅₀	Dose Efficace médiane
ESI	Electrospray Ionization
GLUT-1	Glucose Transporter 1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	High Resolution
HRP	Horseadish Peroxidase
MRM	Multiple Reaction Monitoring
NO	Monoxyde d'azote
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PAL	Pénylalanine Ammonia-Lyase
Q-TOF	Quadripole – Time Of Flight
¹³ C-RMN	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
¹ H-RMN	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
ROS	Reactive Oxygen Species
SIRT-1	Silent Information Regulator 1
SPE	Extraction en Phase Solide
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Liste des figures

Figure 1. Structure du resvératrol sous ses deux formes <i>cis</i> - et <i>trans</i> -.....	5
Figure 2. Le resvératrol et cinq de ses oligomères allant de la forme dimérique à la forme pentamérique.....	6
Figure 3. Couplages régio-isomériques de types 3 – 8' et 8 – 10' du resvératrol.....	9
Figure 4. Couplages régio-isomériques de types 8 – 8' et 8 – 12' du resvératrol.....	10
Figure 5. Voie des phénylpropanoïdes, à l'origine de la biosynthèse du 4-coumaroyl Co A.....	11
Figure 6. Départ des voies de biosynthèse des différentes classes de polyphénols à partir du 4-coumaroyl Co A, leur précurseur commun.....	12
Figure 7. Biosynthèse du resvératrol.....	13
Figure 8. Principaux monomères, dimères et trimères présents dans la vigne.....	18
Figure 9. Principaux tétramères présents dans la vigne.....	20
Figure 10. Couplage oxydatif du resvératrol catalysé par l'acétate d'argent.....	74
Figure 11. Différents types de couplages régio-isomériques mis en jeu lors de la réaction de couplage oxydatif du resvératrol dans le méthanol en présence d'acétate d'argent.....	83
Figure 12. Produits spécifiques du couplage oxydatif du resvératrol et de l' ϵ -viniférine dans le méthanol en présence d'acétate d'argent, et leurs différents types de couplages régio-isomériques.....	85
Figure 13. Exemple de culture de <i>Plasmopara viticola</i> sur feuille de vigne (A) et d'essai d'inhibition de sporulation sur disques foliaires (B).....	87
Figure 14. Exemple d'essais d'inhibition du développement mycélien de <i>Botrytis cinerea</i> par la δ -viniférine (A), de puits contrôle (B1) et d'inhibition par le pyriméthanol (B2).....	88
Figure 15. Différents types de couplages régio-isomériques mis en jeu lors de la réaction de couplage oxydatif du resvératrol dans l'éthanol en présence d'acétate d'argent.....	118

Liste des tableaux

Tableau 1. Stilbènes détectés dans le vin rouge.....	33
---	----

Introduction

Introduction

La chimie des substances naturelles réussit encore de nos jours à s'imposer dans le milieu de la recherche, et reste une discipline de référence pour répondre à diverses problématiques relevant du domaine pharmaceutique et de celui des sciences végétales notamment. De la diversité génétique du monde vivant, ainsi que des interactions complexes en découlant, résulte une multitude de métabolites dont seule la chimie des substances naturelles permet de révéler l'existence pour mettre en valeur leur potentiel biologique au service de la science et de l'Homme. Dans ce travail de recherche détaillé plus loin, il est question d'un groupe spécifique de molécules d'origine naturelle, fortement représentées entre autres chez *Vitis vinifera* (la vigne cultivée) : les stilbènes. Ces molécules sont retrouvées dans tous les organes végétatifs, mais également reproducteurs de la vigne, notamment les baies de raisin, et sont par conséquent présentes dans le vin, produit prisé et consommé par l'Homme depuis des millénaires. C'est ainsi que les travaux de cette thèse s'imprègnent d'une deuxième discipline, l'œnologie, qui leur a donné un cadre précis et leur sert de champ d'application potentiel.

Les stilbènes, qui appartiennent à la famille des polyphénols, jouent le rôle de phytoalexines. Autrement dit, ils participent aux défenses de la vigne contre le stress environnemental, notamment les attaques d'agents pathogènes comme les champignons et les parasites. En effet, l'étude de leur potentiel phytopharmaceutique en viticulture a montré qu'ils présentent des activités antifongique et antimicrobienne contre *Botrytis cinerea* et *Plasmopara viticola*, agents de deux maladies majeures de la vigne, la pourriture grise et le mildiou. A une époque où l'usage des pesticides chimiques est de plus en plus controversé, ces stilbènes puisés dans différentes parties végétatives de la vigne, constituent une piste intéressante pour trouver des biopesticides alternatifs, tout en valorisant les co-produits de la vigne riches en stilbènes, tels les sarments, les ceps ou les racines. Outre leur intérêt phytopharmaceutique, les stilbènes présents dans l'alimentation humaine, principalement dans le vin, ont fait l'objet d'études approfondies pour leurs autres activités biologiques chez l'homme. Ainsi, l'étude des stilbènes identifiés dans le vin a révélé leurs activités anti-inflammatoire, anti-neurodégénérative, antiproliférative, antioxydante et antibactérienne, valorisables dans le domaine de la santé humaine.

Au grand potentiel biologique des stilbènes s'ajoute un potentiel de modulation chimique, présent notamment chez les stilbènes monomériques comme le resvératrol ou le picéide, mais aussi chez certains dimères comme l' ϵ -viniférine, par leur aptitude à s'oligomériser pour former des stilbènes à structures complexes qui se corrèlent souvent avec une activité biologique plus élevée. Cette oligomérisation est possible grâce à la structure phénolique des stilbènes, propice aux couplages oxydatifs par transfert d'électron du stilbène oxydé vers un cation métallique, la formation de radicaux phénoxyles et la

cyclisation intramoléculaire des deux molécules de stilbènes, aboutissant à la formation de dimères, trimères et tétramères du resvératrol. Les conditions de la réaction de couplage oxydatif, notamment le métal et le solvant utilisés, ont un impact direct sur la structure des produits obtenus. La variation de la nature du solvant ou du cation métallique utilisés conduit à l'obtention d'oligomères à structures différentes, enrichissant ainsi la famille des stilbènes en nouvelles molécules et augmentant son potentiel d'activités biologiques.

Les travaux de recherche menés dans le cadre de cette thèse ont été effectués au sein de l'équipe Molécules d'Intérêt Biologique (MIB), partie intégrante de l'Unité de Recherche Œnologie, à l'Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) de l'Université de Bordeaux. A l'image des compétences de l'équipe MIB, ces travaux peuvent donc se diviser en deux parties. Une première partie de chimie des produits naturels et une seconde partie de biologie et d'œnologie. L'objectif de cette thèse était d'explorer l'hémisynthèse des stilbènes pour obtenir, à partir de stilbènes monomériques et dimériques présents en grande quantité dans les organes de la vigne, des stilbènes plus complexes, plus rares voire nouveaux, et ayant une activité biologique plus importante. Une fois ces stilbènes obtenus et caractérisés, il était question de les mettre en valeur, d'abord en santé végétale, par l'étude *in vitro* de leur activité antimicrobienne contre les agents pathogènes de la vigne ; ensuite en œnologie, par l'exploration de la présence de ces stilbènes dans le vin et des conditions de leur formation, et enfin en santé humaine par l'étude *in vitro* de leur activité anti-inflammatoire.

Afin de situer le contexte de ce travail de recherche, de présenter les travaux entrepris et discuter des résultats obtenus, ce manuscrit a été divisé en quatre parties : une première partie traite de l'état de l'art, une deuxième partie présente les travaux et les résultats de l'hémisynthèse de stilbènes et son application phytopharmaceutique, une troisième partie expose les résultats de l'hémisynthèse de stilbènes et son application en œnologie et en santé humaine, et une quatrième partie de discussion générale. Enfin, une conclusion incluant les perspectives de ce travail de thèse clôture ce manuscrit.

Etat de l'art

Etat de l'art

1. Les stilbènes : structure, biosynthèse et rôle physiologique

1.1. Structure

Les stilbènes sont une classe de métabolites secondaires polyphénoliques dont le principal critère de reconnaissance réside dans la présence, au sein de leur structure chimique, du 1,2-diphényléthylène ou du 1,2-diphényléthane comme unité de base. Un stilbène monomérique est ainsi formé de 2 noyaux aromatiques reliés par un pont éthylène (Shen et al., 2013), soit un squelette chimique C6-C2-C6 typique. La double liaison qui constitue le pont éthylène présente généralement une configuration *trans*- (*E*) ; quelques stilbènes à configuration *cis*- (*Z*) ont néanmoins été isolés dans la nature (**Figure 1**). Outre l'isomérie (*Z*)-(*E*), des groupes tels les hydroxyles, les méthyles, les méthoxyles, les prényles et les géranyles viennent enrichir la structure des stilbènes et sont ainsi responsables de la grande diversité et du nombre élevé de molécules existantes (PRDb-ISVV, <https://mib-polyphenol.eu>). A ces groupes de substitution viennent enfin s'ajouter des sucres, formant des dérivés principalement glycosylés. Une grande partie de ces dérivés a été décrite grâce au développement des techniques analytiques, notamment la résonance magnétique nucléaire (RMN), aux côtés de la spectrométrie de masse.

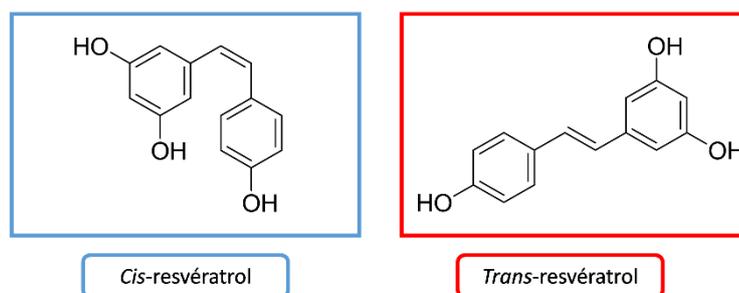


Figure 1. Structure du resvératrol sous ses deux formes *cis*- et *trans*-.

Le resvératrol (3,4',5-trihydroxystilbène) reste le stilbène le plus connu et le plus étudié, des décennies après avoir été isolé pour la première fois en 1939 (Takaoka, 1940). C'est le monomère le plus abondant dans la famille des Vitacées, notamment chez *Vitis vinifera* (Rivière et al., 2012); il est aussi abondamment présent dans les racines de *Polygonum cuspidatum* (Polygonacées). Ce stilbène, à structure monomérique simple, sert de base pour la biosynthèse de stilbènes oligomériques issus du couplage de plusieurs molécules de resvératrol (**Figure 2**). D'autres monomères comme le picéatannol

et l'isorhapontigénine ont également leurs propres dérivés oligomériques. Ainsi, le degré d'oligomérisation, le type de couplage (type C-C ou C-O-C), et les monomères mis en jeu sont autant de facteurs responsables du grand nombre de combinaisons possibles et d'oligomères produits (Shen et al., 2013). Les oligomères du resvératrol sont les plus nombreux (environ 180 molécules décrites), et le couplage peut mettre en jeu 2 molécules de resvératrol, produisant un dimère, et jusqu'à 8 molécules de resvératrol, aboutissant alors à un octamère (Rivière et al., 2012). Parmi eux se trouve l' ϵ -viniférine, dimère du resvératrol et stilbène majeur chez les espèces du genre *Vitis*, qui sert de base pour la biosynthèse des oligomères du resvératrol à plus haut poids moléculaires, à commencer par les trimères.

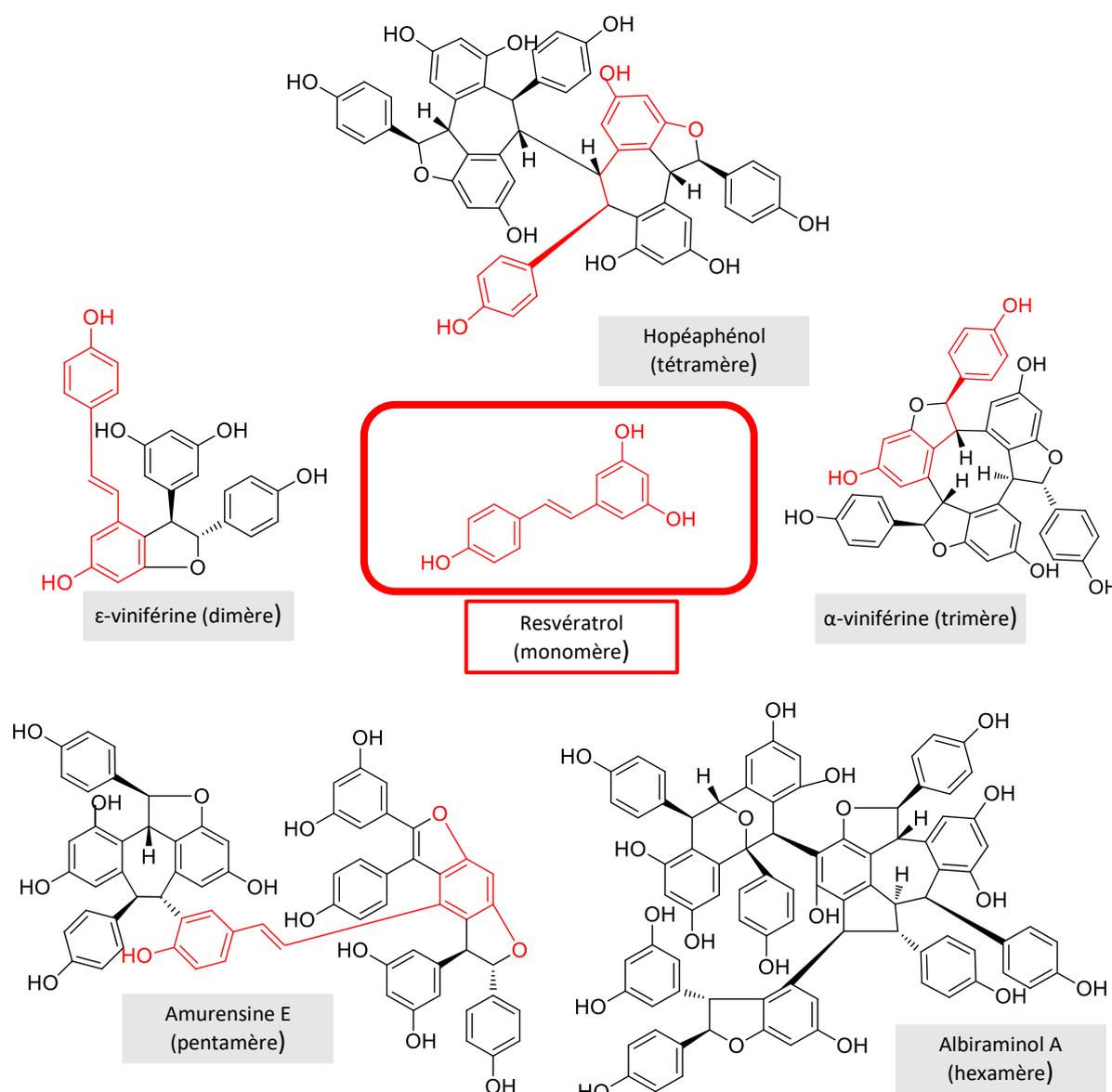


Figure 2. Le resvératrol et cinq de ces oligomères allant de la forme dimérique à la forme pentamérique.

Quel que soit le type de couplage mis en jeu, il est désormais largement admis que la dimérisation du resvératrol implique nécessairement son passage à l'état radicalaire par oxydation (Shen et al., 2017). Les deux radicaux vont alors subir un couplage suivant une orientation régio-isomérique précise, pour former un intermédiaire *para*-quinone méthide qui subira alors des réactions de cyclisation de Friedel-Crafts et de tautomérisation et donner les différents oligomères. Ensemble, les couplages régio-isomériques et les réactions de cyclisation sont responsables de la grande diversité des structures observées et obtenues à partir d'une même molécule d'origine, le resvératrol. Plus rarement, des réactions entre l'intermédiaire *para*-quinone méthide et un stilbène préformé peuvent prendre le dessus sur les réactions de cyclisation intramoléculaire faisant généralement suite au couplage des deux radicaux. Ce phénomène est un facteur de diversification supplémentaire des oligomères et est surtout observé lors de la formation des oligomères aux degrés d'oligomérisation les plus élevés comme les pentamères, hexamères et heptamères.

Les réactions de couplage entre deux molécules de resvératrol peuvent essentiellement se faire selon trois orientations régio-isomériques différentes : des couplages 8 – 10' (**Figure 3**), 8 – 8' (**Figure 4**) ou 3 – 8' (**Figure 3**) (Keylor et al., 2015). Seuls quelques dimères sont issus d'un couplage 8 – 12' (**Figure 4**) comme la gnétine C ou 12 – 12' comme l'amurensine M. Le couplage 8 – 10' reste le plus courant, notamment chez les Vitacées, où il permet la biosynthèse de l' ϵ -viniférine dont est issu un grand nombre d'oligomères (Xiao et al., 2008). Parmi les stilbènes formés par ce couplage se trouvent également les ampélopsines B, D et F ainsi que le pauciflorol F (Tanaka et al., 1998). Le couplage 8 – 8' est également observé chez les Vitacées, où il permet la formation de plusieurs dimères comme le pallidol et la quadrangularine A. Quant au couplage 3 – 8', c'est l'un des moins fréquents, mais permet cependant la biosynthèse de la δ -viniférine, l'un des dimères les plus actifs contre *P. viticola* et *B. cinerea* (Breuil et al., 1998) (Pezet et al., 2003).

Concernant la formation des oligomères plus complexes à structure trimérique ou tétramérique, elle peut se faire par réaction entre un dimère préformé et le resvératrol, ou par dimérisation à partir de dimères du resvératrol, mais également par des substitutions électrophiles via la réaction de Friedel et Crafts. Il est à noter que les tétramères et les pentamères ne sont pas le résultat de réactions en chaîne impliquant l'ajout d'une molécule de resvératrol à chaque passage d'un degré d'oligomérisation à l'autre, mais plutôt le résultat de réactions entre 2 dimères préformés, ou entre dimères et trimères (Keylor et al., 2015). Quoi qu'il en soit, ces réactions suivent les mêmes types de couplages régio-isomériques impliqués dans la formation des dimères. Ainsi, le miyabénol C est le produit du couplage 8 – 10' entre l' ϵ -viniférine (par sa position 8) et le resvératrol (par sa position 10'). Les deux molécules peuvent subir le même couplage en inversant respectivement les positions mises en jeu, produisant alors un autre trimère, la gnétine H, résultat du couplage entre le resvératrol par sa position 8' et l' ϵ -viniférine par sa position 10. Cette régio-isomérisation permet encore une fois la diversification du nombre de trimères possibles. Cependant, cela ne s'applique pas pour les trimères issus d'un couplage 8 – 8' comme

l'ampélopsine C, ou pour les tétramères issus de la dimérisation de deux molécules d' ϵ -viniférine comme l'hopéaphénol (couplage 8 – 8'), vu que le produit intermédiaire obtenu sera toujours le même. Dans ce cas, ce sont les différentes réactions de cyclisation intramoléculaire qui vont provoquer la production de trimères différents (Keylor et al., 2015). Aussi, bien que l' ϵ -viniférine soit impliquée dans la formation d'une grande partie des trimères et des tétramères, d'autres dimères comme la quadrangularine A, la parthénocissine A ou l'amurensine A sont également mis en jeu, notamment dans la biosynthèse d'oligomères issus d'un couplage 3 – 8' (He et al., 2008). Malgré toutes ces avancées dans l'élucidation des mécanismes d'interaction inter- et intramoléculaires régissant la formation des stilbènes, les mécanismes contrôlant la stéréochimie et la régio-sélectivité des couplages des radicaux phénoxyles restent encore hypothétiques. L'hypothèse de l'intervention de protéines auxiliaires (dirigeantes) au cours du couplage, comme dans le cas de la formation des lignanes (Davin et al., 1997), reste à étayer.

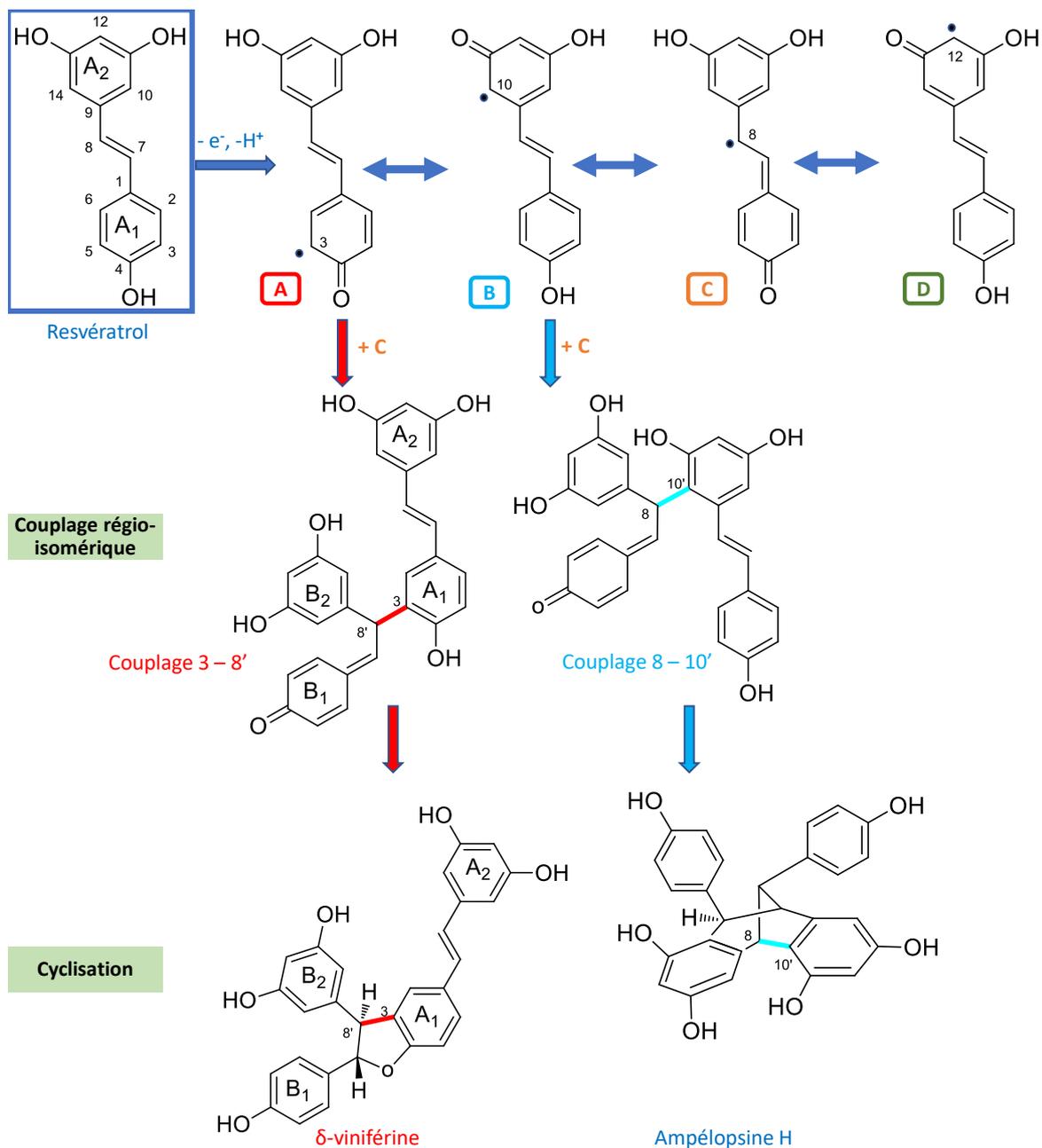


Figure 3. Couplages régio-isomériques de types 3 – 8' et 8 – 10' du resvératrol (d'après Keylor et al., 2015, modifié).

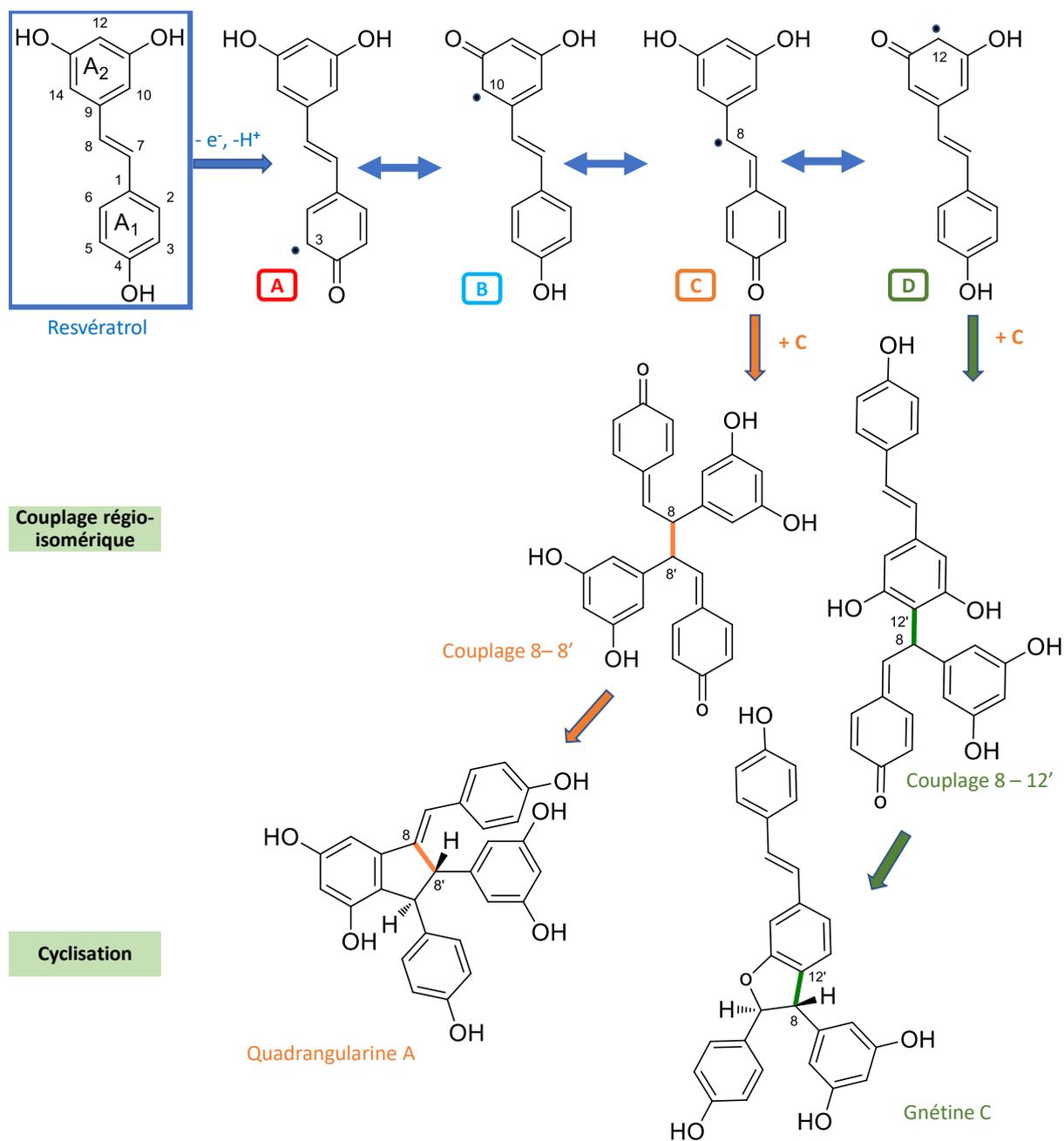


Figure 4. Couplages régio-isomériques de types 8 – 8' et 8 – 12' du resvératrol (d'après Keylor et al., 2015, modifié).

1.2. Biosynthèse

1.2.1. Voie des phénylpropanoïdes

La biosynthèse des stilbènes relève de la voie des phénylpropanoïdes, voie commune à tous les composés de la famille des polyphénols, utilisant un acide aminé issu de la voie du shikimate, la phénylalanine, comme substrat de base (Vogt, 2010). En effet, le préphénate issu de la biotransformation du shikimate subit une décarboxylation oxydative suivie d'une transamination catalysée par la préphénate aminotransférase pour donner l'arogénate, qui aboutira à la phénylalanine sous l'action de l'arogénate-déhydratase (Siehl et al., 1986). Intervient alors la phénylalanine ammonia-lyase (PAL) qui catalyse la transformation de la phénylalanine en *trans*-cinnamate par désamination. Deux enzymes cruciales sont encore nécessaires pour arriver au point de départ spécifique de la biosynthèse des polyphénols : la cinnamate-4-hydroxylase qui transforme le *trans*-cinnamate en 4-hydroxycinnamate par hydroxylation, et la 4-coumaroyl CoA-ligase qui transforme le 4-hydroxycinnamate en 4-hydroxycinnamoyl CoA, appelé aussi 4-coumaroyl CoA et considéré comme le précurseur commun à tous les polyphénols (**Figure 5**) (Vogt, 2010).

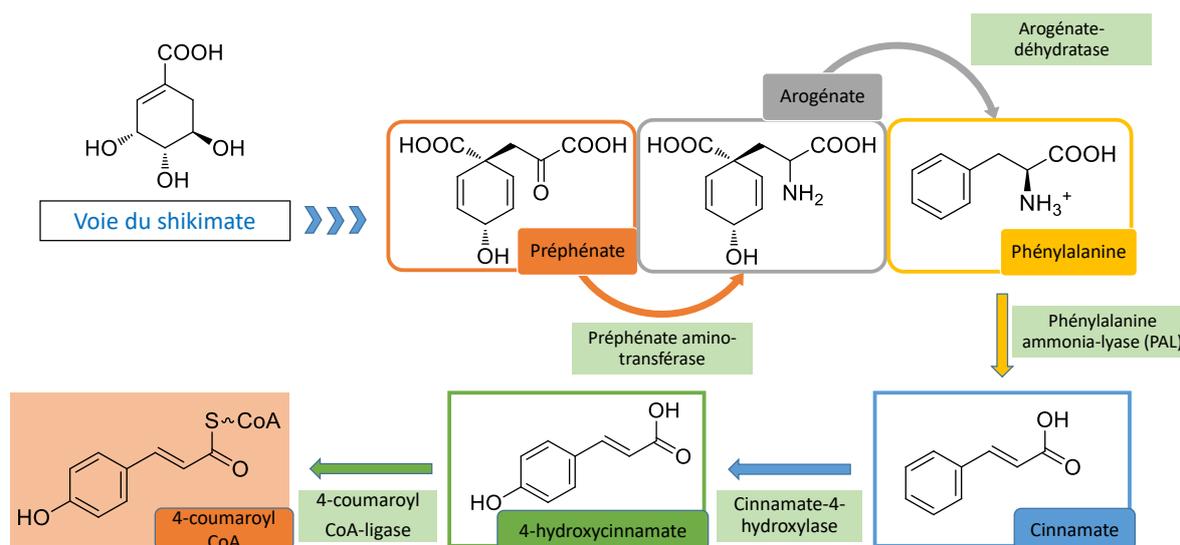


Figure 5. Voie des phénylpropanoïdes, à l'origine de la biosynthèse du 4-coumaroyl CoA (d'après Siehl et al., 1986, et Vogt, 2010, modifié).

Ainsi, les composés phénoliques issus du 4-coumaroyl CoA se divisent en plusieurs classes (**Figure 6**). La classe la plus importante est représentée par les flavonoïdes. Cette classe comprend les flavonols (pigments jaunes concentrés dans les pellicules des baies de raisins noirs et blancs, à propriétés antioxydantes), les flavones, les isoflavones, les flavanones, les flavanols ou catéchines (tanins

catéchiques responsables de la structure du vin et de son effet astringent en bouche), les aurones et les anthocyanidines, précurseurs des anthocyanes, qui sont les pigments rouges du raisin et de plusieurs autres fruits rouges, également concentrés dans la pellicule des raisins rouges et pouvant être exceptionnellement présents dans la pulpe des baies de cépages dits teinturiers, c'est-à-dire dont la pulpe est colorée à l'instar des pellicules. Ce sont ces pigments qui confèrent au vin rouge sa couleur. Les autres composés phénoliques issus du 4-coumaroyl CoA sont les coumarines, les phénylpropènes, les esters phénylpropanoïdes et les acide-phénols. Quant aux formes polymérisées, elles regroupent la cutine, la subérine et les lignanes. Enfin, dans cette famille des polyphénols se trouvent les stilbènes, dont il est question dans ce travail de thèse. Notons que les polyphénols regroupent également les dérivés des acides benzoïque et cinnamique, ainsi que des formes chalcones (Bruneton, 2009) (Vogt, 2010) (*Traité d'oenologie - Tome 2, 2017*).

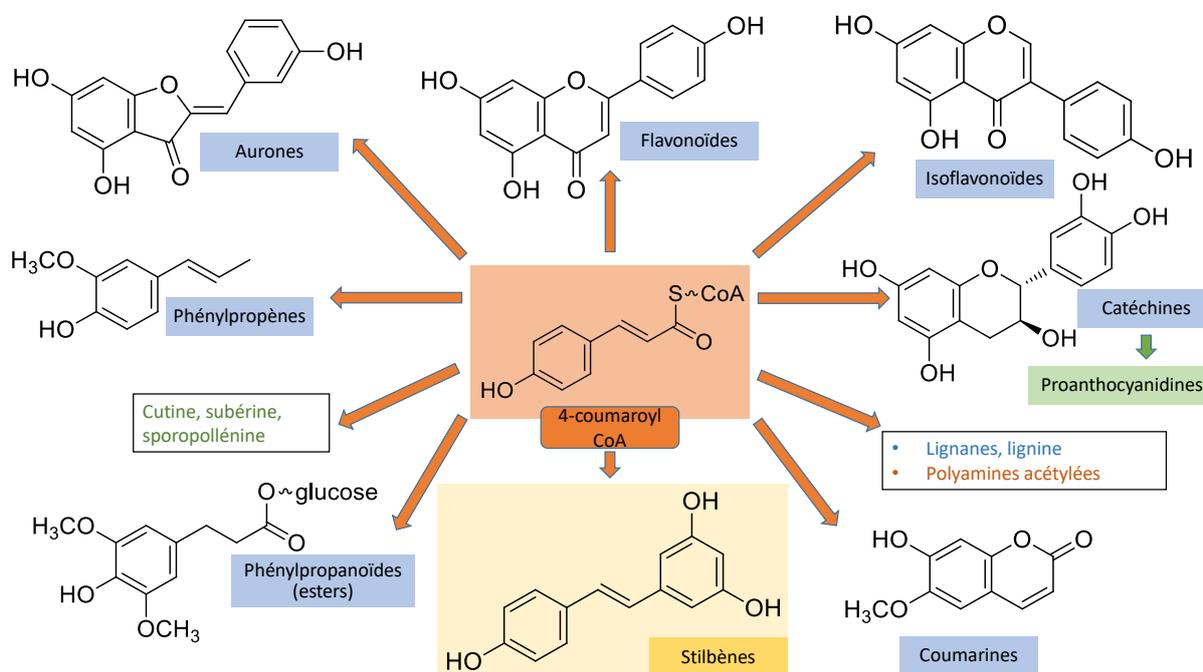


Figure 6. Départ des voies de biosynthèse des différentes classes de polyphénols à partir du 4-coumaroyl CoA, leur précurseur commun (d'après Vogt, 2010, modifié).

1.2.2. Biosynthèse du resvératrol et ses dérivés

Le 4-coumaroyl CoA obtenu à partir de la phénylalanine subit une réaction de condensation avec trois unités de malonyl-CoA, aboutissant à la formation d'un tétrakétide intermédiaire (Soleas et al., 1997), qui se transforme en resvératrol, unité de base des stilbènes, par l'action de la stilbène-synthase (**Figure 7**). Cette même condensation est également nécessaire pour la biosynthèse des flavonoïdes ; la stilbène-synthase est alors remplacée par la chalcone-synthase, impliquant une réaction de Claisen (Wiese et al., 1994). Quant aux oligostilbènes, leur biosynthèse repose en grande partie sur la dimérisation du resvératrol en *trans-ε*-viniférine, qui subira alors des réarrangements et des cyclisations, pour donner de

nouveaux dimères, dépendamment des sites de protonation impliqués. Cette même *trans-ε*-viniférine peut également subir une isomérisation suivie de couplages aboutissant aux tétramères du resvératrol (Shen et al., 2013).

A ce jour, le nombre de stilbènes identifiés est estimé à plus d'un millier de molécules, isolées dans environ 24 familles botaniques différentes, entre autres les Acéracées, les Combrétacées, les Gnétacées, les Légumineuses, les Moracées, les Polygonacées, les Rosacées et les Vitacées (Pawlus et al., 2012) (Shen et al., 2013). Une grande partie de ces stilbènes a été répertoriée dans une base de données disponible en ligne sous le nom de ISVV – Polyphenols Reference Database (<https://mib-polyphenol.eu>). Dans le cadre de mes travaux de thèse, j'ai participé à la construction de cette base de données, effectuée par l'équipe MIB. Elle recense actuellement 897 stilbènes, en présentant leurs structures, leurs données spectrales et physico-chimiques, ainsi que les références bibliographiques relatives aux travaux de recherche au cours desquels ils ont été identifiés.

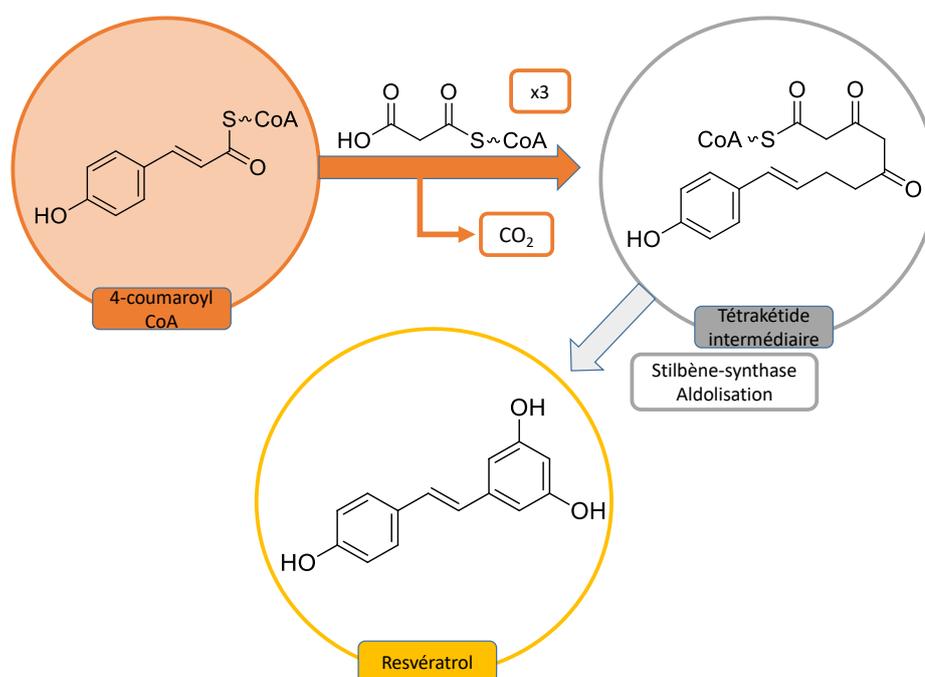


Figure 7. Biosynthèse du resvératrol (d'après Shen et al., 2013, modifié).

La biosynthèse des stilbènes est attestée chez la moitié des genres de la famille des Vitacées : *Ampelopsis*, *Cayratia*, *Cissus*, *Cyphostemma*, *Muscadinia*, *Parthenocissus*, *Rhoicissus* et *Vitis*. Dans ce dernier genre, *Vitis vinifera* L., la vigne cultivée, est de loin la plante la plus étudiée, pour son importance alimentaire et économique notamment. Plus de 60 stilbènes y ont été identifiés à ce jour, dans ses différents organes végétatifs et reproducteurs (Rivière et al., 2012).

1.3. Rôle physiologique : les stilbènes, des phytoalexines

Cultivée sur tout le pourtour du bassin méditerranéen, dans la région du Caucase, en Europe centrale, de l'Est et de l'Ouest, mais également dans le nouveau monde, la vigne fait clairement preuve d'une grande adaptabilité vis-à-vis des différents types de climats et de sols auxquels elle est confrontée. Cette remarquable adaptation passe notamment par la capacité de la vigne à se défendre face à différents stress environnementaux qui entraveraient son développement. Outre les aléas climatiques (sécheresse, gel...), les contraintes pédologiques (salinité, acidité...), la vigne est sujette aux attaques d'agents pathogènes, notamment fongiques, dont deux majeurs : *Plasmopara viticola*, agent du mildiou et parasite spécifique de la vigne, et *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture grise (Jaillard et al., 2015). Ces infections déclenchent des voies de biosynthèse de métabolites secondaires dont le rôle est de lutter contre l'infection pour assurer la continuité du cycle de vie de la plante et sa pérennité. L'étude des mécanismes génétiques encadrant la biosynthèse des stilbènes a montré d'ailleurs que l'expression du gène codant pour la stilbène-synthase augmente significativement suite à une stimulation induite par une infection, un traumatisme physique ou autres stress (Vannozzi et al., 2012). La première identification du resvératrol s'est faite dans les hypocotyles infectés d'*Arachis hypogaea* (l'arachide) (Ingham, 1976), et quelques mois plus tard dans les feuilles de vigne aux côtés de certaines viniférines (P. Langcake and Pryce, 1977). Ces composés ont aussitôt été liés au rôle de phytoalexines au sein de la plante, autrement dit des molécules de défense. En effet, les feuilles de vigne ayant servi à ce premier isolement de stilbènes ont été soumises à différents stress biologiques et physiques. Le stress biologique était dû à une infection par *B. cinerea*. Le stress physique quant à lui consistait en une irradiation des feuilles aux rayons UV.

Il est à noter que la symbiose entre la vigne et les champignons mycorhiziens arbusculaires se développant au niveau des racines de la plante semble avoir un impact positif sur le déclenchement de la biosynthèse des stilbènes au niveau des feuilles en réponse à une infection par *B. cinerea* et *P. viticola* (Bruisson et al., 2016). La synthèse du resvératrol en réponse à l'infection par *B. cinerea* s'effectue également au niveau des baies de raisin à partir du stade de véraison (Kelloniemi et al., 2015) et s'amplifie jusqu'à maturité de la baie (Gatto et al., 2008), accompagnée d'une augmentation de la synthèse de lignine, dans le but de renforcer les parois cellulaires, et limiter ainsi la pénétration du champignon. Bien qu'il soit omniprésent en réponse au stress, le resvératrol n'est pas le stilbène le plus puissant dans la lutte contre *B. cinerea* et *P. viticola*. En effet, au cours de l'étude de la résistance de plusieurs espèces de vigne contre ces maladies, des corrélations ont été établies entre les concentrations de l' ϵ -viniférine et de l' α -viniférine produites et la résistance de la vigne (Langcake, 1981). L'étude des spécimens de vignes issues de l'hybridation du Merzling (cépage allemand) et du Teroldego (cépage italien) montre que la résistance accrue à *P. viticola* est positivement corrélée avec une augmentation de la concentration en stilbènes (monomères et oligomères) au niveau des feuilles (Malacarne et al., 2011). Il en découle que les structures oligomériques sont plus favorables à la lutte antimicrobienne de la plante.

2. Stilbènes dans la vigne : nature, répartition et applications en santé végétale

2.1. Contexte actuel

Le rôle de phytoalexines pour lequel les stilbènes sont principalement biosynthétisés par les plantes, en l'occurrence la vigne, a été longtemps éclipsé par les effets bénéfiques des stilbènes pour la santé humaine. Cependant, cette approche phytosanitaire trouve toute sa place dans le contexte actuel, marqué par la nécessité de réduire l'usage des produits phytopharmaceutiques, notamment au vignoble ; une nécessité à la fois environnementale et sanitaire, émanant d'une volonté grandissante du consommateur, ainsi que des politiques gouvernementales visant à protéger l'environnement, matérialisées entre autres par le plan Ecophyto II+ (www.ecophyto-pro.fr) (www.agriculture.gouv.fr). Ce plan faisant suite aux plans Ecophyto I et II a pour objectif de réduire l'usage des produits phytopharmaceutiques de 50% d'ici 2025. L'échec du plan Ecophyto I, marqué par l'augmentation de l'usage des pesticides d'environ 5% par an entre 2009 et 2013, alors que l'objectif était de réduire leur usage de 50% entre 2008 et 2018 (www.inra.fr: Le plan Ecophyto 2025 pour réduire l'usage des pesticides : les raisons d'espérer) (Guichard et al., 2017), et la pression des aléas climatiques observés ces dernières années, sont autant de facteurs pressants pour la recherche d'alternatives aux pesticides. En outre, l'usage du cuivre, que ce soit en agricultures conventionnelle ou biologique, est également remis en question, pour son effet néfaste sur la macrofaune du sol (surtout les vers de terre), notamment à long terme, ainsi que pour son effet toxique sur les plantes surtout en sol acide. Cette volonté de réduire l'usage du cuivre est d'autant plus problématique en agriculture biologique, où il est le seul produit autorisé pour lutter contre le mildiou (www.inra.fr: Rapport de l'expertise collective scientifique : Peut-on se passer du cuivre en protection des cultures biologiques).

Ainsi, les stilbènes, de par leur rôle de molécules de défense innées produites par la vigne, constituent l'une des pistes alternatives de lutte contre les ravageurs, notamment fongiques. D'autres moyens sont également en cours d'exploration. Il existe ainsi des méthodes physiques impliquant la lutte thermique et les rayonnements ultra-violetts (Fleurat-Lessard et al., 2000). Des méthodes d'induction de la résistance de la vigne aux ravageurs et d'élicitation de ses molécules de défense sont également en cours d'étude, comme l'application du benzothiadiazole, de la thiamine (vitamine B1) ou d'extraits végétaux riches en anthraquinones sur les feuilles de vigne (Godard et al., 2009) (Harm et al., 2011) (Boubakri et al., 2013).

2.2. Nature et répartition des stilbènes chez la vigne

Les stilbènes de la vigne sont retrouvés dans tous les organes végétatifs : racines, ceps, sarments et feuilles (Wang et al., 2010). Des variations de teneur et de degré d'oligomérisation sont observées suivant l'organe considéré et les cépages ou même les espèces du genre *Vitis*.

2.2.1. Stilbènes dans les sarments

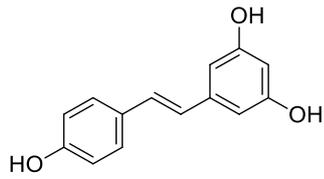
Dans les sarments de *V. vinifera* L., les stilbènes sont surtout retrouvés au niveau des vaisseaux conducteurs, mais également dans la moelle et le cortex (Houillé et al., 2015b). Les principaux composés identifiés à ce jour sont le resvératrol, le picéatannol (monomères) (**Figure 8**), l' ϵ -viniférine et l'ampélopsine A (dimères) (**Figure 8**), le miyabéanol C (trimère) (**Figure 8**), la vitisine B, l'hopéaphénol et l'isohopéaphénol (tétramères) (**Figure 9**) (Schnee et al., 2013) (Richard et al., 2016). Selon l'étude de Lambert et al. sur 16 différents cépages, la teneur moyenne en stilbènes des sarments de vigne atteint 4732 mg/kg de matière sèche (MS), avec un maximum de 8485 mg/kg MS pour le Pinot noir. Parmi ces stilbènes, l' ϵ -viniférine est la plus abondante pour la majeure partie des cépages étudiés, avec une teneur moyenne de 2171 mg/kg MS (Lambert et al., 2013). Elle est suivie par le resvératrol, le picéatannol et l'hopéaphénol. Cependant, pour certains cépages, la teneur en tétramères peut être supérieure à celle de l' ϵ -viniférine ou du resvératrol. Ainsi, contrairement aux sarments du Pinot noir où les monomères et dimères sont majoritaires, notamment le resvératrol et l' ϵ -viniférine, ceux du Carignan et du Riesling sont plus riches en hopéaphénol. Quant aux sarments du Gewurztraminer, ils sont plus riches en vitisine B. Aussi, certains stilbènes minoritaires comme le miyabéanol C ou la vitisine B peuvent être absents des sarments de certains cépages. Dans le cas du Merlot et du Cabernet Sauvignon, les deux cépages rouges majoritaires du vignoble bordelais, les sarments contiennent surtout de l' ϵ -viniférine (2263 et 2379 mg/kg respectivement) et du resvératrol (1181 et 871 mg/kg respectivement), à l'instar du Pinot noir (Lambert et al., 2013). La dominance de l' ϵ -viniférine est également observée dans les sarments de Cabernet Sauvignon et de Tannat, avec des teneurs de 126 mg/g de matière sèche, suivie par le resvératrol présent à 61 mg/g de matière sèche. Dans ces cépages, le pallidol et la vitisine A sont dosés dans les sarments, en plus des stilbènes cités plus tôt (Gabaston et al., 2017). Des résultats similaires concernant la teneur totale en stilbènes des sarments de vigne ont été observés au Chili, allant de 6915 à 7857 mg/kg de matière sèche, chez le Pinot noir et le Gewurztraminer, respectivement. Cependant, dans cette étude, le resvératrol domine l' ϵ -viniférine, avec une concentration de 5590 mg/kg de matière sèche chez le Pinot noir (Vergara et al., 2012).

Le picéide et la ω -viniférine (**Figure 8**) sont également biosynthétisés au niveau des sarments. Notons que ces teneurs moyennes peuvent augmenter ou diminuer selon les conditions environnementales dans lesquelles évolue la vigne, étant donné que la biosynthèse des stilbènes est augmentée par des stimuli de stress (Guerrero et al., 2016). Ainsi, l'intensité et la fréquence des attaques des agents pathogènes ont un impact significatif sur la nature des stilbènes produits et leur distribution au sein de l'organe. Au niveau des sarments de vignes infectées par *P. viticola*, la concentration du resvératrol a tendance à diminuer, au profit de l' ϵ -viniférine dont la concentration augmente, par rapport à un pied de vigne sain. Cette accumulation serait le résultat d'une production locale au sein du sarment, mais également d'un transport de stilbènes produits au niveau du site d'infection (Houillé et al., 2015b). Ce changement serait un indice de l'impact de l'infection sur l'orientation de la biosynthèse des stilbènes au niveau des

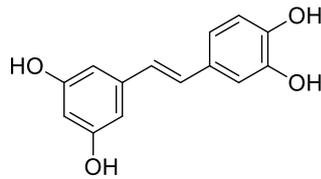
sarments, conduisant dans ce cas à l'oligomérisation du resvératrol en ϵ -viniférine, sous l'action des peroxydases présentes dans les cellules. De plus, cette conversion viendrait conforter la corrélation positive qui existe entre le degré d'oligomérisation des stilbènes et leurs activités antimicrobienne et antifongique, évoquée précédemment ; la dimérisation du resvératrol en ϵ -viniférine, plus active contre *P. viticola*, est donc favorable à la défense de la plante contre le pathogène. D'autres oligomères voient leur concentration augmenter également, notamment le miyabénol C et l'isohopéphénol.

Quant à l'impact de l'infection sur la distribution des stilbènes dans l'organe infecté, l'étude de Houillé et al. (Houillé et al., 2015b) montre que dans un sarment infecté, les stilbènes ont tendance à s'accumuler au niveau du cortex plutôt que dans la moelle. Cette répartition serait due à la position externe du cortex, qui se trouve en contact direct avec les pathogènes. Notons qu'une fois taillés, les sarments peuvent voir leur composition en stilbènes altérée, vu que la biosynthèse des monomères comme le resvératrol et le picéatannol reste possible suite à l'induction de la stilbène-synthase en réponse au stress généré par la taille de l'organe, durant les premières semaines suivant la taille. Ainsi, au cours de la conservation des sarments taillés, la concentration du resvératrol peut augmenter de 5 à 40 fois par rapport à la concentration initiale observée au moment de la taille, sans pour autant augmenter la concentration des oligomères, dont la formation dépend des peroxydases (Gorena et al., 2014) (Houillé et al., 2015a). L'augmentation du resvératrol et du picéide dans les sarments issus de la taille d'hiver peut être amplifiée par une segmentation supplémentaire des sarments, générant un nombre important de plaies et conduisant par conséquent à une activation accrue de la stilbène-synthase (Billet et al., 2018). D'ailleurs, les sarments sont les organes végétatifs ayant la plus forte concentration en resvératrol (Wang et al., 2010).

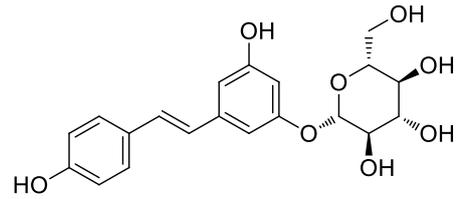
Concernant la composition en stilbènes des sarments de vignes sauvages, il existe certaines différences au niveau de la nature et de la concentration observées. Ainsi, parmi les espèces étudiées, les sarments de *V. amurensis* contiennent, en plus des stilbènes couramment observés chez *V. vinifera*, l'ampélopsine E (Z/E), l'amurensine B et la Z-vitisine B. La teneur en resvératrol y est souvent supérieure à celle de *V. vinifera*, avec une concentration allant jusqu'à 5,4 g/kg de matière sèche. Dans les sarments de *Muscadinia rotundifolia*, le resvératrolside et le 3,5,4'-trihydroxystilbène-2-C-glucoside sont présents en grande quantité. Quant aux sarments de *V. riparia*, ils contiennent la plus forte teneur en stilbènes totaux, atteignant 19 g/kg de matière sèche, contre 6,9 g/kg pour *V. vinifera* var Cabernet Sauvignon. D'ailleurs, comparée aux espèces américaines, *V. vinifera* présente des teneurs de stilbènes plutôt faibles dans ses sarments. En tout cas, cette étude montre que les vignes sauvages sont une source naturelle importante de stilbènes (Pawlus et al., 2013).



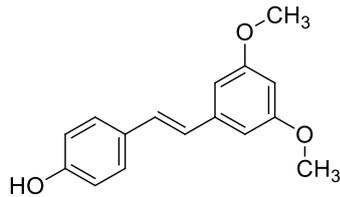
Resvératrol (monomère)



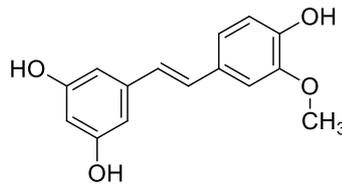
Picéatannol (monomère)



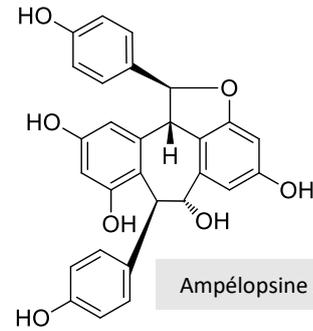
Picéide (monomère)



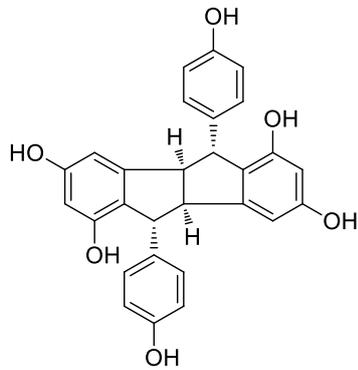
Ptérostilbène (monomère)



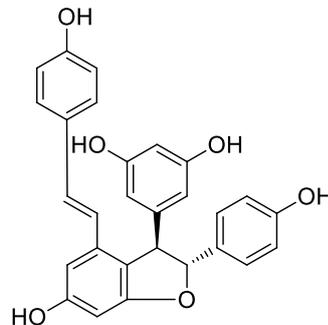
Isorhapontigénine (monomère)



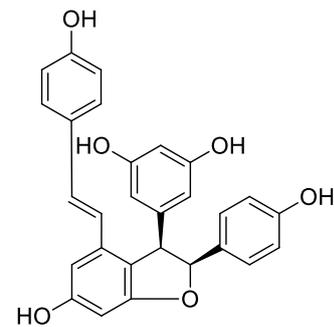
Ampélopsine A (dimère)



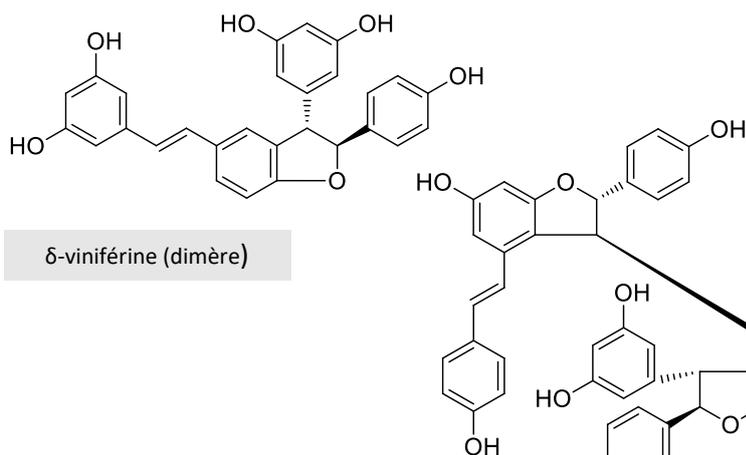
Pallidol (dimère)



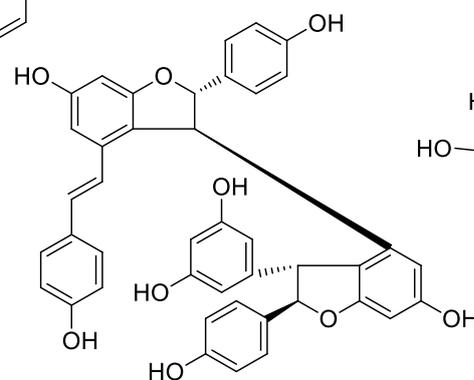
ε-viniférine (dimère)



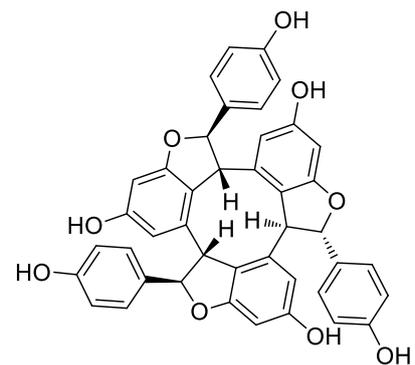
ω-viniférine (dimère)



δ-viniférine (dimère)



Miyabénol C (trimère)



α-viniférine (trimère)

Figure 8. Principaux monomères, dimères et trimères présents dans la vigne.

2.2.2. Stilbènes dans les ceps (charpente)

La charpente du pied de vigne est l'ensemble du bois pérenne, formé par le tronc et les bras porteurs des sarments annuels. C'est la partie essentiellement composée par le greffon, qui représente le système aérien de la vigne. En dessous du point de greffe, la partie visible du tronc appartient au porte-greffe. L'étude de la composition en stilbènes de charpentes de Cabernet Sauvignon et Tannat greffées sur un porte-greffe SO4, montre une richesse en ϵ -viniférine, isohopéaphénol et vitisine B (**Figures 8 et 9**). Un dimère et deux tétramères représentent ainsi la majorité des stilbènes présents, avec des teneurs similaires de 79 mg/g, 79 mg/g et 57 mg/g respectivement (Gabaston et al., 2017).

2.2.3. Stilbènes dans les racines

Les stilbènes présents dans les racines de vigne sont des molécules constitutives qui s'accumulent au gré du développement de la plante, notamment dans les tissus lignifiés. L'étude des stilbènes présents dans les racines de vigne concerne essentiellement les espèces et variétés utilisées comme porte-greffe, étant donné que de nos jours, la quasi-totalité des vignobles à travers le monde sont constitués de cépages de *V. vinifera* greffés sur des porte-greffes sélectionnés à partir d'hybridations entre les espèces de vignes américaines et *V. vinifera*. Cette pratique s'est répandue puis fut imposée en Europe pour faire face à la crise du phylloxéra, un puceron ravageur de la vigne et originaire du continent américain. En effet, ce puceron, notamment sous sa forme radicole, s'attaque aux racines de *V. vinifera* et se nourrit des flux de sèves qui y circulent, affaiblissant l'organe au point de causer sa dégénérescence et la mort du pied de vigne. Son arrivée en Europe à la fin du XIX^{ème} siècle anéantit la majorité des vignobles, étant donné que la vigne y était plantée franche de pied, c'est-à-dire multipliée et plantée directement au sol par bouturage sans utiliser de porte-greffe. Pour pouvoir replanter le vignoble européen avec les cépages traditionnels de *V. vinifera*, il fallait désormais avoir recours aux vignes sauvages américaines, dont les racines sont naturellement résistantes au phylloxéra. Quatre espèces majeures ont servi pour l'obtention des porte-greffes actuels, après hybridation et sélection : *Vitis berlandieri*, *Vitis labrusca*, *Vitis riparia* et *Vitis rupestris* (Blouin, 2007) (Jaillard et al., 2015). Cela dit, ces vignes ont conféré leurs caractères génétiques et leurs capacités d'adaptation aux porte-greffes qui en sont issus, notamment leur capacité à biosynthétiser les stilbènes. Ces porte-greffes forment par conséquent aujourd'hui l'ensemble du système racinaire des vignobles de l'Ancien et du Nouveau Monde.

Une étude des racines du porte-greffe SO4 (issu du croisement de *V. riparia* et *V. berlandieri*) montre une dominance des oligomères du resvératrol (**Figures 8 et 9**): l'ampélopsine A (dimère) à 21 mg/g de matière sèche, la vitisine B (*r*-viniférine, tétramère), la vitisine A (*r*2-viniférine, tétramère) et l'hopéaphénol (tétramère) à 128 mg/g, 21 mg/g et 18 mg/g de matière sèche respectivement (Gabaston et al., 2017). Contrairement à la composition des stilbènes des sarments de *V. vinifera*, les monomères sont faiblement présents au niveau des racines, ne formant que 12% du poids total des stilbènes extraits (resvératrol et picéatannol). L'isohopéaphénol, le pallidol, le miyabénol C, l' ϵ -viniférine et la ω -

viniférine ont également été dosés au niveau des racines. Dans cette même étude, la comparaison de la nature des stilbènes majoritaires de la racine avec ceux de la charpente (tronc et coursons de la vigne) et des sarments montre une diminution du degré d'oligomérisation des stilbènes majoritaires en allant du système racinaire aux organes aériens. En effet, dans les sarments, les stilbènes majoritaires sont le resvératrol, un monomère, et l' ϵ -viniférine, un dimère ; quant à la charpente, formée dans ce cas par des greffons de Cabernet franc et de Tannat (cépages *V. vinifera*), elle contient majoritairement un dimère et deux tétramères en quantités similaires : l' ϵ -viniférine, l'isohopéaphénol et la vitisine B (Gabaston et al., 2017). L'évolution du degré d'oligomérisation et de la nature des composés majoritaires sont à comparer avec celles observées chez d'autres porte-greffes et d'autres combinaisons de porte-greffes/greffons, en vue de comprendre la cause de cette répartition. Il s'agit d'abord de savoir si la richesse en l'un ou l'autre des stilbènes est spécifique de l'espèce, du cépage. Il s'agit également d'explorer les causes de la biosynthèse et de l'oligomérisation de ces stilbènes ainsi que le rôle joué par les stilbènes au niveau racinaire.

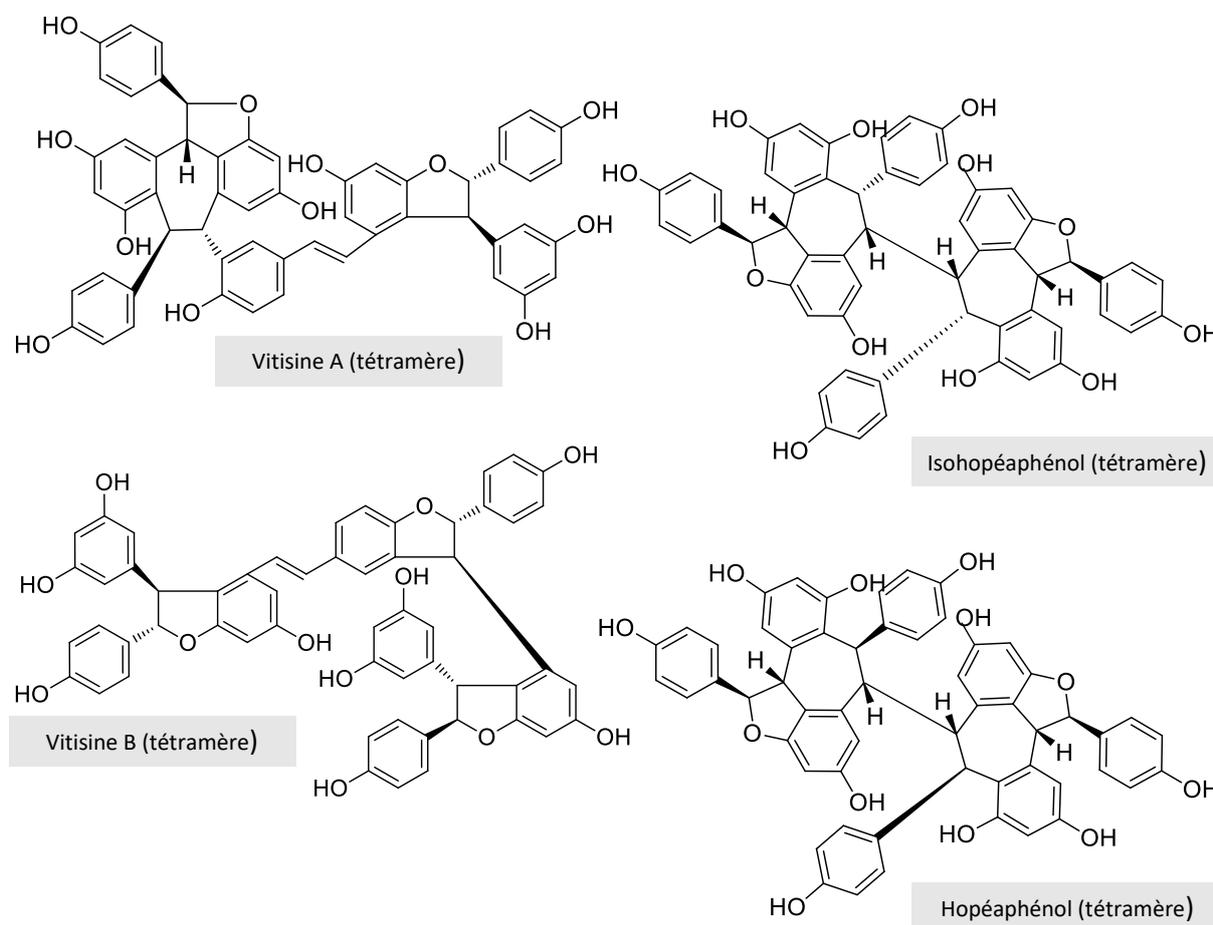


Figure 9. Principaux tétramères présents dans la vigne.

2.2.4. Stilbènes dans les feuilles

La stilbène-synthase est exprimée au niveau des feuilles de la vigne, permettant ainsi la biosynthèse de stilbènes nécessaire à la protection de l'organe foliaire, porte d'entrée principale des agents pathogènes causant les maladies fongiques. Outre le stimulus généré par les agents pathogènes, la stilbène-synthase foliaire est activée par exposition aux rayonnements ultra-violets (UV). L'activité de l'enzyme a été augmentée de 100 fois, avec un taux d'activité optimal atteint 15 heures après l'irradiation, chez *Cissus antarctica*, espèce de la famille des Vitacées (Fritzemeier and Kindl, 1981). Comme évoqué précédemment, les feuilles sont l'un des premiers organes de la vigne où les stilbènes furent identifiés et décrits comme phytoalexines produites en réponse à l'infection par *B. cinerea*. Face à l'infection par *P. viticola*, les feuilles biosynthétisent plusieurs stilbènes : trois monomères, le resvératrol, le picéide et le ptérostilbène ; cinq dimères : l' ϵ -viniférine, la *Z/E*- ω -viniférine, la quadrangularine A et le pallidol ; deux trimères : le miyabénol C et l' α -viniférine ainsi que deux tétramères, l'ampélopsine H et l'isohopéaphénol, pour une teneur moyenne de 28 mg/kg de feuilles fraîches (Mattivi et al., 2011) (Vrhovsek et al., 2012).

2.3. Potentiel de lutte des stilbènes contre *Plasmopara viticola* et *Botrytis cinerea*

Plasmopara viticola et *Botrytis cinerea* sont deux agents pathogènes majeurs de la vigne, retrouvés dans les différentes régions viticoles du monde, et pouvant attaquer la vigne et s'y développer lorsque des conditions d'humidité et de chaleur précises sont réunies, occasionnant des dégâts majeurs au niveau de la santé du vignoble et du rendement des récoltes, avec des pertes économiques conséquentes (www.ephytia.inra.fr). Cela dit, le choix d'intégrer spécifiquement *P. viticola* et *B. cinerea* dans ce travail de thèse revient non seulement à l'ampleur des dégâts qu'ils occasionnent, mais également à leur sensibilité aux stilbènes. En effet, *P. viticola* et *B. cinerea* seraient des cibles naturelles des stilbènes et constituent un modèle d'agent pathogène idéal pour en évaluer l'activité biologique. En effet, les stilbènes de la vigne étant des phytoalexines dont la biosynthèse est augmentée ou activée par des attaques fongiques ou microbiennes ou autres stimuli externes, il est important d'évaluer leur pouvoir antimicrobien et antifongique sous forme pure afin de repérer les composés les plus actifs et de mieux comprendre leur mécanisme d'action. La validation de leur efficacité contre les agents pathogènes de la vigne permettrait d'évaluer leur efficacité en combinaison avec des pesticides chimiques contre certaines souches fongiques résistantes, ou même de remplacer certains pesticides.

2.3.1. *Plasmopara viticola* : cycle de vie et conséquences sur la vigne

Plasmopara viticola est un parasite spécifique de la vigne, originaire d'Amérique du Nord et répandu dans une grande partie des vignobles à travers le monde. En France, il fut signalé pour la première fois en Gironde vers la fin du XIX^{ème} siècle. Le parasite s'attaque aux organes verts de la vigne et nécessite des conditions de chaleur relative et d'humidité pour se développer (Dubos, 2002). Ainsi, les attaques

de mildiou présentent souvent une recrudescence en cas de pluies survenant lors de la phase végétative de la vigne. En revanche, son développement est limité par la sécheresse et les températures élevées : la germination des conidies est inhibée au-delà de 30°C (Blouin, 2007).

Son cycle annuel comprend une phase sexuée et une phase asexuée. La forme sexuée du parasite est appelée oospore, et permet sa conservation durant l'hiver, dans les feuilles mortes au sol, en attendant l'installation des conditions favorables à son développement. La phase asexuée débute à la germination des oospores, qui ne peut se faire qu'au printemps, une fois que les rameaux de vigne ont commencé à se développer, et à des conditions de température et d'humidité précises : la température doit être supérieure ou égale à 12°C et s'accompagner de précipitations de l'ordre de 10 mm, étalées sur un à deux jours. En effet, la pluie et la chaleur relative sont nécessaires pour amener les oospores à maturité, condition nécessaire à leur germination. Une fois ces conditions réunies, les oospores germent en émettant des filaments qui se terminent par des macroconidies, les poches qui contiennent les zoospores. A leur tour, les zoospores, caractérisées par une mobilité que leur confèrent les deux cils dont elles sont pourvues, migrent et se déposent sur les organes verts de la vigne. Leur germination à ce niveau est suivie par leur pénétration dans la feuille de vigne via les stomates, et nécessite la présence d'eau liquide (feuilles humectées par l'eau de pluie), d'où le risque accru d'attaques de mildiou après la pluie (Blouin, 2007).

La pénétration des zoospores dans la feuille de vigne est suivie de deux phases : la contamination primaire et la contamination secondaire. Au cours de la contamination primaire, la maladie est asymptomatique : le parasite fait croître son mycélium à l'intérieur de l'organe, sans se manifester à l'extérieur. Pour croître, il exploite les substances nutritives des cellules végétales, qu'il puise par l'intermédiaire des suçoirs présents au niveau des filaments du mycélium. Les premiers signes externes de la présence de *P. viticola* dans l'organe apparaissent vers la fin de cette phase, sous forme de taches de couleur vert pâle à la surface supérieure de l'organe (appelées taches d'huile). Ces taches sont suivies de l'apparition de poussière blanche, constituée de conidiophores et de conidies, poches contenant de nouvelles zoospores. Ainsi, sept à quatorze jours se seront écoulés entre la germination des premiers zoospores et l'apparition des taches de sporulation à la surface des organes infectés (Dubos, 2002). Si les conditions de température et d'humidité nécessaires sont maintenues, les nouvelles zoospores formées vont germer à leur tour, et seront ainsi responsables de la phase de contamination secondaire. De cette façon, plusieurs phases de contamination sont possibles au cours d'une même saison, tant que les conditions climatiques le permettent. A la fin de la saison végétative de la vigne, les oospores se forment au niveau des feuilles âgées infectées ; c'est là qu'elles passeront l'hiver avant leur germination au printemps prochain (Dubos, 2002).

Concernant les dégâts causés au vignoble : le mildiou est responsable du dessèchement des feuilles allant jusqu'à leur chute prématurée, entraînant de lourdes conséquences sur le rendement et la qualité de la

récolte, suite à la perte de la capacité photosynthétique de la plante, et la diminution importante de la production des sucres indispensables au développement et à la maturation de la baie, ainsi qu'au développement des organes végétatifs. La diminution de la production des sucres par la plante complique également la mise en réserve de nutriments pour l'hiver, affaiblissant la plante à long terme et impactant la qualité et la quantité des récoltes des années suivantes. *P. viticola* peut également infecter les inflorescences et compromettre la récolte à venir : les inflorescences finissent par se dessécher et tomber. Le développement du parasite peut perdurer ou survenir tout au long du développement des baies jusqu'à la fermeture de la grappe. A partir de la véraison, la perte de la fonctionnalité des stomates de la baie empêche la pénétration des zoospores ; les baies non infectées aux stades plus précoces sont alors épargnées (Blouin, 2007) (Gessler et al., 2011).

Divers moyens de lutte contre le mildiou sont connus et pratiqués par les viticulteurs : il s'agit de l'adaptation des pratiques culturales et de l'emploi de produits chimiques. Ainsi, le viticulteur peut adapter ses pratiques culturales pour prévenir l'infection par *P. viticola*, en réduisant l'apport en engrais azotés, étant donné que l'azote favorise l'excès de développement des organes végétatifs de la vigne et crée ainsi plus de surface propice à l'infection. Il peut également éliminer les restes de taille qui pourraient contenir des oospores (Blouin, 2007). L'obtention de cépages naturellement résistants par croisements est également un moyen sûr d'éviter les dégâts dus au mildiou et à la pourriture grise. Il existe déjà des cépages résistants tels que le Regent, le Concord, le Frontenac (cépages rouges), et le Seyval (cépage blanc) qui sont résistants à la fois à ces deux maladies, ainsi qu'à d'autres maladies fongiques (Pedneault and Provost, 2016). La résistance de ces cépages est entre autres liée à leur bagage génétique leur permettant d'assurer une synthèse accrue de stilbènes, avec la mise en évidence de l'implication directe du locus *Rpv3-1* (Eisenmann et al., 2019). Ainsi, une étude des stilbènes produits par le cépage résistant Bianca après inoculation des feuilles par *P. viticola* a montré l'accumulation d'oligomères tels l'ampélopsine H, le vaticanol C, le pallidol et l' α -viniférine (Chitarrini et al., 2017). Concernant les produits chimiques, il en existe plusieurs catégories : les produits de contact, comme les imides cycliques et les phtalimides, qui ne sont pas absorbés par la plante, et agissent en préventif sur la germination des zoospores ; les produits systémiques comme les benzimidazoles, qui vont pénétrer dans la plante et être véhiculés par la sève, atteignant différents organes infectés, en vue d'agir sur le mycélium de *P. viticola*, et d'exercer ainsi un effet curatif; et les produits pénétrants comme le pyriméthanyl, qui pénètrent dans la feuille sans pour autant subir des transports dans les flux de sève, et présentent à la fois des effets curatifs et préventifs (Dubos, 2002). Citons également la bouillie bordelaise, autorisée pour le traitement du mildiou en agriculture biologique, et qui est composée d'un mélange d'eau, de sulfate de cuivre et de chaux, et agit en préventif en tant que produit de contact. Aux côtés du cuivre, des produits moins efficaces existent, comme certains extraits végétaux, ou des huiles essentielles, utilisés en agriculture biologique (Andrison and Savini, 2018). Dans tous les cas, l'idéal serait d'empêcher la germination des zoospores et de prévenir la survenue de l'infection. Enfin, l'usage

de produits éliciteurs, c'est-à-dire des stimulateurs de défense naturelles de la plante, est également envisagé pour accroître la résistance de la vigne face à *P. viticola* et optimiser ses mécanismes de défense. Ainsi, l'usage des oligogalacturonides chez la vigne induit la synthèse de stilbènes tels le resvératrol et le picéide en activant la stilbène-synthase (Krzyszaniak et al., 2018).

2.3.2. Stilbènes contre *Plasmopara viticola*

2.3.2.1. Effet des sarments et des racines de vigne

Un extrait de sarments de vigne contient surtout des monomères et des dimères, le resvératrol et l' ϵ -viniférine étant les deux stilbènes majoritaires (Biais et al., 2017) (Rodríguez-Cabo et al., 2018). L'action préventive de l'extrait de sarments contre l'infection par *Plasmopara viticola* est attestée à la fois *in vitro* et *in vivo*, bien que dans cette dernière condition, les résultats soient moins probants (Pezet et al., 2004) (Schnee et al., 2013) (Chalal et al., 2014) (Richard et al., 2016). La fréquence d'attaque par *P. viticola* est ainsi réduite de 69% *in vitro*, et de 39% *in vivo* au vignoble, pour une concentration de 5 g/L de l'extrait (Richard et al., 2016). D'après cette étude, l'extrait de sarments aurait un pouvoir inhibiteur sur la libération des zoospores à partir des sporanges de *P. viticola*, et sur la germination des zoospores, mais à des concentrations de l'ordre de 100 mg/L (Richard et al., 2016). Une étude *in vitro* de l'inhibition du développement mycélien de *P. viticola* sur des feuilles de Cabernet Sauvignon par l'extrait de sarment lui attribue une activité inhibitrice médiane (CI₅₀) de 210 mg/L (Gabaston et al., 2017). En comparaison, les extraits de charpente et de racines, plus riches en tétramères, sont environ deux à quatre fois plus actifs, avec des CI₅₀ de 120 et 60 mg/L, respectivement (Gabaston et al., 2017). Dans cette étude, il est montré que l'augmentation progressive de l'activité inhibitrice est positivement corrélée avec l'augmentation du degré d'oligomérisation des stilbènes majoritaires de l'extrait. Ainsi, l'efficacité de l'extrait de racines serait due à sa richesse en tétramères de resvératrol. D'ailleurs, cette hypothèse est étayée par l'évaluation de l'activité des tétramères constitutifs de l'extrait de sarment après purification et isolement ; ainsi, la vitisine B est la plus active, suivie par l'hopéaphénol, la vitisine A et l'isohopéaphénol, avec des CI₅₀ de 10, 16, 18 et 40 mg/L, respectivement (Gabaston et al., 2017).

2.3.2.2. Mécanismes d'action

Inhibition de la mobilité des zoospores

En inhibant la mobilité des zoospores, les stilbènes peuvent empêcher le parasite de pénétrer les feuilles de vigne et de les infecter. Pour cette activité inhibitrice étudiée *in vitro*, le resvératrol présente la CI₅₀ la plus élevée parmi les stilbènes étudiés, et semble donc être le moins actif (Pezet et al., 2004). Cette CI₅₀ est de 192 μ M, soit environ 7 fois plus que le ptérostilbène (28 μ M), ou encore 13 fois plus que la δ -viniférine (14 μ M). Notons que cette inhibition de la mobilité ne peut être le premier mécanisme d'action des stilbènes, vu que leur biosynthèse est activée en réponse à l'infection. Cependant, cette

activité pourrait intervenir lors d'infections récidivantes, vu que les stilbènes seront déjà accumulés dans la feuille de vigne en réponse à la première infection.

Le 11,13-diméthoxyisopallidol et la 11,13-diméthoxy-*trans*- δ -viniférine, obtenus par l'action du sécrétome enzymatique de *B. cinerea* sur le resvératrol et le ptérostilbène, exercent également un effet inhibiteur sur la mobilité des zoospores de *P. viticola* à une concentration de 10 μ M. L'examen des zoospores exposées à ces deux dimères a montré des altérations de la membrane cellulaire ainsi que des perturbations au niveau des parois de certains organites comme les mitochondries et les ribosomes. Néanmoins, ces deux nouveaux dimères restent moins puissants que le ptérostilbène, monomère dont ils sont issus (Gindro et al., 2017). L'étude de leur effet contre *B. cinerea* devrait aider à mieux comprendre l'intérêt de ce métabolisme présent chez le champignon et permettant de générer des stilbènes qui lui sont potentiellement toxiques.

Inhibition de la sporulation

La capacité des stilbènes à inhiber la sporulation de *P. viticola* au niveau des feuilles de vigne infectées *in vitro* se rapproche étroitement de l'inhibition de la mobilité des zoospores. Le resvératrol se trouve parmi les moins actifs (CI₅₀ de 110 mg/L soit 484 μ M) (Gabaston et al., 2017), alors que le ptérostilbène et la δ -viniférine font preuve d'une grande efficacité, avec des CI₅₀ de 12 μ M et 14 μ M, respectivement. D'ailleurs, l'importante accumulation de ces stilbènes dans les feuilles de vignes Solaris, cépage résistant au mildiou, conforte l'hypothèse de leur participation active à la lutte contre le développement mycélien de *P. viticola* et permet de les considérer comme l'un des facteurs de résistance de ce cépage (Pezet et al., 2004). En effet, le dosage des stilbènes dans les feuilles de vigne Solaris, 96 heures après inoculation de zoospores, révèle des concentrations jusqu'à dix fois supérieures de resvératrol par rapport à celles présentes dans les feuilles de Chasselas (cépage sensible au mildiou) soumises aux mêmes conditions. Les concentrations d' ϵ -viniférine et de δ -viniférine sont également en nette augmentation dans les feuilles de Solaris, jusqu'à 6,5 fois et 4 fois par rapport à celles des feuilles de Chasselas (Pezet et al., 2004). Cette corrélation positive entre la résistance de certains cépages et l'augmentation de la production de stilbènes dans les feuilles a été préalablement observée dans les travaux de Dercks et Creasy. Ainsi, le cépage Castor accumule cinq fois plus de resvératrol dans ses feuilles que le Riesling, après inoculation par les zoospores de *P. viticola*, tout en maintenant élevée la concentration du resvératrol tout au long de l'infection, alors qu'elle diminue progressivement chez le Riesling (Dercks and Creasy, 1989).

2.3.3. *Botrytis cinerea* : cycle de vie et conséquences sur la vigne

Botrytis cinerea est un champignon polyphage, c'est-à-dire pouvant s'attaquer à un large éventail d'espèces végétales, responsable d'une maladie majeure de la vigne, la pourriture grise. A l'instar de *P. viticola*, il se développe dans des conditions humides, s'attaquant aux jeunes organes verts de la vigne au printemps, et aux baies de raisin lors de la phase de maturation. Le champignon se manifeste au vignoble essentiellement sous sa forme asexuée, constituée d'un mycélium cloisonné ressemblant à un ruban. Le mycélium porte des conidiophores se terminant par des conidies unicellulaires (Dubos, 2002).

Pour assurer sa conservation durant l'hiver, il prend la forme de sclérotés installés au niveau des sarments, mais il peut également résister sous forme de mycélium dans les anfractuosités de l'écorce. Au printemps, ces sclérotés vont produire des conidiophores, libérant à leur tour des conidies. Ces dernières sont alors disséminées par le vent et la pluie, atteignant les organes cibles de la vigne. Cette dissémination est maximale au moment des vendanges, là où le risque d'attaques de *B. cinerea* est le plus élevé. Les conidies nécessitent des conditions humides pour germer, que ce soit de l'eau sous forme liquide ou grâce à l'humidité élevée de l'air. Elles sont moins exigeantes que les oospores de *P. viticola* en termes de température et peuvent germer à des températures variant entre 1 et 30°C, bien que la température optimale se situe aux alentours de 18°C (Dubos, 2002). A la germination, le champignon pénètre alors dans la baie en utilisant son tube germinatif, via des microblessures présentes au niveau de la pellicule, ou plus souvent via les stomates. Cependant, l'essentiel de la contamination des baies semble causé par le mycélium du champignon préalablement développé sur des débris végétaux proches des baies. Dans tous les cas, le mycélium finit par produire des conidiophores se terminant par des conidies, de couleur blanche virant au grisâtre, typiques de la pourriture grise. Ces conidies vont être responsables de nouvelles contaminations successives, jusqu'à l'arrêt du cycle végétatif et la formation des sclérotés pour passer l'hiver (Blouin, 2007).

Le champignon s'attaque aux rameaux, feuilles, inflorescences, ainsi qu'au rachis de la grappe et les pédicelles des baies, causant le flétrissement de l'ensemble de la grappe. Contrairement à ce qui est observé dans le cas de *P. viticola*, les baies vertes sont rarement réceptives à *B. cinerea*, ce sont plutôt les baies arrivant à maturité, à partir du stade de véraison, qui peuvent être infectées. En effet, les sucres qui commencent à s'accumuler dans ces baies constituent la base de l'apport nutritif de *B. cinerea*. Les baies attaquées vont alors présenter une coloration brune précédant leur dessèchement par fracturation de la pellicule, et leur détachement de la grappe. Notons qu'il suffit d'une seule baie infectée pour que le champignon envahisse et colonise le reste de la grappe, de proche en proche. Les dégâts les plus importants sont causés par l'infection des baies de la véraison à la récolte, et peuvent compromettre une vendange entière. De plus, le métabolisme du champignon au sein de la baie conduit à la formation de composés d'altération qui finissent par se retrouver dans le vin, ou à la dégradation de certains arômes présents dans la baie (Dubos, 2002). Par conséquent, les caractéristiques organoleptiques des vins qui en découlent seront perturbées. Cependant, dans certains vignobles, la colonisation des baies par *B.*

cinerea est une condition essentielle à l'élaboration de certains vins liquoreux, notamment dans le vignoble de Sauternes en Gironde. L'action desséchante du champignon sur la baie permet de concentrer les sucres et de produire certains arômes indispensables à la typicité de ces vins ; il est alors question de pourriture « noble » et non plus de pourriture grise.

Les moyens de lutte passent d'abord par l'adaptation des pratiques culturales, en évitant l'entassement des feuilles et en favorisant l'aération du pied de vigne. Le viticulteur peut également détruire les sources d'inoculum, notamment les débris de bois. Comme évoqué précédemment, l'emploi de cépages résistants est également un moyen d'éviter les problèmes dus aux maladies fongiques. Quant à la lutte chimique, plusieurs familles de pesticides sont utilisées : les benzimidazoles, les anilino-pyridines, et les anilides, qui agissent par divers mécanismes, notamment par la perturbation de l'activité cellulaire et l'inhibition de la biosynthèse des stéroïdes indispensables à la constitution du champignon. Il n'existe pas de traitement efficace contre *B. cinerea* en agriculture biologique à l'heure actuelle (Dubos, 2002). Concernant les moyens de lutte biologique, l'usage combiné d'agents de contrôle biologique comme *Bacillus subtilis* (produisant des enzymes lytiques et des composés antimicrobiens) et d'antifongiques chimiques permettrait de réduire la fréquence d'utilisation et la dose de ces derniers tout en assurant une protection efficace du vignoble contre *B. cinerea* (Rotolo et al., 2018).

2.3.4. Stilbènes contre *Botrytis cinerea* : inhibition du développement mycélien

Le resvératrol est l'un des premiers stilbènes à avoir été étudiés pour leurs propriétés antimicrobiennes contre *P. viticola* et *B. cinerea*. Ainsi, son activité contre *B. cinerea* a été évaluée à plusieurs niveaux, par l'inhibition de la germination des conidies qui atteint 50% *in vitro*, et par l'inhibition du développement mycélien *in vitro* également, à des concentrations comprises entre 60 et 140 µg/mL (Adrian et al., 1997). Observées de plus près, les cellules de *B. cinerea* présentent des modifications anatomiques comme les granulations cytoplasmiques et la formation de tubes germinatifs secondaires et tertiaires au niveau de la conidie, qui seraient une tentative de survie et de contournement de l'inhibition exercée par le resvératrol (Adrian et al., 1997). Certains dérivés hydroxyméthylés du resvératrol présentent également une activité inhibitrice importante du développement mycélien de *B. cinerea*, avec des CI_{50} de 28 à 55 µM, soit une activité proche de celle du ptérostilbène, qui présente une CI_{50} de 52 µM (Chalal et al., 2014).

De plus, l'effet de synergie potentielle entre le resvératrol et le pyriméthanol, un fongicide de synthèse, contre *B. cinerea*, a également été évalué *in vitro* et *in vivo*. La combinaison des deux composés *in vitro* diminue la concentration inhibitrice minimale du pyriméthanol d'environ seize fois par rapport à celle observée lors de l'application du pyriméthanol seul aux mêmes concentrations, contre des souches modérément à fortement résistantes au pyriméthanol, pour lesquelles la CI_{50} du pyriméthanol est de 88 mg/L. Pour les essais *in vivo* sur les grappes de raisin au vignoble, la combinaison du resvératrol et du pyriméthanol ne diminue pas l'incidence de la maladie, mais permet la réduction significative de la taille

des lésions observées sur les baies de raisin (Xu et al., 2018). Ces données montrent le rôle important que pourraient jouer les stilbènes dans la réduction de l'usage des pesticides, avant même d'envisager leur utilisation comme alternative.

Notons que *B. cinerea* est également capable de biosynthétiser certains dimères du resvératrol selon le couplage 8 – 8' comme le pallidol, en utilisant le resvératrol produit par la plante hôte. Cette biosynthèse est catalysée par la laccase fongique produite par le micro-organisme et serait un moyen de défense contre le resvératrol, en produisant des dimères avec une activité antifongique réduite (Cichewicz et al., 2000). *B. cinerea* effectue également la biosynthèse de la δ -viniférine (Breuil et al., 1999), selon le couplage 3 – 8', plus rare. Cependant, l'hypothèse d'une détoxification du resvératrol est moins probable dans ce cas, la δ -viniférine étant un antimicrobien très puissant, du moins contre *P. viticola* (Pezet et al., 2003).

Enfin, il a été montré qu'un extrait méthanolique de sarments de Pinot noir peut inhiber le développement mycélien de *B. cinerea* à une concentration de 5 mg/L. L' ϵ -viniférine présente dans cet extrait inhibe le développement mycélien à une concentration de 5 mM (Schnee et al., 2013). Cependant, les activités observées contre *B. cinerea* sont généralement plus faibles que contre *P. viticola* (Gabaston et al., 2017). Plus récemment, un extrait de sarments de Pinot noir riche en resvératrol (23 mg/mL), picéatannol (4,5 mg/mL) et ϵ -viniférine (5,2 mg/mL) a permis de réduire d'environ 48% les lésions causées par *B. cinerea* sur les feuilles de vigne, par application préventive sur les plantes. L'extrait a été préparé de façon à présenter une concentration de 100 μ g/mL en resvératrol (De Bona et al., 2019).

2.3.5. Relation Structure-Activité

La compréhension du mécanisme d'action antimicrobien des stilbènes est un élément clé pour tout développement industriel potentiel. Les études de relation structure-activité restent peu concluantes mais parviennent à déceler certaines corrélations. Ainsi, au niveau des monomères, le ptérostilbène, présentant 2 groupements méthoxyles, est considéré comme étant le monomère antimicrobien le plus puissant. Ces substitutions par des groupements hydroxyles et méthoxyles se montrent avantageuses dans plusieurs cas, mais les niveaux d'activité dépendent de l'agent pathogène. Ainsi, certains monomères substitués seront plus efficaces contre *P. viticola*, d'autres contre *B. cinerea*. Ces différences ne permettent pas toutefois d'identifier clairement la relation structure-activité de ces différents monomères à l'heure actuelle (Chalal et al., 2014).

D'autre part, il est clair que le degré d'oligomérisation a un impact décisif sur l'efficacité des stilbènes. Les différentes études menées contre différents agents pathogènes montrent une corrélation positive entre le degré d'oligomérisation des stilbènes et leur efficacité contre les agents pathogènes. En effet, certains dimères comme la δ -viniférine et des tétramères comme la vitisine B présentent les CI_{50} les plus basses dans plusieurs cas (Pezet et al., 2004) (Gabaston et al., 2017). Comme évoqué précédemment, l'extrait de racines de vigne, dont les stilbènes majoritaires sont des tétramères, est le plus actif contre

P. viticola, comparé aux extraits de sarments et de ceps (Gabaston et al., 2017). Les tétramères qui le composent possèdent également les CI_{50} les plus basses par rapport aux autres stilbènes à structures inférieures. Aussi, les tétramères du resvératrol semblent également plus efficaces contre *Diplodia seriata* et *Neofusicoccum parvum*, deux champignons impliqués dans les maladies du bois de la vigne (Lambert et al., 2012). Un extrait enrichi en stilbènes de racines a été utilisé pour lutter contre *Leptinotarsa decemlineata*, un coléoptère phytophage et ravageur des plantes de la famille des Solanacées, notamment la pomme de terre. L'extrait de racines de vigne, surtout les vitisines A et B, inhibent le développement de la larve, réduisent sa capacité d'alimentation et causent la mortalité de l'insecte en champ. D'autre part, l'étude de la macrofaune du sol après contact avec l'extrait de racines montre l'absence de toxicité des stilbènes envers ces organismes, notamment envers *Eisenia fetida* (vers de terre), espèce précieuse pour le maintien de la fertilité des sols agricoles (Gabaston et al., 2018). Ces résultats sont d'une grande importance étant donné que toute utilisation des stilbènes en combinaison avec les pesticides chimiques ou en tant que traitement à part entière doit s'accompagner d'une étude de leur toxicité et de leur impact environnemental.

3. Les stilbènes dans le vin et applications en santé humaine

3.1. Présence des stilbènes dans le vin

3.1.1. Origine

Le vin est une source importante de polyphénols à propriétés antioxydantes. La majeure partie de ces polyphénols provient de la baie de raisins, particulièrement de la pellicule et des pépins (Gerós et al., 2012). L'élevage du vin en barriques de bois de chêne permettra l'extraction et l'enrichissement du vin en polyphénols supplémentaires. Enfin, quelques polyphénols sont le produit de l'activité bactérienne qui se développe dans le vin, comme le tyrosol et le 4-éthylphénol (Packer, 2001). Les polyphénols étant des métabolites secondaires, leur teneur dans les baies de raisin est sujette à des variations selon le cépage et le climat considérés, puisqu'elle est le résultat du bagage génétique du cépage, mais également des conditions environnementales à court et à long terme sous lesquelles évolue la plante. Cette variation peut même s'apprécier au sein des baies d'un même vignoble où les attaques d'agents pathogènes sévissent dans un rang de vignes et épargnent un autre, par exemple. Dans le vin, la teneur en polyphénols va non seulement dépendre du cépage utilisé, mais également des techniques de vinification mises en œuvre. Ainsi, les vins blancs étant pour la plupart issus d'un pressurage rapide du raisin sans contact prolongé avec les parties solides (pellicule et pépins), leur teneur en polyphénols sera inférieure à celle des vins rouges, issus d'une macération prolongée du moût avec les pellicules et les pépins, s'accompagnant d'une extraction des polyphénols par l'éthanol formé lors de la fermentation. Aussi, la filtration et le collage des vins sont un moyen de réguler la teneur des polyphénols (Waterhouse, 2002).

Parmi les polyphénols retrouvés dans le vin, les stilbènes ne constituent qu'une petite partie en termes de quantité, avec de plus fortes concentrations dans les vins rouges. Les stilbènes présents dans la baie de raisin se concentrent dans la pellicule et sont totalement absents des pépins (Fornara et al., 2008). Ils sont extraits au cours de la fermentation alcoolique. Cette extraction est impossible dans les vins blancs, dont le moût fermente après pressurage sans être en contact avec la pellicule, et dont la quantité de stilbènes provient essentiellement de l'extraction mécanique au moment du pressurage. Ainsi, dans un vin rouge élaboré dans des conditions de macération pelliculaire, la concentration en resvératrol est 13 fois plus élevée que dans un vin élaboré à partir d'un moût issu de pressurage direct. De même, l'essai de macération sur vin blanc montre une augmentation de la concentration des stilbènes d'environ 10 fois par rapport à un vin blanc vinifié après pressurage direct des baies de raisin (Jeandet et al., 1995). Aussi, l'emploi de la thermovinification, qui consiste à chauffer le moût rouge pour une durée limitée dans le but d'extraire des anthocyanes et autres polyphénols responsables de la couleur et de la texture du vin, contribue à l'augmentation de la teneur en stilbènes également. En effet, lors d'une étude comparative de l'extraction des polyphénols dans plusieurs vins, la thermovinification durant une heure à 60°C a généré une augmentation considérable de la concentration en resvératrol et picéide dans le vin (Burns et al., 2001). Après une thermovinification, la concentration en picéide dans le vin passe de 35 à 74 μM , pouvant atteindre 112 μM avant même le début de la fermentation et l'extraction par l'éthanol des stilbènes de la pellicule.

L'étude des pellicules de raisins de plusieurs cépages français et espagnols révèle des concentrations totales de monomères (resvératrol et picéide) allant de 22 à 1026 $\mu\text{g/g}$ de pellicule sèche, la concentration maximale étant observée dans les baies de Merlot, avec une nette dominance pour le picéide, qui n'est autre que le resvératrol glucoside (glycosylé en position 3), qui atteint à lui seul une concentration de 988 $\mu\text{g/g}$ de pellicule sèche (isomères *Z/E* combinés) (Romero-Pérez et al., 2001). Le *Z*-picéide est naturellement présent dans les baies de raisin, même si la majeure partie du picéide retrouvé dans les baies est sous forme *E*-picéide, avec une concentration pouvant être quarante fois plus élevée (Adrian et al., 2000). Dans des baies de raisin rouge (Cabernet Sauvignon et Merlot) produites au Chili, le *E*-picéide était le monomère dominant par rapport au resvératrol avec des teneurs allant de 1,5 à 7,3 $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche (Burns et al., 2002). C'est le cas pour la grande majorité des cépages et cette dominance est à nouveau observée dans le vin, mais le ratio picéide/resvératrol évolue significativement au cours du temps et selon les étapes d'élaboration du vin (Mattivi et al., 1995).

Enfin, notons que les stilbènes peuvent être produits dans la baie de raisin par élicitation après irradiation aux rayons ultraviolets C (UV-C) (Peter Langcake and Pryce, 1977). C'est notamment le cas du resvératrol, dont la concentration initiale dans la pellicule fraîche d'une baie saine de Chardonnay atteint environ 7 $\mu\text{g/g}$ de pellicule fraîche. Suite à l'irradiation aux UV-C, cette concentration augmente considérablement pour atteindre 37 $\mu\text{g/g}$ de pellicule fraîche au bout de 24 heures, et 123 $\mu\text{g/g}$ de

pellicule fraîche au bout de 48 heures (Adrian et al., 2000). Cette même étude montre d'ailleurs que l'augmentation de la concentration du resvératrol par élicitation aux UV-C est moins marquée dans les baies infectées par *B. cinerea*. Deux hypothèses ont été soulevées : soit le métabolisme du resvératrol par *B. cinerea*, évoqué précédemment, qui atténuerait l'augmentation du resvératrol, soit l'incapacité des rayons UV-C à stimuler davantage la production du resvératrol, déjà activée par l'attaque fongique dans ce cas (Adrian et al., 2000). L'élicitation par les UV-C est également possible après récolte des grappes. Le resvératrol peut alors atteindre une concentration quatre fois supérieure à celle mesurée au moment de la récolte (Cantos et al., 2002). Cette biosynthèse suivant la séparation de l'organe reproducteur de la plante rappelle celle observée dans les sarments de vigne issus de la taille d'hiver. Cette augmentation induite par l'homme de la concentration des monomères dans la baie de raisin est conséquemment observée dans le vin. Ainsi, les vins rouges issus de raisins irradiés à aux UV-C sont 1,5 et 2 fois plus riches en picéatannol et resvératrol, respectivement (Cantos et al., 2003). De la même façon, le passerillage des baies de raisins y induit une augmentation de l'expression de la stilbène-synthase et par conséquent une augmentation de la concentration du resvératrol. En effet, le passerillage est une technique de vinification traditionnelle répandue dans certaines régions de France (Alsace, Corrèze, Corse), mais également en Espagne, Italie, Grèce, Chypre et autres pays de Méditerranée orientale, qui consiste en un séchage prolongé des grappes de raisins (deux à trois mois) au soleil ou à l'ombre avant de les presser et de vinifier le moût. Le flétrissement des baies et leur déshydratation partielle seraient un stimulus environnemental activant les mécanismes de défense de la baie (Versari et al., 2001).

3.1.2. Composition et teneur dans le vin

Les teneurs en stilbènes dans le vin sont très variables. Selon les travaux de Waterhouse et al. (2002), dans un vin rouge jeune (âgé de moins de 6 mois, non élevé en barrique), la teneur moyenne en polyphénols totaux est de 1732,5 mg/L, et celle des stilbènes atteint 7 mg/L. Dans un vin rouge élevé 2 ans en barrique, la teneur en polyphénols totaux atteint 1742 mg/L, avec une teneur en stilbènes stabilisée à 7 mg/L. L'étude de 18 vins rouges espagnols montre la présence du picéide (isomères *Z/E*) et du resvératrol (isomères *Z/E*), avec une nette dominance des isomères *E*. Dans ces vins, les stilbènes sont présents à des concentrations assez faibles, avec une teneur moyenne en stilbènes totaux de 5,65 mg/L et un maximum de 13,78 mg/L pour un vin issu de cépage Merlot. Le *E*-picéide est le plus présent avec des concentrations maximales dans le vin rouge pouvant atteindre 4 mg/L (Lamuella-Raventos et al., 1995) (Romero-Pérez et al., 1999). Dans les vins blancs, les teneurs en ces quatre monomères sont plus faibles, allant de 0,05 à 1,8 mg/L (Romero-Pérez et al., 1996). Dans le cas de 120 vins rouges et blancs portugais étudiés, des quantités bien plus élevées sont observées : la teneur en stilbènes totaux varie entre 0,6 et 73 mg/L pour les vins rouges, avec une moyenne d'environ 18 mg/L. Pour les vins blancs, les teneurs sont plus faibles, allant de 0,6 à 23,5 mg/L, avec une moyenne de 11 mg/L. Dans ces vins portugais, 5 stilbènes ont été identifiés : *Z/E*-resvératrol, *Z/E*-picéide et *E*-astringine, isolée pour la

première fois dans le vin (issu du cépage Syrah notamment). Comme pour l'étude précédente, le stilbène dominant est *E*-picéide, pouvant atteindre une concentration de 50 mg/L dans l'un des vins rouges (Ribeiro de Lima et al., 1999). Ces concentrations rejoignent celles observées dans les vins rouges élaborés au sud du Brésil à partir de cépages internationaux comme le Merlot, le Cabernet Sauvignon, le Cabernet Franc et le Tannat (Vitrac et al., 2005). Dans cette étude, six stilbènes ont été identifiés : le resvératrol (isomères *Z/E*), le picéide, l'astringine, l' ϵ -viniférine et la δ -viniférine, détectée et quantifiée pour la première fois dans le vin. Selon cette étude, la teneur en stilbènes totaux est extrêmement variable d'un vin et d'un cépage à l'autre, et peut varier entre 2,5 et 87,5 mg/L. Parmi les vins inclus dans cette étude, ceux élaborés à partir de raisins de Merlot sont les plus concentrés en stilbènes. Cette variabilité se reflète également sur la concentration des différents stilbènes présents qui change considérablement d'un vin à l'autre. Cependant, les stilbènes dominants sont les monomères, notamment le picéide et le resvératrol. Ceci dit, les vins brésiliens étudiés se distinguent par la forte teneur en δ -viniférine et en *Z*-resvératrol (10 et 15 mg/L en moyenne dans les vins de Merlot, respectivement) alors que le *E*-resvératrol présente une concentration moyenne de 2 mg/L. Une étude de l'extraction du resvératrol et du picéide lors de la fermentation montre que le picéide est extrait dès les premiers jours de macération, alors que l'extraction du resvératrol augmente au fur et à mesure de la production d'éthanol (Mattivi et al., 1995). Un tétramère, l'hopéaphénol, a été identifié dans des vins rouges de Merlot provenant d'Afrique du Nord, à des concentrations allant de 0,3 à 3,8 mg/L (Guebailia et al., 2006). Plus récemment, une étude sur la composition en stilbènes des vins rouges (Pinot noir, Merlot, Cabernet Sauvignon) de la vallée d'Okanagan au Canada révèle la présence de 41 stilbènes différents, par analyse MS/MS et ESI-QTOF (**Tableau 1**). Aux stilbènes majoritairement présents cités précédemment s'ajoutent des homodimères et des hétérodimères du picéatannol et du resvératrol, dont la parthénocissine A, la quadrangularine A, l'ampélopsine D, les *Z/E*-scirpusine A, l'ampélopsine C et l'isohopéaphénol, ainsi que douze composés qui n'ont pas pu être identifiés (Moss et al., 2013). Enfin, une étude récente, sur des vins originaires d'Espagne, a dosé les principaux stilbènes des sarments de vigne dans les vins (Guerrero et al., 2020). Cette étude réalisée sur des vins rouges et blancs a confirmé que le picéide est le principal stilbène des vins (6,9 et 0,2 mg/L en moyenne dans les vins rouges et blancs, respectivement). De plus, des quantités relativement importantes d'oligomères ont été observées, comme pour l'hopéaphénol (1.6 mg/L en moyenne dans les vins rouges).

Degré d'oligomérisation	Composés identifiés	NI
Monomères	<i>cis</i> -resvératrol ; <i>trans</i> -resvératrol ; <i>trans</i> -picéatannol ; <i>cis</i> -picéide ; <i>trans</i> -picéide ; <i>trans</i> -astringine	0
Dimères	pallidol ; parthénocissine A ; quadrangularine A ; ampélopsine D ; <i>cis</i> - ϵ -viniférine ; <i>trans</i> - ϵ -viniférine, <i>cis</i> - ω -viniférine ; <i>trans</i> - ω -viniférine ; <i>cis</i> - δ -viniférine ; <i>trans</i> - δ -viniférine ; <i>cis</i> -scirpusine A ; <i>trans</i> -scirpusine A ; rétrisol A/B ; scirpusine B ; parthénostilbénine A ; parthénostilbénine B ; ϵ -viniférine glucoside	5
Trimères	ampélopsine C ; <i>cis</i> -miyabénol C ; <i>trans</i> -miyabénol C	5
Tétramères	hopéaphénol; isohopéaphénol	2

Tableau 1. Stilbènes détectés et identifiés dans le vin rouge. D'après Moss et al., 2013, modifié.
NI : nombre de composés non identifiés

La teneur en stilbènes des vins dépend donc non seulement des cépages, des régions ou des techniques de vinification, mais également de la qualité sanitaire des baies de raisin. Sachant que la teneur en stilbènes augmente dans la baie en réponse aux infections, l'impact attendu serait une augmentation proportionnelle dans le vin. Néanmoins, concernant le resvératrol, une infection sévère des grappes par *B. cinerea* conduit à la diminution de sa concentration dans le vin correspondant (Jeandet et al., 1995). En effet, bien qu'une infection limitée de la grappe (10% de la grappe) génère une augmentation de la teneur en resvératrol dans le vin par rapport à un vin issu de baies saines, une infection étendue touchant plus de 40% de la baie cause une diminution de la concentration dans le vin. Cette diminution serait d'autant plus importante que l'étendue de l'infection augmente. Ce phénomène serait en lien direct avec le métabolisme du resvératrol par les laccases de *B. cinerea* évoqué précédemment, qui génère des oligomères du resvératrol. Par conséquent, la concentration des stilbènes oligomériques issus de ce métabolisme devrait augmenter dans le vin. Cette hypothèse reste cependant à valider par de plus amples études. D'ailleurs, l'étude de la composition en stilbènes des baies de Sémillon et de Sauvignon blanc ayant subi la pourriture noble dans le vignoble de Sauternes (développement de *B. cinerea*) montre que l' ϵ -viniférine augmente au fur et à mesure du développement du champignon sur la baie, contre une diminution du resvératrol. Cet oligomère n'est pas détecté dans les baies saines issues des mêmes cépages. Cependant, aux derniers stades du développement du champignon, le taux d' ϵ -viniférine diminue d'environ 50%. Cette diminution serait due à l'oligomérisation de la molécule en stilbènes plus actifs contre *B. cinerea*, notamment des trimères et des tétramères (Landrault et al., 2002). L'impact de l'infection des baies par *Erysiphe necator*, champignon agent de l'oïdium, a également été étudié. Contrairement à ce qui est observé dans le cas de l'infection par *B. cinerea*, la concentration de

resvératrol ne diminue pas au gré de l'infection mais augmente proportionnellement. Ainsi, dans les baies subissant une infection importante, la concentration de *E*-resvératrol est 12 fois plus élevée que dans les baies saines, suivie par celle du *Z*-picéide, dont la concentration est 8 fois plus élevée que celle observée dans les baies saines. Cette augmentation continue prouverait que *E. necator* n'est pas en mesure de métaboliser le resvératrol (Romero-Pérez et al., 2001).

Dans la région du Xérès en Espagne, l'élevage du vin du même nom a un impact direct sur sa teneur en stilbènes. La méthode d'élevage en « vin de voile » dans les fûts de chêne repose sur le développement des levures à la surface du vin et au contact du volume d'air présent dans le fût, qui couvrent le vin d'un film biologique appelé « *flor* » ou voile, permettant sa lente oxydation. Naturellement, l'activité biologique de ce biofilm de levures donne au Xérès ses caractéristiques organoleptiques mais exerce également un effet oxydant sur les stilbènes présents dans le vin. Bien que la fermentation ait également un impact sur le taux de resvératrol et de picéide, via l'hydrolyse d'une partie du picéide en resvératrol et la diminution préférentielle du taux de son isomère *cis* (métabolisé prioritairement par les levures), c'est l'élevage en présence du film de levures qui exerce l'effet le plus significatif sur ces deux monomères majeurs du vin. En effet, plus de 80% du resvératrol et du picéide disparaissent au cours de cet élevage. La levure exerce alors son métabolisme sur les deux formes isomériques des deux monomères (Roldán et al., 2010). Mais cette hydrolyse exercée par les levures n'est pas la seule cause de la disparition du resvératrol et du picéide : au métabolisme des levures s'ajoutent les phénomènes d'oxydation (Castellari et al., 1998) et le piégeage du resvératrol par l'acétaldéhyde produit par les levures. Enfin une diminution supplémentaire, allant jusqu'à 15%, est observée après la filtration du vin, avant son embouteillage (Roldán et al., 2010).

Enfin, l'origine des isomères *cis* des stilbènes dans le vin a également été étudiée. Généralement, la conversion du *E*-resvératrol en *Z*-resvératrol est considérée comme une conséquence de la photo-isomérisation et du pH acide du vin (Trela and Waterhouse, 1996). Cependant, Jeandet et al. ont démontré que le *Z*-resvératrol est initialement présent dans la baie de raisin, et qu'il peut être dosé en grandes quantités dans des vins conservés à l'abri de la lumière (Jeandet et al., 1995). Les phénomènes d'isomérisation du resvératrol et du picéide interviendraient également au cours de la fermentation, via l'activité enzymatique des β -glucosidases de certaines souches fermentaires de *Saccharomyces cerevisiae*, capables d'isomériser ces monomères (Mattivi et al., 1995) (Clare et al., 2005). Par conséquent, la présence du *Z*-resvératrol dans le vin serait à la fois due à un apport initial de la baie de raisin et à une conversion du *E*-resvératrol au cours de la vinification et de la conservation du vin.

3.2. Applications en santé humaine

L'activité biologique du resvératrol et de ses dérivés, à l'instar des autres polyphénols, peut être divisée en deux types complémentaires. D'une part, les stilbènes exercent une activité biologique non

spécifique, commune à tous ces composés, qui repose sur leur structure chimique phénolique. Cette caractéristique leur confère un pouvoir antioxydant, leur permettant de piéger les radicaux libres comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS), ainsi que les produits de fin de glycation (AGE, *advanced glycation endproducts*) (Grillo and Colombatto, 2008) (Liu and Gu, 2012). Ces produits étant impliqués dans le développement de maladies neurodégénératives et métaboliques majeures, comme le cancer, l'athérosclérose et le diabète, leur chélation par les stilbènes contribue à protéger les tissus sensibles et à prévenir ces maladies (Snopek et al., 2018). D'autre part, les stilbènes peuvent exercer une activité biologique spécifique, c'est-à-dire via des mécanismes ciblés, tels que l'interaction avec des récepteurs, des enzymes, ou des facteurs de transcription. Ceci leur permet notamment de moduler des voies de signalisation cellulaire, et l'expression de gènes. Ainsi, le resvératrol interagit avec une multitude de protéines conduisant souvent à leur inhibition dont l'ADN topoisomérase II, enzyme indispensable à la réplication, la transcription et la croissance cellulaire, la protéine kinase C (Harikumar and Aggarwal, 2008). Aussi, il interagit avec des récepteurs comme le récepteur aux œstrogènes. Il est également connu pour augmenter l'expression de la protéine p53 apoptotique, et pour inhiber certains facteurs de croissance et d'angiogenèse comme le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire). A travers ces différentes interactions, le resvératrol et ses dérivés se sont montrés efficaces dans différents tests *in vitro* et *in vivo* chez l'animal, présentant principalement des effets anti-inflammatoires et antioxydants fortement liés à leur activité anticancéreuse, cardioprotectrice et neuroprotectrice, ainsi qu'une activité cytotoxique et antimicrobienne, présentés ci-après. Cependant, le resvératrol reste le stilbène le plus étudié en santé humaine, du fait de sa présence dans le vin, et de sa disponibilité en quantités suffisantes sur le marché pour mener un large éventail d'études en biologie et pharmacologie. Contrairement au resvératrol et autres monomères, les oligomères du resvératrol sont pour la plupart absents du marché. En effet, l'approvisionnement en quantités suffisantes de ces stilbènes reste un facteur limitant pour l'exploration de leur activité biologique. Cela n'a pas empêché diverses équipes de chercheurs d'étudier l'activité anticancéreuse *in vitro* des oligomères du resvératrol, souvent obtenus par extraction à partir de leur source naturelle, comme exposé plus loin.

3.2.1. Activité antimicrobienne

L'étude de l'activité antimicrobienne des stilbènes, notamment du resvératrol, s'est essentiellement faite *in vitro* à cause de leur très faible biodisponibilité (Walle et al., 2004). Le mécanisme d'action antibactérien du resvératrol implique plusieurs cibles : inhibition de l'hydrolyse d'ATP, de l'ATP-synthase et de la phosphorylation oxydative, déformation cellulaire et perturbation de la structure membranaire (Vestergaard and Ingmer, 2019). Des études de relation structure-activité sur plusieurs bactéries Gram + et Gram – ont montré que les stilbènes sous forme de dimères et ceux qui possédaient un nombre plus élevé de groupements hydroxyles et méthoxyles étaient plus puissants (Singh et al., 2019). Plusieurs espèces de bactéries sont sensibles à l'action inhibitrice du resvératrol, dont *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae* et *Mycobacterium tuberculosis*. Contre ces bactéries, le

resvératrol présente des CI_{50} inférieures à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et moins (Vestergaard and Ingmer, 2019). Outre son pouvoir bactéricide, le resvératrol manifeste des propriétés anti-virulence intéressantes. Il peut ainsi causer une réduction de la formation du biofilm chez certaines espèces comme *Staphylococcus aureus* (Qin et al., 2014) et *Escherichia coli* (Lee et al., 2013). D'autres propriétés anti-virulence ont été constatées, comme la réduction de la motilité bactérienne et de l'expression des toxines bactériennes. Ces propriétés ont inspiré des études visant à utiliser le resvératrol en combinaison avec les antibiotiques pour une meilleure réponse au traitement, notamment dans le contexte actuel de montée en puissance des bactéries résistantes (Liu et al., 2016). Cependant, dans certains cas, la présence du resvératrol a réduit l'activité bactéricide des antibiotiques utilisés. Le mécanisme mis en cause est le pouvoir antioxydant du resvératrol, qui viendrait protéger les bactéries et réduire leur mortalité. Ces observations sont à nuancer, vu que le resvératrol a dans d'autres cas potentialisé l'effet de certains antibiotiques, citons par exemple les aminoglycosides contre *S. aureus* et autres bactéries à Gram + (Nøhr-Meldgaard et al., 2018). Enfin, les seules études *in vivo* de l'activité antibactérienne du resvératrol se limitent à son usage externe chez l'Homme, notamment contre les lésions acnéiques causées par *Propionibacterium acnes*, qui sont significativement réduites suite à l'application d'une dose de 1 mg/g de resvératrol incorporé dans un hydrogel à base de carboxyméthylcellulose (Fabbrocini et al., 2011). Concernant l'activité antifongique du resvératrol, elle s'avère être plus importante que son activité antibactérienne, les CI_{50} contre les champignons étant plus basses. Le resvératrol agit sur plusieurs champignons dont les genres *Tricophyton*, *Microsporium* et *Candida*, les CI_{50} les plus basses se situant entre 10 et 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Jung et al., 2005).

3.2.2. Activité antioxydante et protection cellulaire

Le stress oxydant est défini par l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) issues du métabolisme mitochondrial entre autres. En s'accumulant, les ROS exercent une toxicité sur les cellules et les tissus causant leur altération, et favorisent le développement de maladies métaboliques et neurodégénératives, via l'activation des mécanismes pro-inflammatoires. Les ROS peuvent particulièrement induire une oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN, se traduisant par des pertes de contrôle cellulaire conduisant à des divisions anarchiques ou à l'inverse, par une apoptose cellulaire et des mutations du génome (Uttara et al., 2009).

A l'instar d'autres polyphénols, les stilbènes sont principalement connus pour leurs activités antioxydantes. Des tests *in vitro* d'activité antioxydante (ORAC) de différents stilbènes montrent une importante activité de l' ϵ -viniférine et de l'ampélopsine A. Cette dernière se démarque également par son pouvoir inhibiteur de l'agrégation du peptide $A\beta_{25-35}$ *in vitro*, peptide responsable de la formation des plaques séniles chez les patients atteints d'Alzheimer (Biais et al., 2017). L'évaluation de l'effet antioxydant du vinéatrol@30, un extrait de sarment de vigne commercialisé et riche en resvératrol et ϵ -viniférine, ainsi que d'autres oligomères, a également montré sa capacité à piéger les radicaux libres et à protéger les molécules lipidiques contre la peroxydation lipidique (Müller et al., 2009). Ce pouvoir

antioxydant des stilbènes a conduit à l'utilisation du resvératrol en tant que principe actif des produits cosmétiques de lutte contre le vieillissement de la peau. En plus de piéger les radicaux libres, d'inhiber les facteurs de transcription pro-inflammatoires, il stimule la synthèse du collagène au niveau de la peau. Cette utilisation du resvératrol et des stilbènes en général peut être considérée comme leur principale application chez l'homme (Ratz-Lyko and Arct, 2019). Quant à la protection cardiovasculaire attribuée aux stilbènes, notamment au resvératrol, elle est la résultante de son activité antioxydante, du piégeage des radicaux libres, de son activité anti-inflammatoire et de l'activation de protéines et d'enzymes antioxydantes et cardioprotectrices comme la sirtuine-1 (SIRT-1) (Baur et al., 2006) (Zordoky et al., 2015). Cette protection cardiovasculaire a longtemps alimenté le concept de « *French paradox* », qui établit une relation entre l'importante consommation de vin rouge par la population française et un plus faible taux d'incidence des maladies cardiovasculaires, malgré une alimentation souvent riche en matières grasses saturées, ou du moins aussi riche que pour d'autres populations présentant un taux d'incidence plus élevé de ces maladies (Blouin and Cruege, 2013) (Weiskirchen and Weiskirchen, 2016). Ce pouvoir protecteur du vin a été expliqué par sa forte teneur en polyphénols, parmi lesquels les stilbènes joueraient un rôle majeur.

3.2.3. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est une réponse adaptative de l'organisme face à un stimulus perçu comme anxiogène, tel des organismes pathogènes, des molécules semblables aux molécules du soi ou des lésions. Elle se décline en deux types : l'inflammation aiguë, mécanisme à travers lequel l'organisme va contrôler ou éliminer le stimulus grâce à différents acteurs, et l'inflammation chronique, qui survient lorsque l'organisme n'arrive pas à éliminer ce stimulus (Dvorakova and Landa, 2017). Cette dernière peut être délétère pour l'organisme. En effet, elle s'accompagne de la production de monoxyde d'azote (NO) et de ROS, substances toxiques pour les tissus, et de prostaglandines pro-inflammatoires par l'action d'enzymes comme la cyclo-oxygénase (COX), conduisant au développement des maladies métaboliques et des cancers, comme évoqué précédemment (Egea et al., 2017).

Le resvératrol est capable d'inhiber la formation des produits de la 5-lipoxygénase et de la cyclooxygénase des leucocytes de rat *in vitro*, comme le thromboxane A2, facteur prothrombique impliqué dans les phénomènes d'inflammation vasculaire (Yoshiyuki et al., 1985). L'étude de son activité sur la cyclo-oxygénase 1 (COX-1) *in vitro* montre d'ailleurs qu'il est capable de l'inactiver; cette dernière agit en contrepartie en oxydant le resvératrol, produisant des espèces radicalaires qui inactivent irréversiblement l'enzyme tout en se couplant pour donner l' ϵ -viniférine et la δ -viniférine (Szewczuk et al., 2005). Dans une autre étude, vingt-cinq stilbènes (huit monomères, douze dimères, un trimère et quatre tétramères) ont été évalués pour leur capacité à inhiber la synthèse de NO par les cellules microgliales de type BV-2. Leur activité a été comparée à celle de la dexaméthasone, anti-inflammatoire stéroïdien. Parmi eux, dix stilbènes ont présenté un niveau d'activité efficace, causant une inhibition

significative du NO (d'environ 50%) à des CI_{50} allant de 3,9 à 23,4 μM (Nassra et al., 2013). Le resvératrol et le picéatannol sont les plus actifs parmi les monomères testés, et l' ϵ -viniférine est la plus efficace parmi les dimères. Cependant, ce sont deux tétramères, les vitisines A et B, qui se sont montrés les plus actifs, inhibant 70% de la production de NO à une concentration de 5 μM , avec des CI_{50} de 3,9 et 4,7 μM , respectivement. A cette même concentration, la dexaméthasone a permis une inhibition de 40% du NO. Ceci montre encore une fois l'intérêt de l'oligomérisation des stilbènes dans la potentialisation de leur effet biologique en santé animale et humaine. Cette étude a également permis de montrer que les monomères glycosylés comme le picéide et l'astringine sont moins actifs que les monomères non glycosylés comme le resvératrol et le picéatannol (Nassra et al., 2013). Dans la littérature, plusieurs autres monomères possèdent un potentiel anti-inflammatoire, comme l'oxyresvératrol, le ptérostilbène, la rhapontigénine et le gnétol (Dvorakova and Landa, 2017). Outre ces monomères, plusieurs oligomères présentent une activité anti-inflammatoire significative. En effet, dans une étude de l'activité anti-inflammatoire de dimères du resvératrol sur des macrophages RAW 264.7, un dimère présentant quatre fonctions OH substituées par des groupes méthyle, a permis d'inhiber la production de NO avec une CI_{50} de 3,8 μM , tout en diminuant l'expression des NO-synthases et de la production de l'interleukine (IL)-1 β (Zhong et al., 2013). Aussi, l' α -viniférine, trimère du resvératrol, inhibe l'activité prostaglandine H_2 synthase de la cyclo-oxygénase 2 (COX-2) *in vivo* lors d'un œdème induit par la carragénine sur un modèle animal, réduisant ainsi le taux de prostaglandine H_2 , précurseur des prostaglandines qui sont d'importants marqueurs de l'inflammation. Elle diminue également l'expression du facteur de transcription *Nuclear factor-kappa B* (NF- κB), et par conséquent l'expression de COX-2 et de la forme induite des NO-synthases (iNOS), responsables de la production du NO, fortement impliqué dans les voies de signalisation cellulaire pro-inflammatoire (Chung et al., 2003). Plus récemment, l'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* du vitisinol A, de l' ϵ -viniférine, de la vitisine A, de la vitisine B et de l'hopéaphénol sur des macrophages murins RAW 264.7 montre que le vitisinol A est plus efficace, permettant une réduction de 66% de la production de NO à une concentration de 5 μM , et une inhibition complète de cette réduction à la concentration de 10 μM . De plus, l'étude de l'activité *in vivo* du vitisinol A sur la réduction de l'œdème de l'oreille de souris révèle qu'il serait plus efficace à une dose de 50 μg que l'indométhacine, anti-inflammatoire non stéroïdien, à 500 μg (Chang et al., 2017).

3.2.4. Activité chimiopréventive et anticancéreuse

Plusieurs études attestent de l'action protectrice de certains stilbènes contre le cancer au niveau des trois phases de la carcinogénèse, à savoir l'initiation, la promotion et la progression tumorales. D'abord, l'action du resvératrol et du ptérostilbène contre l'initiation tumorale peut être expliquée par leur pouvoir antioxydant leur permettant de piéger les radicaux libres impliqués à ce stade de la carcinogénèse (Rimando et al., 2002). De plus, l'action du resvératrol et du ptérostilbène contre la promotion tumorale serait liée à leur activité anti-inflammatoire qui se traduit par l'inhibition des activités cyclo-oxygénase

et hydroperoxydase de COX-1 impliquée dans ce stade de la carcinogénèse. La dose efficace médiane (DE₅₀) du resvératrol est de 15 µM, bien inférieure à celle de certains anti-inflammatoires non-stéroïdiens largement utilisés comme l'aspirine (880 µM) (Jang et al., 1997) ; la DE₅₀ du resvératrol pour l'inhibition de COX-1 est encore plus faible selon (Rimando et al., 2002), atteignant 1 µM. Enfin, le resvératrol est également impliqué dans l'arrêt de la phase de progression du cancer et de l'angiogénèse, par l'inhibition de l'enzyme H⁺-ATPase, une pompe à proton nécessaire à la régulation du pH et à la survie des cellules tumorales entre autres (Lopez-Lluch et al., 2012). Aussi, le resvératrol ainsi que l'extrait de sarments (vinéatrol®) ont la capacité d'inhiber la prolifération cellulaire tumorale du cancer du côlon et d'arrêter sa progression (Marel et al., 2008).

Le resvératrol peut également réduire ou inhiber l'internalisation du glucose dans les cellules cancéreuses en interagissant directement avec le récepteur GLUT-1. Cette activité inhibitrice permet au resvératrol de contribuer au traitement anti-cancéreux et d'augmenter son efficacité (Zambrano et al., 2019).

Plusieurs dimères, trimères et tétramères du resvératrol ont été étudiés. Parmi eux, la peracétyl-ampélopsine A et la *cis*-vitisine A semblent avoir la cytotoxicité la plus élevée, avec une DE₅₀ de 0,8 µM contre les cellules d'adénocarcinome cervical, et une DE₅₀ de 0,93 µM contre les cellules d'adénocarcinome pulmonaire, respectivement (Ohyama et al., 1999). Le pauciflorol B et le vaticanol C présentent également une forte activité avec des DE₅₀ de 2,8 µM contre les cellules d'adénocarcinome cervical (Qiao et al., 2013) et de 3,0 µM contre les cellules leucémiques (Ohguchi et al., 2005), respectivement. L'ε-viniférine (Quiney et al., 2004), l'α-viniférine (González-Sarrías et al., 2011), l'hopéaphénol (Muhtadi et al., 2006) et la vitisine B (Ohyama et al., 1999) sont également actives avec des DE₅₀ inférieures à 10 µM contre des souches de cellules leucémiques, des lymphomes et des mélanomes. En guise de comparaison, le resvératrol présente une cytotoxicité et induit l'apoptose cellulaire à partir d'une concentration de 50 µM, sur des cellules tumorales mammaires (Basly et al., 2000).

3.3. Biodisponibilité des stilbènes, facteur limitant leur application pharmacologique

Malgré le grand nombre d'effets biologiques attribués au resvératrol et plusieurs de ses dérivés, les études de leur effet *in vivo* chez l'Homme sont extrêmement rares comparées aux études *in vitro*. Cela est dû à la faible biodisponibilité des stilbènes, qui conditionne nécessairement leur action pharmacologique. En effet, bien que présents dans l'alimentation quotidienne, principalement le vin, et à partir de différentes sources alimentaires selon les populations étudiées, les stilbènes peinent à rejoindre le compartiment sanguin, essentiellement pour deux raisons : certains stilbènes comme le resvératrol présentent des problèmes de solubilité entravant leur absorption au niveau du tube digestif ; s'ils sont absorbés, certains subissent un métabolisme intense les rendant inactifs et facilitant leur élimination (Weiskirchen and Weiskirchen, 2016). Le resvératrol présentant à la fois des problèmes de

solubilité et de métabolisme intense, il est de plus en plus mis de côté au profit de ses dérivés plus solubles, pour les nouvelles études *in vivo*. Aussi, plusieurs études sur l'encapsulation des stilbènes sont en cours pour les incorporer dans une forme galénique capable d'assurer leur absorption et de limiter leur métabolisme, pour leur permettre d'exercer leur activité pharmacologique. La réussite de ces formulations permettrait de trancher sur l'utilité de stilbènes en tant que molécules thérapeutiques efficaces chez l'Homme, et permettrait également de mieux comprendre les différents mécanismes d'action responsables de leur activité biologique.

Ainsi, dans le cadre de mes travaux sur les stilbènes, je me suis intéressé aux données disponibles dans la littérature concernant la biodisponibilité, la pharmacocinétique et plus particulièrement le métabolisme des monomères et oligomères dérivés du resvératrol, retrouvés dans l'alimentation humaine. Ces données sont issues d'études menées *in vitro* et *in vivo* chez l'animal et l'Homme. En revanche, les données sur le resvératrol n'ont pas été incluses, ce stilbène phare ayant déjà fait l'objet de plusieurs revues de la littérature, et d'études approfondies de ses différentes activités biologiques ainsi que de sa pharmacocinétique (Wenzel and Somoza, 2005) (Cottart et al., 2010) (Wang and Sang, 2018). Dans cette revue, il a été également question d'exposer les différentes sources alimentaires de stilbènes connues à ce jour, ainsi que la variation des teneurs et des fréquences d'exposition de la population aux stilbènes en fonction des zones géographiques et des habitudes alimentaires, sachant que le vin reste l'aliment le plus riche en stilbènes. L'ensemble de ces données fait enfin l'objet d'une discussion générale dans laquelle les données pharmacocinétiques des différents stilbènes étudiés sont comparées, dans le but de contribuer à identifier les stilbènes présentant une pharmacocinétique favorable à leur activité biologique, ainsi qu'à identifier les données manquantes pouvant orienter les futurs travaux de recherche portant sur les stilbènes en santé humaine. Cette revue de la littérature a fait l'objet d'un article scientifique intitulé « *A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability* » soumis en janvier 2018 dans *Phytochemistry Reviews* et accepté en mai 2018 (El Khawand et al., 2018).

A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability

Toni El Khawand,¹ Arnaud Courtois,^{1,2,*} Josep Valls,¹ Tristan Richard,¹ Stéphanie Krisa¹

¹Univ. Bordeaux, Unité de recherche Œnologie, Molécules d'Intérêt Biologique, EA 4577, USC 1366 INRA, ISVV, BxINP, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Villenave d'Ornon cedex, France

²Centre Antipoison et de Toxicovigilance d'Aquitaine Poitou-Charentes, Bâtiment UNDR, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

*Corresponding author: arnaud.courtois@u-bordeaux.fr

Abstract

Stilbenes are a class of phenolic metabolites found in various edible plants, such as grapevine, berries and peanuts. Their bioactivity and their potential benefits for human health have been the subject of several studies. Among all identified stilbenes, resveratrol has been particularly studied and results from literature showed that it presents several biological activities, including antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative effects. Likewise, some researches focused on other stilbenes and highlighted similar biological activity for those compounds. However, stilbenes present a high diversity in their phenolic structures (various chemical substituents and polymerization) which is a determining factor of their absorption and metabolism rates. Consequently, this could affect the effectiveness of stilbenes *in vivo*. In this context, an evaluation of the bioavailability and metabolism of stilbenes is necessary to move forward with pharmacological and clinical studies. Hence, this review aims to present recently obtained data and results concerning stilbenes sources and bioavailability, as a contribution to the valorization of the role of dietary stilbenes in the human diet.

Keywords: Bioavailability; metabolism; pharmacokinetics; stilbenes

Abbreviations:

AUC: Area under the curve

C_{max}: Maximal concentration

HSA: Human serum albumin

SULT: Sulfotransferases

UGT UDP: Glucuronosyl transferase

V_d: Volume of distribution

Introduction

Stilbenes are phenolic compounds found in various families of plants (Rivière et al. 2012). Some of these secondary metabolites have been recognized as phytoalexins and associated with the defense mechanisms of plants as they are produced after infection by pathogens or exposure to UV radiation and present antifungal activities. The stilbene structure is based on the C6–C2–C6 backbone, defined by two aromatic rings linked by an ethylene bridge. The most known and best characterized stilbene is resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene). More than 400 stilbene derivatives have been identified. Their structures range from monomers to octamers and carry various substituents at different positions, like glycosyl, hydroxyl, methyl or isopropyl groups. The presence of stilbenes in the human diet is however limited to a few foods such as grapes, red wine, peanuts and some types of berries (Neveu et al. 2010).

Among the stilbene compounds, resveratrol has been extensively studied during the past 20 years due to its wide range of biological activities, such as modulation of cell proliferation, of angiogenesis, of redox status, of mitochondrial activity, stimulation of adipocytes lipolysis and suppression of inflammation (Vang et al. 2011). More recently, biological studies have been performed on other stilbenes, especially on monomer and dimer compounds. Some stilbenes with structure-induced antioxidant properties are also able to induce antioxidant enzymes (Reinisalo et al. 2015). They also inhibit transcription factors involved in inflammation, such as nuclear factor kappa B (NF- κ B), activator protein 1 (AP-1), and mitogen activated protein kinases (MAPKs), thus modulating the production of many markers of inflammation (reactive nitrogen and oxygen species, cytokines) (Dvorakova and Landa 2017). These properties, among others, are suggested to provide protection against many chronic diseases including cancer, cardiovascular and neurodegenerative pathologies (Sirerol et al. 2016).

The majority of phenolic compounds are metabolized in the organism after oral administration, through phase I reactions (oxidation, reduction, and hydrolysis) and/or phase II reactions (conjugation reactions including glucuronidation, sulfonation, methylation) in different organs, mainly liver and intestine (Del Rio et al. 2013). Metabolism is considered as one of the main causes of the poor bioavailability of these compounds, including stilbenes. Indeed, in the case of resveratrol, many pharmacokinetic studies indicate a low bioavailability associated with an extensive metabolism. Resveratrol is mainly metabolized to glucuronide and/or sulfate conjugates, but also to dihydroresveratrol (conjugated or not) resulting from the reduction of the aliphatic double-bond and likely produced by the intestinal microflora (Fig. 1).

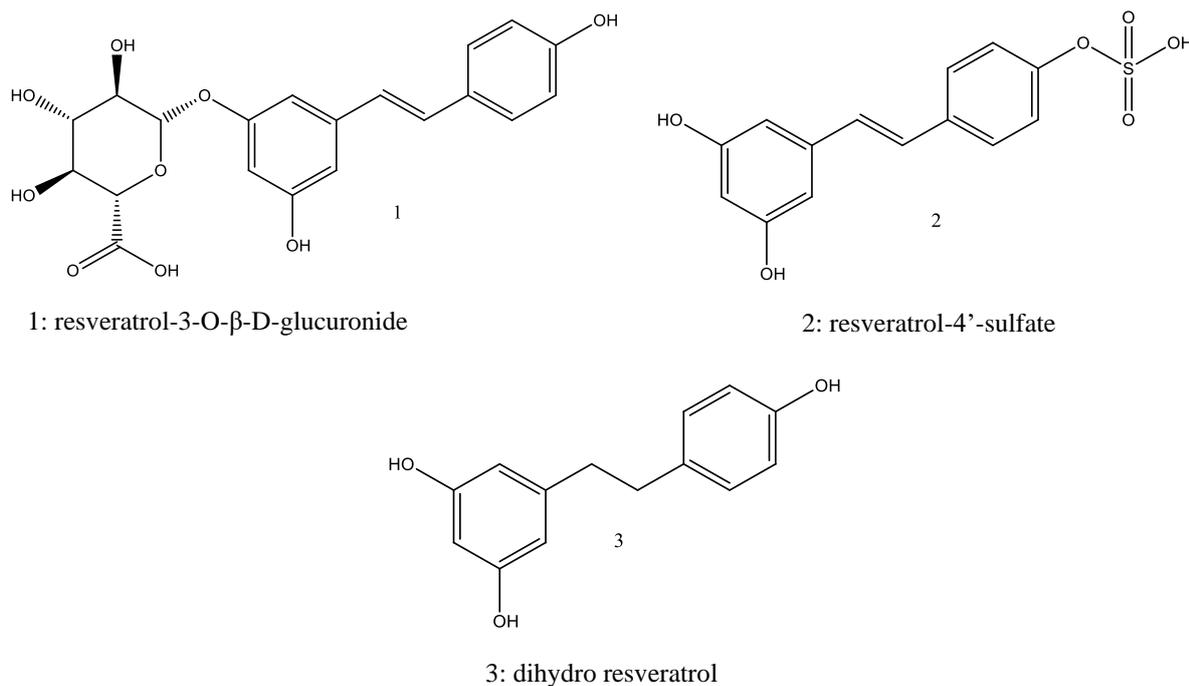


Figure 1. Chemical structures of main resveratrol metabolites: glucuronide/sulfate conjugates and dihydroresveratrol

Today, more than 20 metabolites of resveratrol are identified in significant quantities. One could assume that the very low bioavailability of the parent compound can limit its potential benefits for health. Nevertheless, several studies reported that the metabolites of resveratrol have their own biological activities, which could explain, at least in part, the beneficial health effects of resveratrol (Hoshino et al. 2010; Polycarpou et al. 2013; Walker et al. 2014; Falomir et al. 2016; Eseberri et al. 2017). Therefore, as stilbene derivatives are also subject to an intense metabolism, the identification of their metabolites and the description of their biological activities represent an important issue.

Nowadays, stilbene derivatives being identified in an increasing number of food sources, it seems important to have a better understanding of their pharmacokinetics. Hence, we will focus in this review on sources, bioavailability and metabolism of stilbenes, while taking into account their chemical structures.

Sources and daily intake of stilbenes

Due to the complexity of the qualitative and quantitative analysis of different stilbenes occurrence in their natural sources, the information about the total intake of stilbenes is scarce. It is difficult to estimate the normal human consumption of stilbenes for different reasons. In fact, the amount of stilbenes daily intake is highly different around the world according to the type of diet. Besides, some plants could be either consumed as food or as medicinal plants. Although they are synthesized in plants through the shikimate and phenylalanine ammonia lyase pathways (Jeandet et al. 2010; Dubrovina and Kiselev 2017), they are usually produced in lower quantities in

comparison with polyphenols generally produced, at least in part, by the same pathways. This makes difficult the analysis of stilbenes, unlike other more abundant polyphenol families like anthocyanins, flavanols or flavonols. Besides, the analysis of stilbenes in food sources is normally limited to the simplest forms (resveratrol and piceid, its glucoside substituted form) due to the lack of standards or to the detection limits. While these monomers are the main stilbenes looked for in food, recent advances suggest that oligomeric forms such as viniferins could highly contribute to the total amount of stilbenes consumed (Rivière et al. 2012). It must also be taken into account the extremely high variability of the plant content in stilbenes, which is determined by genetic factors (cultivars), by environmental factors (soil, temperature, water regime of the plant...) and even by manufacture practices (like vinification in the case of wines) (Lingua et al. 2016; Rivière et al. 2012; Shen et al. 2009). On the other hand, unlike grapes and peanuts, many plant sources are rich in stilbenes, but are rarely consumed as food, or are localized in specific areas. For example, *Polygonum cuspidate* is used for the extraction of resveratrol or piceid to be used as nutraceutical or food complement in Europe, while it is consumed as a food or for medicinal usage in Asia. In Europe, the main source of stilbenes is considered to be red wine (Neveu et al.2010), but the intake of red wine differs greatly in the population. In consequence, there is a lack of data regarding the final intake of stilbenes, and researchers still need to put additional efforts to correctly quantify the content of stilbenes in food.

Among the data of stilbenes intake that can be found in the literature (Rabassa et al.2015) estimated a total dietary resveratrol intake in a cohort study of 529 participants in Italy to 0.5 mg/person/day, distributed in tertiles with means of 0.0 mg/person/day; 0.5 mg/ person/day and 2.1 mg/person/day. Li et al. (2013) found a mean of 0.3 mg/day in Chinese adults. Zamora-Ros et al. (2008) estimated the value of an average intake of stilbenes (as sum of resveratrol and piceid) to 0.933 µg/person/day from the dietary data of 41,440 subjects in Spain. Some other authors stated that the dose may be up to 4 mg/person/day (Vang et al. 2011). Furthermore, the estimated intake values differ depending on sex (with a greater amount of dietary stilbenes for men), age (the intake tends to increase in the older categories), and level of education or lifestyle (Zamora-Ros et al. 2008).

One of the highest amounts of stilbenes is found in grape and wine derivatives, and this amount can be extremely variable (Sebastià et al. 2012). The biosynthesis of stilbenes can be genetically determined by the type and variety of grapes, but it can also be deeply altered by agricultural and environmental factors (soil, temperature, pathogen attack...). For example, since stilbenes are considered to act as phytoalexins, they are highly inducible or sometimes repressed. Moreover, in the case of processed products like juices or wines, the concentrations of stilbenes may be modulated by postharvest processing practices or the winemaking process. In grapes, resveratrol accumulates in the skins; and the contents can vary between 0.16 µg/g FW (Fresh Weight; in Crimson variety) and 245 µg/g FW (in Bobal variety) (Rimando et al. 2004; Creasy and Coffee 1988). Concerning wines, ZamoraRos et al. (2008) estimated a content of 1.14 mg/g of resveratrol and 3.0 mg/g of piceid. This dominance of the glucosylated form (piceid) over the aglycon (resveratrol) can be found in several varieties. Lee and Rennaker (2007) found that the contents of piceid (0.4–5.9 mg/L) are higher than those of resveratrol (0–1.45 mg/L) in wines of Merlot, Cabernet Sauvignon, Chardonnay and Riesling. Because of the different contact times in white and red macerations, the stilbenes content is higher in red wines. Pawlus et al. (2012) reviewed the stilbene chemistry in the *Vitis* genus and in wine, where, together with the simple monomers such as resveratrol, piceid, piceatannol, astringin and pterostilbene, other more complex forms can be found. Some of these forms have also been quantified in wines including the dimers pallidol (2.5 mg/L), ε-viniferin (0.2–4.3 mg/ L) and δ-viniferin (3.8–22.4 mg/L) (Vitrac et al. 2002, 2005). Concerning tetrameric structures, Guebailia et al. (2006) identified the presence of

hopeaphenol in the range of 0.6–3.8 mg/L in Algerian wines, while isohopeaphenol was found in a range between 0 and 2.9 mg/L in Tunisian red wines (Arraki et al. 2017). By applying an UHPLC-ESI q-TOF mass screening of extracted red wines, Moss et al. (2013) inferred the presence of a total of 41 (known and novel) stilbenes. In addition to the well-known monomers, several resveratrol–resveratrol and piceatannol–piceatannol homodimers together with resveratrol–piceatannol heterodimers were detected, as well as modified (O-glycosylated, methoxylated and oxidized) dimers and multiple trimers and tetramers. These studies underlined the chemical complexity of stilbenes in grapes and wines, the main sources of stilbenes intake.

Besides high concentrations in grape berries, stilbenes can also be found in minor contents in *Vaccinium* berries such as *V. myrtillus* (bilberries: 0.02–0.77 µg/g dry weight), *V. ellioti* (blueberries: 0.45 µg/g dry weight); *V. macrocarpon* (cranberries), *V. vitis-idaea* (lingonberries), *Morus* spp. (mulberries) and *Fragaria x ananassa* (strawberries) (Sebastià et al. 2012). Concerning the compounds present in these berries, the monomers resveratrol, pterostilbene and piceatannol have been described so far (Rimando et al. 2004).

Apart from berries, recent studies have detected the presence of resveratrol, piceatannol and piceid in others plants and fruits such as rhubarb, banana, guava, leech, pineapple, apple, peach, passion fruit and pears (Zheng et al. 2013; Arslan and Yilmaz 2013; Peng et al. 2015; Matsui et al. 2010), but at low concentrations. In fact, these studies showed that piceid was the major form existing in vegetable foods, higher than resveratrol. Resveratrol could also be found in the byproducts of guava and Surinam cherry (Da Silva et al. 2014).

In almonds, piceid has been detected in the skin (0.15–0.22 µg/100 g), meat (0.06–0.08 µg/100 g) and the blanch water (6.33–8.43 µg/100 g). The blanch water of almonds also contained piceatannol and oxyresveratrol (0.91–2.55 µg/100 g) (Chang et al. 2016).

Stilbenes have also been found in quantifiable amounts in beers. Resveratrol was found in the range of 1.3–77 µg/L, and piceid was found in the range of 1.8–27.3 µg/L. However, in many cases, the levels were below the limits of quantification and detection. The mean of total resveratrol in all the analysed beers was 14.7 µg/L (Chiva-Blanch et al. 2011).

Gnetol has been extensively isolated in the genus *Gnetum*, which is represented by tropical evergreen shrubs and trees that are used as traditional medicine or incorporated into food products throughout Asia (Remsberg et al. 2015). Fruits and seeds of *Gnetum gnemon* (melinjo used as ordinary food in Indonesia) also contain resveratrol dimers, such as gnetin C and its glucosides, gnemonosides A, C and D (Tani et al. 2014).

To summarize, the most important source of stilbenes in western diet is wine, which would represent a 98.4% of the intake, followed by grape berries and grape juice (1.6%), whereas peanuts and other berries would contribute less than 0.01% (Zamora-Ros et al. 2008). The reader is also invited to consult the Phenol-Explorer database, which give an extensive overview of polyphenol content, and among them stilbenes, in foodstuff (Neveu et al. 2010). In food, five monomers (piceid, astringin, pterostilbene, piceatannol and oxyresveratrol), three dimers (pallidol, ε-viniferin and δ-viniferin) and two tetramers (hopeaphenol and isohopeaphenol) have been identified along with resveratrol.

Pharmacokinetic of monomers structurally related to resveratrol

This part of the discussion is not limited to dietary stilbenes and includes the majority of the stilbene monomers that were subjected to pharmacokinetic studies reported in the literature. The structure of each molecule is given in Fig. 2. Pharmacokinetics and bioavailability values are compiled in Table 1 while the metabolites are presented in Table 2. CAS number, PubChem CID and InChI Key for these monomers can be found as supplementary information.

The discussed monomers structurally related to resveratrol will be divided in 5 different groups of structures:

- Hydroxylated compounds (piceatannol, gnetol and oxyresveratrol).
- Dehydroxylated compounds (pinosylvin).
- Methylated compounds (pinostilbene, pterostilbene, rhapontigenin and isorhapontigenin).
- Isoprenylated compounds (arachidin-1 and arachidin-3).
- Glycosylated derivatives of resveratrol (piceid).

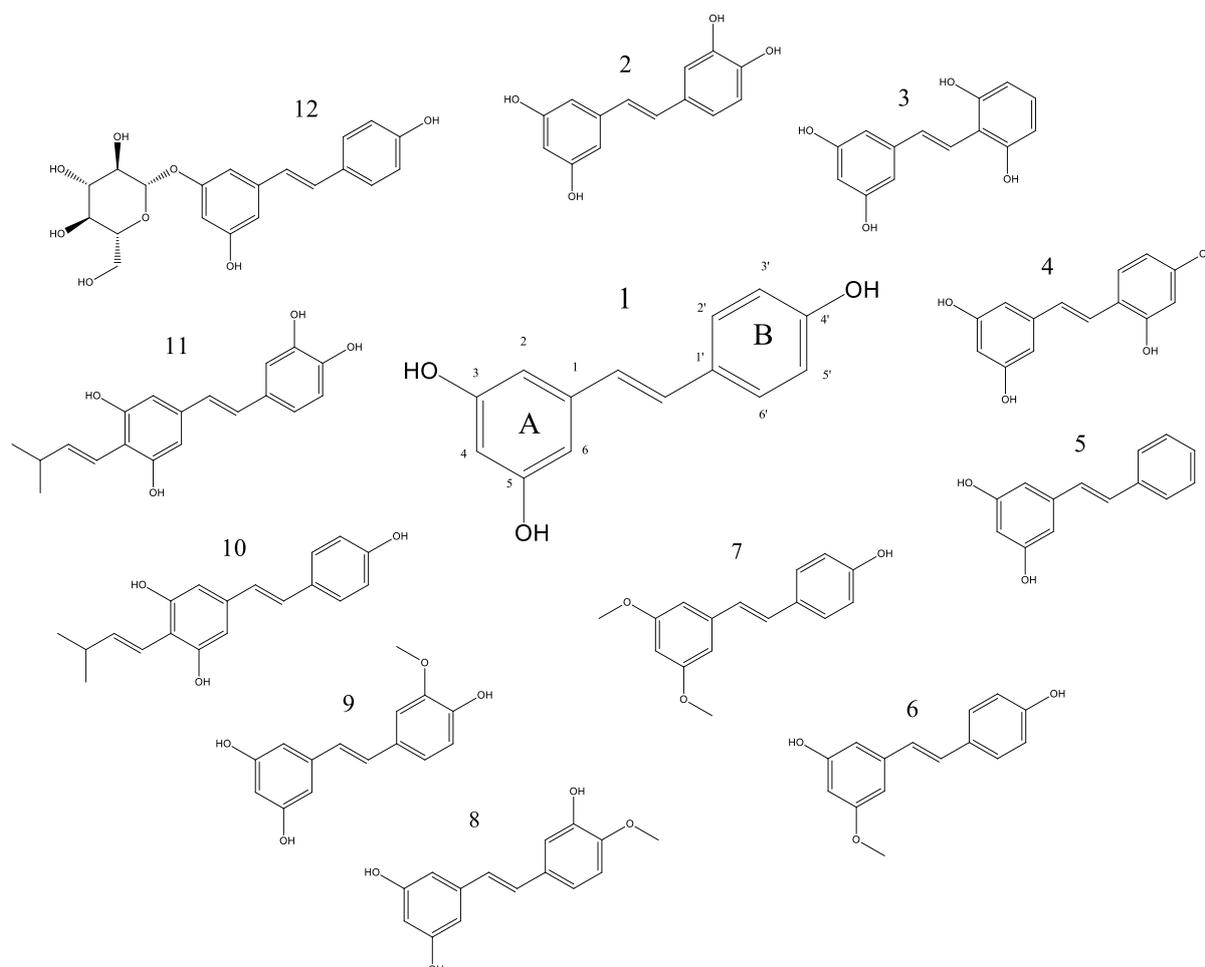


Figure 2. Chemical structures of resveratrol and stilbene monomers discussed in the review.

1: resveratrol (MW: 228.24); 2: piceatannol (MW: 244.24); 3: gnetol (MW: 244.24); 4: oxyresveratrol (MW: 244.24); 5: pinosylvin (MW: 212.24); 6: pinostilbene (MW: 242.27); 7: pterostilbene (MW: 256.30); 8: rhapontigenin (MW: 258.27); 9: isorhapontigenin (MW: 258.27); 10: arachidin 3 (MW: 296.36); 11: arachidin 1 (MW: 312.36); 12: piceid (MW: 390.38)

Piceatannol, gnetol, and oxyresveratrol

These three monomers were grouped because their structure differs only by the position of the two hydroxyl groups present on the cycle B of the monomer (Fig. 2).

Piceatannol

Piceatannol, along with pterostilbene and piceid, is one of the most studied resveratrol monomer derivatives. Several studies were performed *in vitro* and *in vivo* in the past few years in order to describe its pharmacokinetic profile, as shown below.

Piceatannol absorption was studied *in vivo* in rats by Setoguchi et al. (2014) and compared to the one of resveratrol. This work pointed out that piceatannol absorption evolved in a dose-dependent manner, increasing with the oral dosage ranging from 90 to 360 $\mu\text{mol/kg}$. The maximum serum concentration (C_{max}) of piceatannol appeared 15 min after its administration and was 2.6 times higher than that of resveratrol (4.2 vs 1.6 $\mu\text{mol/L}$ respectively) (Setoguchi et al. 2014). Besides, after administration of piceatannol and resveratrol (90 $\mu\text{mol/kg}$), plasma area under the curve (AUC) for intact piceatannol (4.3 $\mu\text{mol h/L}$) was higher than $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ for intact resveratrol (2.0 $\mu\text{mol h/L}$). However, when considering the $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$ for total resveratrol (i.e. resveratrol and its respective metabolites), it was higher than for total piceatannol (39.6 vs 23.5 $\mu\text{mol h/L}$ respectively). Those results suggested that piceatannol may have a higher absorption rate and a better metabolic stability than resveratrol (Setoguchi et al. 2014).

Concerning piceatannol distribution, its apparent volume of distribution (V_d) was determined to be 10.76 L/kg and was greater than total rat body water, indicating a high distribution in the organism (Roupe et al. 2006).

Piceatannol metabolism was studied by Roupe et al. (2004) *in vitro*, using rat liver microsomes. The presence of glucuronide metabolites was confirmed after β -glucuronidase enzymatic hydrolysis. Glucuronidation was also investigated using human liver microsomes, and 3 mono-glucuronidated piceatannol metabolites were detected (Henry-Vitrac et al. 2008). It was shown that these three glucuronides could be produced by UDP glucuronosyl transferase 1A1 (UGT1A1) and UGT1A8 enzymes, while UGT1A10 produced only two of them (Miksits et al. 2010). Other UGT isoforms like UGT1A9 and UGT1A3 are also involved in piceatannol metabolism but to a lesser extent. Piceatannol *in vitro* metabolism could also lead to three sulfate derivatives in humans, one disulfate and two monosulfates. While disulfate metabolite formation is higher than the monosulfates at a low concentration of piceatannol (1–20 μM), monosulfate metabolites clearly increased at greater substrate concentrations, revealing a disulfate substrate inhibitory effect on sulfotransferase. The study of sulfotransferases (SULT) activity depending on substrate concentration proved this observation. Two sulfotransferases, SULT1E and SULT1A2*1, are responsible of piceatannol monosulfation, whereas disulfate metabolite is produced by SULT1A1*1 and SULT1B1 using the monosulfate metabolites as substrates. Hence, disulfate metabolite prevailed at 10 μM piceatannol, whereas at 60 μM piceatannol, its formation was strongly inhibited, with inhibition constants (K_i) values of 1.3 μM and 3.3 μM for SULT1A1*1 and SULT1B1 respectively (Miksits et al. 2009).

The formation of such sulfo-conjugates is hence suggested to serve as an inactive pool of stilbenes that provides the parent compound after cleavage, allowing a sustained exposure to the active stilbene in the organism (Patel et al. 2013). In addition, such conjugation might also prevent the enzymatic oxidation of the stilbene,

extending its half-life time. This feature is already proved for other types of compounds like the biologically inactive estrogen sulfate, which is hydrolysed by cellular sulfatases into the bioactive estradiol (Pasqualini and Chetrite 2005).

Piceatannol metabolism was also studied *in vivo* in Sprague–Dawley rats by Roupe et al. (2006) leading to the detection of one mono-glucuronidated metabolite (Table 2). Setoguchi et al. (2014) investigated the metabolism of piceatannol *in vivo* in rats after intragastric administration. They detected by LC–MS a mono-glucuronidated metabolite, along with new recorded metabolites of piceatannol: two others glucuronidated metabolites (mono and diglucuronide), three O-methyl glucuronidated metabolites, one O-methyl sulfated metabolite and isorhapontigenin. In this study where piceatannol and resveratrol metabolism are compared, no production of resveratrol methylated metabolites was observed. Hence, since piceatannol structure presents a catechol ring, unlike resveratrol, Setoguchi et al. (2014) suggested that catechol-O-methyltransferase was implicated in this methylation. Noteworthy, the glucuronide methylated metabolites disappeared after hydrolysis, while rhapontigenin was detected, along with an increase of isorhapontigenin, which led the authors to suggest that these metabolites were conjugates of rhapontigenin and isorhapontigenin. Many of the piceatannol metabolites are bioactive well-characterized stilbenes, and thus may contribute to the pharmacological activity of piceatannol.

Gnetol

Gnetol pharmacokinetic profile was investigated *in vivo* in Sprague–Dawley rats after intravenous and oral administrations. Bioavailability was estimated to 6.59% (Remsberg et al. 2015). This low bioavailability, shared with other stilbenes, is suggested to be the consequence of poor intestinal absorption and high metabolism, mainly via glucuronidation. The study pointed out a glucuronidation process occurring rapidly after intravenous and oral administrations. However, the glucuronidated metabolites structure was not elucidated.

Both unchanged gnetol and glucuronidated metabolites were present in urine, the metabolites being the major form, while unchanged gnetol was found in a very low amount. However, after intravenous administration, hepatic clearance was found to be much higher than renal clearance (2.21 and 0.12 L/h/kg respectively), suggesting that gnetol was more likely to be excreted in bile, and thereafter eliminated in feces (Remsberg et al. 2015).

Oxyresveratrol

The first pharmacokinetic parameters of oxyresveratrol were indirectly obtained from oral administration of mulberroside A, which is a diglycoside form of oxyresveratrol. It was found that 50% of the initial administered dose of mulberroside A, was recovered in plasma, bile or urine under free or conjugated forms. The oral bioavailability of mulberroside A was estimated to be extremely low (only 1%) (Qiu et al. 1996). It was suggested that mulberroside A could undergo a rapid conversion to oxyresveratrol in gut by bacteria, since it was stable in the stomach, and is therefore relatively well absorbed in the intestine (Zhaxi et al. 2010).

In a recent study, Sangsen et al. (2015) chose to administer a dosage of 180 mg/kg of oxyresveratrol to male rats. They measured an AUC_{0-10h} of 1897 ng.h/mL, a C_{max} of 662 ng/mL at a T_{max} of 10 min. These values are similar to those found by Chen et al. (2016b). Indeed, in the study of Chen et al. (2016b), oxyresveratrol was given to rats by oral (100, 200 and 400 μ mol/kg) and intravenous routes (15, 30 and 90 μ mol/kg), and authors noticed a rapid absorption (T_{max} of 15 min) of oxyresveratrol (Chen et al. 2016b). In this case, the AUC_{0-inf}

increased with the doses, and bioavailability was significantly higher when dose was increased from 100 $\mu\text{mol/kg}$ (9.13%) to 400 $\mu\text{mol/kg}$ (15.2%). Oxyresveratrol displayed a moderate volume of distribution ($V_d = 0.906 \text{ L/kg}$) and a rapid clearance ($CL = 0.067 \text{ L/min/kg}$) from blood, since oxyresveratrol was no more quantifiable 3 h after the intravenous administration (90 $\mu\text{mol/kg}$). Interestingly, the pharmacokinetic parameters of resveratrol were also determined in this study, and it was found that resveratrol was more bioavailable (16.5 and 22.3% for 200 and 400 $\mu\text{mol/kg}$, respectively), more distributed into peripheral tissue ($V_d = 1.62 \text{ L/kg}$) and more rapidly cleared from blood (0.107 L/min/kg) (Chen et al. 2016b), in comparison with oxyresveratrol. In line with the rapid disappearance of oxyresveratrol from blood, it was observed that oxyresveratrol underwent an extensive hepatic metabolism resulting in the formation of glucuronides, methylated glucuronides and sulfated derivatives which are excreted in bile and urine (Huang et al. 2010).

Pinosylvin

Pinosylvin pharmacokinetic was studied *in vivo* in Sprague–Dawley rats, after a single intravenous administration of 10 mg/kg (Roupe et al. 2006). In this study, pinosylvin presented a V_d of 2.29 L/kg suggesting that pinosylvin was moderately distributed in tissues, and a rapid elimination rate with a plasmatic half-life time of 0.82 h. The total clearance reached 1.84 L/h/kg , while hepatic clearance reached 1.67 L/h/kg , suggesting that hepatic metabolism represents the main clearance, probably through the formation of glucuronidated metabolites, and resveratrol (Roupe et al. 2005a). In addition, the small amount of pinosylvin and its glucuronidated metabolite found in urine (only 9.46% of the total pinosylvin dose), suggested the involvement of non-renal excretion pathway such as feces that could represent the main excretion route of pinosylvin (Roupe et al. 2006). Concerning pinosylvin bioavailability, Yeo et al. (2013b) calculated it following an oral administration of 50 mg/kg in rats. They reported a very low bioavailability, inferior to 1%.

Compound	Reference	Dose	AUC _{0-inf}		Cmax		Tmax	T1/2	Bioavailability (%)
			<i>μg.min/mL</i>	<i>μg/mL</i>					
Piceatannol	Setoguchi et al. 2014	90 <i>μmol/kg</i> <i>22 mg/kg</i>	4.3* <i>μmol.h/L</i>	<i>63.0</i>	3.3 <i>μmol/L</i>	<i>0.81</i>	15 min	/	/
	Setoguchi et al. 2014	180 <i>μmol/kg</i> <i>44 mg/kg</i>	12.3* <i>μmol.h/L</i>	<i>180.2</i>	7.5 <i>μmol/L</i>	<i>1.83</i>	15 min	/	/
	Setoguchi et al. 2014	360 <i>μmol/kg</i> <i>87.9 mg/kg</i>	20.6* <i>μmol.h/L</i>	<i>301.9</i>	8.1 <i>μmol/L</i>	<i>1.98</i>	15 min	/	/
Gnetol	Remsberg et al. 2015	100 mg/kg	3.62 <i>μg.h/mL</i>	<i>217.2</i>	/	/	15 min	4.20 h	6.59
Oxyresveratrol	Sangsen et al. 2015	180 mg/kg	1897** <i>ng.h/mL</i>	<i>113.82</i>	662 <i>ng/mL</i>	<i>0.66</i>	10 min	/	/
	Chen et al. 2016b	100 <i>μmol/kg</i> <i>24.4 mg/kg</i>	145 <i>μM.min</i>	<i>35.4</i>	1.06 <i>μmol/L</i>	<i>0.26</i>	15 to 240 min	/	9.13
	Chen et al. 2016b	200 <i>μmol/kg</i> <i>48.8 mg/kg</i>	331 <i>μM.min</i>	<i>80.8</i>	3.07 <i>μmol/L</i>	<i>0.75</i>	15 to 60 min	/	10.4
	Chen et al. 2016b	400 <i>μmol/kg</i> <i>97.7 mg/kg</i>	965 <i>μM.min</i>	<i>235.7</i>	8.58 <i>μmol/L</i>	<i>2.10</i>	15 to 90 min	/	15.2
Pinosylvin	Yeo et al. 2013	50 mg/kg	/	/	27.9 <i>ng/mL</i>	<i>0.03</i>	/	/	<1
Pinostilbene	Chen et al. 2016a	50 mg/kg	7900 <i>ng.min/mL</i>	<i>7.9</i>	89.1 <i>ng/mL</i>	<i>0.09</i>	15 to 240 min	/	1.87
Pterostilbene	Lin et al. 2009 [◇]	10 mg/kg	34 <i>ng.min/mL</i>	<i>0.034</i>	141 <i>ng/mL</i>	<i>0.14</i>	60 or 120 min	/	12.5
	Kapetanovic et al. 2011	56 mg/kg	13700 <i>ng.h/mL</i>	<i>822.0</i>	2820 <i>ng/mL</i>	<i>2.82</i>	2 h	1.5 h	66.9
	Kapetanovic et al. 2011	56 mg/kg 14 days	15000 <i>ng.h/mL</i>	<i>900.0</i>	2550 <i>ng/mL</i>	<i>2.55</i>	2 h	1.6 h	73.2
	Kapetanovic et al. 2011	168 mg/kg	57700 <i>ng.h/mL</i>	<i>3462.0</i>	7880 <i>ng/mL</i>	<i>7.88</i>	4 h	1.9 h	94.2
	Kapetanovic et al. 2011	168 mg/kg 14 days	49600 <i>ng.h/mL</i>	<i>2976.0</i>	5580 <i>ng/mL</i>	<i>5.58</i>	8 h	1.9 h	80.8
	Yeo et al. 2013	15 mg/kg Fasting rats Suspension	/	/	73 <i>ng/mL</i>	<i>0.07</i>	30 to 300 min	/	<5.5
	Yeo et al. 2013	15 mg/kg Suspension	34.0 <i>μg.min/mL</i>	<i>34.0</i>	235.1 <i>ng/mL</i>	<i>0.24</i>	45 to 120 min	/	15.9
	Yeo et al. 2013	15 mg/kg Solution	126.4 <i>μg.min/mL</i>	<i>126.4</i>	415.4 <i>ng/mL</i>	<i>0.42</i>	90 to 300 min	/	59.2
	Yeo et al. 2013	30 mg/kg Solution	451.8 <i>μg.min/mL</i>	<i>451.8</i>	1038.1 <i>ng/mL</i>	<i>1.04</i>	120 to 240 min	/	105.8
	Yeo et al. 2013	60 mg/kg Solution	989.9 <i>μg.min/mL</i>	<i>989.9</i>	1647.3 <i>ng/mL</i>	<i>1.65</i>	120 to 720 min	/	115.9
Azzolini et al. 2014	88 <i>μmol/kg</i> <i>22.5 mg/kg</i>	13.7** <i>nmol.h/mL</i>	<i>210.7</i>	1.5 <i>nmol/mL</i>	<i>0.38</i>	2 h	/	35	
Piceid	Lv et al. 2006	50 mg/kg	52.26 <i>μg.min/mL</i>	<i>52.3</i>	0.364 <i>μg/mL</i>	<i>0.36</i>	20.83 min	100.6 min	/
	Zhou et al. 2009 [◇]	50 mg/kg	55 <i>mg.min/L</i>	<i>55.0</i>	1033 <i>ng/mL</i>	<i>1.03</i>	20 min	120.2 min	/
	Zhou et al. 2009 [◇]	100 mg/kg	87 <i>mg.min/L</i>	<i>87.0</i>	1280 <i>ng/mL</i>	<i>1.28</i>	20 min	185.0 min	/
	Zhou et al. 2009 [◇]	300 mg/kg	230 <i>mg.min/L</i>	<i>230.0</i>	2800 <i>ng/mL</i>	<i>2.80</i>	30 min	285.3 min	/

Table 1. Chemical structures of resveratrol monomer derivatives after oral administration in rats

All the studies were conducted on male rats except for 2 where the gender was not specified ([◇]); AUC_{0-8h} intact piceatannol (*); AUC_{0-12h} (**). Dose, AUC_{0-inf} and Cmax values, presented in *italic*, were modified in mg/kg, *μg.min/mL* and *μg/mL*, respectively.

Pinostilbene, pterostilbene, rhapontigenin, isorhapontigenin

The following section will describe the pharmacokinetics of methylated derivatives of resveratrol. Rhapontigenin and isorhapontigenin have one methylated group on the B cycle whereas pinostilbene and pterostilbene have one or two methylated groups on the A cycle.

Pinostilbene

The pharmacokinetic of pinostilbene was studied in rats after intravenous (5–10 mg/kg) and oral (50 mg/kg) administrations. The bioavailability was very low (1.87%), the C_{max} was estimated to be 89.1 ng/mL and was reached from 15 to 240 min. Pinostilbene exhibited a low V_d (0.808 L/kg) and a high clearance from blood (0.107 L/min/kg) after 10 mg/kg intravenous administration. These values highlighted a very rapid elimination of pinostilbene, which could be due to metabolic instability. Unfortunately, the metabolites of pinostilbene were not described (Chen et al. 2016a).

Pterostilbene

Pterostilbene pharmacokinetic profile was studied *in vivo* in rats following intravenous administration of 20 mg/kg. The authors measured an apparent V_d of 2.41 L/kg, a half-life time of 1.73 h and a total CL of 0.960 L/h/kg (Remsberg et al. 2008). Likewise, Lin et al. (2009) found similar results, a V_d of 1.2 L/kg, a half-life time of 1.61 h, and a total clearance of 2.2 L/h/kg after 10 mg/kg intravenous administration. Kapetanovic et al. (2011) proceeded to an intravenous administration of 11.2 mg/kg and measured a higher V_d of 5.3 L/kg, a half-life time of 2.9 h, and a Cl of 2.7 L/h/kg. All these data showed that pterostilbene is poorly distributed in tissue and rapidly cleared from blood. Furthermore, oral bioavailability shows to be variable with reported values of 12.5% (Lin et al. 2009), 35% (Azzolini et al. 2014) and 66.9% (Kapetanovic et al. 2011) and seemed to depend on the administered dose (10, 22.5 and 56 mg/kg respectively). This dose-dependent manner was confirmed by Yeo et al. (2013a). In this report, Yeo et al. (2013a) chose to compare resveratrol and pterostilbene pharmacokinetics in rats at equimolar dose. They pointed out a much higher oral bioavailability and systemic exposure for pterostilbene in comparison to resveratrol (oral bioavailability of 29.8 and 66.9% for resveratrol and pterostilbene, respectively; AUC_{0–inf} of 1350 and 13,700 ng.h/mL for resveratrol and pterostilbene, respectively). However, the half-life time was much higher for resveratrol than for pterostilbene (11.8 and 1.5 h, respectively). Moreover, as a result of the study, it appeared that a prolonged exposure to pterostilbene (14 days) did not modify the bioavailability of pterostilbene in rats, when compared to a single administration.

Pterostilbene metabolism involved glucuronidation and sulfation, and among those pathways, sulfation was shown to be predominant (Kapetanovic et al. 2011). The pterostilbene metabolism was confirmed by Shao et al. (2010), who also identified other metabolites in urine in mice (Table 2). Indeed, nine metabolites were identified, glucuronidated or sulfated conjugates, as reported above, but also mono-hydroxylated and demethylated pterostilbene derivatives (Shao et al. 2010). In addition, it was recently shown that pterostilbene metabolism could lead to the formation of pinostilbene as a major metabolite in the colon of mice (Sun et al. 2016).

Pterostilbene elimination seemed to occur mainly through biliary pathway since only 0.219% of the dose is excreted in rat urine (Remsberg et al. 2008). As mentioned above, elimination is a rapid process; indeed, most of the studies reported a half-life time ranging between 1 and 3 h and a total clearance between 1 or 3 L/h/kg.

Rhapontigenin

Rhapontigenin pharmacokinetics were studied *in vivo* in rats after an intravenous administration of 10 mg/kg. Rhapontigenin presented a large Vd of 11.05 L/kg, which suggests that it was widely distributed in tissues. The total clearance was estimated to 1.18 L/h/kg, and hepatic clearance was shown to be predominant, with a value of 1.16 L/h/kg. Moreover, rhapontigenin plasmatic elimination rate was high with a half-life time of 3 h and the total rhapontigenin excreted in urine represented only 1.25% of total rhapontigenin excreted. It was then suggested that non-renal excretion, mainly biliary excretion, could be the major elimination pathway (Roupe et al. 2006). It was also shown that rhapontigenin presented an extensive metabolism, mainly involving glucuronidation. Moreover, the glucuronide metabolites production was confirmed by *in vitro* experiments using rat liver microsomes. The rhapontigenin glucuronides were detected in urine only, and in a very reduced amount, again suggesting that urinary route is not the main elimination pathway (Roupe et al. 2005b).

Isorhapontigenin

Some data is available for isorhapontigenin pharmacokinetics in humans (Tani et al. 2014). Healthy volunteers received a single oral dose of 1 g Melinjo Seed Extract powder containing 2 mg/g (7.75 $\mu\text{mol/g}$) of isorhapontigenin. The C_{max} of isorhapontigenin (262 nM) was reached after 6.7 h. Monoglucuronide and monosulfate metabolites were detected and their presence confirmed by enzymatic hydrolysis.

Arachidin-1, arachidin-3

As far as we know, no data is available for arachidin-1 and -3 absorption, distribution or elimination, but few is available regarding their metabolism. Arachidin-1 and -3 glucuronidation was studied *in vitro* using recombinant UGTs and human liver and intestine microsomes. Results showed that arachidin-1 metabolism led to 2 mono-glucuronidated metabolites. The major one is suggested to be glucuronidated at 40 position and was obtained mainly through the activity of recombinant UGT1A7, UGT1A9, UGT1A10 and human liver microsomes, while the minor one is suggested to be glucuronidated in position 3 and was produced mainly by the recombinant UGT1A7 and human intestine microsomes, and to a lesser extent by human liver microsomes. Concerning arachidin-3, only one mono-glucuronidated metabolite was observed and the glucuronidation was suggested to occur in the 40 position (Brents et al. 2012). Among all tested UGTs, UGT1A7 and UGT1A10, both extrahepatic UGTs, proved to be the main contributors to the metabolism of arachidin-3.

Prenyl groups occurring in arachidin-1 and -3 increased their lipophilicity in comparison to resveratrol and may have an impact on their absorption rate and metabolism. Indeed, the glucuronidation of arachidin-1 and -3 was compared to the ones of resveratrol and piceatannol, and, while arachidin-1 and -3 had a similar metabolism rate (similar Michaelis constant or K_m), their metabolism was significantly slower than those of resveratrol and piceatannol (Brents et al. 2012). This relative metabolic stability is an important factor in increasing arachidin-1 and -3 bioavailability and thus is necessary in order to ensure a biological activity.

Piceid

Piceid pharmacokinetic was studied *in vivo* in rats after oral dosage of 50, 100 and 300 mg/kg (Zhou et al. 2009; Lv et al. 2006). A rapid absorption was noticed, since 10 min after administration piceid was found in all tissues, and the highest concentrations were measured in spleen > lung > brain > testis > liver > kidney > heart.

Then, even if oral bioavailability was not determined, one could consider that piceid is effectively absorbed through intestinal tract, a fact that was highlighted by some *in vitro* results. Indeed, an *in vitro* study of piceid and resveratrol cell uptakes was held by Henry et al. (2005) on Caco-2 cells monolayers. Results showed that both stilbenes could cross the cell barrier but with a better efficiency for resveratrol than for its glycone form, piceid. Besides, authors showed that the sodium glucose cotransporter 1 (SGLT1) was likely to be responsible of piceid uptake into the cell, whereas piceid efflux seemed to involve multidrug-related protein 2 (MRP2/ABCC2 protein) (Henry et al. 2005).

Regarding piceid metabolism, it was shown that piceid could undergo a deglycosylation process to form resveratrol (Table 2). Indeed, Zhang et al. (2008) studied piceid metabolism *in vivo* in rats, and followed the evolution of piceid concentration in stomach, small intestine, large intestine and caecum following an oral administration. Results showed an occurrence of resveratrol that started from the small intestine. A low amount of resveratrol 90 min after administration was detected in the stomach and small intestine, and the amounts of resveratrol were far below those of piceid. Nevertheless, after 240 min post-administration, in the large intestine, piceid and resveratrol were detected, and resveratrol amount increased to a higher level than piceid. It was demonstrated, by using rat small intestine cell-free extracts that piceid conversion into resveratrol occurred through a deglycosylation reaction by Lactase Phlorizin Hydrolase and Cytosolic- β -Glucosidase in intestine (Henry-Vitrac et al. 2006).

Piceid and resveratrol (as a metabolite of piceid) are mainly metabolized by glucuronidation process. Indeed, after an oral administration of piceid in rat, resveratrol glucuronide appeared as a major metabolite. This metabolite appeared simultaneously with the parent molecule (piceid) and the resveratrol in the plasma. Besides, resveratrol glucuronide was still present after 24 h and had a half-life time of 4 h whereas piceid and resveratrol were detectable till 8 and 12 h respectively, with a half-lifetime of 1 and 2 h respectively (Zhou et al. 2007). In addition, it was shown *in vivo* in rat and *in vitro* by using human liver microsomes that piceid could also undergo its own glucuronidation, with the formation of two monoglucuronides, namely piceid-5-O-glucuronide and piceid-40-O-glucuronide (Zhou et al. 2009; Henry-Vitrac et al. 2008).

In humans, piceid metabolism showed an extended inventory of conjugates. Healthy volunteers received an *in bolus* dosage of 85.5 mg per 70 kg. Unlike rat metabolism for piceid, human metabolism produced sulfated conjugates as major metabolites instead of glucuronides. In fact, seven metabolites were identified, of which resveratrol-sulfates were the most abundant in plasma and urine. The metabolites were resveratrol-3-sulfate, resveratrol-3,4'-disulfate, resveratrol-3,5-disulfate, resveratrol-3-glucuronide, resveratrol-4'-glucuronide and resveratrol-C/-O conjugated diglucuronides. Among the sulfates, resveratrol-3,5-disulfate reached the highest concentration in plasma, while among the glucuronides, the resveratrol diglucuronides reached the highest concentration (Burkon and Somoza 2008). A correlation between UGT1A1 concentration in plasma and glucuronides metabolites production was observed. In fact, glucuronides reached their highest concentration in plasma between 4 and 6 h, along with UGT1A1 enzyme. All these metabolites were completely eliminated 24 h after piceid administration (Burkon and Somoza 2008). Noteworthy, piceid and resveratrol were not detected in plasma. In urine, sulfate metabolites were also observed, and represented 15% of the administered piceid dose, while glucuronides represented 8%. These values indicate that piceid is mainly eliminated via non urinary pathways.

Piceatannol (Pc)		Pterostilbene		Piceid	
<u>Rat</u>		<u>Rat</u>		<u>Rat</u>	
<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	Kapetanovic et al. 2011	<i>In vivo</i>	
mono-glucuronides (x2)	Roupe et al. 2004	glucuronide (x1)	Azzolini et al. 2014	Resveratrol (Resv)	Zhang et al. 2008
<i>In vivo</i>		sulfate (x1)		Resv mono-glucuronide (x1)	Zhou et al. 2007
mono-glucuronides (x2)				piceid mono-glucuronide (x1)	Zhou et al. 2009
di-glucuronide (x2)	Roupe et al. 2006	<u>Mice</u>			
O-methyl-Pc-monoglucuronide (x3)	Setoguchi et al. 2014	<i>In vivo</i>		<u>Human</u>	
O-methyl-Pc-monosulfate (x1)		glucuronide (x1)	Shao et al. 2010	<i>In vitro</i>	
isorhapontigenin		sulfate (x1)		piceid-5-O-glucuronide	
rhapontigenin		mono-demethylated (x1)		piceid-4'-O-glucuronide	Henry-Vitrac et al. 2008
		mono-demethylated glucuronide (x1)		<i>In vivo</i>	
<u>Human</u>		mono-demethylated sulfate (x1)		Resv-3-sulfate	
<i>In vitro</i>		mono-hydroxylated (x1)		Resv-3,4'-sulfate	
Pc-3-O-glucuronide		mono-hydroxylated glucuronide (x1)		Resv-3,5-disulfate	Burkon et al. 2008
Pc-3'-O-glucuronide	Miksits et al. 2010	mono-hydroxylated sulfate (x1)		Resv-3-glucuronide	
Pc-4'-O-glucuronide	Henry-Vitrac et al. 2008	mono-hydroxylated glucuronide sulfate (x1)		Resv-4'-glucuronide	
mono-sulfates (x2)	Miksits et al. 2009			Resv-2-C-β-D/4'-O-β-D-diglucuronide	
di-sulfate (x1)				Resv-2-C-β-D/5-O-β-D-diglucuronide	
Gnetol		Rhapontigenin		Arachidin-1	
<u>Rat</u>		<u>Rat</u>		<u>Human</u>	
<i>In vivo</i>	Remsberg et al. 2015	<i>In vivo</i>	Roupe et al. 2005	<i>In vitro</i>	Brents et al. 2012
glucuronide (x1)		mono-glucuronide (x1)	Roupe et al. 2006	mono-glucuronides (x2)	
Oxyresveratrol		Isorhapontigenin		Arachidin-3	
<u>Rat</u>		<u>Human</u>		<u>Human</u>	
<i>In vivo</i>		<i>In vivo</i>		<i>In vitro</i>	Brents et al. 2012
oxyresveratrol glucuronide, oxydated and methylated derivatives (x3)	Huang et al. 2010	mono-glucuronide (x1)	Tani et al. 2014	mono-glucuronide (x1)	
dihydro-oxyresvertarol glucuronide (x2)		mono-sulfate (x1)			
oxyresveratrol sulfate (x1)		<u>Pinosylvin</u>			
dihydro-oxyresvertarol sulfate (x1)		<u>Rat</u>			
		<i>In vivo</i>	Roupe et al. 2006		
		mono-glucuronide (x1)			

Table 2. Detected and identified metabolites of dietary resveratrol monomer derivatives *in vitro* and *in vivo* in rats, mice and humans

Monomers interaction with human serum albumin

The biological activities of stilbenes greatly depend on their bioavailability which is impacted by their stability and their absorption rate. Compound interaction with proteins, and especially serum albumin in blood, could interfere with their stability and their distribution. In this context, it is well known that stilbenes could interact with serum albumin through hydrophilic or hydrophobic interactions (Latruffe et al. 2014). Unfortunately, the interactions of stilbenes with proteins are poorly studied and therefore data is scarce. This data in addition to the influence of stilbene-protein binding on cellular uptake is resumed in the following section.

In general, all stilbenes show a very high rate of protein binding with human serum albumin (HSA), with 90.7% for resveratrol, 92.81% for oxyresveratrol, and 90.86% for piceatannol which are hydroxylated monomers; 86.74% for isorhapontigenin, 93.61% for pinostilbene, and 96.09% for pterostilbene which are hydroxylated and methoxylated derivatives. The percentage of binding seemed to increase as the number of methoxylated groups increased. The lowest percentage of binding to HSA was observed for piceid (71.99% protein binding) which contains a glycoside moiety (Cao et al. 2016).

Overall uptake into endothelial cells was estimated to be low, ranging from 0.79% of the initial dose for isorhapontigenin, 1.14% for piceid, 2.85% for resveratrol, 11.81% for pinostilbene and was the highest for pterostilbene reaching 22.84%. The percentage of uptake was a null value for oxyresveratrol and piceatannol. Therefore, those results suggested that the percentage of uptake increased when the degree of hydroxylated groups decreased and the number of methoxylated groups increased for the considered derivatives. In most cases (resveratrol, isorhapontigenin, oxyresveratrol, piceid and piceatannol), the presence of serum albumin slightly increased cellular uptake, whereas for pinostilbene and pterostilbene, the opposite effect was observed (Cao et al. 2016).

Finally, it was shown that approximately 50% of piceid metabolites, such as glucuronides and sulfates, could also interact with plasmatic proteins. This could prevent further metabolism or modify their elimination (Burkon and Somoza 2008).

Stilbene monomers formulation

Piceatannol

Recently, Inagaki et al. (2016) tried to enhance piceatannol uptake *in vivo* in rats. Piceatannol (180 $\mu\text{mol/kg}$) was complexed with α -cyclodextrin and administered to Sprague–Dawley male rats at 3 different concentrations of α -cyclodextrin: 90, 180 and 540 $\mu\text{mol/kg}$, whereas the control form consisted in piceatannol suspended in carboxymethyl cellulose. As a result of pharmacokinetic parameters measurements for piceatannol-cyclodextrin complexes (with 540 $\mu\text{mol/kg}$ of α -cyclodextrin), C_{max} (5.3 $\mu\text{mol/L}$) was twice as high as that of the control (2.5 $\mu\text{mol/L}$). It was also the case for the 2 other concentrations tested (Inagaki et al. 2016). Furthermore, the T_{max} for piceatannol-cyclodextrin complexes at 540 $\mu\text{mol/kg}$ dosage was reduced to 0.25 h, while it was 0.50 h for the control. Likewise, C_{max} of piceatannol conjugates were also increased, but not to the same degree, while their T_{max} did not significantly change when compared to control, except for O-methyl conjugates, with a T_{max}

of 1 h for the 3 concentrations (vs 4 h for the control) (Inagaki et al. 2016). Therefore, this is a promising strategy towards a safer and more reliable administration form of piceatannol.

Pterostilbene

Yeo et al. (2013a) measured a bioavailability of 15.9% following an oral suspension dosage of 15 mg/kg, while pterostilbene incorporated in a cyclodextrin formulation clearly increased bioavailability, that reached 59.2% at 15 mg/kg and 115.9% at 60 mg/kg (Yeo et al. 2013a).

In a 2017 study, pterostilbene was linked to amino acids, such as isoleucine, leucine and β -alanine (for a total of 9 new synthesized derivatives) to form prodrugs in an attempt to improve its bioavailability (Azzolini et al. 2017). The role of these amino acids is to protect the 4' hydroxyl function, in order to prevent high hepatic extraction rate and metabolism following absorption. Hence, the hydroxyl moieties transformed into a carbamate ester were linked to the N-terminus of the amino acid. After *in vitro* and *ex vivo* (in blood) evaluation of the prodrugs stability, the authors proceeded to pharmacokinetic evaluation *in vivo* in rats. The rats received 22 mg/kg by gavage. As a result of this assay, it appeared that the prodrugs containing a hydrophobic side chain as promoeity, particularly those formed with isoleucine, leucine and valine, showed the best absorption rates, with the highest C_{max} (94, 113 and 102 μ M respectively) and AUC_{0-24h} of total pterostilbene (1250, 1900 and 1500 μ mol h/L), while pterostilbene administered in same conditions hardly showed an AUC_{0-24h} of 240 μ mol.h/L (Azzolini et al. 2014). Noteworthy is the detection of a unique sulfated metabolite of pterostilbene during the study. Furthermore, Azzolini et al. investigated the specific organ distribution improvement with the prodrug formed by isoleucine. Encouraging results consisted in a considerable enhancement of pterostilbene AUC_{0-inf} in brain, heart, testes and skeletal muscles, showing a two-fold increase. Enhanced absorption of the prodrug was attributed to the carboxylic function ionization and carbamate ester bond that increased the molecule polarity and facilitated the passive diffusion through membranes. Absorption mechanisms of the same prodrug were studied using human Caco-2 cell monolayers, which led to confirm that both passive and active transport paths were implicated (Azzolini et al. 2017).

Pharmacokinetic of oligomeric stilbenes

Despite the large number of resveratrol oligomers and their potential interest for human health, little information is available from literature about their pharmacokinetics. The structure of the discussed oligomers is given in Fig. 3 and their metabolites are presented in Table 3. CAS number, PubChem CID and InChI Key for these oligomers can be found as supplementary information.

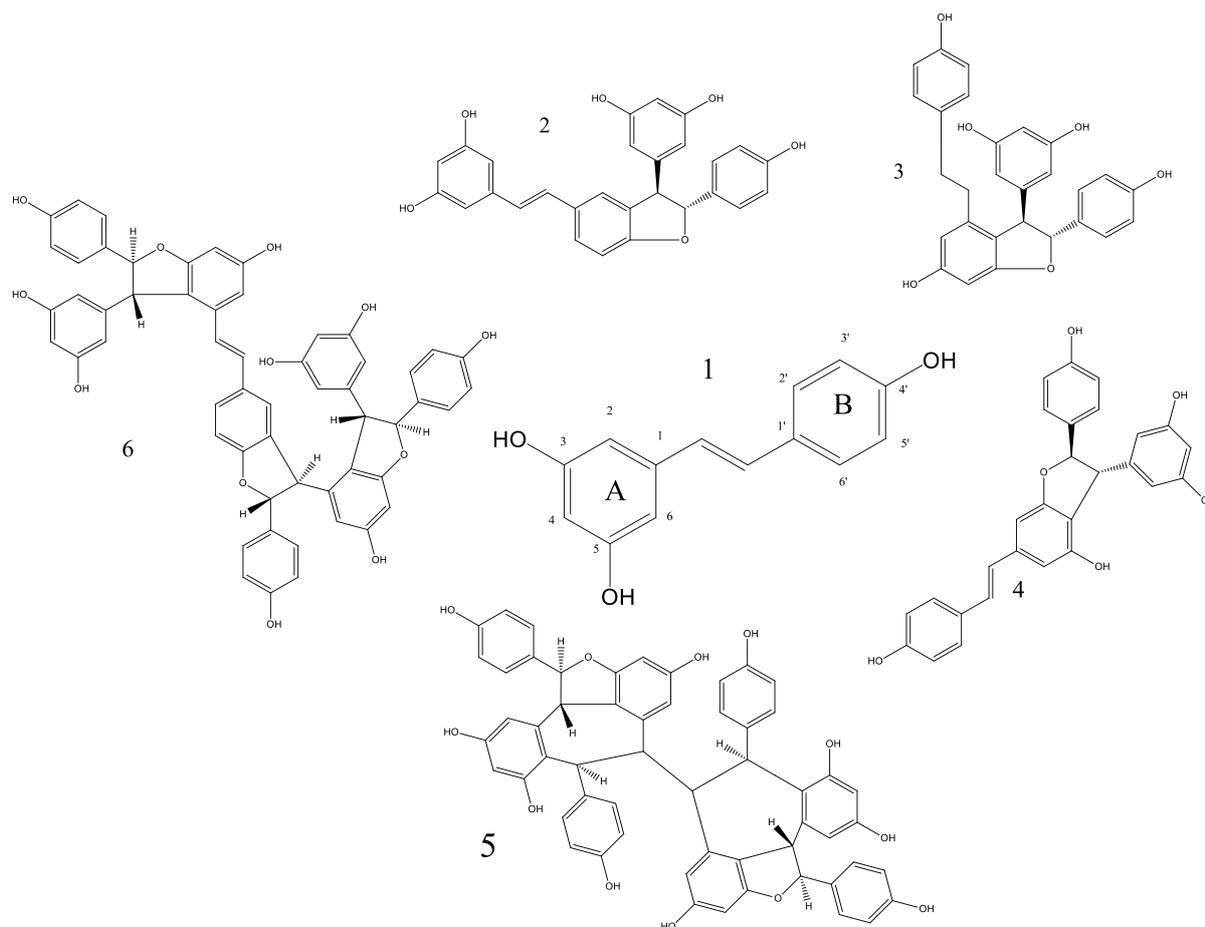


Figure 3. Chemical structures of resveratrol and oligomer stilbenes discussed in the review.

1: resveratrol (MW: 228.24); 2: δ -viniferin (MW: 454.47); 3: ϵ -viniferin (MW: 454.47); 4: gnetin C (MW: 454.47);
5: hopeaphenol (MW: 906.93); 6: vitisin B (MW: 906.93)

Resveratrol dimers: δ -viniferin, ϵ -viniferin and gnetin C

δ -viniferin, ϵ -viniferin

Among resveratrol dimers, some data is available for δ - and ϵ -viniferin *in vivo* in rats or mice and *in vitro* in rats and humans. The pharmacokinetics have been studied after oral or intravenous administrations for δ -viniferin (Liu et al. 2014; Mao et al. 2016), and after oral, intravenous or intraperitoneal administrations for ϵ -viniferin (Kim et al. 2017).

The bioavailability of δ -viniferin is relatively low and, depending on studies, ranges between 2.3 and 15.2% (Mao et al. 2016; Liu et al. 2014). Interestingly, the oral bioavailability of δ -viniferin was not modified when increasing dosage (14.8% at 20 mg/kg, 12.7% at 40 mg/kg and 15.2% at 80 mg/kg), suggesting that the absorption was subjected to saturation process (Liu et al. 2014). For ϵ -viniferin, the oral bioavailability was reported to be weaker, with only 0.77% after an oral dosage of 40 mg/kg (Kim et al. 2017). This low bioavailability for δ -viniferin and extremely low for ϵ -viniferin could be explained by a poor absorption and an extensive metabolism. Indeed, an *in vitro* study of ϵ -viniferin absorption by Caco-2 cells was conducted by Willenberg et al.

(2015). Results showed that, unlike resveratrol in same conditions, ϵ -viniferin did not cross the Caco-2 monolayer, since it was not detected on the basolateral side of the cells. The study concluded that ϵ -viniferin could hardly be absorbed in human intestine. Nevertheless, 16% of the added amount of ϵ -viniferin was found bound to the Caco-2 cell surfaces or in the cells. More research is then needed in order to identify the potential impact of ϵ -viniferin on the human intestine surface (Willenberg et al. 2015).

According to Liu et al. (2014), with an oral administration of 80 mg/kg of δ -viniferin in rats, C_{max} was 1406 ng/mL and occurred at T_{max} of 42.5 min, with an AUC_{0-inf} of 186 $\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ and a half-life time of 29.9 h. Mao et al. investigated δ -viniferin pharmacokinetic in rats after oral administrations (70 mg/kg). The measurements of those parameters showed that C_{max} reached 399.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ with a T_{max} of 1.7 h, an AUC_{0-inf} of 1181.9 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ and a half-life time of 4.2 h (Mao et al. 2016).

Concerning δ -viniferin and ϵ -viniferin distribution, the V_d of δ -viniferin ranged between 12.2 and 24.5 L/kg (Liu et al. 2014; Mao et al. 2016) and was considerably higher than the one observed for ϵ -viniferin which was about 1.36 L/kg. Those observations suggest that δ -viniferin is distributed in tissues, whereas ϵ -viniferin seemed to mainly remain in the blood compartment. This observation was corroborated by a slow clearance of δ -viniferin (half-life time values comprised between 4.3 and 5.8 h, and between 4.2 and 29.9 h, after intravenous and oral administrations respectively) as compared to the one of ϵ -viniferin (half-life time values of 1.92, 2.1 and 3.4 h after intravenous, intraperitoneal and oral administrations, respectively).

In vivo, after oral administration, δ -viniferin is rapidly metabolized. One glucuronidated and one sulfated metabolites have been identified by a LC-MS specific method, which was confirmed by the enhancement of the δ -viniferin concentration after hydrolysis of the samples with β -glucuronidase or sulfatase. Those metabolites appeared in plasma samples within 5 min, and their concentrations exceeded that of the parent molecule after 10 min. Moreover, the AUC_{0-inf} of glucuronidated and sulfated metabolites reached 18,758.3 and 3303.2 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$ respectively in rats. These values are significantly greater than the δ -viniferin AUC_{0-inf} (1181.9 $\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{L}$). The two metabolites are rapidly cleared from blood with a half-life time of 7.3 and 9.5 h for glucuronide and sulfate respectively after oral administration. Their apparent V_d (6.6 and 5.4 L/kg for the glucuronide and sulfate, respectively) suggested that they are distributed into tissues, but to a lesser extent than the parent molecule. δ -viniferin is mainly excreted via the feces in unchanged form (60.3%), whereas only 0.003% of the initially administered dose was found in urine (Mao et al. 2016). Interestingly, authors observed two significant peaks (at 2 h and approximately between 4.5 and 6 h after administration) of δ -viniferin concentration in blood samples on the concentration-time curve, and suggested that this was due to enterohepatic re-circulation, as it was already observed previously for resveratrol (Marier et al. 2002).

Concerning ϵ -viniferin metabolism, although a very small amount of ϵ -viniferin is absorbed by Caco-2 cells, Willenberg et al. observed that ϵ -viniferin amount in cell fractions did not increase after conjugate hydrolysis assay, suggesting that ϵ -viniferin was neither glucuronidated nor sulfated by Caco-2 cells, after 6 h of incubation (Willenberg et al. 2015). In a recent study, the metabolic profile of ϵ -viniferin was described *in vitro* in rats and humans (Courtois et al. 2017). Glucuronides and sulfates derivatives of ϵ -viniferin were first obtained by chemical hemi-synthesis and fully characterized by UPLC-MS and NMR spectroscopy. After incubation of ϵ -viniferin with

rat or human S9 liver fractions, four glucuronidated and four sulfated conjugates were formed. In both species, ϵ -viniferin was subjected to an intense metabolism as 70 to 80% of the molecule was converted to glucuronides and/or sulfates. In humans, three major metabolites (two glucuronides and one sulfate) were observed, whereas only one major glucuronide was observed in rats (Table 3). This observation suggests that some interspecies differences exist since glucuronidation is predominating in rats and both glucuronidation and sulfation are involved in humans. In a precedent *in vitro* study, Willenberg et al. (2015) observed a high glucuronidation rate with rat liver microsomes, reaching 85% of total ϵ -viniferin, while it reached 46% with human liver microsomes (Willenberg et al. 2015).

As described above, the overall oral bioavailability of both isomers of viniferin is low, and this could be explained in part by their intense hepatic metabolism. In addition, metabolism arising from extrahepatic tissues, and especially the involvement of the gut microorganisms and intestinal epithelium should not be overlooked. This extensive metabolism also raises the unresolved question of the biological activity of the two dimers.

Gnetin C

Gnetin C and its glucosides (gnemonosides A, C and D) pharmacokinetic profiles were studied *in vivo* in humans. Tani et al. (2014) investigated absorption rate and metabolism of this compound through Melinjo Seed Extract powder after single and repeated oral administrations. Gnetin C occurred at a concentration of 28 mg/g in Melinjo Seed Extract powder, and the content of the total three glucosides reached 167 mg/g. For single dose evaluation, healthy volunteers received 1 g of Melinjo Seed Extract powder. Concerning absorption, results for gnetin C showed a C_{max} of 143 nM at 16.6 h (T_{max}) and an AUC_{0-96h} of 6977 nmol.h/L (Tani et al. 2014). Although gnetin C glucosides such as gnemonosides A, C and D were present in MSE powder, they were absent in plasma, which led Tani et al. to suggest that they were deglycosylated into gnetin C and then absorbed.

Concerning metabolism, two gnetin C metabolites, both being monoglucuronidated, were detected through UPLC-MS/MS and enzyme hydrolysis (Tani et al. 2014). One of the metabolites was quantified and showed a C_{max} of 77.9 nM at 10.4 h (T_{max}) with an AUC_{0-96h} of 2511 nmol.h/L. Noteworthy is the persistence of gnetin C in plasma, being detected after 96 h of dose administration of Melinjo Seed Extract powder. Tani et al. suggested that this prolonged presence confirms the gradual deglycosylation of gnetin C glucosides by intestine bacterial flora before being absorbed under gnetin C form.

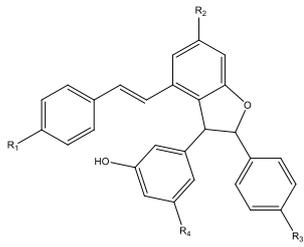
<i>δ</i>-viniferin	
<u>Rat</u>	
<i>In vivo</i>	
mono-glucuronide (x1)	Mao et al. 2016
mono-sulfate (x1)	
<i>ε</i>-viniferin	
<u>Rat</u>	
<i>In vitro</i>	
mono-glucuronides (x4) : G1, G2, G3 and G4	Courtois et al. 2017
mono-sulfates (x4) : S1, S2, S3 and S4	
G1: R ₁ =OGlu; R ₂ =R ₃ =R ₄ =OH	
G2: R ₂ =OGlu; R ₁ =R ₃ =R ₄ =OH	
G3: R ₃ =OGlu; R ₁ =R ₂ =R ₄ =OH	
G4: R ₄ =OGlu; R ₁ =R ₂ =R ₃ =OH	
S1: R ₁ =OSO ₂ OH; R ₂ =R ₃ =R ₄ =OH	
S2: R ₂ =OSO ₂ OH; R ₁ =R ₃ =R ₄ =OH	
S3: R ₃ =OSO ₂ OH; R ₁ =R ₂ =R ₄ =OH	
S4: R ₄ =OSO ₂ OH; R ₁ =R ₂ =R ₃ =OH	
	
	Courtois et al. 2017
<u>Human</u>	
<i>In vitro</i>	
mono-glucuronides (x4) : G1, G2, G3 and G4	
mono-sulfates (x2) : S1 and S2	
G1: R ₁ =OGlu; R ₂ =R ₃ =R ₄ =OH	
G2: R ₂ =OGlu; R ₁ =R ₃ =R ₄ =OH	
G3: R ₃ =OGlu; R ₁ =R ₂ =R ₄ =OH	
G4: R ₄ =OGlu; R ₁ =R ₂ =R ₃ =OH	
S1: R ₁ =OSO ₂ OH; R ₂ =R ₃ =R ₄ =OH	
S2: R ₂ =OSO ₂ OH; R ₁ =R ₃ =R ₄ =OH	
Gnetin C	
<u>Human</u>	
<i>In vivo</i>	
mono-glucuronides (x2)	Tani et al. 2014

Table 3. Detected and identified metabolites of dietary resveratrol oligomer derivatives *in vitro* and *in vivo* in rats and humans

Resveratrol tetramers: vitisin B and hopeaphenol

Vitisin B

The pharmacokinetic study of vitisin B was conducted after oral (250 mg/kg), intravenous (0.5 and 1 mg/kg) and intraperitoneal administrations (5, 10 and 25 mg/kg) in rats (Choi et al. 2015).

Following oral administration, no vitisin B could be found in blood samples of treated rats. After intravenous administration, vitisin B (1 mg/kg) was rapidly cleared from blood with a half-life time of approximately 30 min. The Vd was about 94.7 mL/kg indicating that this tetramer was not widely distributed into tissues. Unfortunately, no data is available about its metabolism and its specific distribution into tissues. After intravenous administration, no vitisin B was found in urine samples suggesting that most of the molecule is excreted by hepatic route.

After intraperitoneal administration, the T_{max} was reached at 240–360 min, and the half-life time was significantly longer (between 435 and 501 min) than the one observed after intravenous route (26.1 min). AUC_{0–inf} and C_{max} increased in a dose-dependent manner, with 142, 284 and 352 µg.min/mL and 0.197, 0.424 and 0.600 µg/mL for 5, 10 and 25 mg/kg, respectively (Choi et al. 2015).

Hopeaphenol

For hopeaphenol, another resveratrol tetramer, even less data is available since only *in vitro* studies were performed. In order to estimate its intestinal absorption, a Caco-2 cells transwell system was used. After apical exposure to cells monolayers, no hopeaphenol was detected in the basolateral chamber. Willenberg et al. (2015) concluded that hopeaphenol is hardly absorbed by Caco-2 cells and consequently by human intestine. This result indicates that this resveratrol tetramer could not cross intestinal barrier in an *in vitro* model. Nevertheless, a significant amount of the added dose of hopeaphenol was recovered into Caco-2 cells indicating that this compound is able to penetrate the cells. This observation deserves to be studied in order to identify any potential pharmacological effect of hopeaphenol on the human intestine surface. Besides, after conjugates cleavage in cell fractions, the hopeaphenol amount did not increase, suggesting that hopeaphenol is highly stable and non-metabolized by Caco-2 glucuronosyl- and sulfo-transferases (Willenberg et al. 2015). It was also reported that hopeaphenol was not metabolized neither by human nor by rat liver microsomes (Willenberg et al. 2012), while under the same conditions, resveratrol and ε-viniferin were highly glucuronidated. This result points out the stability of hopeaphenol structure, which could have a positive impact on its bioavailability later on, since high glucuronidation is a main cause of poor stilbene bioavailability. Hopeaphenol conjugation is yet to be investigated *in vivo* in order to confirm this particularity.

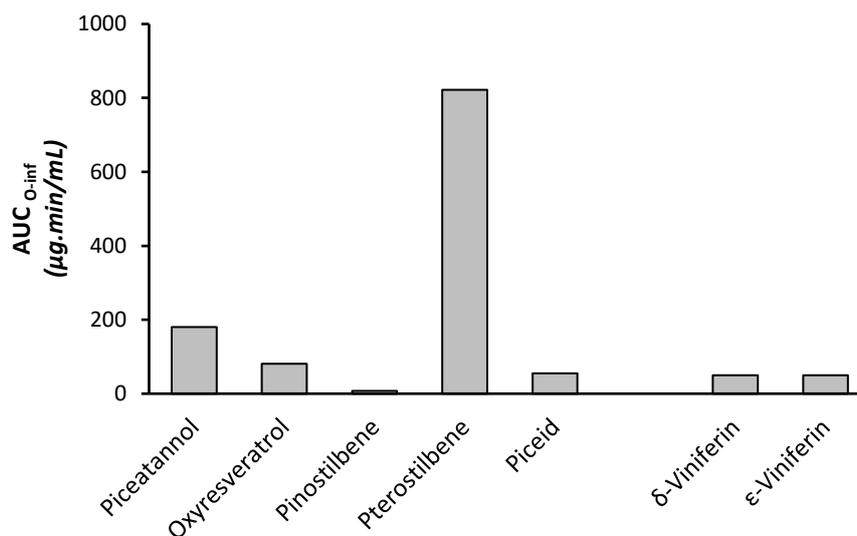


Figure 4. Graphic representation of AUC_{0-inf} of different stilbenes after oral administration at concentration ranging between 40 and 50 mg/kg in rats. The values of AUC_{0-inf} were taken from the references mentioned in the review.

General conclusion

Main sources of stilbenes in human diet are represented by wine and plants that could be consumed as food or for medicinal usage all over the world. Stilbenes can be found in a low amount in grapes and grapes juice, and in an extremely low amount in nuts and berries. As the amount of stilbenes may differ from source to source, the consumption rate differs too among individuals, therefore information about their total intake are scarce and difficult to estimate. Nevertheless, some studies pointed out that it could be ranged between 0.5 and 4 mg/person/day.

Bioavailability of stilbenes is extremely different from molecule to molecule. Some monomers are bioavailable whereas oligomers presented a very low bioavailability. Correspondingly, it seemed obvious that when the degree of oligomerization increased, bioavailability decreased. Indeed, among oligomers, it was reported that vitisin B, a resveratrol tetramer, could not reach systemic blood circulation after an oral administration, which was not the case for resveratrol dimers like viniferin. The calculated bioavailability values of gnetol, oxyresveratrol and pinostilbene are inferior to 20% and indicate a small fraction reaching systemic circulation. To the best of our knowledge, the bioavailability of piceatannol and piceid was not reported in the literature. Nevertheless, their respective AUC_{0-inf} are in the same order of magnitude than the ones of gnetol, oxyresveratrol or pinostilbene, which suggest that these molecules are poorly bioavailable (Fig. 4). The highest calculated bioavailability value was observed with pterostilbene. In fact, pterostilbene bioavailability reached a very high percentage with oral doses greater than 50 mg/kg (>60%). Authors suggested this high bioavailability was related to its structure, and

more precisely to the presence of only one para-hydroxyl group on cycle B and of the dimethoxy pattern on cycle A that enhance its metabolic stability in addition to its liposolubility.

A large body of literature reported the potential health benefit of those monomers and oligomers structurally related to resveratrol since they present many interesting biological activities. It should not be forgotten that some of those biological activities could be due to artifacts or interferences with the bioassay, as it was already reported for curcumin. This feature led to the classification of those types of compounds as pan assay interference compounds (PAINS) or invalid metabolic panaceas (IMPS) (Nelson et al. 2017).

Considering the potential health benefit of monomers or oligomers structurally related to resveratrol, one could hypothesize that non-bioavailable oligomers could exert a local beneficial action in the intestine, whereas monomer could exert a systemic beneficial action upon absorption and delivery to target tissues. This relatively low bioavailability is generally related to a low absorption in addition to an extensive metabolism.

Absorption is the first step for the stilbenes to reach blood circulation before they exert their pharmacological actions. There is a high variability of the absorption rate and the velocity, which seem to greatly depend on the presence of chemical structure substituents and on the degree of oligomerization of the stilbenes. In fact, the absorption studies conducted on *in vitro* cell cultures show clearly that stilbene monomers have a better absorption rate when compared to oligomers.

Another point that limits the bioavailability of stilbenes is their high metabolism. Most of the studies reported that stilbene monomers or oligomers are subjected to an intense and complex metabolism in the liver and in the intestine. This metabolism mostly involves glucuronidation and sulfation reactions. For some cases, as for piceatannol and oxyresveratrol, methylation reactions have also been reported. Glucuronidation seemed to occur mainly in rats whereas sulfation occurred in humans. This difference has to be considered in further investigations since most of the studies are performed in rats or mice and therefore could lead to misinterpretation and thus make it difficult to extrapolate some results to humans. Moreover, only few studies aimed to identify the exact chemical structure of the produced metabolites.

An interesting point is that during their metabolism, some stilbene derivatives could form other naturally occurring stilbenes. This was observed for instance during piceatannol metabolism which can lead to the formation of isorhapontigenin, during piceid metabolism which leads to the formation of resveratrol after deglycosylation process, and during oxidative metabolism of pinosylvin which also leads to resveratrol. Therefore, some stilbenes can exhibit additional biological function due to their active metabolites.

Different authors suggest that some stilbene monomers (oxyresveratrol) as well as oligomers (δ -viniferin) undergo an enterohepatic recirculation. This fact could maintain the plasmatic concentration of these molecules at a certain level, and influence their metabolism rate. In order to investigate the impact of this recirculation on different stilbenes pharmacokinetics, it would be interesting to study their presence in bile.

To exert their biological actions, stilbene derivatives have to be distributed in their target tissue after absorption. It was noticed that stilbene monomers presented a higher Vd than stilbene oligomers, suggesting that monomers are better distributed from blood to tissues than oligomers. This feature is in accordance with the higher absorption rate of monomers in comparison with oligomers as described above. Unfortunately, no data is available

for tissue distribution of those stilbene derivatives, except for pterostilbene. Indeed, Azzolini et al. (2014) reported the presence of pterostilbene and its metabolites in liver, kidneys, lungs, brain, heart, skeletal muscles and testis. Moreover, the same research group found pterostilbene and its metabolites in adipose tissue of mice after oral administration of lipid-mimetic prodrugs of pterostilbene (Mattarei et al. 2017).

Even if the biological activities of monomers or oligomers structurally related to resveratrol are well described and promising, an enhanced bioavailability, if it remains safety and efficacy, is prerequisites for their potential health benefits. The overall reported bioavailability of stilbenes is mostly low due primarily to their poor absorption and their significant metabolism but could also be modified by the alimentary bolus or gastro-intestinal degradation. Nevertheless, one could not discard that the biological activities of metabolites could be more active than the parent molecules which is a common phenomenon in pharmacology. In this context, we believe that further research is needed for the synthesis and the description of the active metabolites, in addition to the description of further pharmacokinetic parameters that are still lacking, and which are essential for a therapeutic use in human.

References

- Arraki K, Renouf E, Waffo-Téguo P, et al (2017) Identification and quantification of stilbenes in some Tunisian red wines using UPLC-MS and HPLC-DAD. *OENO One* 51:.. doi: 10.20870/oenone.2017.51.2.1673
- Arslan G, Yilmaz N (2013) Determination of Trans-resveratrol levels in different fruits, vegetables and their skin by HPLC. *Asian J Chem* 25:1225–1228
- Azzolini M, La Spina M, Mattarei A, et al (2014) Pharmacokinetics and tissue distribution of pterostilbene in the rat. *Mol Nutr Food Res* 58:2122–2132. doi: 10.1002/mnfr.201400244
- Azzolini M, Mattarei A, La Spina M, et al (2017) New natural amino acid-bearing prodrugs boost pterostilbene's oral pharmacokinetic and distribution profile. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV* 115:149–158. doi: 10.1016/j.ejpb.2017.02.017
- Brents LK, Medina-Bolivar F, Seely KA, et al (2012) Natural prenylated resveratrol analogs arachidin-1 and -3 demonstrate improved glucuronidation profiles and have affinity for cannabinoid receptors. *Xenobiotica Fate Foreign Compd Biol Syst* 42:139–156. doi: 10.3109/00498254.2011.609570
- Burkon A, Somoza V (2008) Quantification of free and protein-bound trans-resveratrol metabolites and identification of trans-resveratrol-C/O-conjugated diglucuronides - two novel resveratrol metabolites in human plasma. *Mol Nutr Food Res* 52:549–557. doi: 10.1002/mnfr.200700290
- Cao H, Jia X, Shi J, et al (2016) Non-covalent interaction between dietary stilbenoids and human serum albumin: Structure-affinity relationship, and its influence on the stability, free radical scavenging activity and cell uptake of stilbenoids. *Food Chem* 202:383–388. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.02.003
- Chang SK, Alasalvar C, Bolling BW, Shahidi F (2016) Nuts and their co-products: The impact of processing (roasting) on phenolics, bioavailability, and health benefits – A comprehensive review. *J Funct Foods Complete*:88–122. doi: 10.1016/j.jff.2016.06.029
- Chen W, Yeo SCM, Chuang XF, Lin H-S (2016a) Determination of pinostilbene in rat plasma by LC-MS/MS: Application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal* 120:316–321. doi: 10.1016/j.jpba.2015.12.051
- Chen W, Yeo SCM, Elhennawy MGAA, Lin H-S (2016b) Oxyresveratrol: A bioavailable dietary polyphenol. *J*

- Funct Foods 22:122–131. doi: 10.1016/j.jff.2016.01.020
- Chiva-Blanch G, Urpi-Sarda M, Rotchés-Ribalta M, et al (2011) Determination of resveratrol and piceid in beer matrices by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:698–705. doi: 10.1016/j.chroma.2010.12.012
- Choi W-K, Yoon KD, Lee JK, et al (2015) Development and validation of a liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the quantification of vitisin B in rat plasma and urine. *J Sep Sci* 38:1872–1880. doi: 10.1002/jssc.201500071
- Courtois A, Jourdes M, Dupin A, et al (2017) *In Vitro* Glucuronidation and Sulfation of ϵ -Viniferin, a Resveratrol Dimer, in Humans and Rats. *Mol Basel Switz* 22:. doi: 10.3390/molecules22050733
- Creasy LL, Coffee M (1988) Phytoalexin production potential of grape berries. *J Am Soc Hortic Sci USA*
- Da Silva LMR, De Figueiredo EAT, Ricardo NMPS, et al (2014) Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. *Food Chem* 143:398–404. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.001
- Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, et al (2013) Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxid Redox Signal* 18:1818–1892. doi: 10.1089/ars.2012.4581
- Dubrovina AS, Kiselev KV (2017) Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta* 246:597–623. doi: 10.1007/s00425-017-2730-8
- Dvorakova M, Landa P (2017) Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacol Res* 124:126–145. doi: 10.1016/j.phrs.2017.08.002
- Eseberri I, Lasa A, Miranda J, et al (2017) Potential miRNA involvement in the anti-adipogenic effect of resveratrol and its metabolites. *PLoS One* 12:e0184875. doi: 10.1371/journal.pone.0184875
- Falomir E, Lucas R, Peñalver P, et al (2016) Cytotoxic, Antiangiogenic and Antitelomerase Activity of Glucosyl- and Acyl- Resveratrol Prodrugs and Resveratrol Sulfate Metabolites. *ChemBiochem Eur J Chem Biol* 17:1343–1348. doi: 10.1002/cbic.201600084
- Guebailia HA, Chira K, Richard T, et al (2006) Hopeaphenol: the first resveratrol tetramer in wines from North Africa. *J Agric Food Chem* 54:9559–9564. doi: 10.1021/jf062024g
- Henry C, Vitrac X, Decendit A, et al (2005) Cellular uptake and efflux of trans-piceid and its aglycone trans-resveratrol on the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J Agric Food Chem* 53:798–803. doi: 10.1021/jf048909e
- Henry-Vitrac C, Desmoulière A, Girard D, et al (2006) Transport, deglycosylation, and metabolism of trans-piceid by small intestinal epithelial cells. *Eur J Nutr* 45:376–382. doi: 10.1007/s00394-006-0609-8
- Henry-Vitrac C, Richard T, Desmoulière A, et al (2008) *In vitro* glucuronidation of trans-piceid and trans-piceatannol by human liver microsomes. *J Int Sci Vigne Vin Bordx Fr* 42:241–243
- Hoshino J, Park E-J, Kondratyuk TP, et al (2010) Selective synthesis and biological evaluation of sulfate-conjugated resveratrol metabolites. *J Med Chem* 53:5033–5043. doi: 10.1021/jm100274c
- Huang H, Chen G, Lu Z, et al (2010) Identification of seven metabolites of oxyresveratrol in rat urine and bile using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr BMC* 24:426–432. doi: 10.1002/bmc.1309
- Inagaki H, Ito R, Setoguchi Y, et al (2016a) Administration of Piceatannol Complexed with α -Cyclodextrin Improves Its Absorption in Rats. *J Agric Food Chem* 64:3557–3563. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00398
- Jeandet P, Delaunoy B, Conreux A, et al (2010) Biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of stilbene phytoalexins in plants. *BioFactors Oxf Engl* 36:331–341. doi: 10.1002/biof.108
- Kapetanovic IM, Muzzio M, Huang Z, et al (2011) Pharmacokinetics, oral bioavailability, and metabolic profile of resveratrol and its dimethylether analog, pterostilbene, in rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 68:593–601. doi:

10.1007/s00280-010-1525-4

Kim J, Min JS, Kim D, et al (2017) A simple and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for trans- ϵ -viniferin quantification in mouse plasma and its application to a pharmacokinetic study in mice. *J Pharm Biomed Anal* 134:116–121. doi: 10.1016/j.jpba.2016.11.044

Latruffe N, Menzel M, Delmas D, et al (2014) Compared binding properties between resveratrol and other polyphenols to plasmatic albumin: consequences for the health protecting effect of dietary plant microcomponents. *Mol Basel Switz* 19:17066–17077. doi: 10.3390/molecules191117066

Lee J, Rennaker C (2007) Antioxidant capacity and stilbene contents of wines produced in the Snake River Valley of Idaho. *Food Chem* 105:195–203. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.03.069

Li G, Zhu Y, Zhang Y, et al (2013) Estimated daily flavonoid and stilbene intake from fruits, vegetables, and nuts and associations with lipid profiles in Chinese adults. *J Acad Nutr Diet* 113:786–794. doi: 10.1016/j.jand.2013.01.018

Lin H-S, Yue B-D, Ho PC (2009) Determination of pterostilbene in rat plasma by a simple HPLC-UV method and its application in pre-clinical pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr BMC* 23:1308–1315. doi: 10.1002/bmc.1254

Lingua MS, Fabani MP, Wunderlin DA, Baroni MV (2016) From grape to wine: Changes in phenolic composition and its influence on antioxidant activity. *Food Chem* 208:228–238. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.009

Liu Q, Liao X, Xu J, et al (2014) Development and validation of a sensitive and selective LC-MS/MS method for the determination of trans δ -viniferin, a resveratrol dehydromer, in rat plasma and its application to pharmacokinetics and bioavailability studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 958:124–129. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.03.026

Lv C, Zhang L, Wang Q, et al (2006) Determination of piceid in rat plasma and tissues by high-performance liquid chromatographic method with UV detection. *Biomed Chromatogr* 20:1260–1266. doi: 10.1002/bmc.693

Mao P, Lei Y, Zhang T, et al (2016) Pharmacokinetics, bioavailability, metabolism and excretion of δ -viniferin in rats. *Acta Pharm Sin B* 6:243–252. doi: 10.1016/j.apsb.2016.03.008

Marier J-F, Vachon P, Gritsas A, et al (2002) Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J Pharmacol Exp Ther* 302:369–373

Matsui Y, Sugiyama K, Kamei M, et al (2010) Extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) seed containing high amounts of piceatannol inhibits melanogenesis and promotes collagen synthesis. *J Agric Food Chem* 58:11112–11118. doi: 10.1021/jf102650d

Mattarei A, Rossa A, Bombardelli V, et al (2017) Novel lipid-mimetic prodrugs delivering active compounds to adipose tissue. *Eur J Med Chem* 135:77–88. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.04.034

Miksits M, Maier-Salamon A, Vo TPN, et al (2010) Glucuronidation of piceatannol by human liver microsomes: major role of UGT1A1, UGT1A8 and UGT1A10. *J Pharm Pharmacol* 62:47–54. doi: 10.1211/jpp.62.01.0004

Miksits M, Sulyok M, Schuhmacher R, et al (2009) In-vitro sulfation of piceatannol by human liver cytosol and recombinant sulfotransferases. *J Pharm Pharmacol* 61:185–191. doi: 10.1211/jpp/61.02.0007

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. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM* 27:1815–1827. doi: 10.1002/rcm.6636

Nelson KM, Dahlin JL, Bisson J, et al (2017) The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin. *J Med Chem* 60:1620–1637. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00975

Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, et al (2010) Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database J Biol Databases Curation* 2010:bap024. doi: 10.1093/database/bap024

- Pasqualini JR, Chetrite GS (2005) Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93:221–236. doi: 10.1016/j.jsbmb.2005.02.007
- Patel KR, Andreadi C, Britton RG, et al (2013) Sulfate metabolites provide an intracellular pool for resveratrol generation and induce autophagy with senescence. *Sci Transl Med* 5:205ra133. doi: 10.1126/scitranslmed.3005870
- Pawlus A, Waffo-Téguo P, Shaver J, Mérillon J-M (2012) Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a review. *J Int Sci Vigne Vin* 46:57–111. doi: 10.20870/oenone.2012.46.2.1512
- Peng X-L, Xu J, Sun X-F, et al (2015) Analysis of trans-resveratrol and trans-piceid in vegetable foods using high-performance liquid chromatography. *Int J Food Sci Nutr* 66:729–735. doi: 10.3109/09637486.2015.1088934
- Polycarpou E, Meira LB, Carrington S, et al (2013) Resveratrol 3-O-D-glucuronide and resveratrol 4'-O-D-glucuronide inhibit colon cancer cell growth: evidence for a role of A3 adenosine receptors, cyclin D1 depletion, and G1 cell cycle arrest. *Mol Nutr Food Res* 57:1708–1717. doi: 10.1002/mnfr.201200742
- Qiu F, Komatsu K, Saito K, et al (1996) Pharmacological properties of traditional medicines. XXII. Pharmacokinetic study of mulberroside A and its metabolites in rat. *Biol Pharm Bull* 19:1463–1467
- Rabassa M, Zamora-Ros R, Urpi-Sarda M, et al (2015) Association of habitual dietary resveratrol exposure with the development of frailty in older age: the Invecchiare in Chianti study. *Am J Clin Nutr* 102:1534–1542. doi: 10.3945/ajcn.115.118976
- Reinisalo M, Kårlund A, Koskela A, et al (2015) Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. In: *Oxid. Med. Cell. Longev.* <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/340520/>. Accessed 28 Dec 2017
- Remsberg CM, Martinez SE, Akinwumi BC, et al (2015) Preclinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics and Content Analysis of Gnetol in Foodstuffs. *Phytother Res* 29:1168–1179. doi: 10.1002/ptr.5363
- Remsberg CM, Yáñez JA, Ohgami Y, et al (2008) Pharmacometrics of pterostilbene: preclinical pharmacokinetics and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. *Phytother Res PTR* 22:169–179. doi: 10.1002/ptr.2277
- Rimando AM, Kalt W, Magee JB, et al (2004) Resveratrol, Pterostilbene, and Piceatannol in *Vaccinium* Berries. *J Agric Food Chem* 52:4713–4719. doi: 10.1021/jf040095e
- Rivière C, Pawlus AD, Mérillon J-M (2012) Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Nat Prod Rep* 29:1317–1333. doi: 10.1039/c2np20049j
- Roupe K, Halls S, Davies NM (2005a) Determination and assay validation of pinosylvin in rat serum: application to drug metabolism and pharmacokinetics. *J Pharm Biomed Anal* 38:148–154. doi: 10.1016/j.jpba.2004.12.015
- Roupe K, Teng XW, Fu X, et al (2004) Determination of piceatannol in rat serum and liver microsomes: pharmacokinetics and phase I and II biotransformation. *Biomed Chromatogr BMC* 18:486–491. doi: 10.1002/bmc.342
- Roupe KA, Helms GL, Halls SC, et al (2005b) Preparative enzymatic synthesis and HPLC analysis of rhapontigenin: applications to metabolism, pharmacokinetics and anti-cancer studies. *J Pharm Pharm Sci Publ Can Soc Pharm Sci Soc Can Sci Pharm* 8:374–386
- Roupe KA, Yáñez JA, Teng XW, Davies NM (2006) Pharmacokinetics of selected stilbenes: rhapontigenin, piceatannol and pinosylvin in rats. *J Pharm Pharmacol* 58:1443–1450. doi: 10.1211/jpp.58.11.0004
- Sangsen Y, Wiwattanawongsa K, Likhitwitayawuid K, et al (2015) Modification of oral absorption of oxyresveratrol using lipid based nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 131:182–190. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.04.055
- Sebastià N, Soriano JM, Montoro A, et al (2012) Resveratrol in berries: A review. In: *Berries: Properties, Consumption and Nutrition*. pp 37–53

- Setoguchi Y, Oritani Y, Ito R, et al (2014) Absorption and metabolism of piceatannol in rats. *J Agric Food Chem* 62:2541–2548. doi: 10.1021/jf404694y
- Shao X, Chen X, Badmaev V, et al (2010) Structural identification of mouse urinary metabolites of pterostilbene using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM* 24:1770–1778. doi: 10.1002/rcm.4579
- Shen T, Wang X-N, Lou H-X (2009) Natural stilbenes: an overview. *Nat Prod Rep* 26:916–935. doi: 10.1039/b905960a
- Sirerol JA, Rodríguez ML, Mena S, et al (2016) Role of Natural Stilbenes in the Prevention of Cancer. In: *Oxid. Med. Cell. Longev.* <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/3128951/>. Accessed 3 Jan 2018
- Sun Y, Wu X, Cai X, et al (2016) Identification of pinostilbene as a major colonic metabolite of pterostilbene and its inhibitory effects on colon cancer cells. *Mol Nutr Food Res* 60:1924–1932. doi: 10.1002/mnfr.201500989
- Tani H, Hikami S, Iizuna S, et al (2014) Pharmacokinetics and safety of resveratrol derivatives in humans after oral administration of melinjo (*Gnetum gnemon* L.) seed extract powder. *J Agric Food Chem* 62:1999–2007. doi: 10.1021/jf4048435
- Vang O, Ahmad N, Baile CA, et al (2011) What is new for an old molecule? Systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One* 6:e19881. doi: 10.1371/journal.pone.0019881
- Vitrac X, Bornet A, Vanderlinde R, et al (2005) Determination of stilbenes (delta-viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, epsilon-viniferin) in Brazilian wines. *J Agric Food Chem* 53:5664–5669. doi: 10.1021/jf050122g
- Vitrac X, Monti J-P, Vercauteren J, et al (2002) Direct liquid chromatographic analysis of resveratrol derivatives and flavanonols in wines with absorbance and fluorescence detection. *Anal Chim Acta* 458:103–110. doi: 10.1016/S0003-2670(01)01498-2
- Walker J, Schueller K, Schaefer L-M, et al (2014) Resveratrol and its metabolites inhibit pro-inflammatory effects of lipopolysaccharides in U-937 macrophages in plasma-representative concentrations. *Food Funct* 5:74–84. doi: 10.1039/c3fo60236b
- Willenberg I, Brauer W, Empl MT, Schebb NH (2012) Development of a rapid LC-UV method for the investigation of chemical and metabolic stability of resveratrol oligomers. *J Agric Food Chem* 60:7844–7850. doi: 10.1021/jf302136t
- Willenberg I, Michael M, Wonik J, et al (2015) Investigation of the absorption of resveratrol oligomers in the Caco-2 cellular model of intestinal absorption. *Food Chem* 167:245–250. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.103
- Yeo SCM, Ho PC, Lin H-S (2013a) Pharmacokinetics of pterostilbene in Sprague-Dawley rats: the impacts of aqueous solubility, fasting, dose escalation, and dosing route on bioavailability. *Mol Nutr Food Res* 57:1015–1025. doi: 10.1002/mnfr.201200651
- Yeo SCM, Luo W, Wu J, et al (2013b) Quantification of pinosylvin in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a pre-clinical pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 931:68–74. doi: 10.1016/j.jchromb.2013.05.023
- Zamora-Ros R, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, et al (2008) Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort. *Br J Nutr* 100:188–196. doi: 10.1017/S0007114507882997
- Zhang W, Li Q, Zhu M, et al (2008) Direct determination of polydatin and its metabolite in rat excrement samples by high-performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 56:1592–1595
- Zhaxi M, Chen L, Li X, et al (2010) Three major metabolites of mulberroside A in rat intestinal contents and feces. *Planta Med* 76:362–364. doi: 10.1055/s-0029-1186160
- Zheng Q, Wu H, Guo J, et al (2013) Review of Rhubarbs: Chemistry and Pharmacology. *Chin Herb Med* 5:9–32. doi: 10.7501/j.issn.1674-6384.2013.01.003

Zhou M, Chen X, Zhong D (2007) Simultaneous determination of trans-resveratrol-3-O-glucoside and its two metabolites in rat plasma using liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 854:219–223. doi: 10.1016/j.jchromb.2007.04.025

Zhou S, Yang R, Teng Z, et al (2009) Dose-dependent absorption and metabolism of trans-polydatin in rats. *J Agric Food Chem* 57:4572–4579. doi: 10.1021/jf803948g

4. Hémisynthèse des stilbènes

L'hémisynthèse consiste à synthétiser chimiquement une molécule à partir d'un composé naturel provenant d'un organisme vivant, notamment des plantes dans la plupart des cas, ou d'autres sources naturelles. Le recours à l'hémisynthèse est souvent nécessaire pour obtenir des molécules retrouvées en faible quantité dans la nature, ou dont l'obtention par les moyens naturels est difficile ou non transposable à l'échelle industrielle. Elle est également pratiquée pour des raisons économiques, la synthèse chimique de certains composés étant souvent moins coûteuse que l'extraction à partir de sources naturelles. Enfin, l'hémisynthèse permet d'obtenir de nouveaux composés introuvables à l'état naturel. Cette technique trouve toute son importance dans le domaine pharmaceutique, pour la synthèse de principes actifs d'origine naturelle. L'hémisynthèse du taxol en est un exemple phare : alcaloïde anticancéreux isolé à partir de l'écorce de *Taxus brevifolia* (if du Pacifique), son usage a été vite confronté à un manque d'approvisionnement (Kingston, 2007). L'écorce étant une partie végétative pérenne et indispensable à la survie de l'arbre, la prélever impliquait la perte du spécimen, la nécessité de le remplacer par un nouveau plant et d'attendre plusieurs années avant d'avoir une quantité d'écorces suffisante. S'ajoute à cela la faible teneur du composé dans l'écorce. Les essais d'hémisynthèse débutent alors et c'est en France que les résultats les plus prometteurs sont obtenus. A partir de la 10-désacétylbaccatine III extraite des aiguilles de *Taxus baccata* (if européen), des analogues du taxol sont obtenus par estérification et oxyamination après réaction avec l'acide cinnamique (Denis et al., 1988). Cette hémisynthèse a également permis d'obtenir un nouveau composé encore plus actif que le taxol, le taxotère (Guéritte-Voegelein et al., 1986) (Earhart, 1999). Ces protocoles d'hémisynthèse sont d'ailleurs toujours en cours d'utilisation pour la production de ces alcaloïdes anticancéreux.

Outre ce rôle primordial que joue l'hémisynthèse en santé humaine, elle est également un outil efficace pour l'exploration des composés naturels et leur identification. En mimant certaines réactions survenant lors de la biosynthèse des métabolites secondaires dans la nature, les chercheurs sont parvenus à établir les liens entre les différentes molécules et à élucider les réactions de biosynthèse régissant leur production. De plus, l'hémisynthèse et la caractérisation de certaines molécules non encore identifiées dans la nature permet de procéder à leur identification et à leur isolement dans les organismes où elles pourraient potentiellement être produites. Cela dit, les paragraphes suivants porteront principalement sur l'état de l'art et les avancées concernant l'hémisynthèse des stilbènes.

4.1. Peroxydation enzymatique

4.1.1. Peroxydases de raifort et du soja

Les premiers essais d'hémisynthèse conduits sur les stilbènes, notamment le resvératrol et l' ϵ -viniférine, ont été effectués par voie enzymatique, dans le but de valider le rôle de ces deux molécules comme précurseurs des autres stilbènes oligomériques formés par couplage oxydatif. Les essais se sont d'abord concentrés sur le resvératrol dans le but de prouver sa dimérisation en ϵ -viniférine. Cette réaction d'oxydation du resvératrol par le peroxyde d'hydrogène est catalysée par la peroxydase de raifort (HRP, de l'anglais *Horseadish peroxidase*) (Rappoport, 2004). Cependant, les premiers essais n'ont pas permis la synthèse de l' ϵ -viniférine, mais celle de deux autres dimères contenant un noyau dihydrobenzofurane, dont la δ -viniférine, avec des rendements compris entre 41 et 73% (Langcake and J. Pryce, 1977). D'autres travaux de mise au point impliquant la HRP parviennent également à produire la δ -viniférine avec un rendement remarquable de 89% à pH 8 (Li et al., 2012). Ce rendement est le résultat d'une optimisation du pH de la réaction enzymatique, qui s'avère être un moyen de contrôle efficace de la régio-sélectivité du couplage oxydatif. Alors qu'à pH 8, c'est la δ -viniférine qui est presque exclusivement obtenue, à pH 6 on observe majoritairement la formation des léachianols F/G, et du pallidol à pH 4. Dans une autre étude, l'utilisation d'une autre enzyme, la peroxydase du soja, dans de l'éthanol, conduit non seulement à la formation de la δ -viniférine, mais également du pallidol, des quadrangularines B et C et des léachianols F et G, avec des rendements compris entre 5 et 12% pour chaque composé (Takaya et al., 2005).

Pour obtenir l' ϵ -viniférine par voie enzymatique à partir du resvératrol, c'est une autre enzyme, une stilbène-oxydase semblable à la laccase de *B. cinerea*, qui s'est montrée très efficace, avec un rendement supérieur à 90% (Pezet, 1998). Les raisons de cette régio-sélectivité spécifique restent à préciser, étant donné que les autres enzymes dimérisant le resvératrol catalysent le couplage 3 – 8' donnant la δ -viniférine.

Par la suite, des travaux ont tenté de valider le rôle de précurseur de l' ϵ -viniférine dans la biosynthèse des oligomères de haut poids moléculaire. Dans des conditions similaires à celles décrites pour le resvératrol, le couplage de l' ϵ -viniférine a permis la production de plusieurs tétramères selon différents couplages : un couplage 3 – 8' qui a produit les vitisines B et C (6 et 3% respectivement), et un couplage 8 – 8' qui a produit l'hopéaphénol et l'isohopéaphénol (9 et 1% respectivement). Ces réactions enzymatiques sont assez rapides (15 minutes) et se font à température ambiante (Takaya et al., 2002). Ainsi, le couplage oxydatif de l' ϵ -viniférine et du resvératrol sous l'action de la HRP, produit les resviniférines A et B, deux trimères, dans un mélange eau/acétone (Wilkens et al., 2010). Dans une autre

étude, cette même réaction produit le miyabénol C et la gnétine H, également avec des rendements faibles de 3,4 et 3,3%, respectivement (Jiang et al., 2012).

Le principal mécanisme réactionnel proposé repose sur la déshydrogénation du resvératrol et de l' ϵ -viniférine catalysée par l'enzyme. Ces composés subissent alors différents réarrangements pour former des radicaux capables de réagir entre eux par l'intermédiaire de couplages, aboutissant aux divers dimères et trimères obtenus, comme pour la voie de biosynthèse des stilbènes (Zhang et al., 2017). Ces travaux ont permis une meilleure compréhension des mécanismes de biosynthèse des oligomères dérivés du resvératrol et de souligner l'importance du rôle de l' ϵ -viniférine.

4.1.2. Utilisation du sécrétome enzymatique de *Botrytis cinerea*

Comme évoqué précédemment, *B. cinerea* est capable d'oligomériser le resvératrol auquel il est exposé dans la baie de raisin. Ce couplage oxydatif du resvératrol, assuré par les stilbène-oxydases et laccases de *B. cinerea*, serait un moyen de contrer l'action inhibitrice du resvératrol sur le développement du champignon. Les essais *in vitro* ont permis d'identifier trois nouveaux dimères, produits sous l'action oxydative de *B. cinerea* : restrytisol A, B et C ; trois autres dimères ont été également produits : δ -viniférine, léachianol F et pallidol (Cichewicz et al., 2000). Ces dimères sont formés selon le couplage 8 – 8', sauf pour la δ -viniférine (3 – 8'). Cependant, la δ -viniférine est l'un des stilbènes antifongiques les plus puissants, et sa production a nécessairement un effet inhibiteur sur le champignon et remettrait en cause l'effet protecteur de cette oxydation du resvératrol. L'une des hypothèses proposées évoque l'existence d'étapes supplémentaires dans ce métabolisme fongique des stilbènes dont le but est de neutraliser les oligomères formés pour protéger le champignon.

Récemment, le sécrétome de *B. cinerea* a permis l'hémisynthèse de plusieurs dimères du resvératrol et du ptérostilbène. La réaction enzymatique était totale au bout de 5 heures. En plus des dimères évoqués dans les études précédentes, cinq nouveaux dimères issus du ptérostilbène, ainsi que le léachianol G et six nouveaux dimères hybrides du resvératrol et du ptérostilbène, ont été obtenus. L'hémisynthèse de ces dimères a mis en jeu trois modes de couplage différents : 3 – 8', 8 – 8' et 8 – 4' (Gindro et al., 2017).

4.2. Couplage oxydatif des stilbènes catalysé par les sels de métaux

4.2.1. Hémisynthèse de l' ϵ -viniférine à partir du resvératrol

L'utilisation des sels de métaux pour l'oxydation des phénols est apparue par la suite et s'est avérée être un moyen relativement efficace. Cependant la nécessité d'utiliser une quantité stœchiométrique lors des réactions reste le facteur limitant dans l'utilisation à l'échelle industrielle de cette voie d'hémisynthèse. Le chlorure de fer (FeCl_3) a été longtemps utilisé pour oxyder les phénols. Cette oxydation par le Fe (III) passe par la formation d'un radical phénoxy, suite à un transfert unique d'électron du phénol vers le métal et la perte d'un H^+ . La formation de ce radical rend donc possible le couplage de type C – C

nécessaire pour la formation d'oligomères du resvératrol. Ces réactions d'oxydation des phénols nécessitent souvent une quantité de sels de métaux supérieure à la quantité équimolaire, et se font dans un solvant. Cependant, certaines réactions menées dans des milieux solides se sont déroulées plus rapidement qu'en milieu liquide, tout en donnant de meilleurs rendements (Rappoport, 2004). Cette amélioration du rendement est prouvée pour le chlorure de fer hexahydraté ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) utilisé pour le couplage oxydatif des phénols en milieu solide, sans utilisation de solvant, à condition de chauffer le milieu réactionnel à 50°C , ce qui permet le déroulement de la réaction en deux heures, contre une durée de plusieurs jours à température ambiante. L'agitation n'est pas un facteur d'amélioration du rendement dans ce cas (Toda et al., 1989). Obtenir l' ϵ -viniférine par oxydation du resvératrol fut l'un des premiers objectifs des travaux retrouvés dans la littérature. Cependant, le recours aux sels de métaux n'a pas permis d'augmenter les rendements en ϵ -viniférine, qui étaient bien plus bas que ceux observés avec les réactions enzymatiques. L'utilisation du nitrate de thallium (III) $\text{Tl}(\text{NO}_3)_3$, dans le méthanol, a permis de produire de l' ϵ -viniférine avec un rendement de 30% (Takaya et al., 2005). Le couplage oxydatif du resvératrol en ϵ -viniférine peut aussi s'effectuer en utilisant le chlorure de Fer sous sa forme hexahydratée ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) dans le méthanol, avec un faible rendement de 13,5% (Zhang et al., 2017).

4.2.2. Hémisynthèse de la δ -viniférine à partir du resvératrol

A l'instar des réactions enzymatiques abordées plus tôt, la plupart des essais de dimérisation du resvératrol en utilisant des sels de métaux ont conduit à la formation de la δ -viniférine, souvent exclusivement, avec des rendements très satisfaisants, traduisant parfois une conversion presque totale du resvératrol. Parmi les sels de métaux utilisés, le sulfate de cuivre est le moins efficace, avec un rendement de 16% (Fan et al., 2009). Cependant, des rendements supérieurs à 80% sont observés avec l'acétate d'argent (AcOAg) (**Figure 10**), l'oxyde de manganèse (MnO_2) et le FeCl_3 (Sako et al., 2004) (Takaya et al., 2005). A partir de ces différents travaux, il a été établi que le sel de métal et le solvant utilisés pour effectuer la réaction conditionnent indéniablement le rendement de la réaction, sa vitesse ainsi que la nature des produits formés. Enfin, l'hémisynthèse de la δ -viniférine a également été effectuée en utilisant des réactifs organiques comme le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) avec un faible rendement de 18% (Wang et al., 1999), ou par des réactions photochimiques catalysées par le nitruire de carbone graphitique donnant un rendement élevé de 85% (Song et al., 2014).

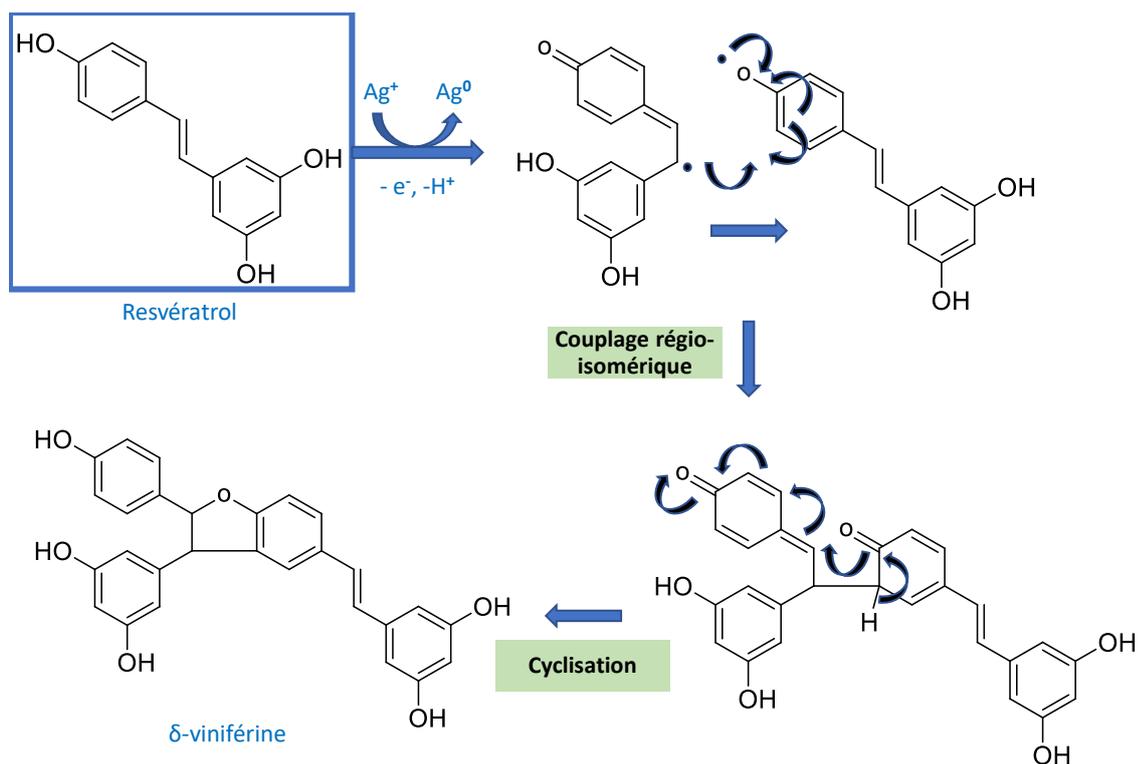


Figure 10. Couplage oxydatif du resvératrol catalysé par l'acétate d'argent. D'après Sako et al., 2004, modifié.

4.2.3. Orientation des réactions de couplage pour l'obtention de nouveaux oligomères

Bien que l'obtention de l' ϵ -viniférine via le couplage oxydatif *in vitro* du resvératrol ait toujours été l'objectif principal de la plupart des travaux publiés dans la littérature, en vue de l'utiliser comme précurseur pour la production de tétramères plus complexes, elle n'a jamais été le produit majoritaire de ces réactions, qu'elles soient enzymatiques ou chimiques. Un autre dimère, la δ -viniférine, se trouve souvent être le produit majoritaire de ces réactions. La formation de la δ -viniférine est le résultat du couplage en positions 3 – 8' de deux molécules de resvératrol (Keylor et al., 2015). Un des moyens pour contrôler la régio-sélectivité des réactions de couplage oxydatif par les métaux serait de faire varier le solvant et/ou le métal utilisés. En effet, les travaux de Velu et al. (2008) ont permis de montrer que pour un même sel de métal utilisé, les produits d'oxydation varient selon le solvant du milieu réactionnel. Ainsi, l'oxydation du ptérostilbène par FeCl₃ dans du dichlorométhane (CH₂Cl₂) produit du pallidol méthylé et de l'ampélopsine F, alors que mener la même réaction dans un mélange de CH₂Cl₂/Méthanol produit le tricuspidadol méthylé (Velu et al., 2008). Un autre moyen pour remédier au manque de sélectivité des réactions de couplage serait de protéger certains groupements du resvératrol pour modifier l'orientation de la réaction et espérer produire de nouveaux dimères. Le resvératrol peut

également être protégé par des groupements *tert*-butyl plus encombrants orientant la réaction vers un couplage 8 – 8'. Dans ce cas, le couplage oxydatif du resvératrol par des oxydants métalliques permet la production de trois dimères différents (Li et al., 2010), selon le métal et le solvant utilisés, après déprotection des dimères intermédiaires obtenus. Ainsi l'action oxydante de dérivés de l'argent ou du manganèse sur le resvératrol conduit à la quadrangularine A, avec un rendement plus élevé dans le dichlorométhane (CH_2Cl_2) qu'avec un mélange benzène-acétone. Par contre, l'oxydation du resvératrol avec le $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans le mélange benzène-acétone et le CH_2Cl_2 conduit au pallidol et à l'ampélopsine F, respectivement (Li et al., 2010). Dans ce travail, la protection des groupements du resvératrol ainsi que le choix du solvant et du métal sont autant de facteurs de contrôle de la réaction de couplage oxydatif. Pour conclure sur ces différents travaux, selon le dimère souhaité, il s'agira de choisir le couple métal/solvant optimal, tout en prenant en compte la protection de la molécule de départ capable d'orienter la réaction dans le sens désiré.

La synthèse totale d'oligomères du resvératrol, comme la quadrangularine A ou le pallidol, est également attestée dans la littérature (Matsuura et al., 2015) mais ne sera pas abordée dans ce travail.

Objectifs

Objectifs

A l'issue de cet exposé de l'état de l'art sur les stilbènes de la vigne et du vin, les objectifs de cette thèse peuvent être énoncés comme suit :

1. Mettre au point l'hémisynthèse d'oligomères de stilbènes de la vigne et du vin
2. Valoriser ces oligomères dans le domaine phytosanitaire : lutte contre les maladies de la vigne
3. Etudier la présence de ces composés dans le vin

Le premier objectif représente le fondement de ce travail, et consiste à optimiser et développer des réactions rapides et efficaces d'hémisynthèse de stilbènes de la vigne à haut poids moléculaire. En effet, les stilbènes à structure oligomérique semblent exercer une activité biologique plus élevée, notamment dans la lutte contre les maladies fongiques de la vigne. Cependant, leurs teneurs sont relativement faibles dans la vigne, souvent plus riche en monomères comme le resvératrol, et en dimères comme l' ϵ -viniférine, surtout au niveau des sarments. Il s'agira donc de produire des oligomères à partir de constituants qui sont le resvératrol et l' ϵ -viniférine, en appliquant des réactions de couplage oxydatif en présence de sels de métaux. En variant les conditions réactionnelles et les réactifs, ce travail vise à produire divers oligomères potentiellement valorisables en santé végétale et en santé humaine.

Le deuxième objectif consiste à valoriser certains des oligomères obtenus dans le but d'identifier des composés ou des mélanges de composés à forte activité antimicrobienne et antifongique contre deux agents pathogènes majeurs de la vigne, *Plasmopara viticola* et *Botrytis cinerea*. En cas d'efficacité, ces travaux pourraient contribuer à la production d'alternatives aux pesticides chimiques, dans le contexte actuel de limitation des intrants chimiques en viticulture. Ainsi, leur activité inhibitrice de la sporulation de *P. viticola* et du développement mycélien de *B. cinerea* sera testée *in vitro*.

Le troisième objectif s'intéresse aux stilbènes du vin, et vise à comprendre le devenir de ces composés dans certaines conditions d'élaboration, de conservation et d'élevage du vin. En se basant sur le couplage oxydatif du resvératrol effectué lors de la réaction d'hémisynthèse, la transformation oxydative du resvératrol dans le vin sera étudiée, dans le but de prouver sa faisabilité dans des conditions naturelles, et d'identifier les oligomères qui peuvent en découler. Une fois ces stilbènes obtenus, leur effet sur la santé sera évalué *in vitro*, notamment en termes d'activité anti-inflammatoire, pour déterminer l'impact de leur formation sur le potentiel d'activité des stilbènes du vin, connus pour leurs effets bénéfiques en santé humaine.

Chapitre I : Production d'un extrait enrichi en stilbènes oligomériques par hémisynthèse pour une application phytosanitaire

Chapitre I : Production d'un extrait enrichi en stilbènes oligomériques par hémisynthèse pour une application phytosanitaire

1. Stratégie

Les études menées à ce jour sur le potentiel antimicrobien et antifongique des stilbènes de la vigne affirment que les oligomères du resvératrol, notamment des dimères comme la δ -viniférine et plusieurs tétramères, sont les composés ayant la plus forte activité (Pezet et al., 2003) (Schnee et al., 2013). Ces formes à degré d'oligomérisation supérieur se concentrent souvent dans les parties pérennes de la vigne, à savoir le cep et les racines (Gabaston et al., 2017). Les sarments, bien que disponibles annuellement en grande quantité suite à la taille d'hiver des vignes, sont plutôt riches en resvératrol et ϵ -viniférine, composés moins actifs (Adrian et al., 1997) (Schnee et al., 2013). D'autre part, l'hémisynthèse d'oligomères du resvératrol et de l' ϵ -viniférine en utilisant des métaux est documentée depuis plusieurs années dans la littérature, avec des taux de réussite variables suivant les conditions et les objectifs établis (Keylor et al., 2015). La régio-sélectivité variable des réactions de couplage oxydatif des stilbènes pourrait être mise au profit de la production rapide et efficace de stilbènes présents en faible quantité à l'état naturel, obtenus selon des modes de couplage peu fréquents et surtout, ayant une plus forte activité antifongique et antimicrobienne. En suivant ce raisonnement, l'objectif du travail détaillé ci-après a été de mettre au point et de maîtriser des conditions réactionnelles du couplage oxydatif du resvératrol en s'inspirant de travaux antérieurs. Les produits ont été identifiés et leurs activités antimicrobienne et antifongique contre *P. viticola* et *B. cinerea* ont été évaluées. Par la suite, en se basant sur cet essai préliminaire, il a été question de transposer les conditions du couplage oxydatifs à un extrait de sarments de vigne, en vue de l'enrichir en stilbènes oligomériques et de produire un extrait efficace contre *P. viticola* et *B. cinerea*.

Les conditions des réactions de couplage oxydatif, l'identification des oligomères obtenus et les résultats concernant leurs activités biologiques sont discutés.

2. Présentation des travaux

2.1. Réaction de couplage : preuve de concept et application sur l'extrait de sarments

Le premier travail effectué a consisté à maîtriser et optimiser le couplage oxydatif du resvératrol en utilisant l'acétate d'argent (AcOAg). Cette réaction préalablement établie au Japon en 2004 (Sako et al., 2004) avait alors uniquement produit la δ -viniférine. Le choix du resvératrol provient de son abondance dans les sarments de vigne, de sa disponibilité sur le marché des substances chimiques et de son rôle d'unité de base pour la formation des oligomères. Quant au choix du sel métallique, il se base sur le rendement élevé de la réaction obtenu par Sako et al. (2004), atteignant 97%. Des essais préliminaires avec différents sels métalliques ont confirmé sa capacité à induire l'oligomérisation. De plus, la δ -viniférine étant l'un des composés les plus actifs contre *P. viticola*, son obtention au cours de l'enrichissement de l'extrait de sarment en oligomères est favorable à une activité biologique importante.

Plusieurs essais ont été menés pour reproduire la réaction de couplage du resvératrol. D'abord sur de petites quantités de resvératrol (10 mg), il a été question de varier la température de la réaction (30°C, 40°C, 50°C et 60°C). Le taux de conversion du resvératrol à 30°C a atteint 30%, avec une augmentation d'un facteur 2 à 40°C, avant d'atteindre 100% à 50°C. Il a ainsi été décidé de mener la réaction à 50°C, pendant une heure, durée suffisante pour permettre la conversion totale du resvératrol. En même temps, des changements du rapport stœchiométrique de la réaction ont été menés en vue de réduire la proportion en sel métallique. Cependant, la conversion du resvératrol n'a jamais été totale quand le rapport stœchiométrique était égal à 1, contrairement à ce qui a été observé au cours des travaux antérieurs. Il a fallu augmenter la proportion de l'AcOAg jusqu'à 1,5 fois pour assurer la conversion totale du resvératrol. Concernant le choix du solvant du milieu réactionnel, le méthanol a été utilisé pour son pouvoir solubilisant élevé sur le resvératrol et pour sa capacité à faciliter la réaction de couplage du resvératrol, pour aboutir aux meilleurs rendements en δ -viniférine (Sako et al., 2004). Enfin, l'agitation continue du mélange réactionnel a eu un impact décisif sur le rendement de la réaction, étant donné que le taux de conversion du resvératrol est de 60% en optimisant le reste des conditions sans agitation, alors qu'il atteint 100% en appliquant l'agitation. Le volume de méthanol a été fixé à 1 mL pour 10 mg de stilbènes, volume suffisant pour dissoudre les constituants du milieu réactionnel tout en évitant de trop les diluer. Ainsi, la sélection des conditions optimales a permis de faire un *scale-up* réussi en travaillant sur un à plusieurs grammes de resvératrol. Le même taux de conversion du resvératrol a été conservé, aux mêmes conditions et durée de réaction. Les atomes d'argent libérés de leur forme acétate au cours de la réaction se déposent sur les parois du ballon au cours de la réaction pour former un miroir d'argent, ce qui facilite leur élimination. La stabilisation de ce dépôt est renforcée par la centrifugation du milieu réactionnel en vue de récupérer uniquement le méthanol contenant les stilbènes. Trois lavages du dépôt d'argent suivis d'une centrifugation sont ensuite effectués pour récupérer tous les stilbènes. Le mélange réactionnel ainsi débarrassé des résidus peut être ensuite conditionné en vue de purifier les stilbènes par

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) préparative. Le rendement de la δ -viniférine est en nette diminution par rapport aux travaux antérieurs (Sako et al., 2004), passant de 97% à 57%, au profit d'autres dimères. Notons que les 4 dimères obtenus sont le résultat de trois modes de couplage différents (détaillés dans le paragraphe suivant).

Cette diversité ainsi que l'activité antifongique élevée du mélange réactionnel et des oligomères obtenus nous ont conduits à transposer cette réaction à un extrait de sarments de Cabernet Sauvignon et de Merlot. Cet extrait est issu du vinéatrol®, extrait de sarments enrichis en stilbènes fourni par la société ACTIchem (Montauban, France). Il a été obtenu par une extraction à l'acétate d'éthyle suivie par un fractionnement par chromatographie de partage centrifuge (CPC). L'objectif était d'obtenir un « extrait stilbénique pur » contenant principalement les deux composés majoritaires des sarments à savoir le resvératrol et l' ϵ -viniférine. Ainsi, une fraction contenant principalement de l' ϵ -viniférine et du resvératrol a été produite pour y appliquer la réaction de couplage oxydatif. La fraction utilisée contient également de la vitisine B, tétramère qui augmente son potentiel antifongique et antimicrobien de base (Gabaston et al., 2017). Pour réaliser la réaction de couplage oxydative sur cette fraction, il a fallu prendre en compte les proportions respectives du resvératrol et de l' ϵ -viniférine au sein de la fraction, pour adapter la quantité d'acétate d'argent nécessaire pour assurer une conversion totale des deux composés. La composition exacte en stilbènes de la fraction choisie a été déterminée par UPLC-MS (*Ultra Performance Liquid Chromatography* couplée à la spectrométrie de masse). La proportion stœchiométrique d'acétate d'argent a été maintenue à 1,5 par rapport aux deux stilbènes majoritaires. Le défi de ce second travail d'hémisynthèse résidait non seulement dans la reproduction des conditions permettant la conversion totale du resvératrol et de l' ϵ -viniférine conjointement en oligomères, mais également dans la complexité du milieu réactionnel, formé d'un mélange de plusieurs molécules, augmentant ainsi les probabilités de couplages différents et aboutissant à un mélange complexe de produits finaux. Ainsi, les différents essais entrepris sur 20 mg ont révélé la seule nécessité de doubler la durée de la réaction, qui atteint alors deux heures, pour assurer la conversion totale du resvératrol et de l' ϵ -viniférine.

2.2. Identification des oligomères obtenus

A l'issue du couplage oxydatif du resvératrol pur, quatre dimères ont été séparés par HPLC préparative. Le mélange réactionnel ainsi que les composés purifiés ont été analysés par UPLC-MS, spectrométrie de masse Q-ToF et ^1H - ^{13}C NMR, en vue de déterminer leurs caractéristiques spectrales, leur masse moléculaire exacte et leur structure chimique. Les résultats obtenus sont présentés dans la publication « *Stilbene extract produced by oxidative coupling as alternative to resveratrol against *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea* for vine treatments* » au paragraphe 3 de ce chapitre. Le composé majoritaire est la δ -viniférine, avec un rendement de 57%. Cette diminution significative du rendement de la δ -viniférine, formée par un couplage 3 – 8' de deux molécules de resvératrol, s'est faite au profit

de la formation de trois autres dimères, préalablement identifiés dans la littérature (**Figure 11**). Parmi ces dimères se trouvent l'oxistilbénine A et l'oxistilbénine B, deux isomères formés par le couplage oxydatif C – O entre la position 8 d'un premier radical phénoxy et la fonction *para*-quinone en position 4' d'un second radical, ayant un rendement total de 32%, avec une prédominance de l'oxistilbénine A. Le dernier dimère, présent en petite quantité, est la parthénostilbénine B, formée selon le mode de couplage 8 – 8', avec un rendement de 6%. La formation du mélange isomérique d'oxistilbénines A et B est en lien direct avec l'utilisation du méthanol comme solvant constitutif du milieu réactionnel. En effet, au moment du couplage des deux radicaux phénoxyes issus du resvératrol, le méthanol se greffe en position 7 du premier radical qui subit alors une *O*-méthylation qui se conserve lors de la cyclisation intramoléculaire des deux radicaux couplés et la stabilisation de la molécule. Le méthanol est donc non seulement un solvant, mais également un réactif.

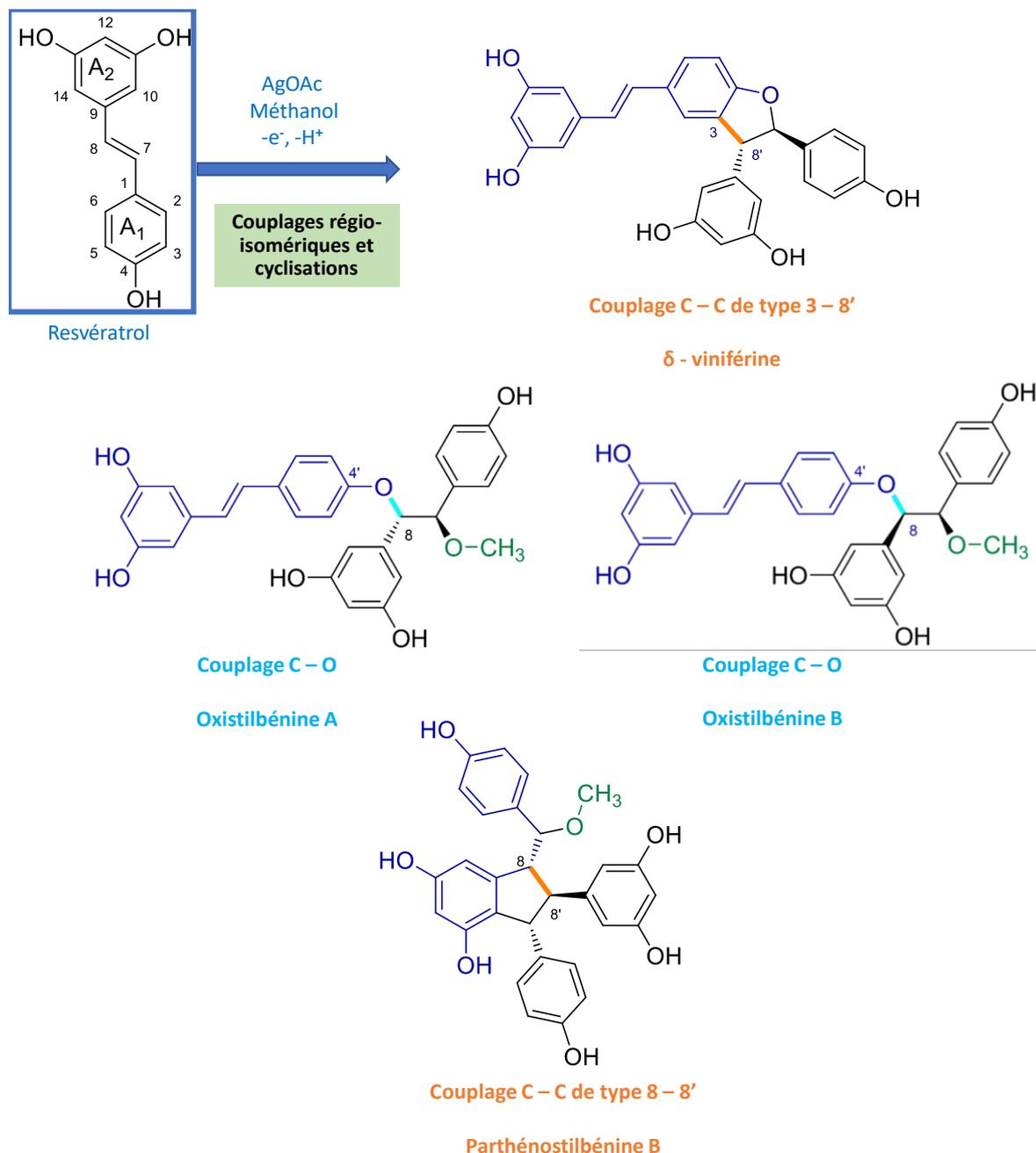


Figure 11. Différents types de couplages régio-isomériques mis en jeu lors de la réaction de couplage oxydatif du resvératrol dans le méthanol en présence d'acétate d'argent.

En utilisant les mêmes techniques de chimie analytique, la purification des différents oligomères produits par le couplage oxydatif de la fraction de stilbènes d'extrait de sarment, révèle la formation de douze oligomères différents : trois dimères, six trimères et trois tétramères. Les résultats obtenus ont fait l'objet de la publication « *New active stilbenes against vine pathogens from oxidative coupling of grapevine extract* » présentée dans le paragraphe 4 de ce chapitre. Parmi eux, dix composés ont été

identifiés, dont quatre pour la première fois : la *trans*-oxistilbénine C, la *trans*-oxistilbénine D, la *trans*-oxistilbénine E et la *cis*-oxistilbénine E (**Figure 12**). La séparation des différents oligomères montre que la formation de dimères à partir du resvératrol est toujours possible, malgré le couplage qui s'effectue entre les radicaux phénoxyles et l' ϵ -viniférine. Ainsi, les radicaux phénoxyles issus du resvératrol interagissent toujours pour former la δ -viniférine et les oxistilbénines A et B, comme évoqué précédemment, et représentent 24% du total des oligomères formés. Par contre, la parthénostilbénine B obtenue précédemment n'a pas été isolée, soit à cause de son faible rendement, soit à cause de l'orientation de la réaction qui favorise d'autres couplages. Quant aux trimères formés, ils sont issus de la réaction entre le resvératrol et l' ϵ -viniférine selon différents modes de couplage C – C ou C – O (**Figures 3 et 4**). Dans le cas de la *trans*-oxistilbénine C, l' ϵ -viniférine oxydée et passée sous la forme *para*-quinone méthide semble piéger le resvératrol, en position 8', par substitution électrophile, avant de subir une cyclisation intramoléculaire de Friedel et Crafts. Dans le cas de la resviniférine A, retrouvée sous ses deux formes *Z* et *E*, le resvératrol et l' ϵ -viniférine subissent un couplage oxydatif de type 3 – 8'. Quant à la *trans*-oxistilbénine D, elle se forme par l'attaque du resvératrol en position 8 par la forme *para*-quinone méthide issue de l' ϵ -viniférine, soit l'inverse de ce qui est observé pour la *trans*-oxistilbénine C. La cyclisation intramoléculaire est empêchée par l'*O*-méthylation du resvératrol en position 7, par addition d'une molécule de méthanol. Enfin, l'oxistilbénine E se forme par couplage oxydatif de type 3' – 8 entre l' ϵ -viniférine et le resvératrol, avec apparition des deux isomères *Z* et *E*. Nous observons donc une grande diversité des mécanismes d'oligomérisation, alliant couplages oxydatifs, substitutions électrophiles et cyclisations intramoléculaires. Les trois oligomères restants sont des tétramères : la vitisine B et d'autres composés minoritaires qui n'ont pas pu être identifiés à ce stade. Sachant que la vitisine B était initialement présente en faible quantité, une part supplémentaire a été formée par dimérisation de l' ϵ -viniférine.

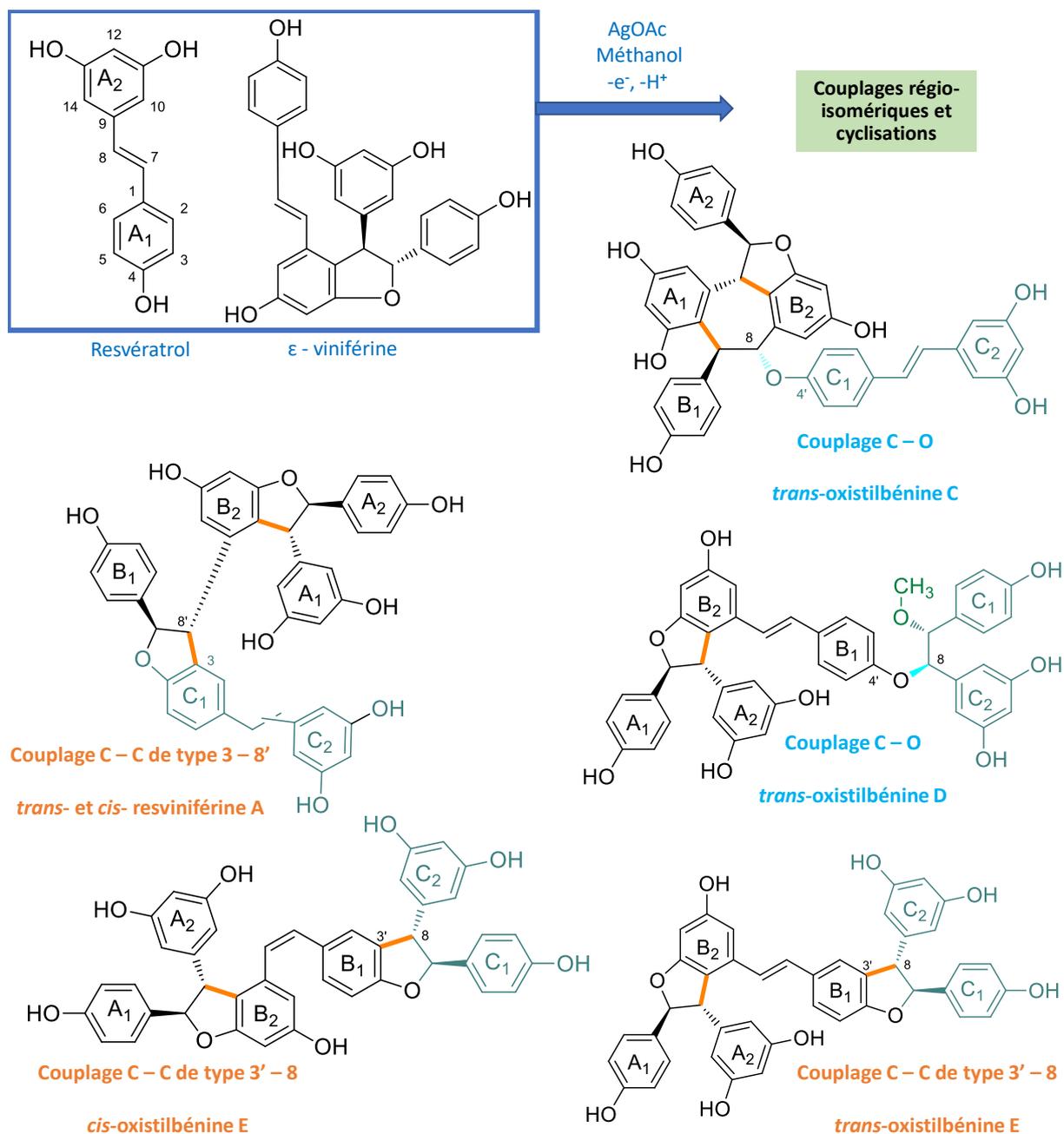


Figure 12. Produits spécifiques du couplage oxydatif du resvératrol et de l'ε-viniférine dans le méthanol en présence d'acétate d'argent, et leurs différents types de couplages régio-isomériques.

2.3. Potentiel phytopharmaceutique

A l'issue du travail d'hémisynthèse de dimères à partir du resvératrol, l'évaluation de l'activité antimicrobienne et antifongique des composés formés semblait nécessaire pour justifier l'utilité de cette réaction et révéler le potentiel phytopharmaceutique des oligomères du resvératrol. La vigne et le vin étant au cœur des thématiques de recherche au sein de l'ISVV, le choix des agents pathogènes se posa rapidement sur *P. viticola* et *B. cinerea*, responsables de deux maladies majeures de la vigne, et dont la manipulation est déjà d'usage au sein de notre équipe de recherche, dans le but de valoriser les stilbènes de la vigne. L'étude de l'activité de l'extrait du mélange réactionnel contenant tous les oligomères formés avait pour but de déterminer le niveau d'activité globale du produit, et l'intérêt de son utilisation sans purification supplémentaire de ses différents composants. Par la suite, l'étude des stilbènes purifiés était nécessaire pour identifier les molécules actives et tenter d'établir les relations structure-activité. De même pour l'extrait de sarments de vigne, qui a été testé sous sa forme finale obtenue par la réaction de couplage, et pour les principaux oligomères identifiés dans cet extrait et testés sous forme pure.

2.3.1. Inhibition de la sporulation de *Plasmopara viticola*

L'inhibition de la sporulation de *P. viticola* a été testée *in vitro* par application préventive des stilbènes sur des disques foliaires de Cabernet Sauvignon. Pour assurer leur solubilisation totale, les stilbènes ont été dissouts dans une solution aqueuse à 1% d'éthanol. Les solutions de stilbènes ont été pulvérisées sous forme de fines gouttelettes sur les disques foliaires, en utilisant un pulvérisateur manuel sous pression, pour une incubation de 24 heures. Ensuite, au moment d'inoculer les disques foliaires, les suspensions de sporanges de *P. viticola* ont été préparées à une concentration de 20 000 sporanges/mL. La souche utilisée est identifiée sous le nom d'ANN-01, et a été prélevée sur des pieds de vigne Ugni blanc en Charente, en 2015. L'inoculation consiste à déposer trois gouttes de suspension de 15 μ L chacune par disque foliaire, suivie d'une incubation de 24 heures à l'obscurité. A l'issue de cette incubation, les gouttelettes d'eau résiduelles sont éliminées par aspiration et les boîtes de pétri contenant les disques foliaires sont incubées pendant 7 jours en respectant une photopériode de 15/9 heures (lumière/obscurité) à une température de 25°C en présence de lumière, et 20°C à l'obscurité, pour favoriser le développement de *P. viticola* (**Figure 13**). L'évaluation de l'aire de sporulation s'est faite visuellement, avec pour référence l'aire de sporulation observée sur les disques témoins, non traités par des stilbènes. L'extrait de sarments de vigne (vinéatrol®) a été choisi pour servir de référence en termes d'activité, pour l'extrait d'oligomères issu du resvératrol (paragraphe 3 de ce chapitre), et pour la fraction d'extrait de sarments enrichie en oligomères par hémisynthèse (paragraphe 4 de ce chapitre). Pour cette dernière fraction, une comparaison est également effectuée avec l'activité de la fraction avant réaction de couplage. Ces essais ont été effectués en triplicats.

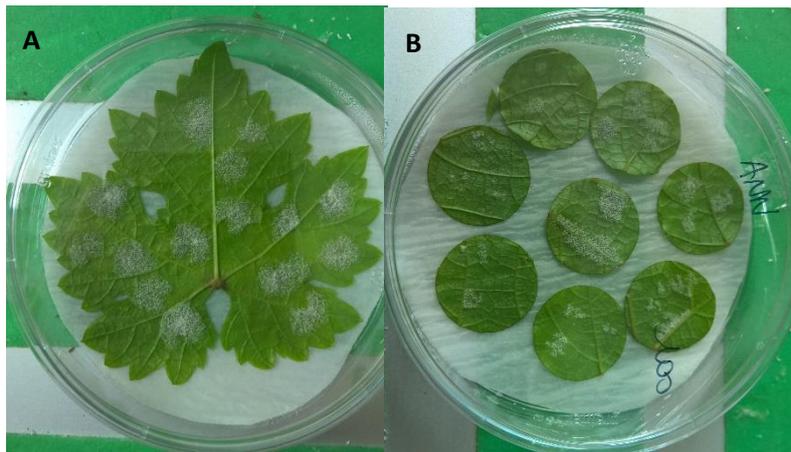


Figure 13. Exemple de culture de *Plasmopara viticola* sur feuille de vigne (A) et d'essai d'inhibition de sporulation sur disques foliaires (B)

Les résultats de ces essais montrent que le mélange d'oligomères issu du couplage du resvératrol est dix fois plus actif que l'extrait vinéatrol®, avec une CI_{50} de 20 mg/L, alors que la fraction d'extrait de sarments enrichie en oligomères est trois fois plus active que l'extrait vinéatrol®, avec une CI_{50} de 63 mg/L. Cette importante augmentation de l'activité est probablement due à la richesse du mélange issu du couplage du resvératrol en δ -viniférine, l'un des stilbènes antifongiques les plus actifs. Mais dans tous les cas, le gain d'activité considérable par rapport à l'extrait de sarments de vigne prouve d'abord que l'oligomérisation du resvératrol est en faveur de l'augmentation de son efficacité. Elle prouve aussi que l'hémisynthèse est un moyen rapide et efficace pour obtenir des extraits enrichis en stilbènes à fort potentiel phytopharmaceutique dans la prévention contre les attaques de *P. viticola*.

Concernant les oligomères testés à l'état pur, la δ -viniférine prédomine avec une CI_{50} de 24 mg/L. Cependant, l'hémisynthèse conduite dans ce travail a permis la formation de nouveaux oligomères à activité comparable voire plus importante que celle de la δ -viniférine, notamment la *trans*-oxistilbénine E et la *cis*-oxistilbénine E, qui présentent des CI_{50} de 21 mg/L et 23 mg/L respectivement, mais également l'oxistilbénine B (déjà identifiée), qui présente une CI_{50} de 30 mg/L, et la *trans*-oxistilbénine C, dont la CI_{50} est de 36 mg/L. En comparaison, le resvératrol et l' ϵ -viniférine, les deux précurseurs de ces oligomères, ont une activité plus faible, avec des CI_{50} de 99 et 72 mg/L, respectivement. Ceci est une preuve supplémentaire de l'aptitude de cette réaction de couplage oxydatif à potentialiser l'activité antifongique des stilbènes majoritaires dans les sarments de vigne, par oligomérisation. Enfin, concernant les tétramères, le seul composé étudié est la vitisine B, qui semble être le composé le plus actif, avec une CI_{50} de 13 mg/L. Son augmentation probable à l'issue de la réaction est en faveur de l'augmentation de l'activité de l'extrait final.

2.3.2. Inhibition du développement mycélien de *Botrytis cinerea*

Les essais de l'activité antifongique des stilbènes contre *B. cinerea* ont été menés *in vitro* sur milieu gélosé, en se basant sur des travaux antérieurs (Adrian et al., 1997). Le milieu de culture est composé de bouillon de dextrose-pomme de terre et d'agar, à 24 et 15 g/L, respectivement. Une fois préparé et stérilisé par autoclavage, il est conditionné dans un bain-marie à 50°C. Ensuite, le milieu est réparti dans des flacons de 15 mL, dans lesquels les solutions éthanoliques de stilbènes aux différentes concentrations testées ont préalablement été placées. Le volume de solution éthanolique représente 2% du volume total après mélange avec le milieu de culture. Cette teneur en éthanol n'affecte pas le développement de *B. cinerea*, comme le montre la comparaison de deux échantillons témoins, qui parviennent à croître normalement et de façon identique, bien que le premier soit cultivé sur un milieu exempt de stilbènes mais contenant 2% d'éthanol, alors que le second est cultivé sur un milieu de culture sans ajout d'éthanol ni de stilbènes. Ainsi, le milieu de culture enrichi en stilbènes est coulé dans des boîtes à 6 puits à raison de trois puits par concentration, sous conditions stériles pour éviter les contaminations par d'autres champignons. L'inoculum de *B. cinerea*, prélevé d'une culture sur milieu gélosé âgée de sept jours à l'aide d'un emporte-pièce de 5 mm de diamètre, est placé au centre du puits et les boîtes sont incubées à 22°C avec une photopériode de 12 heures. Enfin, l'appréciation de l'effet des stilbènes s'est faite par la mesure de l'aire de croissance mycélienne du champignon à deux reprises, 48 et 60 heures après inoculation du milieu de culture (**Figure 14**), en utilisant le logiciel de traitement d'image ImageJ®. Ces données ont permis de calculer la CI₅₀ des extraits et des stilbènes purs testés. Ces essais ont été effectués en triplicats. A l'instar des essais contre *P. viticola*, l'activité biologique des extraits et des stilbènes obtenus par couplage oxydatif a été comparée à celle de l'extrait de sarments et de sa fraction riche en resvératrol et ϵ -viniférine avant réaction, ainsi qu'à celle de ces deux composés précurseurs ayant servi à l'hémisynthèse des oligomères.

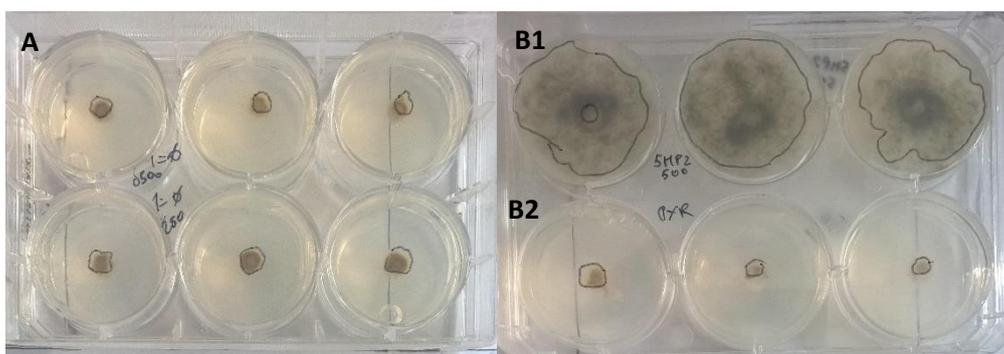


Figure 14. Exemple d'essais d'inhibition du développement mycélien de *Botrytis cinerea* par la δ -viniférine (A), de puits contrôle (B1) et d'inhibition par le pyriméthanyl (B2)

L'analyse des résultats montre que le mélange d'oligomères issu du couplage du resvératrol est environ seize fois plus actif que l'extrait vinéatrol®, avec une CI_{50} de 20 mg/L, identique à celle observée contre *P. viticola*. Quant à la fraction d'extrait de sarments de vigne enrichie en oligomères par couplage oxydatif du resvératrol et de l' ϵ -viniférine, elle est dix fois plus active que la fraction à l'état initial, et soixante-six fois plus active que l'extrait vinéatrol®, avec une CI_{50} de 5 mg/L, soit la plus basse CI_{50} de tous les extraits, que ce soit contre *P. viticola* ou *B. cinerea*. Le couplage oxydatif appliqué à la fraction d'extrait de sarment semble donc d'une grande valeur, permettant de produire un extrait très efficace contre *B. cinerea* et ce à très faible concentration. Aussi, cette fraction obtenue est plus active que chacun de ses constituants à l'état pur, ce qui pourrait être le signe d'un effet synergique entre les différents dimères, trimères et tétramères qui la composent, permettant l'inhibition efficace de *B. cinerea*. En tout cas, cette efficacité ne peut pas cette fois-ci être attribuée à la seule présence de δ -viniférine, l'oligomère le plus actif parmi ceux testés, cette dernière n'étant pas majoritaire au sein de la fraction et ayant une CI_{50} plus élevée.

Parmi les oligomères testés à l'état pur, la δ -viniférine et la vitisine B se démarquent avec les CI_{50} les plus basses, de 7 et 8 mg/L, respectivement. Contrairement à ce qui est observé dans les essais menés contre *P. viticola*, les autres oligomères formés sont moins actifs que la δ -viniférine. Cependant, certains présentent des CI_{50} similaires à celles observées contre *P. viticola* : la resviniférine A, la *cis*-oxistilbénine E et la *trans*-oxistilbénine E, dont les CI_{50} sont de 18, 21 et 23 mg/L, respectivement.

3. Première publication

Le travail sur le couplage oxydatif du resvératrol, considéré comme la preuve de concept ayant permis de continuer ce travail de recherche, a fait l'objet d'un article scientifique intitulé « *Stilbene extract produced by oxidative coupling as alternative to resveratrol against Plasmopara viticola and Botrytis cinerea for vine treatments* » accepté en janvier 2020 dans *OenoOne*.

Stilbene extract produced by oxidative coupling as alternative to resveratrol against *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea* for vine treatments

Toni El Khawand, Julien Gabaston, David Taillis, Marie-Laure Iglesias, Eric Pedrot, Antonio Palos-Pinto, Josep Valls Fonayet, Jean-Michel Mérillon, Stéphanie Cluzet, Alain Decendit, and Tristan Richard*

Univ. Bordeaux, ISVV, EA 4577, USC 1366 INRA, Unité de Recherche Œnologie, Molécules d'Intérêt Biologique, 210 chemin de Leysotte, F-33882 Villenave d'Ornon, France.

Abstract

Aim: Stilbenes are a group of polyphenols produced by grapevine and identified as phytoalexins. They contribute to the defence mechanisms of the plant under stress conditions. The main active compounds are oligomeric stilbenes. Nevertheless, the sourcing of these compounds is limited by plant raw material availability. In order to overcome this limitation, we proceeded to hemisynthesis of oligomeric stilbenes from natural resveratrol by oxidative coupling using metals. The reaction product extract and the obtained pure compounds were tested for their antimicrobial activity *in vitro* against *P. viticola* and *B. cinerea*, and compared with that of resveratrol and grapevine cane extract.

Methods and results: Hemisynthesis was achieved in methanol in the presence of silver acetate (AgOAc) as oxidative coupling reagent. Compound identification was confirmed using UPLC-MS and NMR spectroscopy. The efficiency of the extract and purified compounds was evaluated against *P. viticola* and *B. cinerea* using resveratrol and a grapevine canes extract as control. Results demonstrate the ability of oxidative coupling reaction of resveratrol to produce potent inhibitors of *P. viticola* and *B. cinerea*. The mixture is enriched in antimicrobial compounds with high potency as it is at least ten times more active than grapevine cane extract against *P. viticola*. In addition, this mixture reveals a high fungitoxicity against *B. cinerea* in contrast to the grapevine extract.

Conclusion: The present findings indicate that metals could be used for producing highly antimicrobial compounds from grapevine byproducts. The reaction mixture could be an alternative to natural resveratrol as phytoalexin.

Significance and impact of the study: Stilbenes are natural antifungal agents. The sourcing of these compounds remains complicate in term of large-scale use. In this study, we propose an alternative to produce active oligomeric stilbenes from natural resveratrol. This solution could be used to potentialize the activity of natural resveratrol using metals to protect crops.

Introduction

The use of chemical pesticides to protect crops is increasingly called into question nowadays, due to their damaging impact on human and ecosystems health. This problem is subject to much debate in winegrowing regions, where *Vitis vinifera* grapes and wine production depends on pesticides used to control grapevine microbial diseases. Two of the major diseases encountered in vineyard are the downy mildew, caused by *Plasmopara viticola*, and the grey mould caused by *Botrytis cinerea*. While converting to organic farming agriculture could be a successful strategy to dramatically reduce the use of chemical pesticides, substituents products are still lacking, and copper is also criticized for its negative impact on soils in long-term application. Hence, alternative curative solutions are necessary in order to achieve the reduction of pesticides use and to ensure the stability of wine production and economy worldwide. Some scientific researches have focused on plant extracts and derivatives, like grapevine stilbene extracts (Gabaston et al., 2017; Schnee et al., 2013). Stilbenes are a group of polyphenols produced in several plants and especially in grapevine (Pawlus et al., 2012; Rivière et al., 2012). Under stress conditions as pathogen attacks, stilbenes play the role of phytoalexins and thus are involved in the grapevine defense mechanisms (Gabaston et al., 2017; Langcake and Pryce, 1977; Pezet et al., 2003; Richard et al., 2016; Schnee et

al., 2013; Vrhovsek et al., 2012). Among stilbenes, oligomers of resveratrol, such as viniferins, are promising antimicrobial compounds (Gabaston et al., 2017). Even if these compounds are present grapevine byproducts (Gabaston et al., 2019), oligomeric stilbenes sourcing could be problematic in case of large-scale use such as crop treatment.

Resveratrol is a highly abundant natural stilbene, especially in canes, but above all it can be obtained in huge amount from other natural sources such as *Polygonum cuspidatum* (Vastano et al., 2000). Moreover, different studies report the production of oligomeric stilbenes from resveratrol hemisynthesis using metals (Keylor et al., 2015; Quideau et al., 2014; Snyder et al., 2011; Takaya et al., 2005). The main purpose of this work is to evaluate the ability of oxidative coupling of natural resveratrol to produce active antimicrobial oligomeric stilbenes as an alternative or complement of natural extracts. Hemisynthesis was achieved in methanol in the presence of silver acetate (AgOAc) as oxidative coupling reagent. Compound identification was confirmed using UPLC-MS and NMR spectroscopy. The efficiency of the extract and purified compounds was evaluated against *P. viticola* and *B. cinerea* using resveratrol and a grapevine canes extract.

Materials and Methods

1. Chemicals and instrumentation

All reagents were of analytical grade and used as received without further purification. The *trans*-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene, purity $\geq 99\%$) was purchased from Bulk Powders™ (Colchester, United Kingdom). Silver acetate (AgOAc, purity $\geq 99\%$) was purchased from Acros organics (Geel, Belgium). Grapevine cane extract (Vineatrol) was kindly provided by Actichem (Montauban, France) and produced using a mixture of Cabernet Sauvignon and Merlot cultivars grown in Bordeaux region (France). The extract contained mainly 15% resveratrol, 13% ϵ -viniferin, 4% ampelopsin A, 3% hopeaphenol, 2% ω -viniferin, 2% vitisin A, 2% vitisin B, 2% piceatannol and 2% miyabenol C (Biais et al., 2017; Müller et al., 2009). Resveratrol was extracted and purified from Vineatrol following the method described by Biais et al. (Biais et al., 2017). Methanol (CH₃OH, HPLC grade), ethanol (CH₂OH, HPLC grade), acetonitrile (CH₃CN, HPLC and LC-MS grades, purity $\geq 99.9\%$) and formic acid (HCOOH, 98/100%) were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, United Kingdom). Ultrapure water (8 M Ω .cm) was obtained from an Elga apparatus (High Wycombe, United Kingdom). Syringes were purchased from Millipore (Molsheim, France). The preparative HPLC was performed on a Gilson PLC 2050 apparatus (Middleton, WI, USA) equipped with an UV-VIS detector. Elution was conducted on an Agilent Zorbax SB-C18 column (21.2 mm x250 mm, 7 μ m). The reaction extract powder was solubilized at 50 mg.mL⁻¹ in MeOH-H₂O (50/50; v/v). Extract was then eluted with a flow rate of 20 mL.min⁻¹ using non-acidified ultrapure water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), according the following gradient: 30% B (0-2 min), 30-40% B (2-25 min), 40-100% B (25-26 min) and 100% B (26-31 min). The eluate was monitored at 280 and 306 nm and the fractions were automatically collected. The solvents were removed under reduced pressure and fractions were lyophilized. Compounds purity was measured using an UHPLC-DAD Agilent 1290 series apparatus (Santa Clara, Canada) equipped with an auto sampler module, a binary pump, a degasser, a column heater/selector and an UV-VIS-DAD. The elution was performed on an Agilent SB-C18 (2.1 mm x 100 mm, 1.8 μ m) column at a flow rate of 0.4 mL.min⁻¹, with acidified water (0.1% formic acid, solvent A) and acidified acetonitrile (0.1% formic acid, solvent B) according to the following gradient: 10% B (0.0-1.7 min), 10-20% B (1.7-3.4 min), 20-30% B (3.4-5.1 min), 30% B (5.1-6.8 min), 30-35% B (6.8-8.5 min), 35-60% B (8.5-11.9 min), 60-100% B (11.9-15.3 min), 100% B (15.3-17.0 min), 100-10%B (17-17.30 min). Samples were injected at a concentration of 100 μ g.mL⁻¹ after solubilization in H₂O/MeOH mixture (1/1, v/v). Purity of the isolated compounds was estimated to be $\geq 90\%$. The purified compounds structure was determined by ¹H-¹³C NMR, using a Bruker Avance III 600 NMR spectrometer (Rheinstetten, Germany).

2. Synthetic aspects

Based on the protocol described by Sako et al. (Sako et al., 2004), regioselective oxidative coupling of resveratrol (2.0 g, 40 mmol, 1.0 equiv.) using AgOAc (2.2 g, 60 mmol, 1.5 equiv.) as a metallic catalyst was conducted in MeOH (100%, 200 mL). The reaction mixture turned to an ash color as it was heated at 50°C and stirred for 1

hour. The reaction was then stopped by cooling at 4°C and centrifuged. The methanol fraction was collected and the solvent was removed under reduced pressure. The fraction residue was lyophilized to afford 2.0 g of a dark yellow powder. Produced compounds were isolated and identified using HPLC, UHPLC-DAD and NMR.

3. Bioassays

3.1. *Plasmopara viticola* sporulation inhibition

Grapevine leaves (*V. vinifera*, Cabernet Sauvignon cultivar) were collected from the upper part of the shoots of plants produced by wood-cutting propagation and grown in the INRA nursery (Villenave-d'Ornon, France), under controlled conditions of temperature (25/20°C, day/night) and humidity (75%) with a photoperiod of 15/9h (light/dark). The *P. viticola* isolate ANN-01 used in the assay was collected in 2015 from Ugni Blanc grapevine cultivar leaves in a commercial vineyard (Charente, France). To obtain the necessary quantity of pathogen material, an inoculum (sporangia suspension) of *P. viticola* sporulations stored at -20°C was prepared and grown on the collected Cabernet Sauvignon leaves for 7 days, before proceeding to the sporulation inhibition assay. Leaf disks are cut from Cabernet Sauvignon fresh leaves and treated with the stilbene solutions for 1 day before adding sporangia suspension (20 000 sporangia/mL). After 7 days of cultivation, downy mildew development was measured according to the density of mycelium and number of sporulation sites as Corio-Costet et al. (Corio-Costet et al., 2011).

3.2. *Botrytis cinerea* mycelium development inhibition

This *in vitro* assay is similar to Adrian et al. (Adrian et al., 1997). The culture medium was a mixture of potato dextrose broth (24 g.L⁻¹) and agar (15 g.L⁻¹) (PDA) purchased from Sigma (Saint-Louis, MO, USA), autoclaved at 120°C for 20 minutes. Ethanol solutions of the evaluated compounds were prepared at the concentrations of 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 and 50 mg.mL⁻¹. The compound solutions were then incorporated in the PDA medium (240 µL/12 mL, solution/medium) to obtain final concentrations of 5, 10, 20, 50, 100, 200 and 500 mg.L⁻¹. Six-well plates were used and each mixture was poured in 3 wells, 4 mL/well. A calibrated plug of mycelium of *B. cinerea* was then placed on the surface of culture medium, and the dishes were incubated at 22°C, with a photoperiod of 12/12h (light/dark). Measurements of the mycelium growth area were performed after 48 and 60h of incubation, leading to the calculation of the inhibition rate according to each concentration of the tested compounds and extracts, and hence determining IC₅₀ for each tested compound or extract.

Results and discussion

1. Production of oligomeric stilbenes

Natural resveratrol was purified from a commercial grapevine cane extract. The oxidative coupling reaction of natural resveratrol in presence of silver acetate (AgOAc) was used to produce oligomeric derivatives (Sako et al., 2004). The lyophilization of the reaction mixture led to a dark yellow soft powder. An analysis of reaction mixture was conducted through LC-MS analysis, indicating the synthesis of four main compounds and the absence of resveratrol (Figure 1 and Table 1). Preliminary experiments allowed us to note the stirring effect on the oxidative reaction (data not shown). Indeed, conducting the oxidative coupling of resveratrol under stirring condition had a major positive impact on the yield, since the reaction tests without stirring led to the transformation of only 60% of the resveratrol, whereas under stirring, 100% of the resveratrol reacted. Likewise, the total transformation of resveratrol is also due to the molar ratio of resveratrol to AgOAc 1:1.5 used in the reaction. In preliminary experiments, using reduced molar proportions of AgOAc resulted in a partial transformation of resveratrol.

No	Rt (min)	Compound name	Yield (%)	λ_{\max}	$[M-H]^-$	Fragments
1	6.5	parthenostilbenin B	6	280	485	453, 391, 359, 255
2	9.9	oxistilbenin A	21	310	485	453, 257, 227
3	10.0	oxistilbenin B	11	310	485	453, 257, 227
4	10.3	δ -viniferin	57	310	453	435, 411

Table 1. Peak number, retention time, compound name, yield, UV data (λ_{\max} in nm), and MS data (molecular ion and fragments in negative mode) of the identified compounds.

The chemical structures of the four purified compounds were obtained by NMR and MS analysis. $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectra, along with extensive COSY, HSQC, HMBC and ROESY experiments, showed that these four compounds correspond to different resveratrol dimers: parthenostilbenin B (**1**) (Kim et al., 2005), *threo*-5-[1-[4-[(1*E*)-2-(3,5-dihydroxyphenyl)ethenyl]phenoxy]-2-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyethyl]-1,3-benzenediol, named oxistilbenin A (**2**) (Zhang et al., 2014), *erythro*-5-[1-[4-[(1*E*)-2-(3,5-dihydroxyphenyl)ethenyl]phenoxy]-2-(4-hydroxyphenyl)-2-methoxyethyl]-1,3-benzenediol, named oxistilbenin B (**3**) (Zhang et al., 2014), and δ -viniferin (**4**) (Pezet et al., 2003). The δ -viniferin is the main compound produced (yield 57%) whereas parthenostilbenin B was obtained as residual compound (yield 6%).

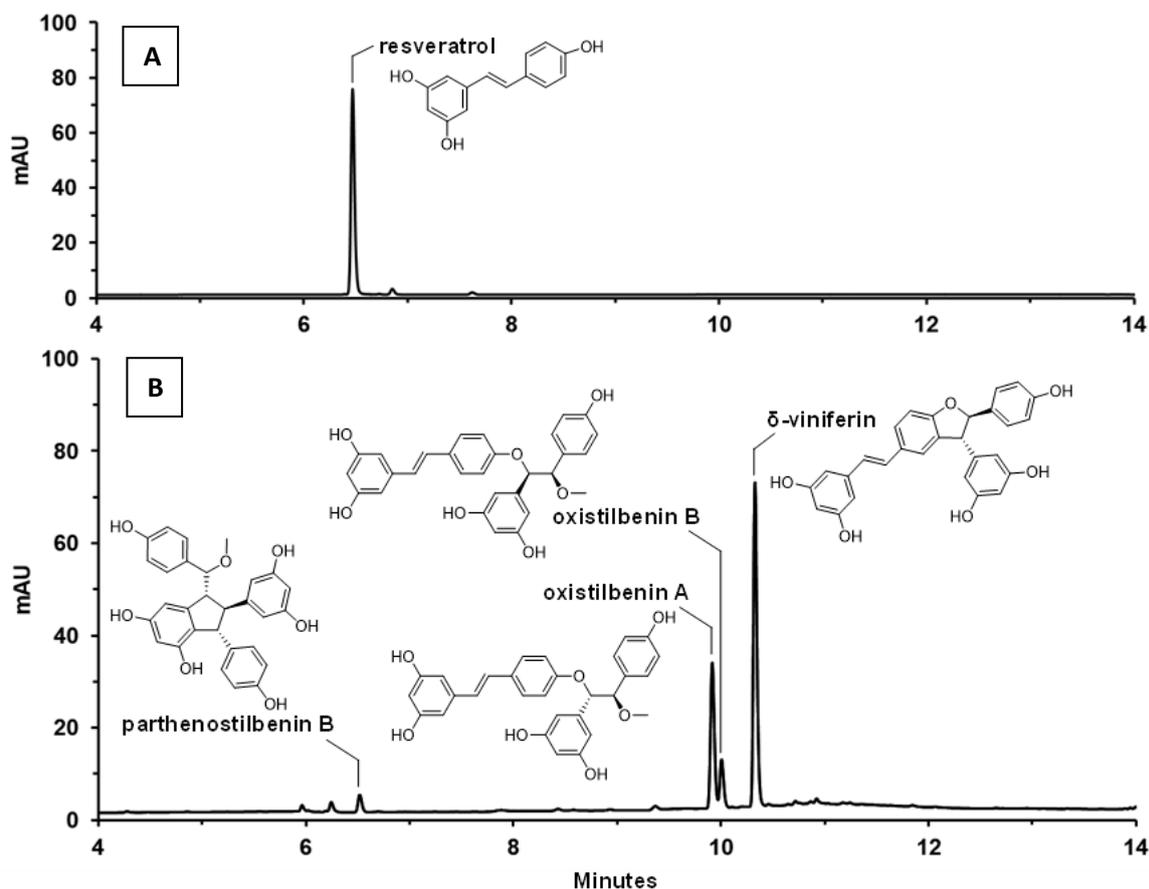


Figure 1. UHPLC-DAD chromatograms of resveratrol (A) and oxidative coupling reaction result (B) at 280 nm.

The optimization of the reaction conditions and the produced compounds presented in this work differ from the previous work of Sako and coauthors (Sako et al., 2004). They used a resveratrol:AgOAc 1:1 molar ratio and observed a complete transformation of resveratrol in δ -viniferin, with no mention of other dimers. This high regioselectivity of the dimerization reaction is not observed in the present work, since three other dimers were

formed, accounting for 37% of the total mixture (Table 1). Moreover, it is noteworthy that the resveratrol dimerization was solvent controlled. Indeed, except the δ -viniferin which has no substituents on its phenolic moieties, the three other dimers present an *O*-methylation, and this *O*-methyl moiety was provided by the methanol used in the reaction mixture. This observation aligns with those of Velu et al. who studied the impact of the solvent used during the reaction on the product distribution and structure (Velu et al., 2008). Another example of the solvent influence is found in Takaya et al. work on biomimic synthesis of resveratrol dimers in ethanol using soybean peroxidase (Takaya et al., 2005). Using ethanol as solvent, they obtained quadrangularin B and C and other resveratrol dimers with ethyl moiety as substituent. These dimers present the same chemical structure as parthenostilbenin B, except that the ethyl moiety is replaced by a methyl group, since the oxidative coupling was conducted in methanol. In addition Snyder et al. produced isoampelopsin D under acid conditions (MeOH, HCl) (Snyder et al., 2011), but no further *O*-methylation observed in parthenostilbenin B. These results confirm the reagent-controlled mechanisms of these dimerization reactions. Hence, while the chemoselective aspect of resveratrol dimers hemisynthesis can hardly be controlled, the solvent choice could be an option to promote the production of specific compounds among others. It is recalled that resveratrol dimers synthesis is based on oxidatively obtained phenyl radicals coupling, thus involving intermolecular and intramolecular cyclization. Depending on the regioisomeric positions involved in the radical coupling, various groups of dimers can be produced. In this study, the major regioisomeric mode was the connectivity 3-8', which generated δ -viniferin, and oxistilbenins, while the regioisomeric mode 8-8' was allowed the synthesis of the parthenostilbenin B. In comparison with oxistilbenins formation, δ -viniferin required a further intramolecular cyclization following the 3-8' intermolecular radical coupling, whereas oxistilbenins cyclization was prevented by the nucleophilic addition of a MeOH moiety on the double bond 7'-1'.

2. Antimicrobial activity on *Plasmopara viticola*

The goal of this is to produce active antimicrobial oligomers from resveratrol. In order to evaluate the preventive antimicrobial activity of the reaction mixture and the purified stilbenes against *P. viticola*, *in vitro* assays were conducted on grapevine leaves. Moreover, as controls and to allow comparison, resveratrol and grapevine cane extract (Vineatrol) were also tested. Leaves were treated with appropriated studied extract or molecules one day before zoospore inoculation. After incubation for 7 days, the sporulation area extent was visually evaluated to attribute a growth percentage. The growth measures led to the calculation of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀), which corresponds to the concentration that inhibits 50% of the *P. viticola* sporulation. The results were presented in Table 2 and Figure 2A.

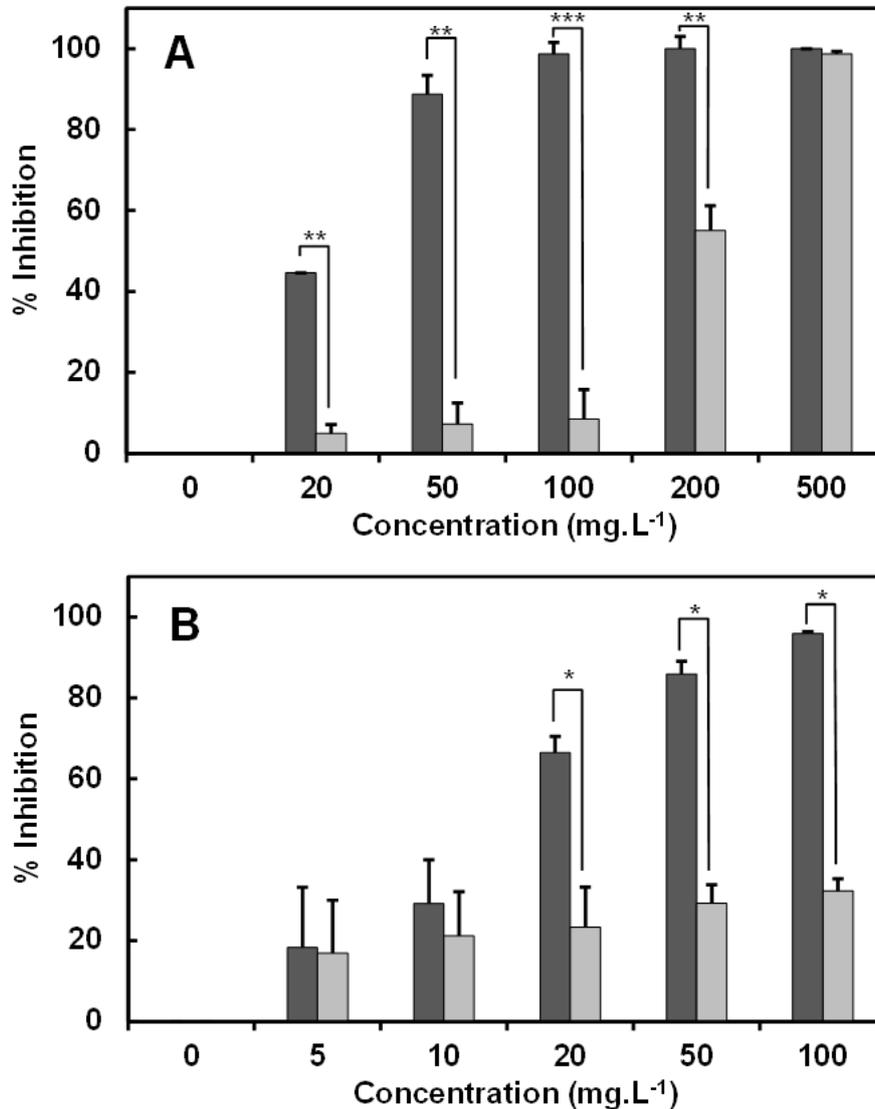


Figure 2. Effect of oxidative coupling reaction mixture and cane grapevine extract on *P. viticola* sporulation (A) and *B. cinerea* mycelial growth (B).

Results are expressed as means \pm SEM. Significant difference between each extract was set at *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, and * $p < 0.1$. Dark grey bar = oxidative coupling reaction mixture, and light grey bar = cane grapevine extract.

The reaction mixture and the grapevine cane extract used as reference were tested at different concentrations ranging from 10 to 500 mg.L⁻¹ (Figure 2A). No inhibition was observed in the control. The reaction mixture totally inhibited the development of *P. viticola* from 200 mg.L⁻¹, as did grapevine extract at 500 mg.L⁻¹ (Figure 2A). The results for the grapevine cane extract are in agreement with Gabaston et coauthors (Gabaston et al., 2017). Grapevine extract effectivity against downy mildew has been demonstrated *in vitro* (Schnee et al., 2013), in greenhouse and vineyard (Richard et al., 2016). The reaction mixture was ten times more potent than the cane extract, with IC₅₀ of 20 and 200 mg.L⁻¹, respectively (Table 2). This result confirms that some metals could be used to potentialize stilbene natural extracts rich in resveratrol.

The four main resveratrol oligomers formed into the reaction mixture were purified as described in Materials and Methods section. Oligomers along with their precursor compound, resveratrol, were tested at different concentrations, ranging from 10 to 500 μM . Data for IC_{50} were expressed both in mg.L^{-1} and in μM (Table 2). The lowest IC_{50} value was shown by δ -viniferin (53 μM) followed by oxistilbenin B (62 μM) and oxistilbenin A (125 μM). The parthenostilbenin B had nearly no inhibition effect on *P. viticola* sporulation. For resveratrol, IC_{50} was high, reaching 434 μM , which came in agreement with Gabaston et al. works (Gabaston et al., 2017), and confirmed again the low antimicrobial potency of resveratrol and its role as a precursor for the synthesis of effective stilbene oligomers. Our data concerning δ -viniferin are in contrast with those of Pezet and coauthors that reported a lower IC_{50} value (14.7 μM) for downy mildew development (Pezet et al., 2004). The variation in IC_{50} could be related to differences in the antimicrobial bioassays, such as the *P. viticola* strain used (Gabaston et al., 2017). Nevertheless, as in our results, δ -viniferin is one of the most potent toxic stilbenes against downy mildew development. In addition to δ -viniferin, this work led to identify oxistilbenin B as a new potent antimicrobial stilbene. Finally, no evident synergic effects were observed between the constituents of the reaction mixture.

	IC_{50}	R^2
cane extract	200	0.9886
reaction mixture	20	1
parthenostilbenin B (1)	Not identified	
oxistilbenin A (2)	61 (125 ^a)	1
oxistilbenin B (3)	30 (62 ^a)	1
δ -viniferin (4)	24 (53 ^a)	1
Resveratrol	99 (434 ^a)	1

^a concentration expressed in μM

Table 2. Concentration (mg.L^{-1}) of different compounds and extracts causing 50% inhibition of mildew development monitored by *P. viticola* sporulation.

3. Antifungal activity against *Botrytis cinerea*

Concerning grey mold, fungitoxicity of extracts and pure compounds was monitored using radial growth test. *B. cinerea* growth areas were measured leading to the calculation of the inhibition rate according to each concentration of the tested compounds and extracts, and hence determining IC_{50} . The results were presented in Table 3 and Figure 2B.

Efficacy of reaction mixture was compared to that of grapevine cane extract (Figure 2B). Interestingly, the reaction mixture is more active than the grape vine extract. The reaction mixture totally inhibited the development of *B. cinerea* from 100 mg.L^{-1} . Whereas grapevine extract presents a moderate efficacy as previously reported (Schnee et al., 2013). The reaction mixture had an IC_{50} of 20 mg.L^{-1} , over sixteen times lower than the one of the cane extract (332 mg.L^{-1}). The reduced toxicity of the grapevine extract against *B. cinerea* could be due to the presence of laccases in this fungus (Pezet et al., 1991).

	IC ₅₀	R ²
cane extract	332	0.9606
reaction mixture	20	0.9867
parthenostilbenin B (1)	135 (277 ^a)	0.9179
oxistilbenin A (2)	58 (119 ^a)	1
oxistilbenin B (3)	36 (74 ^a)	0.9675
δ-viniferin (4)	7 (15 ^a)	1
Resveratrol	98 (429 ^a)	1

^a concentration expressed in μM

Table 3. Inhibitory concentration 50% (mg.L⁻¹) of different compounds and extracts against *B. cinerea* mycelium development.

In addition, fungitoxicity of the four main constituents of oxidative coupling reaction was evaluated using resveratrol as control. Among the four main compounds of the reaction mixture, δ-viniferin presented the lowest IC₅₀ value (15 μM), followed by oxistilbenin B and A (74 and 119 μM, respectively). Whereas resveratrol and parthenostilbenin B were the less active compounds (IC₅₀ 429 and 277 μM, respectively). It should be noted that δ-viniferin is one of the most abundant stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves after inoculation with *B. cinerea* (Timperio et al., 2012).

Conclusion

To summarize, these results demonstrate the ability of oxidative coupling reaction of resveratrol to generate the production of potent inhibitors of *P. viticola* and *B. cinerea*. The reaction mixture could be an alternative to natural resveratrol as phytoalexin. The mixture is enriched in antimicrobial compounds with high potency as it is at least ten times more active than grapevine cane extract against *P. viticola*. In addition, this mixture reveals a high fungitoxicity against *B. cinerea* in contrast to the grapevine extract. The grapevine cane extract contains mainly resveratrol and ε-viniferin, which exhibited lowest antimicrobial effects, while the reaction mixture is mainly constituted of more active oligomeric stilbenes (δ-viniferin and oxistilbenins) against both *P. viticola* and *B. cinerea* development.

Acknowledgements: The authors gratefully thank Actichem (Montauban, France) for providing grapevine products. The work was supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

References

- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., A. Weston, L., Bessis, R., (1997). Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology* 23, 1689-1702.
- Biais, B., Krisa, S., Cluzet, S., Da Costa, G., Waffo-Teguo, P., Mérillon, J.M., Richard, T., (2017). Antioxidant and cytoprotective activities of grapevine stilbenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(24), 4952-4960.
- 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. *European Journal of Plant Pathology* 129(2), 315-329.
- 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*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65(13), 2711-2718.
- Gabaston, J., Leborgne, C., Waffo-Teguo, P., Valls, J., Palos Pinto, A., Richard, T., Cluzet, S., Mérillon, J.M., (2019). Wood and roots of major grapevine cultivars and rootstocks: A comparative analysis of stilbenes by UHPLC-DAD-MS/MS and NMR. *Phytochemical Analysis*.
- Keylor, M.H., Matsuura, B.S., Stephenson, C.R.J., (2015). Chemistry and biology of resveratrol-derived natural products. *Chemical Reviews* 115(17), 8976-9027.
- Kim, H.J., Saleem, M., Seo, S.H., Jin, C., Lee, Y.S., (2005). Two new antioxidant stilbene dimers, parthenostilbenins A and B from *Parthenocissus tricuspidata*. *Planta Medica* 71(10), 973-976.
- Langcake, P., Pryce, R.J., (1977). A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33(2), 151-152.
- 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), 1831-1836.
- Pawlus, A.D., Waffo-Tégou, P., Shaver, J., Mérillon, J.M., (2012). Stilbenoid chemistry from wine and the genus *Vitis*, a review. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 46(2), 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* 43.
- Pezet, R., Perret, C., Jean-Denis, J.B., Tabacchi, R., Gindro, K., Viret, O., (2003). δ -viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(18), 5488-5492.
- Pezet, R., Pont, V., Hoang-Van, K., (1991). Evidence for oxidative detoxication of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39(6), 441-450.
- Quideau, S., Deffieux, D., Pouységu, L., (2014). Oxidative coupling of phenols and phenol ethers, *Comprehensive Organic Synthesis: Second Edition*, pp. 656-740.
- Richard, T., Abdelli-Belhad, A., Vitrac, X., Waffo Teguo, P., Mérillon, J.-M., (2016). *Vitis vinifera* canes, a source of stilbenoids against downy mildew. *OENO One* 50(3), 137-143.
- Rivière, C., Pawlus, A.D., Mérillon, J.M., (2012). Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in Vitaceae. *Natural Product Reports* 29(11), 1317-1333.
- Sako, M., Hosokawa, H., Ito, T., Iinuma, M., (2004). Regioselective oxidative coupling of 4-hydroxystilbenes: synthesis of resveratrol and ϵ -viniferin (E)-dehydrodimers. *Journal of Organic Chemistry* 69(7), 2598-2600.
- 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*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(23), 5459-5467.
- Snyder, S.A., Gollner, A., Chiriac, M.I., (2011). Regioselective reactions for programmable resveratrol oligomer synthesis. *Nature* 474, 461.
- Takaya, Y., Terashima, K., Ito, J., He, Y.-H., Tateoka, M., Yamaguchi, N., Niwa, M., (2005). Biomimic transformation of resveratrol. *Tetrahedron* 61(43), 10285-10290.
- Timperio, A.M., D'Alessandro, A., Fagioni, M., Magro, P., Zolla, L., (2012). Production of the phytoalexins trans-resveratrol and delta-viniferin in two economy-relevant grape cultivars upon infection with *Botrytis cinerea* in field conditions. *Plant Physiology and Biochemistry* 50, 65-71.
- Vastano, B.C., Chen, Y., Zhu, N., Ho, C.-T., Zhou, Z., Rosen, R.T., (2000). Isolation and Identification of Stilbenes in Two Varieties of *Polygonum cuspidatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(2), 253-256.
- Velu, S.S., Buniyamin, I., Ching, L.K., Feroz, F., Noorbata, I., Gee, L.C., Awang, K., Wahab, I.A., Weber, J.-F.F., (2008). Regio- and stereoselective biomimetic synthesis of oligostilbenoid dimers from resveratrol analogues: influence of the solvent, oxidant, and substitution. *Chemistry--A European Journal* 14(36), 11376-11384.
- Vrhovsek, U., Malacarne, G., Masuero, D., Zulini, L., Guella, G., Stefanini, M., Velasco, R., Mattivi, F., (2012). Profiling and accurate quantification of trans-resveratrol, trans-piceid, trans-pterostilbene and 11 viniferins

Chapitre I : Production d'un extrait enrichi en stilbènes oligomériques par hémisynthèse pour une application phytosanitaire

induced by *Plasmopara viticola* in partially resistant grapevine leaves. Australian Journal of Grape and Wine Research 18(1), 11-19.

Zhang, Y., Xianfen, W., Hou, Q., Lin, M., Yao, C.-S., Shi, J., (2014). Preparation of active resveratrol dimeric derivatives by oxidative coupling reaction using AgOAc as oxidant. Chinese Journal of Organic Chemistry 34(5), 886-892.

4. Seconde publication

Le travail sur le couplage oxydatif appliqué à l'extrait de sarments de vigne, permettant l'hémisynthèse d'oligomères du resvératrol et de l' ϵ -viniférine, ainsi que l'évaluation de l'activité biologique de l'extrait enrichi en oligomères contre *P. viticola* et *B. cinerea*, ont fait l'objet d'un article scientifique intitulé « *New active stilbenes against vine pathogens from oxidative coupling of grapevine extracts* » soumis en novembre 2019 dans *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

New active stilbenes against vine pathogens from oxidative coupling of grapevine extract

Toni El Khawand, David Taillis, Grégory Da Costa, Eric Pedrot, Stéphanie Cluzet, Alain Decendit, Josep Valls-Fonayet and Tristan Richard*

Unité de Recherche Œnologie, Molécules d'Intérêt Biologique, EA 4577, USC 1366 INRA, Bordeaux INP, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France

Key words: grapevine, stilbenes, hemisynthesis, antimicrobial activity

Corresponding author: Tristan Richard, email: tristan.richard@u-bordeaux.fr
ORCID Tristan Richard : 0000-0002-5308-8697

Abstract

Cane extracts are grapevine byproducts studied for their antimicrobial properties, mainly on *Plasmopara viticola*. These properties are directly connected to the stilbene content, oligomeric stilbenes being the most active, such as δ -viniferin and r-viniferin. Metals are known to induce stilbene oligomerization by oxidative coupling of stilbene units. In this study, we investigated the ability of silver acetate to induce the formation of oligomeric stilbenes from a cane extract that could be active against *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea* development. Stilbene enriched extract, containing mainly resveratrol, ϵ - and r-viniferin (480, 290, and 60 mg/g, respectively), was prepared using centrifugal partition chromatography (CPC). This extract was submitted to oxidative coupling using silver acetate leading to the formation of new constituents. The main constituents were identified by combination of mass and NMR spectroscopies. A total of 10 compounds were identified including four newly reported compounds: *trans*-oxistilbenin C, *trans*-oxistilbenin D, *cis*- and *trans*-oxistilbenin E. The main compounds produced were r-viniferin (140 mg), *trans*- δ -viniferin (138 mg), and *cis*-oxistilbenin E (129 mg). Extracts and main stilbenes were tested *in vitro* for their preventive effects on *P. viticola* and *B. cinerea* growth. The extract obtained by oxidative coupling exhibited a preventive effect more than 10 and 60 times superior to the one of cane extract against *P. viticola* and *B. cinerea* development, respectively. Among the *de novo* synthesized compounds, r-viniferin was the more active (IC₅₀ lower than 12 μ M for both pathogens). In addition, four *de novo* synthesized compounds presented an IC₅₀ lower than 40 μ M against *P. viticola* and *B. cinerea* development. Findings in this study indicated that metals could be used to significantly potentiating the activity of natural cane extracts to control pathogens.

Introduction

Stilbenes are a group of polyphenols found in different plant species, especially *Vitis vinifera* (grapevine), and playing the role of phytoalexins.¹⁻³ There is a growing interest in grapevine stilbenes, which can be sourced from winemaking byproducts, like grapevine roots and canes, for their antimicrobial potential and their likely use for fighting grapevine pathogens like *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea*.⁴⁻⁷ In fact, concerns regarding the usage of chemical pesticides in grapevine-growing regions have a negative impact on the viticulture sector. Several studies have already established a link between the attacks of grapevine pathogens and the increase in stilbene production in the plant, which highlights the potential of using stilbenes as an efficient alternative to control grapevine diseases.^{8, 9} The high antimicrobial activity of some stilbenes, especially stilbenes with oligomeric structure (dimers, trimers and tetramers) has been noted.^{4, 5} The highest concentrations of these resveratrol oligomers are mainly found in extracts of grapevine roots, while grapevine cane extracts show higher concentrations of monomers and dimers, mainly resveratrol and ϵ -viniferin.⁵ However, grapevine canes can be found in larger quantities in comparison with grapevine roots, due to the annual pruning of the plant. Furthermore, several studies showed that oxidative coupling of resveratrol was possible using metals¹⁰⁻¹², in particular Sako et al., who used silver acetate (AgOAc) to produce ϵ -viniferin from resveratrol, and vitisin B (r-viniferin) from ϵ -viniferin.¹³ Hence, hemisynthesis of resveratrol oligomers using resveratrol and ϵ -viniferin found in large amounts

in cane extracts could be an efficient and fast way to produce an enriched stilbene extract, with high antimicrobial activity.

In this study, we applied oxidative coupling using silver acetate directly on a grapevine cane fraction with high content in resveratrol and ϵ -viniferin, obtained using centrifugal partition chromatography. The main compounds of the reaction mixture were identified by spectroscopic analysis (UHPLC–MS, 1D- and 2D-NMR). Four newly reported stilbenes were identified. The biological activities of the extracts were evaluated *in vitro* on *P. viticola* (downy mildew disease agent) and *B. cinerea* (grey mould disease agent). The antimicrobial effects of the main stilbene compounds present in the extracts were also tested.

Material and Methods

1. Chemicals

All reagents were of analytical grade and used as received without further purification. Methanol (CH₃OH, HPLC grade), ethanol (C₂H₅OH, HPLC grade), acetonitrile (CH₃CN, HPLC and LC-MS grades, purity \geq 99.9 %), ethyl acetate (CH₃COOC₂H₅, laboratory reagent grade) and formic acid (HCOOH, 98/100%) were purchased from Fisher scientific (Loughborough, United Kingdom). Ethyl acetate (CH₃COOC₂H₅, HPLC grade), potato dextrose broth and agar were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). *n*-Heptane (C₇H₁₆, HPLC grade) was purchased from VWR International (Fontenay-sous-Bois, France). Silver acetate (AgOAc, purity \geq 99 %) was purchased from Acros organics (Geel, Belgium). Ultrapure water (8 M Ω .cm) was obtained from an Elga apparatus (High Wycombe, United Kingdom).

2. Cane extract and CPC fractionation

Grapevine cane extract (Vineatrol) was kindly provided by Actichem (Montauban, France) and produced using a mixture of Cabernet Sauvignon and Merlot cultivars grown in Bordeaux (France) region. The stilbene composition of the cane extract was previously studied and described¹⁴⁻¹⁶. Briefly, 40 g of grapevine cane extract powder were dissolved in 500 mL of MeOH/H₂O mixture (1/9, v/v) and extraction of stilbenes was performed with 700 mL of ethyl acetate and repeated 5 times. Ethyl acetate phases were collected, and the solvent was removed under reduced pressure. The stilbene-enriched extract was lyophilized to afford 26 g of a dark brown powder. Fractionation of the cane extract was then performed using CPC according to the protocol of Biaïis et al.¹⁶ The CPC was performed on a Kromaton FCPC® 1000 apparatus (Angers, France) equipped with an Iota S100 pump, a Flash 06 DAD 600 detector and a Spider mixing unit manufactured by Ecom (Prague, Czech Republic). Injection of 5 g of extract per run was followed by elution in the descending mode using the K Arizona biphasic solvent system. The solvent mixture was composed of *n*-heptane/ethyl acetate/MeOH/H₂O (1/2/1/2, v/v). The upper and the lower phases corresponded to the stationary and the mobile phases, respectively. The flow rate of the mobile phase was 20 mL/min with a rotation speed of 1000 rpm for the rotor. The fraction 5, named CE extract and containing the main stilbenes, was collected. This fraction contains three main stilbenes, ϵ -viniferin, resveratrol, and *r*-viniferin (480, 290, and 60 mg/g, respectively), and three others: miyabenol C, ω -viniferin, and δ -viniferin.¹⁶

3. Oxidative coupling reaction

Based on the protocol described by Sako et al.,¹³ regioselective oxidative coupling reaction was conducted on 1 g of the CE extract. The quantity of the silver acetate (AcOAg) metallic catalyst added to perform the reaction was calculated according to the quantities of resveratrol and ϵ -viniferin in the CE extract, in order to afford a stilbene:AgOAc ratio of 1:1.5 The fraction 5 and AcOAg were dissolved in MeOH (100%, 100 mL). The reaction mixture turned to an ash color as it was heated at 50°C and stirred for 2 hours. The reaction was then stopped by cooling at 4°C and centrifuged. The MeOH fraction was collected and the solvent was removed under reduced pressure. The fraction obtained, named CEoxid extract, was lyophilized to afford a dark brown powder.

4. UPLC-MS analysis

The stilbene composition of the fractions was investigated using an UHPLC-DAD Agilent 1290 series apparatus (Santa Clara, Canada) equipped with an auto sampler module, a binary pump, a degasser, a column heater/selector and an UV-VIS-DAD. The elution was performed on an Agilent SB-C18 (2.1 mm x 100 mm, 1.8 μ m) column at a flow rate of 0.4 mL/min, with acidified water (0.1% formic acid, solvent A) and acidified acetonitrile (0.1% formic acid, solvent B) according to the following gradient: 10% B (0.0-1.7 min), 10-20% B (1.7-3.4 min), 20-30% B (3.4-5.1 min), 30% B (5.1-6.8 min), 30-35% B (6.8-8.5 min), 35-60% B (8.5-11.9 min), 60-100% B (11.9-15.3 min), 100% B (15.3-17.0 min), 100-10%B (17-17.30 min). Samples were injected at a concentration of 100 μ g/mL after solubilization in H₂O/MeOH mixture (1/1, v/v).

5. Isolation and identification of the reaction products

Stilbenes were purified from CEoxid extract using preparative HPLC. The apparatus was a Gilson PLC 2050 system (Middleton, WI, USA) equipped with an UV-VIS detector. Elution was conducted on a Phenomenex Kinetex XB-C18 column (21.2 mm x 250 mm, 5 μ m). The reaction extract powder was solubilized at 50 mg/mL in MeOH-H₂O (50/50; v/v). Extract was then eluted with a flow rate of 20 mL/min using non-acidified ultrapure water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), according to the following gradient: 33% B (0-2 min), 33-50% B (2-25 min), 50-100% B (25-26 min) and 100% B (26-31 min). The eluate was monitored at 280 and 306 nm and the fractions were automatically collected. Syringes were purchased from Millipore (Molsheim, France). The solvents were removed under reduced pressure and fractions were lyophilized. The isolated compounds were analyzed using UPLC-MS as previously described and their purity was estimated to be \geq 90%. Exact mass was determined by infusion on a Thermo Fischer Scientific Q Exactive Plus Orbitrap (Waltham, Massachusetts, USA) in negative mode with the following parameters: mode full scan, scan range 100-800 m/z, resolution 280k, automatic gain control (AGC) target 2e5, max ion injection 30 ms; HESI source parameters: spray voltage 2700V, sheath gas flow rate :8, capillary temperature 320 °C. The purified compounds structure was finally determined by ¹H-¹³C NMR analysis, using a Bruker Avance III 600 NMR spectrometer (Rheinstetten, Germany). For high resolution mass analysis, an UPLC-DAD/ESI-Q-TOF system constituted by 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) was used.¹⁷

6. Bioassays

6.1. *Plasmopara viticola* development inhibition

Grapevine leaves (*V. vinifera* L., Cabernet Sauvignon cultivar) were collected from the upper part of the shoots of plants produced by wood-cutting propagation and grown in the INRA nursery (Villeneuve d'Ornon, France), under controlled conditions of temperature (25/20°C, day/night) and humidity (75%) with a photoperiod of 16/8 hours (light/dark). The *P. viticola* isolate ANN-01 used in the assay was collected in 2015 from Ugni Blanc grapevine cultivar leaves in a commercial vineyard (Charente, France). To obtain the required quantity of pathogen material, an inoculum (sporangia suspension) of *P. viticola* was taken from spores stored at -20°C, and grown on Cabernet Sauvignon leaves for 7 days, before proceeding to the development inhibition assay. This multiplication step was followed by the inhibition assay. Leaf disks were cut from Cabernet Sauvignon fresh leaves, treated with the stilbene solutions prepared in sterile water with 1% of ethanol, and then by an aqueous suspension of 20 000 sporangia/mL as described by Gabaston and coauthors.⁵ According to previous works, and by monitoring the development of the pathogen on the control leaf disks treated with water/ethanol (99/1, v/v), it should be noted that one percent of ethanol in water does not affect zoospore mobility and disease development.²

6.2. *Botrytis cinerea* mycelium development inhibition

This *in vitro* assay is similar to those of Langcake et Pryce¹⁸ and Adrian et al.⁷ The culture medium was a mixture of potato dextrose broth (24 g/L) and agar (15 g/L), autoclaved at 120°C for 20 min. Ethanol solutions of the evaluated compounds were prepared at the concentrations of 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 and 50 mg/mL. The compound solutions were then incorporated in the autoclaved culture medium (240 μ L/12 mL, solution/medium) to obtain final concentrations of 5, 10, 20, 50, 100, 200 and 500 mg/L with 2% ethanol. Under these conditions, mycelium

growth was not reduced.⁷ Dishes of 6 wells were used and each mixture was poured in 3 wells, 4 mL/well. A calibrated plug of mycelium of *B. cinerea* was then inoculated on the culture medium, and the dishes were incubated at 22°C, with a photoperiod of 15/9 hours (light/dark). Measurements of the mycelium growth area were performed after 48h and 60h of incubation, leading to the calculation of the inhibition rate according to each concentration of the tested compounds and extracts, and hence determining IC₅₀ for each tested compound or extract.

7. Statistical Analyses

Three independent experiments of eight repetitions were carried out for each assay. Data are shown as means ± SEM. The statistical analysis was performed on the three extracts at each specific concentration. One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD tests was carried out. Significant differences between each extract were set at **p < 0.01 and *p < 0.05.

Results and Discussion

1. Hemisynthesis and identification of the main compounds

The oxidative coupling of resveratrol and ϵ -viniferin using metals induces the production of oligomers.¹³ The purpose of this study is to directly apply the oxidative coupling strategy on a stilbene enriched extract obtained from canes, a grapevine by-product, to increase the efficiency of the extract. Since cane extract contains several different compounds with no more than 45% of stilbenes,¹⁴⁻¹⁶ the extract was firstly fractionated by centrifugal partition chromatography (CPC) following the procedure of Biais and coauthors.¹⁶ The fraction (extract CE) containing the main stilbenes of the cane extract was collected in order to proceed to the oxidative coupling using silver acetate (AgOAc). The UPLC-DAD-MS chromatogram of this fraction is presented in **Figure 1A**. The fraction contains mainly three stilbenes: *trans*-resveratrol (290 mg/g), *trans*- ϵ -viniferin (480 mg/g) and vitisin B (60 mg/g) (**Figure S1** for chemical structure). In addition, minor compounds are present such as miyabenol C, ω -viniferin and δ -viniferin.¹⁶

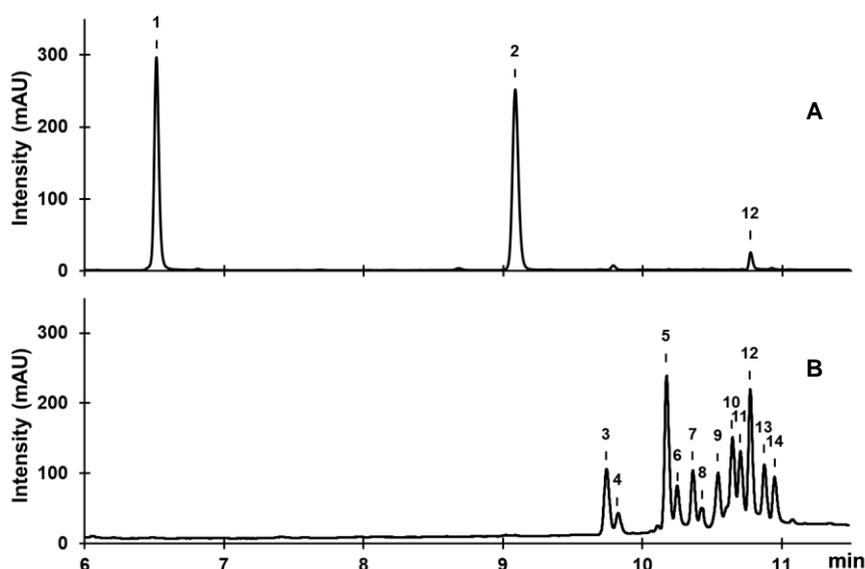


Figure 1. UHPLC-DAD chromatogram of CE (A) and CEoxid extracts (B) at 280 nm.

The UPLC-DAD-MS chromatogram of the cane extract obtained after oxidative coupling in presence of silver acetate (extract CEoxid) is presented in **Figure 1B**. The lyophilization of the reaction mixture led to a dark brown soft powder. The analysis of the CEoxid chromatogram indicates the formation of eleven main compounds and the absence of resveratrol and ϵ -viniferin (**Figure 1**), and shows that under stirring condition, 100% of resveratrol and ϵ -viniferin reacted. The vitisin B probably did not react but increased due to the oligomerization of ϵ -viniferin.¹³ The total transformation of resveratrol and ϵ -viniferin was achieved using a molar ratio 1:1.5 (stilbene:AcOAg). In preliminary experiments, using reduced molar proportions of AcOAg resulted in a partial transformation of both resveratrol and ϵ -viniferin (results not shown).

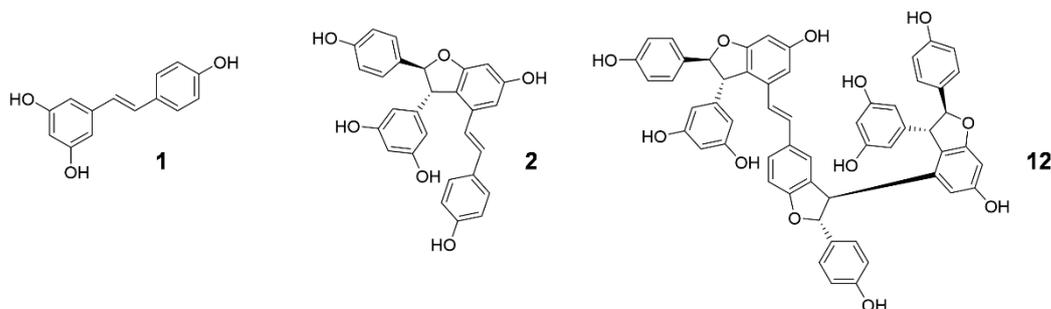


Figure S1. Chemical structures of *trans*-resveratrol (**1**), *trans*- ϵ -viniferin (**2**) and vitisin B (**12**)

In order to identify the *de novo* synthesized compounds, the CEoxid extract was further purified using reversed-phase chromatography. This technique allowed us to collect 14 fractions containing from 15 to 140 mg of stilbene oligomers, for a total of 845 mg/g (**Table 1**). On the basis of their molecular masses, stilbene oligomers were detected including dimers (peaks **3**, **4** and **5**), trimers (peaks **6**, **7**, **8**, **9**, **10** and **11**), and tetramers (peaks **12**, **13** and **14**). The structures of the isolated compounds were elucidated by NMR spectroscopy. A total of 10 compounds were identified (**Figure 2**). In addition to the previously reported *trans*-oxistilbenin A and B (**3** and **4**, respectively), *trans*- δ -viniferin (**5**), *trans*- and *cis*-resviniferin A (**8**), and r-viniferin (**12**), four newly reported stilbenes were identified as *trans*-oxistilbenin C (**7**), *trans*-oxistilbenin D (**9**), *cis*- and *trans*-oxistilbenin E (**10** and **11**, respectively). The main compounds produced were r-viniferin (**12**, 140 mg/g, 14%) and *trans*- δ -viniferin (**5**, 140 mg/g, 14%) followed by *cis*-oxistilbenin E (**10**, 130 mg/g, 13%).

No	Rt (min)	Compound name	Size	[M – H] ⁻	Amount (mg/g)
3	9.74	<i>trans</i> -oxistilbenin A	di-	485	63
4	9.82	<i>trans</i> -oxistilbenin B	di-	485	43
5	10.17	<i>trans</i> - δ -viniferin	di-	453	138
6	10.20	unknown	tri-	679	27
7	10.36	<i>trans</i> -oxistilbenin C	tri-	679	15
8	10.42	<i>trans</i> -resviniferin A + <i>cis</i> -resviniferin A	tri-	679	65
9	10.54	<i>trans</i> -oxistilbenin D	tri-	711	50
10	10.65	<i>cis</i> -oxistilbenin E	tri-	679	129
11	10.70	<i>trans</i> -oxistilbenin E	tri-	679	64
12	10.77	r-viniferin	tetra-	905	140
13	10.87	unknown	tetra-	905	90
14	10.95	unknown	tetra-	905	30

Table 1. Peak number, retention time, compound name, size, MS data, and amount of the identified compounds in the extract after oxidative coupling.

The structures of the identified compounds were obtained by means of mass spectroscopy analysis and NMR spectroscopy, including 2D experiments such as COSY, ROESY, HSQC, and HMBC.

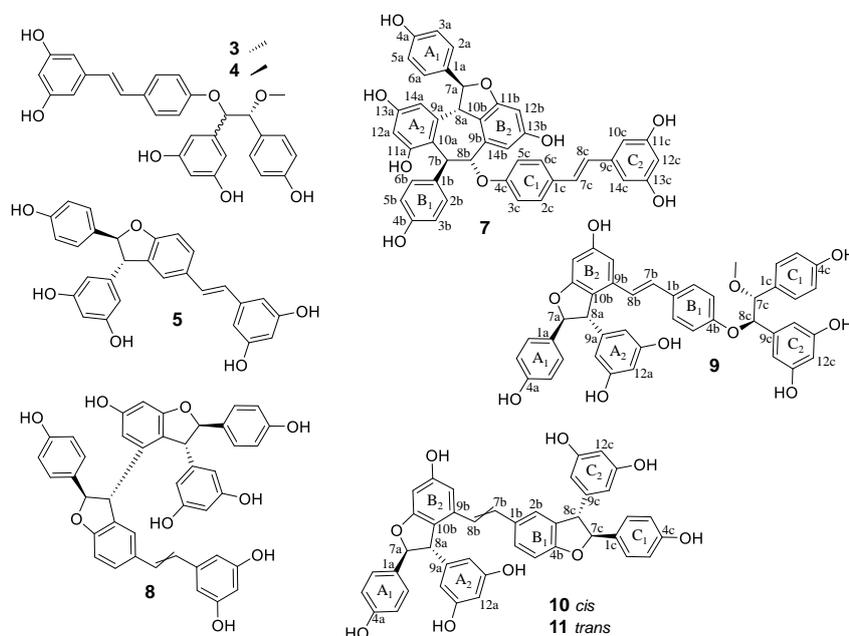


Figure 2. Structure of the newly produced compounds after oxidative coupling.

The *trans*-oxistilbenin C (**7**) was obtained as a pale brown amorphous powder, with a high-resolution molecular ion in negative mode at m/z 679.1942 $[M - H]^-$ corresponding to a resveratrol trimer. The NMR data of **7** are reported in **Table 2**. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum exhibited three sets of AA'XX' type ortho-coupled aromatic protons at δ 6.79 and 7.15 (2H each, d, $J = 8.7$ Hz) for ring A₁, 6.68 and 6.99 (2H each, d, $J = 8.7$ Hz) for ring B₁, 7.07 and 7.51 (2H each, d, $J = 8.7$ Hz) for ring C₁, two sets of meta-coupled aromatic protons at δ 6.27 (1H, d, $J = 2.0$ Hz) and 6.36 (1H, brs) for ring A₂, 6.22 and 6.54 (1H each, d, $J = 2.1$ Hz) for ring B₂, one set of AX₂ type meta-coupled aromatic protons at δ 6.57 (2H, d, $J = 2.1$ Hz) and 6.28 (1H, t, $J = 2.1$ Hz) for ring C₂, two coupled doublets at δ 6.94 and 7.07 (1H each, d, $J = 16.2$ Hz) for a *trans*-configured double bond, and two sets of mutually coupled aliphatic methine protons at δ 4.24 and 5.85 (1H each, d, $J = 11.3$ Hz), 5.74 and 6.25 (1H each, d, $J = 4.7$ Hz). The correlations of the aromatic rings, double bonds and aliphatic protons were deduced from COSY spectrum. All the protonated carbons were identified from HSQC spectrum. The structure of **7** was proposed after examination of the C-H long range correlations from HMBC spectrum (**Figure S2**). The correlations of proton H-8a (δ 4.24) with eight carbon signals [δ 130.3 (C-1a), 87.7 (C-7a), 141.7 (C-9a), 117.5 (C-10a), 104.5 (C-14a), 136.1 (C-9b), 118.9 (C-10b), 158.0 (C-11b)] and proton H-7b (δ 5.74) with seven carbon signals [δ 141.7 (C-9a), 117.5 (C-10a), 157.8 (C-11a), 131.0 (C-1b), 128.0 (C-2b), 77.2 (C-8b), 136.1 (C-9b)] indicate the connectivity between the monomers units A and B. The correlations between proton H-8b (δ 6.25) and carbon C-4c (δ 159.2) provide the connection between monomer unit B and aromatic ring C₁.

The relative stereochemistry of protons H-7a, H-8a, H-7b and H-8b was deduced from ROESY spectrum and after comparison with literature data.^{19, 20} The NOE correlations H-8a / H-2a(6a) and H-7a / H-14a indicate the *trans* orientation of the two methine protons of the dihydrobenzofuran moiety. The correlation between H-2b(6b) / H-8a suggests that the C-7b aryl group is situated *cis* to H-8a. Finally, the α -configuration of the monomer unit C on C-8b was indicated by the NOE correlations H-7b / H-2c(6c) and H-8b / H-2b(6b).

Chapitre I : Production d'un extrait enrichi en stilbènes oligomériques par hémisynthèse pour une application phytosanitaire

	7		9		10		11	
	δ_C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)	δ_C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)	δ_C	δ_H (mult, <i>J</i> in Hz)	δ_C	δ_H (mult, <i>J</i> in Hz)
1a	130.3	-	133.1	-	131.6	-	131.0	-
2a	129.1	7.15 (d, 8.7)	127.2	7.20 (d, 8.7)	127.6	7.21 (d, 8.6)	127.9	7.23 (d, 8.6)
3a	115.2	6.79 (d, 8.7)	115.2	6.83 (d, 8.7)	115.3	6.85 (d, 8.6)	115.2	6.87 (d, 8.6)
4a	157.7	-	157.2	-	157.4	-	157.7	-
5a	115.2	6.79 (d, 8.7)	115.2	6.83 (d, 8.7)	115.3	6.85 (d, 8.6)	115.2	6.87 (d, 8.6)
6a	129.1	7.15 (d, 8.7)	127.2	7.20 (d, 8.7)	127.6	7.21 (d, 8.6)	127.9	7.23 (d, 8.6)
7a	87.7	5.85 (d, 11.3)	93.0	5.40 (d, 5.3)	93.1	5.38 (d, 8.6)	93.2	5.32 (d, 9.3)
8a	48.8	4.24 (d, 11.3)	56.1	4.46 (d, 5.3)	56.9	4.33 (d, 8.6)	57.0	4.40 (d, 9.3)
9a	141.7	-	146.6	-	143.7	-	143.5	-
10a	117.5	-	106.2	6.20 (brs)	106.6	6.12 (d, 2.2)	106.7	6.11 (d, 2.2)
11a	157.8	-	159.0	-	158.8	-	158.8	-
12a	102.7	6.36 (brs)	101.2	6.21 (brs)	101.7	6.24 (t, 2.2)	101.9	6.26 (t, 2.2)
13a	156.5	-	159.0	-	158.8	-	158.8	-
14a	104.5	6.27 (d, 2.0)	106.2	6.20 (brs)	106.6	6.12 (d, 2.2)	106.7	6.11 (d, 2.2)
1b	131.0	-	135.2	-	130.2	-	129.7	-
2b	128.0	6.99 (d, 8.7)	127.5	7.15 (d, 8.7)	126.3	6.82 (d, 1.9)	125.8	6.79 (d, brs)
3b	114.8	6.68 (d, 8.7)	114.8	6.79 (d, 8.7)	132.8	-	132.8	-
4b	155.5	-	158.3	-	161.4	-	161.2	-
5b	114.8	6.68 (d, 8.7)	114.8	6.70 (d, 8.7)	128.9	7.07 (dd, 1.9, 8.3)	128.3	7.03 (dd, 1.7, 8.3)
6b	128.0	6.99 (d, 8.7)	127.5	7.15 (d, 8.7)	108.8	6.68 (d, 8.3)	108.8	6.64 (d, 8.3)
7b	39.2	5.74 (d, 4.7)	128.9	6.88 (d, 16.6)	130.4	6.26 (d, 11.9)	128.3	6.96 (d, 16.3)
8b	77.2	6.25 (d, 4.7)	123.3	6.70 (d, 16.6)	125.7	6.03 (d, 11.9)	126.8	6.86 (d, 16.3)
9b	136.1	-	133.5	-	136.1	-	135.9	-
10b	118.9	-	119.0	-	119.3	-	119.4	-
11b	158.0	-	161.6	-	161.6	-	161.7	-
12b	96.9	6.22 (d, 2.1)	95.9	6.31 (d, 2.1)	95.8	6.30 (d, 2.2)	95.9	6.31 (d, 2.2)
13b	159.7	-	158.7	-	158.4	-	158.7	-
14b	109.7	6.54 (d, 2.1)	103.3	6.70 (d, 2.1)	106.7	6.33 (d, 2.2)	107.7	6.32 (d, 2.2)
1c	130.2	-	129.3	-	131.5	-	133.0	-
2c	127.6	7.51 (d, 8.7)	129.4	7.03 (d, 8.7)	127.3	7.09 (d, 8.6)	127.9	7.06 (d, 8.6)
3c	116.4	7.07 (d, 8.7)	114.7	6.70 (d, 8.7)	115.1	6.82 (d, 8.6)	115.2	6.87 (d, 8.6)
4c	159.2	-	156.9	-	157.4	-	157.3	-
5c	116.4	7.07 (d, 8.7)	114.7	6.70 (d, 8.7)	115.1	6.82 (d, 8.6)	115.2	6.87 (d, 8.6)
6c	127.6	7.51 (d, 8.7)	129.4	7.03 (d, 8.7)	127.3	7.09 (d, 8.6)	127.9	7.06 (d, 8.6)
7c	128.8	7.07 (d, 16.2)	86.9	4.42 (d, 6.6)	93.3	5.29 (d, 5.6)	93.3	5.29 (d, 5.3)
8c	126.5	6.94 (d, 16.2)	83.4	5.15 (d, 6.6)	56.1	4.04 (d, 5.6)	56.1	3.96 (d, 5.3)
9c	140.0	-	140.7	-	146.1	-	146.1	-
10c	104.9	6.57 (d, 2.1)	106.2	6.18 (d, 2.1)	106.2	6.04 (d, 2.2)	106.2	6.05 (d, 2.2)
11c	158.8	-	158.0	-	158.8	-	158.8	-
12c	101.9	6.28 (t, 2.1)	101.8	6.13 (t, 2.1)	101.0	6.19 (t, 2.2)	101.1	6.20 (t, 2.2)
13c	158.8	-	158.0	-	158.8	-	158.8	-
14c	104.9	6.57 (d, 2.1)	106.2	6.18 (d, 2.1)	106.2	6.04 (d, 2.2)	106.2	6.05 (d, 2.2)
OMe			56.3	3.20 (s)				

Table 2. NMR data of compounds 7, 9, 10 and 11 in acetone-d6.

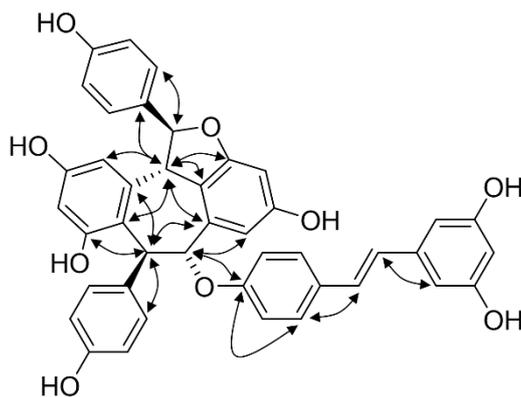


Figure S2. Examination of C-H long range correlations from HMBC spectrum for compound (7)

The *trans*-oxistilbenin D (**9**) was obtained as a pale brown amorphous powder, with a high-resolution molecular ion in negative mode at m/z 711.2203 $[M - H]^-$ corresponding to an *O*-methylated resveratrol trimer. The NMR data of **9** are reported in **Table 2**. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum exhibited three sets of AA'XX' type ortho-coupled aromatic protons at δ 6.83 and 7.20 (2H each, d, $J = 8.7$ Hz) for ring A₁, 6.79 and 7.15 (2H each, d, $J = 8.7$ Hz) for ring B₁, 6.70 and 7.03 (2H each, d, $J = 8.7$ Hz) for ring C₁, one set of meta-coupled aromatic protons at δ 6.31 (1H, d, $J = 2.1$ Hz) and 6.70 (1H, d, $J = 2.1$ Hz) for ring B₂, two sets of AX2 type meta-coupled aromatic protons at δ 6.20 (2H, brs) and 6.21 (1H, brs) for ring A₂, 6.18 (2H, d, $J = 2.1$ Hz) and 6.13 (1H, t, $J = 2.1$ Hz) for ring C₂, two coupled doublets at δ 6.88 and 6.70 (1H each, d, $J = 16.6$ Hz) for a *trans*-configured double bond, two sets of mutually coupled aliphatic methine protons at δ 4.46 and 5.40 (1H each, d, $J = 5.3$ Hz), 4.42 and 5.15 (1H each, d, $J = 6.6$ Hz), and one *O*-methyl group at δ 3.20 (3H, s). The correlations of the aromatic rings, double bonds and aliphatic protons were obtained from COSY spectrum. All the protonated carbons were identified from HSQC spectrum. The structure of **9** was proposed after examination of the C-H long range correlations from HMBC spectrum (**Figure S3**). The correlations of proton H-8a (δ 4.46) with seven carbon signals [δ 133.1 (C-1a), 93.0 (C-7a), 146.6 (C-9a), 106.2 (C-10a(14a)), 133.5 (C-9b), 119.0 (C-10b), 161.6 (C-11b)] indicate the connectivity between the monomer unit A and aromatic ring B₂. The correlations between proton H-8c (δ 5.15) with five carbon signals [δ 158.3 (C-4b), 129.3 (C-1c), 86.9 (C-7c), 140.7 (C-9c), 106.8 (C-10c(14c))] provide the connection between monomer unit C and aromatic ring B₁.

The relative stereochemistry of protons H-7a, H-8a, H-7c and H-8c was deduced from ROESY spectrum and comparison with literature data.^{19, 20} The NOE correlations H-8a / H-2a(6a) and H-7a / H-10a(14a) indicate the *trans* orientation of the two methine protons of the dihydrobenzofuran moiety. The correlations between H-2c(6c) / H-8c and H-10c(14c) / H-7c suggest that the C-7c aryl group is situated *cis* to H-8c.

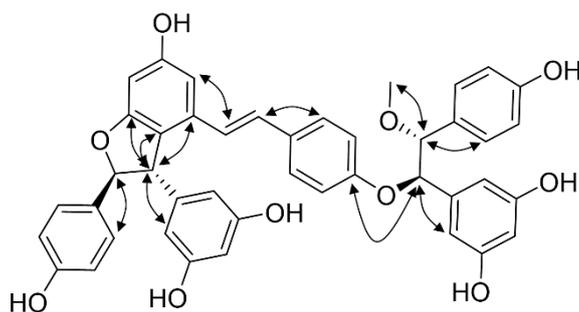


Figure S3. Examination of C-H long range correlations from HMBC spectrum for compound (9)

The *cis*-oxistilbenin E (**10**) was obtained as a pale brown amorphous powder, with a high-resolution molecular ion in negative mode at m/z 679.1944 $[M - H]^-$ corresponding to a resveratrol trimer. The NMR data of **10** are reported

in **Table 2**. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum exhibited two sets of AA'XX' type ortho-coupled aromatic protons at δ 6.85 and 7.21 (2H each, d, $J = 8.6$ Hz) for ring A₁, 6.82 and 7.09 (2H each, d, $J = 8.6$ Hz) for ring C₁, one set of meta-coupled aromatic protons at δ 6.30 (1H, d, $J = 2.2$ Hz) and 6.33 (1H, d, $J = 2.2$ Hz) for ring B₂, two sets of AX₂ type meta-coupled aromatic protons at δ 6.12 (2H, d, $J = 2.2$ Hz) and 6.24 (1H, t, $J = 2.2$ Hz) for ring A₂, 6.04 (2H, d, $J = 2.2$ Hz) and 6.19 (1H, t, $J = 2.2$ Hz) for ring C₂, one set of ABX type ortho-meta-coupled aromatic protons at δ 6.68 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.82 (1H, d, $J = 1.9$ Hz) and 7.07 (1H, dd, $J = 1.9$ and 8.3 Hz) for ring B₁, two coupled doublets at δ 6.26 and 6.03 (1H each, d, $J = 11.9$ Hz) for a *cis*- configured double bond, and two sets of mutually coupled aliphatic methine protons at δ 4.33 and 5.38 (1H each, d, $J = 8.6$ Hz), 4.04 and 5.29 (1H each, d, $J = 5.6$ Hz). The correlations of the aromatic rings, double bonds and aliphatic protons were obtained from COSY spectrum. All the protonated carbons were identified from HSQC spectrum. The structure of **10** was proposed after examination of the C-H long range correlations from HMBC spectrum (**Figure S4**). The correlations of proton H-8a (δ 4.33) with seven carbon signals [δ 131.6 (C-1a), 93.1 (C-7a), 143.7 (C-9a), 106.6 (C-10a(14a)), 136.1 (C-9b), 119.3 (C-10b), 161.6 (C-11b)] indicate the connectivity between the monomer unit A and aromatic ring B₂. The correlations between proton H-8c (δ 4.04) with seven carbon signals [δ 131.5 (C-1c), 93.3 (C-7c), 146.1 (C-9c), 106.2 (C-10c(14c)), 126.3 (C-2b), 132.8 (C-3b), 161.4 (C-4b)] indicate the connectivity between the monomer unit C and aromatic ring B₁.

The relative stereochemistry of protons H-7a, H-8a, H-7c and H-8c was deduced from ROESY spectrum. The NOE correlations H-8a / H-2a(6a) and H-8c / H-2c(6c) indicate, respectively, the *trans* orientation of the methine protons of the two dihydrobenzofuran moieties.

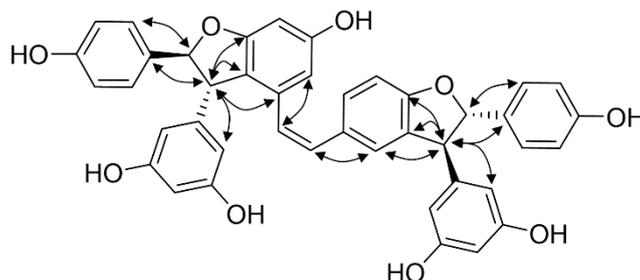


Figure S4. Examination of C-H long range correlations from HMBC spectrum for compound (10)

The *trans*-oxistilbenin E (**11**) was obtained as a pale brown amorphous powder, with a high-resolution molecular ion in negative mode at m/z 679.1944 [$\text{M} - \text{H}$]⁻ corresponding to a resveratrol trimer. NMR data of compound **11** are very similar to **10** (**Table 2**) except for the two coupled doublets at δ 6.86 and 6.96 (1H each, d, $J = 16.3$ Hz) that indicate the presence of a *trans*- configured double bond.

2. Antimicrobial activities

The preventive antimicrobial activities of the extracts and the purified stilbenes were evaluated against *P. viticola* and *B. cinerea*. Resveratrol and cane extract were used as standards.

2.1. Antimicrobial activity against *Plasmopara viticola*

Grapevine extract effectiveness against downy mildew has been demonstrated *in vitro*,^{4, 5} in greenhouse and vineyard.⁶ In order to evaluate the preventive effect, grapevine leaves were treated with cane, CE, or CEoxid extracts, or pure stilbenes a day before zoospore inoculation. After incubation for seven days, the sporulation area extent was visually evaluated to attribute a growth percentage. First of all, the three grapevine extracts were tested at different concentrations ranging from 20 to 500 mg/L. The results are presented in **Figure 3A**. No inhibition was observed in the control (no added stilbenes). The cane extract and CE extract inhibited the growth of *Plasmopara viticola* from 500 mg/L. The CEoxid extract gave a total inhibition for concentrations upper to 200 mg/L. At 100 mg/L, sporulation was inhibited by 9%, 62%, and 76% by cane, CE and CEoxid extracts, respectively. The growth measures led to the calculation of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀), which

corresponds to the concentration that inhibits 50% of the *P. viticola* sporulation. The results were presented in **Table 3**. The lowest value was found for CEoxid extract (63 mg/L), followed by CE extract (85 mg/L), and cane extract (200 mg/L). Firstly, the CE extract, that contains a high level of stilbenes, was more active than the cane extract. Secondly, the CEoxid extract showed the highest preventive effect against downy mildew, more than 3 times superior to cane extract, and 1.3 times than CE extract although stilbene levels between CE and CEoxid extracts were similar.

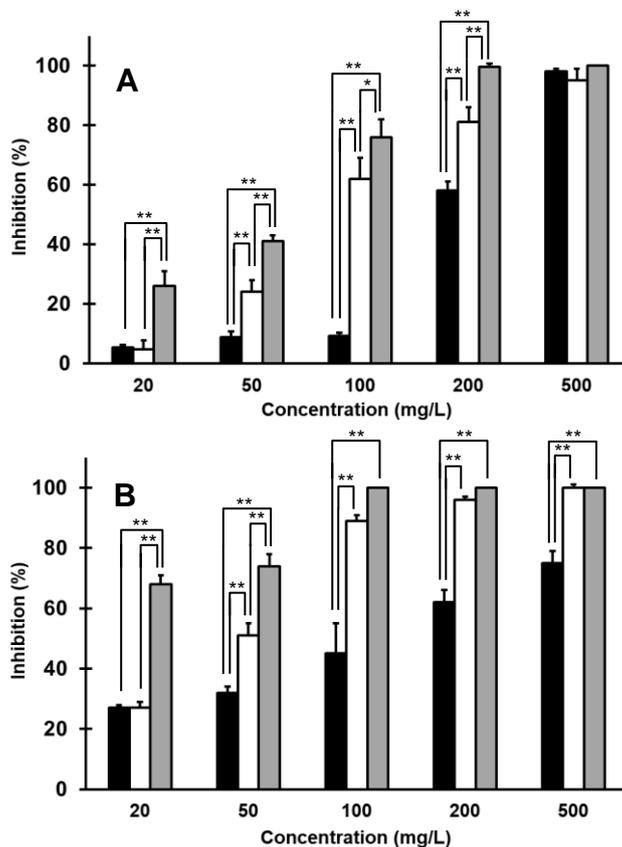


Figure 3. Comparison of the preventive effects of grapevine cane extract (black), CE (white), and CEoxid (grey) extracts against *P. viticola* development (A), and *B. cinerea* mycelial growth (B).

Results are expressed as means \pm SEM. Significant difference between each extract was set at ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$.

In the same manners, the IC_{50} of the main stilbenes identified in the CEoxid extract were measured (**Table 3**). Results are expressed both in mg/L, for the purpose of comparison with the extract data, and in μM , so that results from other studies can be compared. The resveratrol was used as standard and the resulting IC_{50} value was in agreement with literature data.^{4, 5} The highest activity against *P. viticola* growth, and thus the lowest IC_{50} values, was obtained for r-viniferin (**12**, 11 μM), and then for some *de novo* synthesized compounds with IC_{50} ranging between 14 and 53 μM , including oxistilbenin C (**7**, 24 μM), δ -viniferin (**5**, 53 μM), resviniferin A (**8**) (27 μM), *trans*-oxistilbenin D (**9**, 47 μM), and *cis*- and *trans*-oxistilbenin E (**10** and **11**, 15 and 14 μM , respectively). Regarding the two other pure molecules of the CEoxid extract, they presented higher IC_{50} but nevertheless lower than the one of resveratrol (434 μM): *trans*-oxistilbenin A (**3**, 125 μM) and *trans*-oxistilbenin B (**4**, 62 μM). The increase of r-viniferin level and the hemisynthesis of stilbene oligomers could explain the efficiency of CEoxid extract in comparison to CE extract.

	<i>P. viticola</i> development		<i>B. cinerea</i> mycelium development	
	IC ₅₀	R ²	IC ₅₀	R ²
cane extract	200	0.99	330	0.96
CE extract	85	0.98	51	1
CEoxid extract	63	1	5	0.95
resveratrol	99 (434 ^a)	1	98 (429 ^a)	1
<i>trans</i> -oxistilbenin A (3)	61 (125 ^a)	1	58 (119 ^a)	1
<i>trans</i> -oxistilbenin B (4)	30 (62 ^a)	1	36 (74 ^a)	0.96
δ-viniferin (5)	24 (53 ^a)	1	7 (15 ^a)	1
<i>trans</i> -oxistilbenin C (7)	36 (24 ^a)	1	91 (134 ^a)	0,97
resviniferin A (8)	41 (27 ^a)	0.99	18 (27 ^a)	0,97
<i>trans</i> -oxistilbenin D (9)	66 (47 ^a)	0.97	74 (104 ^a)	0,94
<i>cis</i> -oxistilbenin E (10)	23 (15 ^a)	0.99	21 (31 ^a)	1
<i>trans</i> -oxistilbenin E (11)	21 (14 ^a)	1	23 (34 ^a)	1
r-viniferin (12)	13 (11 ^a)	1	8 (9 ^a)	0,98

^a concentration expressed in μM.

Table 3. IC₅₀ values (mg.L⁻¹) of the extracts and main identified compounds against *P. viticola* and *B. cinerea*.

2.2. Antimicrobial activity against *Botrytis cinerea*

Fungitoxicity of extracts and pure compounds was monitored using radial growth test. *Botrytis cinerea* growth areas were measured in order to calculate the inhibition rate according to each concentration of the tested compounds and extracts, and hence determining IC₅₀. In a first approach, the different extracts were tested at concentrations ranging from 20 to 500 mg.L⁻¹. The results were presented in **Figure 3B**. Efficacy of the CEoxid extract was compared to the one of cane and CE extracts. First of all, the cane extract exhibits a moderate effect against the development of *B. cinerea* reaching 65% inhibition for the highest concentration tested. This finding is in agreement with literature.⁴ In contrast, the CE and CEoxid extracts were more effective reaching 89 and 100% inhibition, respectively, at 100 mg/L. The CEoxid extract totally inhibited the development of *B. cinerea* from 100 mg/L. To compare the activities of the different extracts, IC₅₀ were calculated (**Table 3**). The CEoxid extract was the more active extract, exhibiting an IC₅₀ of 5 mg/L, over 60 and 10 times lower than the cane and the CE extracts (330 and 51 mg/L, respectively).

The IC₅₀ of the main constituents of CEoxid extract against the mycelial growth of *B. cinerea* is shown in **Table 3**. As previously reported, resveratrol presented a moderate antifungal activity (IC₅₀ of 429 μM).⁵ As for *P. viticola*, r-viniferin (**12**) was the most active inhibitor of *B. cinerea* development, presenting the lowest IC₅₀ of 9 μM, followed by δ-viniferin (**5**, 15 μM) and resviniferin A (**4**, 27 μM). In addition to these three compounds, three *de novo* synthesized stilbene oligomers presented an IC₅₀ lower than 100 μM: *trans*-oxistilbenin B (**4**, 74 μM), *cis*- and *trans*-oxistilbenin E (**10** and **11**, 31 and 34 μM, respectively). *trans*-oxistilbenin A (**3**), *trans*-oxistilbenin C (**7**) and *trans*-oxistilbenin E (**10**) exhibited IC₅₀ of 119, 134 and 104 μM, respectively. Thus, the oxidative coupling of CE extract using AcOAg induced the production of an active pool of stilbene oligomers against *B. cinerea* development.

Findings in this study confirmed that stilbenes have strong antimicrobial activity against the growth of *P. viticola* and *B. cinerea*. The fractionation of the cane extract using CPC induced the production of an effective extract against both pathogens. The ability of CE extract to inhibit *P. viticola* and *B. cinerea* development could be mainly due to the presence of r-viniferin. This compound presented the highest inhibitory effects against the two tested

microorganisms. The oxidative coupling induced the hemisynthesis of *de novo* oligomeric stilbenes including r-viniferin, δ -viniferin, and the newly reported *trans*-oxistilbenin C (**7**), *trans*-oxistilbenin D (**9**), *cis*- and *trans*-oxistilbenin E (**10** and **11**, respectively). As previously reported,^{5, 21} we observed a positive correlation between the degree of oligomerization and the inhibition of the development of pathogens. The CEoxid extract produced by oxidative coupling, that contains only oligomers, had the highest antimicrobial activity against *P. viticola* and *B. cinerea*. Interestingly, this extract strongly inhibited both grapevine pathogens. In contrast, cane and CE extracts were more active on *P. viticola* than on *B. cinerea* development. Thus metals could be used to increase the efficacy of stilbene extracts for the development of fungicides from natural extracts rich in stilbenes.

Funding

This work was supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Acknowledgments

The authors gratefully thank Actichem (Montauban, France) for providing grapevine products.

References

1. 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.
2. Pezet, R.; Gindro, K.; Viret, O.; Richter, H., Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* **2004**, *43*.
3. Langcake, P.; Pryce, R. J., A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* **1977**, *33*, 151-152.
4. 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.
5. Gabaston, J.; Cantos-Villar, E.; Biaies, 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.
6. Richard, T.; Abdelli-Belhad, A.; Vitrac, X.; Waffo Teguo, P.; Mérillon, J.-M., *Vitis vinifera* canes, a source of stilbenoids against downy mildew. *OENO One* **2016**, *50*, 137-143.
7. Adrian, M.; Jeandet, P.; Veneau, J.; A. Weston, L.; Bessis, R., Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *J. Chem. Ecol.* **1997**, *23*, 1689-1702.
8. Pezet, R.; Perret, C.; Jean-Denis, J. B.; Tabacchi, R.; Gindro, K.; Viret, O., δ -viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *J. Agric. Food. Chem.* **2003**, *51*, 5488-5492.
9. Vrhovsek, U.; Malacarne, G.; Masuero, D.; Zulini, L.; Guella, G.; Stefanini, M.; Velasco, R.; Mattivi, F., Profiling and accurate quantification of trans-resveratrol, trans-piceid, trans-pterostilbene and 11 viniferins induced by *Plasmopara viticola* in partially resistant grapevine leaves. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2012**, *18*, 11-19.
10. Quideau, S.; Deffieux, D.; Pouységu, L., Oxidative coupling of phenols and phenol ethers. In *Comprehensive Organic Synthesis: Second Edition*, 2014; Vol. 3, pp 656-740.
11. Velu, S. S.; Buniyamin, I.; Ching, L. K.; Feroz, F.; Noorbatcha, I.; Gee, L. C.; Awang, K.; Wahab, I. A.; Weber, J.-F. F., Regio- and stereoselective biomimetic synthesis of oligostilbenoid dimers from resveratrol analogues: influence of the solvent, oxidant, and substitution. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11376-11384.
12. Snyder, S. A.; Gollner, A.; Chiriac, M. I., Regioselective reactions for programmable resveratrol oligomer synthesis. *Nature* **2011**, *474*, 461.

13. Sako, M.; Hosokawa, H.; Ito, T.; Inuma, M., Regioselective oxidative coupling of 4-hydroxystilbenes: synthesis of resveratrol and ϵ -viniferin (E)-dehydrodimers. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2598-2600.
14. Müller, C.; Ullmann, K.; Wilkens, A.; Winterhalter, P.; Toyokuni, S.; Steinberg, P., Potent antioxidative activity of vineatrol@30 grapevine-shoot extract. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2009**, *73*, 1831-1836.
15. Romain, C.; Bresciani, L.; Gaillet, S.; Feillet-Coudray, C.; Calani, L.; Bonafos, B.; Vidé, J.; Rugani, N.; Ramos, J.; Rio, D. D.; Cristol, J.-P.; Rouanet, J.-M., Moderate chronic administration of Vineatrol-enriched red wines improves metabolic, oxidative, and inflammatory markers in hamsters fed a high-fat diet. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 1212-1225.
16. Biais, B.; Krisa, S.; Cluzet, S.; Da Costa, G.; Waffo-Teguo, P.; Mérillon, J. M.; Richard, T., Antioxidant and cytoprotective activities of grapevine stilbenes. *J. Agric. Food. Chem.* **2017**, *65*, 4952-4960.
17. 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. Crop. Prod.* **2017**, *103*, 267-273.
18. Langcake, P.; Pryce, R. J., 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.
19. Oshima, Y.; Ueno, Y.; Hikino, H.; Ling-Ling, Y.; Kun-Ying, Y., Ampelopsins A, B and C, new oligostilbenes of *Ampelopsis brevipedunculata* VAR. Hancei. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 5121-5126.
20. Takaya, Y.; Yan, K.-X.; Terashima, K.; Ito, J.; Niwa, M., Chemical determination of the absolute structures of resveratrol dimers, ampelopsins A, B, D and F. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7259-7265.
21. Malacarne, G.; Vrhovsek, U.; Zulini, L.; Cestaro, A.; Stefanini, M.; Mattivi, F.; Delledonne, 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*, 114.

Chapitre II : Couplage oxydatif du resvératrol dans l'éthanol, application œnologique et effet sur la santé humaine

Chapitre II : Couplage oxydatif du resvératrol dans l'éthanol, application œnologique et effet sur la santé humaine

1. Stratégie

Dans cette partie de mes travaux de thèse, l'objectif était d'explorer les possibilités du couplage oxydatif des stilbènes dans le vin, d'étudier les conditions permettant cette oligomérisation et d'étudier les effets potentiels de ces produits sur la santé humaine. La mise au point et la réussite des réactions d'hémisynthèse menées dans le méthanol ont servi de tremplin pour la conduite de l'hémisynthèse dans l'éthanol, étape indispensable pour établir la preuve de concept et de valider la possibilité de la transposition de ces réactions dans le vin, où l'éthanol est le principal solvant organique permettant la solubilisation des stilbènes entre autres. De plus, comme démontré précédemment, le méthanol exerçant à la fois le rôle de solvant et de réactif intervenant dans la formation des oligomères, il fallait impérativement le remplacer par l'éthanol, qui participera éventuellement à la formation des différents oligomères, en se greffant au niveau de leur structure chimique. Aussi, la recherche d'un catalyseur métallique autre que l'acétate d'argent s'imposait avant toute transposition des conditions réactionnelles dans le vin, l'argent étant quasiment absent de cette boisson. Dans la littérature, plusieurs exemples montrent la possibilité de conduire la réaction de couplage en présence de sels de fer ou de cuivre, dont les quantités dans le vin, de l'ordre du mg/L, permettraient de catalyser cette réaction. Enfin, les conditions de température devaient être adaptées pour se rapprocher des conditions de température auxquelles le vin est couramment soumis.

Une fois la réaction de couplage dans l'éthanol réussie et les oligomères produits identifiés, il était alors possible d'étudier leur présence dans le vin et de les doser. Pour déterminer les causes et les conditions de leur formation dans le vin, une comparaison de leur teneur a été menée entre des échantillons de vin témoin et des échantillons de vin soumis à des conditions de température pouvant faciliter la réaction de couplage oxydatif et générer ces produits. En parallèle, une première évaluation de l'activité biologique de ces composés a été réalisée, notamment sur l'activité anti-inflammatoire.

La mise au point et les résultats de la réaction de couplage oxydatif du resvératrol dans l'éthanol, l'identification des oligomères obtenus, le dosage des oligomères dans le vin et les résultats concernant leur activité anti-inflammatoire sont discutés.

2. Présentation des travaux

2.1. Réaction de couplage du resvératrol dans l'éthanol : preuve de concept

En se basant sur les résultats précédents, obtenus au cours de la première partie de cette thèse, la réaction de couplage du resvératrol en présence d'acétate d'argent (AgOAc) a été conduite selon les mêmes conditions établies précédemment. La seule différence réside dans l'utilisation de l'éthanol comme solvant du milieu réactionnel, pour remplacer le méthanol, et se rapprocher ainsi des conditions observées dans le vin. Des essais préliminaires ont d'abord été conduits sur de petites quantités de resvératrol, de l'ordre de 10 mg, avant d'appliquer la réaction sur 600 mg de resvératrol. Le chauffage à 50°C sous agitation pendant une heure assure une conversion totale du resvératrol et la formation de quatre dimères. La diminution de la température jusqu'à atteindre 40°C fait passer le rendement total en dimères de 89% à 52%, qui peut être légèrement compensé en cas de prolongement de la durée de la réaction d'une heure supplémentaire. La réaction reste possible à 30°C, avec néanmoins un rendement en stilbènes totaux bien plus bas, atteignant 27%. Enfin, mener la réaction à 20°C pendant une heure permet la formation d'un seul dimère, majoritaire sous les conditions de température précédente, avec un rendement de 3%. Ainsi, ces variations de température montrent que la réaction reste possible à 30°C, température pouvant facilement être atteinte dans certaines conditions de traitement ou de conservation des vins.

Cependant, pour réunir les conditions réactionnelles présentes dans le vin, il faut encore remplacer l'AcOAg par un métal retrouvé en quantité suffisante dans le vin pour assurer la faisabilité de la réaction. Le fer a ainsi été choisi pour sa présence dans le vin à des quantités pouvant se rapprocher de celles du resvératrol, variant entre 1 mg et 10 mg/L (Riganakos and Veltsistas, 2003). Employé au même ratio que l'AcOAg par rapport au resvératrol, soit 1,5 pour 1, à une température de 50°C pendant une heure, il permet une conversion partielle du resvératrol, dont le couplage oxydatif aboutit alors à un rendement en stilbènes totaux de 18%, avec la formation des quatre dimères. Ce même rendement a également pu être atteint au bout de 48 heures de réaction en chauffant le milieu réactionnel à 30°C. Ainsi, malgré la réduction importante de sa vitesse et de son rendement, la réaction de couplage oxydatif du resvératrol en présence de fer reste possible, et peut se dérouler à des températures plus couramment subies par le vin. Aussi, le vin étant une boisson se conservant plusieurs années, la durée nécessaire au déroulement de cette réaction en présence du fer peut facilement être atteinte. Néanmoins, pour des raisons pratiques, c'est la réaction en présence d'argent qui a été choisie pour la suite de ce travail de thèse, dans le but de produire les oligomères en quantités suffisantes pour leur identification et l'évaluation de leur activité biologique.

Comme évoqué précédemment, la centrifugation du milieu réactionnel permet la stabilisation du dépôt d'argent en vue de récupérer uniquement l'éthanol contenant les stilbènes formés. Trois lavages du dépôt d'argent suivis d'une centrifugation sont ensuite effectués pour extraire tous les stilbènes restants. Le

mélange réactionnel ainsi débarrassé des résidus métalliques pouvait à présent être conditionné en vue de purifier les stilbènes par HPLC préparative.

2.2. Identification des oligomères obtenus

Que ce soit en présence d'AgOAc ou de FeCl₃, le couplage oxydatif du resvératrol dans l'éthanol aboutit à la formation de quatre dimères, dont la structure et les rendements sont similaires à ceux observés à l'issue de la réaction dans le méthanol. La caractérisation spectrale de ces dimères et l'identification de leur structure chimique ont fait appel aux techniques de HPLC préparative, d'UPLC-MS, de spectrométrie de masse à haute résolution et de ¹H-¹³C-NMR. Le dimère majoritaire est encore une fois la δ-viniférine, formée selon le mode de couplage 3 – 8', avec un rendement de 48% sous conditions optimales, en baisse de 10% par rapport au couplage oxydatif dans le méthanol. Aux côtés de la δ-viniférine, un mélange isomérique de deux oxistilbénines est formé, constitué de l'oxistilbénine F et l'oxistilbénine G, avec un rendement total de 38% et une prédominance de l'oxistilbénine G. A la différence des oxistilbénines A et B qui portent un groupement *O*-méthyle apporté par le méthanol, c'est l'éthanol qui vient se greffer en position 7 des oxistilbénines F et G, au moment du couplage oxydatif. Ce couplage se fait entre la position 8 d'un radical phénoxy et la fonction *para*-quinone en position 4' d'un second radical, de type C – O. Ces deux molécules sont identifiées pour la première fois. Enfin, un quatrième dimère, la quadrangularine B, formé selon le couplage 8 – 8', sur lequel se greffe l'éthanol en position 7, est observé avec un rendement de 3% (**Figure 15**). Ainsi, à l'instar du méthanol, l'éthanol participe activement à ces réactions de couplage en tant que réactif, et permet la production d'oligomères spécifiques, qui pourraient être retrouvés dans le vin.

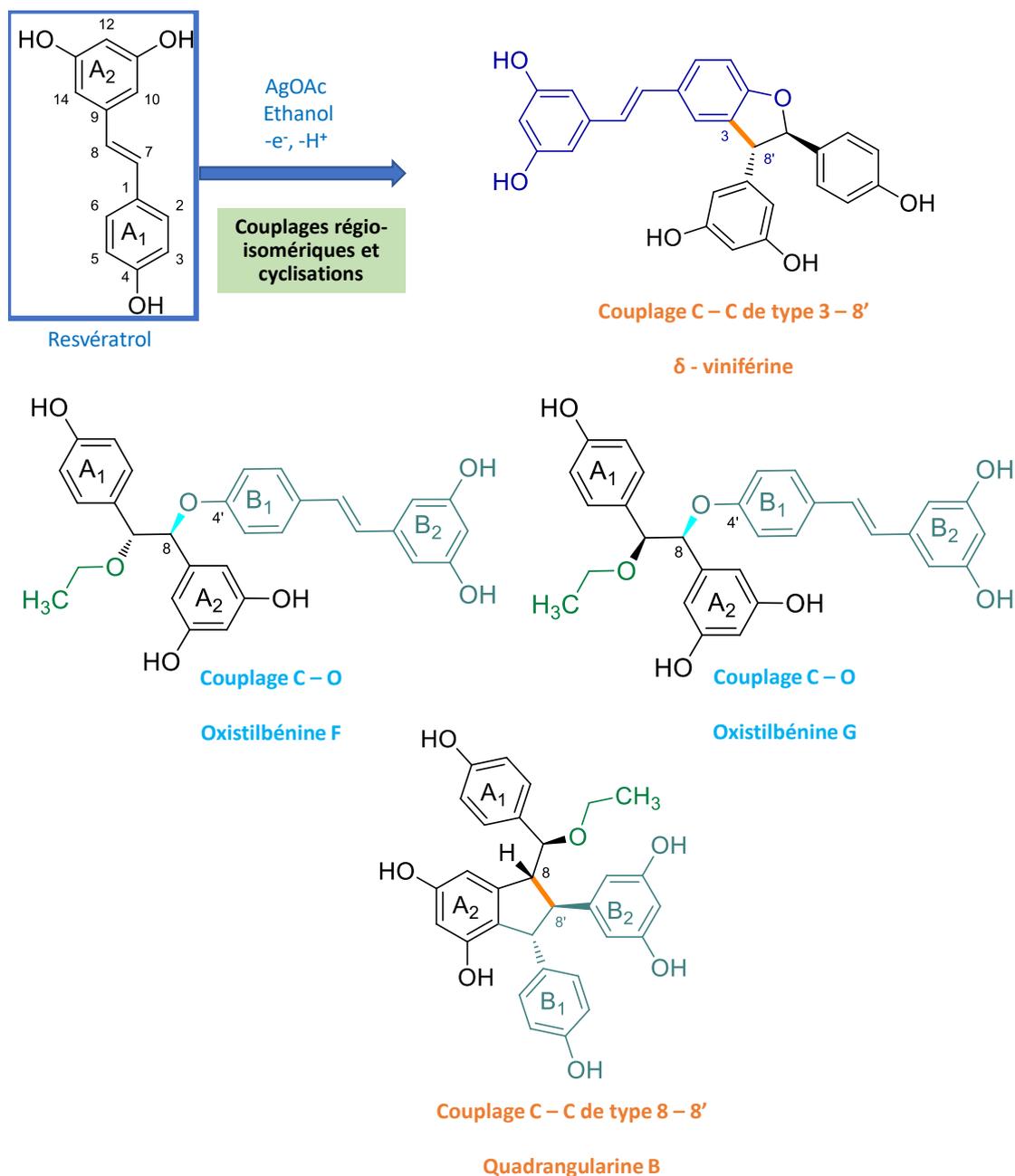


Figure 15. Différents types de couplages régio-isomériques mis en jeu lors de la réaction de couplage oxydatif du resvératrol dans l'éthanol en présence d'acétate d'argent.

2.3. Dosage des oligomères dans le vin

A partir des données spectrales et structurales obtenues lors de l'identification des oligomères du resvératrol, il était à présent possible de les rechercher et les doser dans le vin. Un vin rouge, naturellement plus riche en stilbènes qu'un vin blanc, a été choisi pour vérifier la présence ou la formation de ces oligomères à partir du resvératrol. Seulement, plusieurs facteurs rendent difficile le

bon déroulement de ces réactions de couplage dans le vin. D'abord, le vin est composé d'environ 86% d'eau contre 13% d'éthanol en moyenne, ce qui influe directement sur la solubilité des stilbènes à caractère apolaire, sur la vitesse de la réaction de couplage et sur l'agitation thermique des molécules de réactifs. De plus, l'absence d'agitation du vin en conditions naturelles de conservation, la dilution des stilbènes et des métaux dans le vin ainsi que la complexité chimique de la matrice du vin, sont autant de facteurs qui réduisent la probabilité du contact entre les deux réactifs. Pour favoriser la réaction de couplage, un échantillon de 50 mL de vin rouge a été chauffé au bain-marie pendant 24 heures à 30°C. Cette température a été choisie car elle peut couramment être atteinte dans les conditions naturelles de vinification ou de conservation du vin, ou même dépassée lors d'une thermovinification. La durée de 24 heures a été choisie car la réaction de couplage potentielle serait catalysée par le fer présent dans le vin, et cette réaction se caractérise par sa lenteur et son faible rendement, comme démontré précédemment. La comparaison des teneurs en stilbènes du vin chauffé et du vin témoin est nécessaire pour apprécier la diminution éventuelle du resvératrol et toute augmentation ou apparition éventuelle de nouveaux oligomères. A la fin du chauffage, il fallait concentrer les stilbènes du vin afin de procéder au dosage. Les stilbènes ont donc été extraits par la technique d'extraction en phase solide (SPE) après passage des vins sur colonne de silice C18 et élution des stilbènes au méthanol. L'extrait de stilbènes a été quantifié par spectrométrie de masse sur un triple quadrupôle, après avoir déterminé les transitions ioniques (ions fils) spécifiques à chaque composé par la technique de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). La quantification des stilbènes dans le vin témoin indique la seule présence du *trans*-resvératrol à une concentration de 330 µg/L, du *cis*-resvératrol à 810 µg/L et d'une très faible quantité de δ-viniférine de 20 µg/L. Les oligomères issus du couplage oxydatif du *trans*-resvératrol dans l'éthanol ne sont pas détectés. Dans le vin incubé à 30°C pendant 24 heures, la concentration du *cis*-resvératrol augmente pour atteindre une valeur de 870 µg/L, tandis que la concentration du *trans*-resvératrol diminue de moitié pour atteindre une valeur de 160 µg/L. En contrepartie, la concentration de la δ-viniférine augmente considérablement pour atteindre une valeur cinq fois plus élevée que la concentration de départ, soit 100 µg/L. De plus, l'oxistilbénine G est détectée et identifiée dans le vin chauffé, à une faible concentration de 6 µg/L. Ces données prouvent que le chauffage a favorisé la dimérisation d'une partie du *trans*-resvératrol en δ-viniférine majoritairement, avec formation d'oxistilbénine G. Ces rendements sont conformes à ceux observés à l'issue de la réaction de couplage menée dans l'éthanol, à savoir une prédominance de la δ-viniférine et la formation d'oxistilbénines. Ce type de transformation oxydative du resvératrol dans le vin ainsi que la formation de l'oxistilbénine G sont observés pour la première fois.

2.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

Du moment que la formation des oligomères du resvératrol a été attestée dans le vin, une évaluation de leurs effets potentiels sur la santé s'est imposée. L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de ces composés identifiés dans le vin est un moyen efficace de déterminer leur intérêt pour la santé de

l'homme, l'inflammation chronique étant liée à l'apparition de la plupart des maladies métaboliques comme le cancer, le diabète et l'athérosclérose, comme évoqué précédemment. Ces manipulations sur les cellules animales ont été menées au sein du laboratoire MIB, sur des macrophages du modèle cellulaire RAW 264.7. La cytotoxicité des oligomères a d'abord été évaluée. Une diminution de la viabilité cellulaire est observée aux concentrations supérieures ou égales à 15 μM , sauf pour le resvératrol et la quadrangularine B, qui n'ont pas montré d'effet cytotoxique. Ensuite, pour étudier l'effet des oligomères sur les marqueurs de l'inflammation, les macrophages sont stimulés par du lipopolysaccharide (LPS) d'origine bactérienne induisant une réaction inflammatoire. Simultanément, les mêmes cellules sont traitées avec les stilbènes purifiés, à différentes concentrations, en vue de mesurer leur capacité à réduire la réponse inflammatoire des macrophages, en réduisant la synthèse de NO et de ROS. Le taux de NO est mesuré via le dosage des nitrates (réaction de Griess) dans le surnageant du milieu de culture cellulaire, alors que le dosage des ROS intracellulaires consiste en la mesure de la fluorescence de la dichlorodihydrofluoréscéine (H2DCFDA) oxydée par ces ROS, par fluorimétrie. L'ensemble des résultats montre que les oligomères formés ont une activité anti-inflammatoire plus importante que celle du resvératrol. Ainsi, concernant l'inhibition de la production de NO, la δ -viniférine, l'oxistilbénine F et l'oxistilbénine G, présentant des CI_{50} de 8,7 ; 9,2 et 9,8 μM , respectivement, sont environ deux fois plus actives que le resvératrol, qui présente une CI_{50} de 17,9 μM . Quant à l'inhibition de la production de ROS, la δ -viniférine prédomine avec une CI_{50} de 7,6 μM . Quant à la quadrangularine B, elle semble moins active que les autres dimères testés.

En somme, il semble que la transformation oxydative du resvératrol dans le vin pourrait être en faveur de l'augmentation de l'effet bénéfique des stilbènes du vin sur la santé humaine, via la formation d'oligomères plus actifs, ayant un effet inhibiteur sur les marqueurs de l'inflammation notamment.

3. Publication

Le travail sur le couplage oxydatif du resvératrol dans l'éthanol, permettant l'hémisynthèse de deux nouveaux dimères en plus de la δ -viniférine et de la quadrangularine B, le dosage de ces oligomères et l'étude de leur formation dans le vin ainsi que l'évaluation de leur activité anti-inflammatoire *in vitro* sur des macrophages murins, ont fait l'objet d'un article scientifique intitulé « *Structure and biological activities of de novo synthesized resveratrol derivatives generated after heat treatment in wine* » accepté en février 2020 dans *Food Research International*.

Structure and biological activities of *de novo* synthesized resveratrol derivatives generated after heat treatment in wine

Toni El Khawand, Josep Valls Fonayet, Grégory Da Costa, Ruth Hornedo-Ortega, Michael Jourdes, Céline Franc, Gilles de Revel, Alain Decendit, Stéphanie Krisa, Tristan Richard*

Unité de Recherche Œnologie, EA 4577, USC 1366 INRA, Bordeaux INP, Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, 210 Chemin de Leysotte, 33882 Villenave d'Ornon, France

Corresponding author: Tristan Richard, email: tristan.richard@u-bordeaux.fr
ORCID Tristan Richard: 0000-0002-5308-8697

Highlights

- Four resveratrol dimers were produced by oxidative coupling of resveratrol in ethanol
- Reaction was faster, and yield was higher when AgOAc was used instead of FeCl₃
- Two of the produced dimers are reported for the first time: oxistilbenins F and G
- The compounds were identified and quantified in red wine after heat treatment
- The *de novo* synthesized compounds exhibited anti-inflammatory properties

Abstract

Resveratrol is a well-known wine constituent. Its concentration can vary according to the cultivar choice and the winemaking process. Due to its phenolic structure, resveratrol could be transformed under high temperature or oxidative conditions, leading to the formation of various derivatives including oligomers. Hence, the goal of this study is to investigate the presence of these derivatives in wine. In attempt to obtain these compounds, we proceeded to hemisynthesis of stilbene derivatives from resveratrol in ethanol by oxidative coupling using metals. Four *de novo* synthesized resveratrol derivatives were identified by MS and NMR spectroscopy including two new molecules, oxistilbenin F and oxistilbenin G. Analysis of red wine after heat treatment by LC-MS confirmed the presence of these compounds in wine. Finally, the anti-inflammatory effects of the resveratrol derivatives were evaluated by studying their ability to prevent lipopolysaccharide (LPS)-induced upregulation of nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production in RAW 264.7 macrophage cell line.

Keywords

Resveratrol; stilbene; hemisynthesis; wine; oxidative coupling; anti-inflammatory effect

Introduction

Polyphenols are among the most valuable compounds found in wine and play a major role in the taste and colour of wine and its potential biological activity (Garrido & Borges, 2013; Quideau, Deffieux, Douat-Casassus, & Pouységu, 2011; Waterhouse, 2002). Among them, stilbenes have received great attention. Originally identified in the grapevine and other plants as phytoalexins, (Adrian, Jeandet, Veneau, A. Weston, & Bessis, 1997; Langcake & Pryce, 1977), stilbenes were particularly studied for their several biological effects (Biais et al., 2017; Vang et al., 2011; Zamora-Ros et al., 2008). Resveratrol and its glucoside, the piceid, have the highest concentrations in wine among stilbenes (Guerrero, Valls-Fonayet, Richard, & Cantos-Villar, 2020). Their initial concentrations in

grape and wine depend on several biotic and abiotic factors such as environmental stresses, the cultivar, and technological practices (Fernández-Marín, Puertas, Guerrero, García-Parrilla, & Cantos-Villar, 2014; Poussier, Guilloux-Benatier, Torres, Heras, & Adrian, 2003). Their final concentrations in wine are the result of different mechanisms including enzymatic and microbiological interactions, or oxidative reactions. It was demonstrated that piceid can be hydrolysed during fermentation to produce resveratrol, by the yeast β -glucosidases (Roldán, Palacios, Caro, & Pérez, 2010). Resveratrol *cis-trans* isomerization balance can also be altered in wine under light exposure (Mattivi, Reniero, & Korhammer, 1995). In addition, resveratrol can be oxidized in wine kept under heat and oxygen exposure due to its phenolic structure (Bavaresco, Lucini, Busconi, Flamini, & de Rosso, 2016). In fact, oxidative coupling of resveratrol could occur in presence of metallic catalysts like silver, iron or copper in different solvents (Sako, Hosokawa, Ito, & Iinuma, 2004; Velu et al., 2008). The conditions required to induce these reactions can occur naturally in wine, through the presence of ethanol and several metallic constituents, mainly iron and copper (Płotka-Wasyłka, Frankowski, Simeonov, Polkowska, & Namieśnik, 2018; Tariba, 2011). In this study, the oxidative coupling reaction protocol was adapted to obtain new resveratrol dimers in ethanol using silver acetate (AgOAc) and iron chloride (FeCl₃), in the aim of investigate the presence of these stilbenes in wine. Compounds were identified by MS and NMR analysis. After identification of the *de novo* produced stilbenes, their content was determined in red wine before and after heat treatment using a LC-QqQ-MS method. Finally, their ability to prevent lipopolysaccharide (LPS)-induced upregulation of NO and ROS production in RAW 264.7 macrophage cell line were investigated and compared to that of resveratrol.

Material and methods

1. Analytical standards and reagents

All reagents were of analytical grade and used as received without further purification. Methanol (MeOH, HPLC grade), ethanol (HPLC grade), acetonitrile (HPLC and LC-MS grades, purity $\geq 99.9\%$) and formic acid (98%) were purchased from Fisher scientific (Loughborough, United Kingdom). Ethyl acetate (HPLC grade), ferric chloride (FeCl₃), DMEM and RPMI culture media, foetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, lipopolysaccharide (LPS), glutamine, methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO), Griess reagent, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). *Trans*-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene, purity $\geq 99\%$) was supplied by Bulk Powders™ (Colchester, United Kingdom). Silver acetate (AgOAc, purity $\geq 99\%$) was purchased from Acros organics (Geel, Belgium). Ultrapure water was obtained from an Elga apparatus (High Wycombe, United Kingdom).

2. Oxidative coupling of resveratrol in ethanol

Based on the protocol described by Sako et al. (Sako et al., 2004), regioselective oxidative coupling reaction was first conducted on 600 mg of resveratrol (0.6 g, 12 mmol) using AgOAc (670 mg, 18 mmol) or FeCl₃ (2.9 g, 18 mmol) in ethanol (100%, 60 mL) instead of methanol. The reaction mixture was stirred at temperatures ranged between 20 and 50°C. The reaction was then stopped by cooling at 4°C and centrifuged at 4000 rpm for 5 min. Then, the ethanolic fraction was collected and the solvent was removed under reduced pressure. The lyophilization of the fractions obtained from both AgOAc and FeCl₃ reactions afforded a dark yellow powder and a light brown powder respectively. Produced compounds from both reactions were isolated and identified using HPLC, UHPLC-DAD and NMR.

3. Isolation and identification of the reaction products

The preparative HPLC was performed on a Gilson PLC 2050 apparatus (Middleton, WI, USA) equipped with an UV-VIS detector. Elution was conducted on an Agilent Zorbax SB-C18 column (21.2 mm × 250 mm, 7 μm). The reaction extract powder was solubilized at 50 mg/mL in MeOH-H₂O (50/50; v/v). Extract was then eluted with a flow rate of 20 mL/min using non-acidified ultrapure water (solvent A) and acetonitrile (solvent B), according the following gradient: 35% B (0-2 min), 35-45% B (2-25 min), 45-100% B (25-26 min) and 100% B (26-31 min). The eluate was monitored at 280 and 306 nm and the fractions were automatically collected. The solvents were removed under reduced pressure and fractions were lyophilized. The elution of the reaction mix produced 3 different fractions, the third one being an isomeric mixture. An additional elution was then necessary to separate the 2 isomers. The fraction was eluted with a flow rate of 20 mL/min using non-acidified ultrapure water (solvent A) and methanol (solvent B), according the following gradient: 53% B (0-2 min), 53-56% B (2-25 min), 56-100% B (25-26 min) and 100% B (26-31 min). Compounds purity was measured using an UHPLC-DAD Agilent 1290 series apparatus (Santa Clara, Canada) equipped with an auto sampler module, a binary pump, a degasser, a column heater/selector and an UV-VIS-DAD. The elution was performed on an Agilent SB-C18 (2.1 mm x 100 mm, 1.8 μm) column at a flow rate of 0.4 mL/min, with acidified water (0.1% formic acid, solvent A) and acidified acetonitrile (0.1% formic acid, solvent B) according to the following gradient: 10% B (0.0-1.7 min), 10-20% B (1.7-3.4 min), 20-30% B (3.4-5.1 min), 30% B (5.1-6.8 min), 30-35% B (6.8-8.5 min), 35-60% B (8.5-11.9 min), 60-100% B (11.9-15.3 min), 100% B (15.3-17.0 min), 100-10% B (17.0-17.3 min). Samples were injected at a concentration of 100 μg/mL after solubilization in H₂O/MeOH mixture (1/1, v/v). Purity of the isolated compounds was estimated to be upper than 90%. The purified compounds structure was determined by ¹H-¹³C-NMR, using a Bruker Avance III 600 NMR spectrometer (Rheinstetten, Germany). Exact mass was determined by infusion on a Thermo Fischer Scientific Q Exactive Plus Orbitrap (Waltham, Massachusetts, USA) in negative mode with the following parameters: mode full scan; scan range: *m/z* 100-800; resolution: 280k; automatic gain control (AGC) target: 2e⁵; max ion injection: 30 ms. HESI source parameters: spray voltage: 2700V; sheath gas flow rate: 8; capillary temperature: 320°C.

3.1 Quadrangularin B (2)

Brown amorphous powder. ¹H-NMR (600 MHz, methanol-*d*₄): δ 0.94 (3H, d, *J* = 7.0 Hz), 2.94 (1H, m), 3.17 (1H, m), 3.32 (1H, dd, *J* = 3.0, 8.6 Hz), 3.45 (1H, t, *J* = 3.0 Hz), 3.99 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 4.27 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 5.65 (1H, brs), 6.15 (2H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.17 (1H, t, *J* = 1.9 Hz), 6.23 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.72 (2H, *J* = 8.5 Hz), 6.75 (2H, d, *J* = 8.5 Hz), 6.86 (2H, *J* = 8.5 Hz), 7.00 (2H, d, *J* = 8.5 Hz); ¹³C-NMR (150 MHz, methanol-*d*₄): δ 14.3, 54.4, 58.3, 60.5, 62.9, 84.1, 100.0, 101.1, 104.7, 105.1, 114.3, 114.4, 122.3, 128.1, 129.1, 131.8, 137.2, 146.1, 150.6, 154.2, 155.4, 156.9, 157.7; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₀H₂₇O₇ [M - H]⁻ *m/z* 499.1757, found to be 499.1756.

3.2 δ-viniferin (3)

Colorless amorphous powder. ¹H-NMR (600 MHz, methanol-*d*₄): δ 4.45 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 5.45 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.19 (2H, d, *J* = 2.1 Hz), 6.24 (1H, t, *J* = 2.1 Hz), 6.27 (1H, t, *J* = 2.0 Hz), 6.53 (2H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.85 (2H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.87 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 6.89 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 7.05 (1H, d, *J* = 16.3 Hz), 7.23 (2H, d, *J* = 8.3 Hz), 7.24 (1H, *J* = 1.8 Hz), 7.43 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.2 Hz); ¹³C-NMR (150 MHz, methanol-*d*₄): δ 57.1, 93.2, 101.6, 101.9, 104.9, 106.6, 109.4, 115.3, 123.1, 126.6, 127.7, 127.9, 128.2 (2C), 131.0, 131.7, 139.8, 144.4, 157.7, 158.8, 159.0, 159.7; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₂₈H₂₁O₆ [M - H]⁻ 453.1338, found to be 453.1343.

3.3 Oxistilbenin F (4)

Colourless amorphous powder. ¹H and ¹³C-NMR, see Table 2; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₀H₂₇O₇ [M – H][–] *m/z* 499.1757, found to be 499.1770.

3.4 Oxistilbenin G (5)

Colorless amorphous powder. ¹H and ¹³C-NMR, see Table 2; HRMS (ESI): *m/z* calcd for C₃₀H₂₇O₇ [M – H][–] *m/z* 499.1757, found to be 499.1739.

	4		5	
	δ _C	δ _H (mult., <i>J</i> in Hz)	δ _C	δ _H (mult., <i>J</i> in Hz)
1a	130.2	-	130.2	-
2a/6a	127.1	7.28 (d, 8.7)	127.1	7.33 (d, 8.7)
3a/5a	115.1	6.72 (d, 8.7)	115.2	6.85 (d, 8.7)
4a	157.9	-	158.1	-
7a	127.8	6.90 (d, 16.1)	127.8	6.92 (d, 16.1)
8a	126.6	4.24 (d, 16.1)	126.6	6.79 (d, 16.1)
9a	139.7	-	139.7	-
10a/14a	104.6	6.41 (d, 2.1)	104.6	6.42 (d, 2.1)
11a/13a	158.2	-	158.3	-
12a	101.4	6.14 (brs)	101.4	6.14 (t, 2.1)
1b	129.2	-	128.8	-
2b/6b	129.2	7.12 (d, 8.7)	128.8	6.99 (d, 8.7)
3b/5b	114.3	6.72 (d, 8.7)	114.2	6.66 (d, 8.7)
4b	156.7	-	156.7	-
7b	84.7	4.44 (d, 5.8)	85.2	4.52 (d, 6.9)
8b	82.7	5.10 (d, 5.8)	83.9	5.05 (d, 6.9)
9b	141.4	-	140.6	-
10b/14b	105.8	6.26 (d, 2.1)	106.0	6.11 (d, 2.1)
11b/13b	157.8	-	157.8	-
12b	101.4	6.14 (brs)	101.4	6.05 (t, 2.1)
OCH ₂	64.6	3.28 (m) 3.42 (m)	64.6	3.46 (m)
CH ₃	14.1	1.08 (t, 7.0)	14.1	1.17 (t, 7.0)

Table 2. NMR data of compounds 4 and 5 in methanol-*d*₄.

4. Wine treatment and stilbene content

4.1 Wine treatment protocol

A volume of 50 mL of red wine was heated at 30°C, for 24 hours. Ethanol was eliminated under reduced pressure before proceeding to afford an aqueous wine solution. The samples were then reloaded with pure water to recover a volume of 50 mL to start the SPE extraction of stilbenes. 5000 mg SPE Hypersep C18 cartridges (ThermoScientific, Rockwood, USA) were previously conditioned with 25 mL of methanol and 25 mL of water. The 50 mL sample was then loaded on the cartridge and a clean-up step with 50 mL of water was conducted. Stilbenes were eluted with 50 mL of methanol and concentrated with a rotatory evaporator to a final volume of 20 mL with 50% methanol.

4.2 Stilbene quantification in wine

Stilbenes were controlled and quantified using triple quadrupole-mass spectrometry (QqQ-MS) detection on an Agilent 1260 LC system from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Chromatographic separation was carried out on an Agilent Poroshell C18 (150 mm x 2.1 mm x 2.7 µm) column at 35°C with a binary solvent system composed by acidified water (0.1 % formic acid, solvent A) and acidified acetonitrile (0.1% formic acid, solvent B). The elution was conducted at a flow rate of 0.3 mL/min according to the following gradient: 5-18% B (0-5 min); 18-46% B (5-15 min); 46-95% B (22-25 min); 95% B (25-27 min); 95-5% (27-30 min). The volume of injection for standards and wine samples was 5 µL. The chromatographic system was coupled to an Agilent 6430 Triple Quadrupole mass spectrometer which worked with the following parameters: Drying gas: 11 L/min, Source Temperature: 350°C, Voltage: 3000V. The analysis was performed in optimized multiple reaction monitoring (MRM) conditions obtained by infusion of pure compounds. For the calibration curve, a solution of methanol 50% containing 10 mg/L of resveratrol, quadrangularin B, δ-viniferin, Oxistilbenin F and Oxistilbenin G was prepared in order to prepare standard solutions by successive dilutions 1:2 in 50% methanol.

5. Biological assays

5.1. Cell culture

Murine macrophage cell line RAW 264.7 was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal bovine serum, 1% streptomycin and 100 U/mL penicillin, at 37°C in a humidified, 5% CO₂, 95% air atmosphere. Cells were seeded in 96-well plates (50,000 cells/well). After 24 hours, cells were incubated with increasing concentrations of resveratrol and analogs (1- 20 µM) for 24 hours in the presence or absence of LPS (0.1 µg/mL), in white RPMI medium containing 4 mM of glutamine.

5.2. Cytotoxicity determination

Cell viability was evaluated by monitoring the cell mitochondrial activity, using the MTT reduction assay. MTT solution (0.5 mg/mL) was added to each well and the cells were incubated for additional 3 hours at 37 °C. Then, the supernatant was removed, formazan crystals were dissolved in DMSO and the absorbance was measured at 595 nm in a spectrophotometer microplate reader (FLUOstarOptima, BMG Labtech).

5.3. NO measurement

The NO production was determined by measuring the nitrite content in the culture supernatant. Equal volumes of the Griess reagent and the cell culture supernatant were mixed. After 15 min at room temperature, the absorbance was measured at 540 nm (FLUOstarOptima, BMG Labtech). The standard curve plotted for sodium nitrite was used to calculate NO concentration.

5.4. Intracellular ROS measurement

Generation of ROS in cells was analysed using a fluorometric probe, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA). After treatment, medium was removed, cells were washed with PBS and incubated in the presence of 5 μ M H₂DCFDA at 37°C for 30 min. Then, the fluorescence intensity was quantified using a spectrofluorometer (FLUOstarOptima, BMG Labtech). The wavelengths of excitation and emission used to detect the ROS were 485 nm and 520 nm, respectively.

6. Statistical analysis

Experiments were performed in quadruplicate and repeated at least three times. All values were represented as mean \pm SEM. Data were analysed by one-way analysis of variance followed by a Dunnett's post-test using GraphPad Prism Software (Sa Diego, CA, USA). Significance was set at $p < 0.05$.

Results and discussion

1. Treatment of resveratrol by metals

Resveratrol was treated by means of silver acetate (AgOAc) and iron chloride (FeCl₃) in ethanol followed by chromatographic purification using preparative HPLC and structure identification by HRMS and NMR spectroscopy. The reaction between resveratrol and metals in ethanol led to the formation of four main compounds: quadrangularin B (**2**), δ -viniferin (**3**), oxistilbenin F (**4**), and oxistilbenin G (**5**), as shown in Table 1 and Figure 1. Compound **2** was identified as quadrangularin B (Adesanya et al., 1999). The relative stereochemistry of compound **2** was supported by the examination of ROESY spectrum. The stereochemistry of C-7b and C-8b was established by the presence of NOE correlations H-7b/H-10b and H-8b/H-2b. The correlations H-8a/H-10b and H-8a/H-7b indicated that H-8a and H-7b are on the same side. Finally, NOE cross-peaks H-2a/H-14a and H-2b/H-1 indicated the stereochemistry of C-1 (Adesanya et al., 1999). Compound **3** was the main compound formed (yield 48% in AcOAg, after 1 h at 50°C). The structure of **3** was identified as δ -viniferin by comparison with previously reported mass and NMR data (Pezet et al., 2003). The ¹H-NMR spectrum of compound **3** exhibited the characteristic signals for the dihydrobenzofuran ring at δ 5.45 (d, $J = 8.1$ Hz) and 4.45 (d, $J = 8.1$ Hz), and for the *trans* vinyl protons at δ 7.05 (d, $J = 16.3$ Hz) and 6.89 (d, $J = 16.3$ Hz). Compound **4** was obtained as an amorphous brown powder, with a high-resolution molecular ion in negative mode at m/z [M – H][–] 499.1770 (calcd for C₃₀H₂₇O₇ m/z 499.1757) corresponding to a resveratrol dimer. The ¹H-NMR spectrum of **4** (Table 2) exhibited two AB₂ systems at δ 6.14 (1H, brs, H-12a), 6.41 (2H, d, $J = 2.1$ Hz, H-10a/14a), and δ 6.14 (1H, brs, H-12b), 6.26 (2H, d, $J = 2.1$ Hz, H-10b/14b) for rings A₂ and B₂, respectively; two AA'XX' type ortho-coupled aromatic protons at δ 7.28 and 6.72 (2H each, d, $J = 8.6$ Hz) for ring A₁, δ 6.72 and 7.12 (2H each, d, $J = 8.7$ Hz) for ring B₁; two *trans* coupled olefinic bond proton signals at δ 6.77 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-8a) and 6.90 (1H, d, $J = 16.1$ Hz, H-7a), two coupled aliphatic protons at δ 4.44 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, H-7b) and 5.10 (1H, d, $J = 5.8$ Hz, H-8b), and one ethoxy group at δ 1.08 (3H, $J = 7.0$ Hz), 3.28 (1H, m) and 3.42 (1H, m). The correlations of the aromatic rings, double bond, aliphatic protons were deduced from COSY spectrum. All the protonated carbons were identified from HSQC spectrum. The examination of the C-H long range correlations from HMBC spectrum indicated that **4** was a chain resveratrol dimer connected with C-8b and OH-4a. This connectivity was confirmed by the HMBC cross-peaks C-3a/H-8b and C-9b/H10b. The position of the ethoxy group was deduced from the HMBC cross-peak between OCH₂ and H-7b. Concerning relative stereochemistry, the absence of strong NOE correlations H-8b/H-2b and H-7b/H10b indicated that C-7b and C-8b should be in *threo* form. The structure of the new compound **4** was named oxistilbenin F. Compound **5** was obtained as a brown amorphous powder, with a high-resolution molecular ion in negative mode at m/z [M – H][–] 499.1739 (calcd for C₃₀H₂₇O₇ m/z 499.1757). The NMR data (Table 2) of **5** were nearly identical to those of **4**. Examination of 2D NMR spectra suggested that compounds **4** and **5** are a pair diastereoisomers. In contrast to ROESY spectrum of **4**, the strong NOE cross-peaks H-8b/H-2b and H-7b/H10b observed for **5** suggested that C-7b and C-8b should be in *erythro* form. In addition, the large and small values for H-7b and H-8b measured for *erythro* and *threo* forms, respectively, were in agreement with thus observed in close diastereoisomers (Li et al., 2017). The structure of the new compound **5** was named oxistilbenin G.

Reagent	Temperature (°C)	Time (h)	Yield (%)			
			2	3	4	5
AgOAc	50	1	3	48	6	32
AgOAc	40	1	2	29	4	19
AgOAc	40	2	2	33	5	22
AgOAc	30	1	0	15	2	10
AgOAc	20	1	0	3	0	0
FeCl ₃	50	1	1	10	1	6

Table 1. Treatments of resveratrol (1) with different oxidizing reagents in ethanol.

As previously observed, metals induce resveratrol dimerization by oxidative coupling (Sako et al., 2004; Velu et al., 2008). The reaction can be explained by a single electron transfer from resveratrol to metal cation followed by a regioselective coupling and intramolecular cyclization. The dimerization process is mainly controlled by the one-electron oxidant and the solvent used (Sako et al., 2004; Velu et al., 2008). The efficiency of the reaction (Table 1) depends of the oxidation ability of the employed oxidative reagents and temperature. In all cases, δ -viniferin (3) was the major product and compounds 2 and 4 were obtained as minor products. Comparing the metallic catalysts used, the reaction is much more effective with silver acetate (total yield 87%, after 1 hour at 50°C) than with FeCl₃ (total yield 18%, after 1 hour at 50°C). When FeCl₃ was employed, compounds 2 and 4 were hardly produced, while compounds 3 and 5 only were formed with lower yields. The mechanism of formation of the different dimers could be similar to that reported for isorhapontigenin (Wang et al., 2014). In fact, the oxidative reaction on OH-4 position could induce the formation of phenoxy radicals leading large diversity of coupling modes. Compound 2 was previously obtained by biomimic transformation of resveratrol using peroxidases (Takaya et al., 2005). Compounds 4 and 5 were synthesized and reported for the first time.

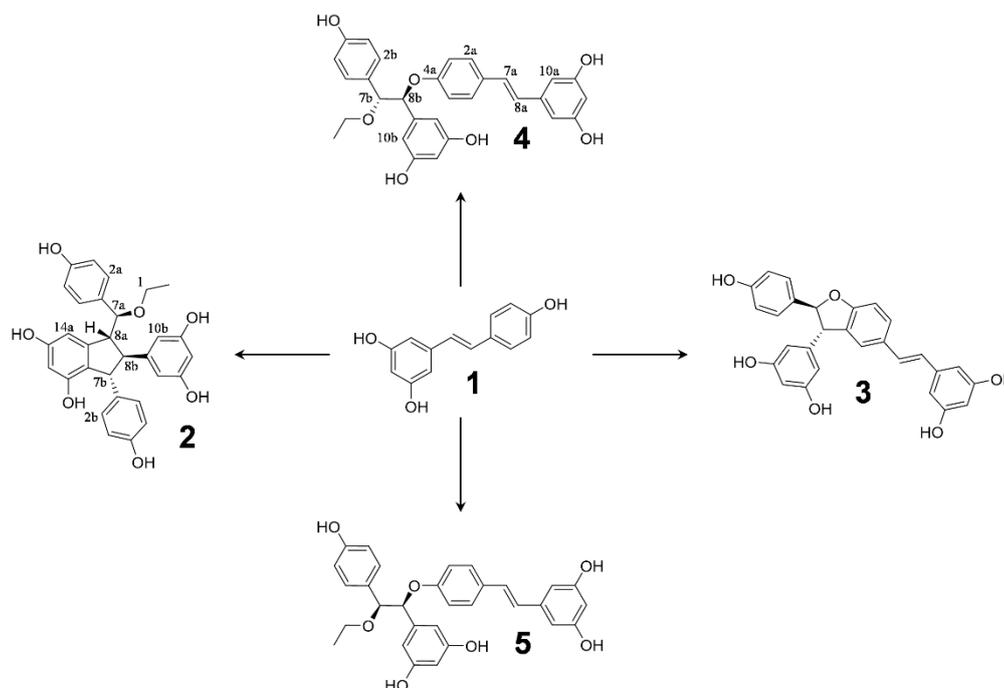


Figure 1. Structures of the compounds formed after oxidative coupling of resveratrol.

3.2. Formation of resveratrol dimers in wine after heat treatment

Resveratrol is one of the main stilbenes identified in wines. Even if its amount vary greatly, its average content is of 2.7 mg/L in red wines (Neveu et al., 2010). In addition, oxidative reagents, such iron, are naturally present in wine (Tariba, 2011). Based on the results obtained in this work, resveratrol dimerization could occur in wine. To confirm this hypothesis, a red wine was subjected to a heat treatment at 30°C for 24 hours. Stilbenes were quantified before and after wine heating using a LC-MS method on a triple quadrupole mass spectrometer (LC-QqQ-MS). MRM mode was used to select specific transitions of the quantified compounds in order to increase both selectivity and sensitivity (Lambert et al., 2015). For each compound, MRM transitions parameters were optimised. The optimised MRM transition parameters are shown in Table 3. For quantitative analysis, the quantifier transition chromatogram of stilbene was used, and the rest of transitions confirmed the stilbene identification in wine. The quantifier transitions were m/z 227/143 for resveratrol (1), m/z 499/359 for quadrangularin B (2), m/z 453/361 for δ -viniferin (3), m/z 499/227 for oxistilbenin F (4), and m/z 499/453 for oxistilbenin G (5).

Compound	Formula	Mode	Precursor ion m/z	Quantifier m/z	Qualifiers m/z	Retention time (min.)	Calibration range (mg/L)
resveratrol (1)	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	-	227	143	185	19.86	0.039-2
quadrangularin B (2)	C ₃₀ H ₂₈ O ₇	-	499	359	255, 289	19.57	0.0048-1.25
δ -viniferin (3)	C ₂₈ H ₂₂ O ₆	-	453	361	227, 107, 215	21.57	0.0097-1.25
oxistilbenin F (4)	C ₃₀ H ₂₈ O ₇	-	499	227	271, 453, 225	22.14	0.0048-1.25
oxistilbenin G (5)	C ₃₀ H ₂₈ O ₇	-	499	453	227, 271, 225	22.41	0.0048-1.25

Table 3. MRM parameters (precursor and product ions m/z , retention times), and quantitative response of stilbene compounds in wine.

The amounts of the five quantified stilbenes before and after wine treatment were reported in Table 4. Before wine treatment, the level of resveratrol was found to be 330 $\mu\text{g/L}$ in the selected red wine. In addition, a small amount of δ -viniferin was observed (20 $\mu\text{g/L}$). This compound is a natural stilbene previously identified in red wine (Vitrac et al., 2005). After wine treatment for 24 hours at 30°C, the level of resveratrol had decreased by almost 50%, while the amount of δ -viniferin had increased by 5-fold bringing it from 20 to 100 $\mu\text{g/L}$. In addition, the formation of oxistilbenin G was observed in red wine after the heat treatment. This compound was specifically formed after oxidative coupling of two resveratrol units in ethanol. The amounts of oligomers obtained were in agreement with the rate observed in the reaction between resveratrol and metals in ethanol (Table 1). The δ -viniferin was the main compound formed in red wine followed by oxistilbenin G, a new identified wine constituent. All these data have confirmed that resveratrol could be transformed by oxidative coupling during wine aging providing oligomers. This is the first demonstration of the fact that oxidative coupling of resveratrol units could occur in red wine. The difference between the total stilbene content before and after treatment (1.50 and 0.94 μM , respectively) seems to indicate that a part of the resveratrol has reacted with other compounds.

Compound	Before heating	After heating
resveratrol (1)	330 ± 100	160 ± 100
quadrangularin B (2)	Nd	nd
δ-viniferin (3)	20 ± 10	100 ± 10
oxistilbenin F (4)	Nd	nd
oxistilbenin G (5)	Nd	6 ± 1
Total	350 ± 110	266 ± 111

Table 4. Stilbene levels in wine before and after heat treatment (24h at 30°C). Results are expressed in µg/L as means of 3 instrumental replicates ± SD.

3.3. Anti-inflammatory activity of resveratrol derivatives

Anti-inflammatory activity of the produced compounds was evaluated using LPS-induce RAW 264.7 cells model. In order to determine the cytotoxicity of stilbenes, the viability was measured after cells treatment at 1 to 20 µM. A decrease of cell viability was observed from 15 µM of δ-viniferin, oxistilbenin F and oxistilbenin G. Resveratrol and quadrangularin B did not show significant cytotoxicity at all tested concentrations (data not shown). On one hand, as shown in the Fig. 2A, resveratrol, δ-viniferin, oxistilbenin F and oxistilbenin G reduced NO production by LPS-stimulated macrophages, with IC₅₀ of 17.9, 8.7, 9.2 and 9.8 µM, respectively. On the other hand, quadrangularin B exhibited a moderate inhibitory activity against NO at the highest concentration. In addition, a decrease effect on the production of ROS was observed for all stilbenes except the quadrangularin B (Fig. 2B). The δ-viniferin was slightly more active in inhibiting ROS production than the other compounds (IC₅₀ 7.6 µM). To conclude, the anti-inflammatory and antioxidant activity of δ-viniferin is stronger than that of resveratrol and other dimers. Thus, oxidative coupling during wine aging could modulate the biological activities associated with red wine stilbenes.

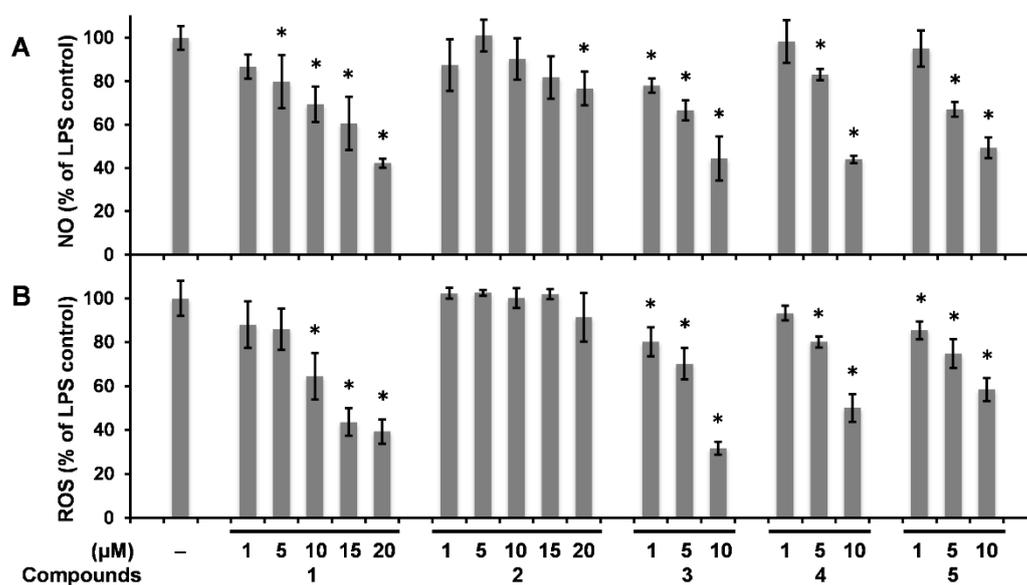


Figure 2. Effect of treatment with stilbene and LPS (0.1 µg/mL) on the NO production (A) or ROS formation (B) in RAW 264.7 cells. Res = resveratrol, δ-vin = δ-viniferin, Oxi F = oxistilbenin F, Oxi G = oxistilbenin G and Qua B = quadrangularin B. Data are expressed as percentage of the control (cells treated with LPS alone set to 100% production), corresponding to the mean ± SEM (n=4).

Conclusion

In this study, the oxidative dimerization of resveratrol using metals in ethanol was investigated. Five dimers with distinct skeletons were obtained in different yields depending on the conditions. In all cases, δ -viniferin and oxistilbenin G were the main compounds formed. We have demonstrated that these reactions could occur in red wine after heat treatment. The treatment has modulated the stilbene content by reducing the resveratrol amount, increasing the amount of δ -viniferin, and inducing the formation of new compounds such as oxistilbenin G. Finally, the anti-inflammatory activity of these compounds was evaluated. The results have indicated that oxidative coupling during wine aging could modulate the biological properties of wine by inducing the formation of more active compounds such δ -viniferin.

Acknowledgements

The work was supported by the Bordeaux Metabolome Facility and MetaboHUB (ANR-11-INBS-0010 project).

References

- Adesanya, S. A., Nia, R., Martin, M. T., Boukamcha, N., Montagnac, A., & Païs, M. (1999). Stilbene derivatives from *Cissus quadrangularis*. *Journal of Natural Products*, 62 (12), 1694-1695.
- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., A. Weston, L., & Bessis, R. (1997). Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines, against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 1689-1702.
- Bavaresco, L., Lucini, L., Busconi, M., Flamini, R., & de Rosso, M. (2016). Wine resveratrol: From the ground up. *Nutrients*, 8 (4).
- Biais, B., Krisa, S., Cluzet, S., Da Costa, G., Waffo-Teguo, P., Mérillon, J. M., & Richard, T. (2017). Antioxidant and cytoprotective activities of grapevine stilbenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65 (24), 4952-4960.
- Fernández-Marín, M. I., Puertas, B., Guerrero, R. F., García-Parrilla, M. C., & Cantos-Villar, E. (2014). Preharvest Methyl Jasmonate and Postharvest UVC Treatments: Increasing Stilbenes in Wine. *Journal of Food Science*, 79 (3), C310-C317.
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. *Food Research International*, 54 (2), 1844-1858.
- Guerrero, R. F., Valls-Fonayet, J., Richard, T., & Cantos-Villar, E. (2020). A rapid quantification of stilbene content in wine by ultra-high pressure liquid chromatography – Mass spectrometry. *Food Control*, 108.
- Lambert, M., Meudec, E., Verbaere, A., Mazerolles, G., Wirth, J., Masson, G., Cheyrier, V., & Sommerer, N. (2015). A High-Throughput UHPLC-Qq-MS Method for Polyphenol Profiling in Rosé Wines. *Molecules*, 20 (5), 7890-7914.
- Langcake, P., & Pryce, R. J. (1977). A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, 33 (2), 151-152.
- Li, W., Dong, T., Chen, P., Liu, X., Liu, M., & Han, X. (2017). Concise synthesis of several oligostilbenes from the enzyme-promoted oxidation of brominated resveratrol. *Tetrahedron*, 73 (21), 3056-3065.
- Mattivi, F., Reniero, F., & Korhammer, S. (1995). Isolation, Characterization, and Evolution in Red Wine Vinification of Resveratrol Monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (7), 1820-1823.
- Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., & Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database*, 2010, bap024.
- Pezet, R., Perret, C., Jean-Denis, J. B., Tabacchi, R., Gindro, K., & Viret, O. (2003). δ -viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (18), 5488-5492.
- Plotka-Wasyłka, J., Frankowski, M., Simeonov, V., Polkowska, Ż., & Namieśnik, J. (2018). Determination of Metals Content in Wine Samples by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23 (11), 2886.
- Poussier, M., Guilloux-Benatier, M., Torres, M., Heras, E., & Adrian, M. (2003). Influence of Different Maceration Techniques and Microbial Enzymatic Activities on Wine Stilbene Content. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54 (4), 261-266.

- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50 (3), 586-621.
- Roldán, A., Palacios, V., Caro, I., & Pérez, L. (2010). Evolution of Resveratrol and Piceid Contents during the Industrial Winemaking Process of Sherry Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (7), 4268-4273.
- Sako, M., Hosokawa, H., Ito, T., & Inuma, M. (2004). Regioselective oxidative coupling of 4-hydroxystilbenes: synthesis of resveratrol and ϵ -viniferin (E)-dehydrodimers. *Journal of Organic Chemistry*, 69 (7), 2598-2600.
- Takaya, Y., Terashima, K., Ito, J., He, Y.-H., Tateoka, M., Yamaguchi, N., & Niwa, M. (2005). Biomimic transformation of resveratrol. *Tetrahedron*, 61 (43), 10285-10290.
- Tariba, B. (2011). Metals in wine - Impact on wine quality and health outcomes. *Biological Trace Element Research*, 144 (1-3), 143-156.
- Vang, O., Ahmad, N., Baile, C. A., Baur, J. A., Brown, K., Csiszar, A., Das, D. K., Delmas, D., Gottfried, C., Lin, H. Y., Ma, Q. Y., Mukhopadhyay, P., Nalini, N., Pezzuto, J. M., Richard, T., Shukla, Y., Surh, Y. J., Szekeres, T., Szkudelski, T., Walle, T., & Wu, J. M. (2011). What is new for an old molecule? systematic review and recommendations on the use of resveratrol. *PLoS One*, 6 (6).
- Velu, S. S., Buniyamin, I., Ching, L. K., Feroz, F., Noorbacha, I., Gee, L. C., Awang, K., Wahab, I. A., & Weber, J.-F. F. (2008). Regio- and stereoselective biomimetic synthesis of oligostilbenoid dimers from resveratrol analogues: influence of the solvent, oxidant, and substitution. *Chemistry--A European Journal*, 14 (36), 11376-11384.
- Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Valls, J., Richard, T., Delaunay, J. C., Mérillon, J. M., & Teissédre, P. L. (2005). Determination of stilbenes (δ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (14), 5664-5669.
- Wang, X.-F., Zhang, Y., Lin, M.-B., Hou, Q., Yao, C.-S., & Shi, J.-G. (2014). Biomimetic synthesis of active isorhapontigenin dimers. *Journal of Asian Natural Products Research*, 16 (5), 511-521.
- Waterhouse, A. L. (2002). Wine Phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957 (1), 21-36.
- Zamora-Ros, R., Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R. M., Berenguer, T., Jakszyn, P., Martínez, C., Sánchez, M. J., Navarro, C., Chirlaque, M. D., Tormo, M. J., Quirós, J. R., Amiano, P., Dorronsoro, M., Larrañaga, N., Barricarte, A., Ardanaz, E., & González, C. A. (2008). Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort. *British Journal of Nutrition*, 100 (1), 188-196.

Discussion générale des résultats

Discussion générale des résultats

Le travail de recherche décrit dans ce manuscrit repose sur l'hémisynthèse d'oligomères du resvératrol par couplage oxydatif, pouvant potentiellement être valorisés dans le domaine viti-vinicole ainsi qu'en santé humaine. D'une part, les stilbènes ainsi formés semblent dotés d'un potentiel antimicrobien et antifongique prometteur contre *Plasmopara viticola* et *Botrytis cinerea*, deux agents pathogènes majeurs de la vigne. D'autre part, la formation de ces stilbènes a permis de démontrer la possibilité de leur formation dans le vin, et de comprendre les conditions favorables à leur apparition. Enfin, leur obtention a permis d'explorer leurs effets potentiels sur la santé humaine, par des tests de leur activité anti-inflammatoire *in vitro*.

1. Avancées sur l'hémisynthèse des stilbènes

1.1. Bilan général

L'ensemble des travaux d'hémisynthèse d'oligomères du resvératrol décrits dans ce manuscrit a finalement permis la production de dix-sept stilbènes différents, répartis entre dimères, trimères et tétramères. Dans la famille des dimères, sept composés ont été produits : δ -viniférine, oxistilbénine A, oxistilbénine B, oxistilbénine F, oxistilbénine G, parthénostilbénine B et quadrangularine B. La famille des trimères est également représentée par sept composés : *trans*-resviniférine A, *cis*-resviniférine A, *trans*-oxistilbénine C, *trans*-oxistilbénine D, *trans*-oxistilbénine E et *cis*-oxistilbénine E. Enfin, dans la catégorie des tétramères, plusieurs composés ont pu être produits, mais seule la vitisine B a pu être identifiée. Parmi ces dix-sept composés, six ont été identifiés pour la première fois : oxistilbénine F, oxistilbénine G, *trans*-oxistilbénine C, *trans*-oxistilbénine D, *trans*-oxistilbénine E, *cis*-oxistilbénine E, soit deux dimères et quatre trimères.

1.2. Mise au point des réactions de couplage oxydatif du resvératrol

La première réaction mise au point a consisté en un couplage oxydatif du resvératrol dans le méthanol, en présence d'acétate d'argent. La seconde réaction a été mise au point selon des conditions similaires, en utilisant les mêmes réactifs, mais en remplaçant le méthanol par l'éthanol. Dans les deux cas, la conversion du resvératrol était totale en une heure, avec la production de quatre dimères à chaque fois, avec des rendements comparables. La δ -viniférine est le dimère majoritaire dans les deux réactions. Cependant, son rendement diminue par rapport aux travaux de référence, passant de 97% (Sako et al., 2004) à des taux compris entre 48 et 57%, et laissant apparaître trois dimères supplémentaires, l'oxistilbénine A, l'oxistilbénine B et la parthénostilbénine B dans le méthanol, et l'oxistilbénine F,

l'oxistilbénine G et la quadrangularine B dans l'éthanol. Le changement de la nature et des rendements du produit final serait dû aux modifications de la cinétique de la réaction opérées lors de ce travail, ainsi qu'au choix du solvant. La cinétique de la réaction a été optimisée de trois façons différentes : le changement du ratio acétate d'argent/resvératrol, augmenté à 1,5 pour 1 ; l'agitation continue du milieu réactionnel permettant d'augmenter la probabilité de contact entre les réactifs, et l'utilisation exclusive de solvants oxygénés, le méthanol et l'éthanol, qui assurent une solubilisation optimale des réactifs. L'accélération de la vitesse de la formation des radicaux phénoxyes issus de l'oxydation du resvératrol aurait ainsi permis à de nouveaux modes de couplage d'avoir lieu dans le milieu réactionnel, facilitant la formation de dimères stables. Outre le rôle des solvants dans l'amélioration de la cinétique de la réaction, ils jouent également le rôle de réactifs, comme évoqué dans la littérature (Velu et al., 2008) (Keylor et al., 2015), intervenant directement dans la réaction de couplage en s'additionnant sur le dimère néoformé, ce qui explique l'obtention de dimères portant des groupes méthyle et éthyle. Cette participation active du méthanol et de l'éthanol à la réaction de couplage pourrait être expliquée par leur caractère protique, c'est-à-dire leur capacité à libérer des protons (H^+) de par leur nature alcoolique. En libérant le proton de leur fonction alcool, le méthanol et l'éthanol passent à l'état radicalaire $R - O^-$, leur permettant d'effectuer une addition électrophile au niveau de la double liaison reliant les positions 7 et 8 du resvératrol. C'est ainsi que les oxistilbénines A et B et la parthénostilbénine B, portant un groupe *O*-méthyle, sont observées dans le méthanol, alors que les oxistilbénines F et G et la quadrangularine B, portant un groupement *O*-éthyle, sont observées dans l'éthanol. Quant au couplage des radicaux phénoxyes, il peut se faire soit selon des liaisons C – O, soit des liaisons C – C. Ce couplage est généralement suivi de cyclisations intramoléculaires de Friedel-Crafts permettant de stabiliser l'oligomère. Ainsi, les oxistilbénines A, B, F et G sont formées selon le couplage C – O entre deux radicaux phénoxyes, alors que la quadrangularine B et la parthénostilbénine B sont le produit du couplage C – C, de type 8 – 8' de deux radicaux phénoxyes ; quant à la δ -viniférine, elle est le résultat d'un couplage 3 – 8'. Enfin, le choix du sel de métal est également un élément primordial, étant le support de l'oxydation. A l'instar du solvant, il intervient dans la cinétique de la réaction et exerce ainsi une influence sur la nature et le rendement des composés formés (Keylor et al., 2015). Le choix de l'acétate d'argent a permis une conversion totale du resvératrol que ce soit dans le méthanol ou l'éthanol, avec une durée de réaction très courte (une heure). D'ailleurs, l'utilisation du chlorure de fer dans les mêmes conditions que l'acétate d'argent ralentit considérablement la réaction de couplage, tout en réduisant les rendements. L'identification des composés obtenus a mis en jeu plusieurs techniques analytiques : UPLC-MS, HPLC, spectrométrie de masse haute résolution (HR-MS) et RMN.

1.3. Couplage oxydatif appliqué à une fraction d'extrait de sarment de vigne

La première application de ces réactions a conduit à la production d'un extrait d'oligomères à fort potentiel antifongique dans la lutte contre *P. viticola* et *B. cinerea*. Dans ce travail, la fraction de stilbènes utilisée pour faire le couplage oxydatif a été obtenue par CPC à partir d'un extrait de stilbènes,

lui-même obtenu par extraction à l'acétate d'éthyle à partir du vinéatrol®, un extrait de sarments de vigne. La fraction utilisée étant essentiellement composée de resvératrol et d' ϵ -viniférine, il était à présent possible de former des trimères et même des tétramères, via le couplage entre ces deux composés, en plus des dimères obtenus à partir du resvératrol. La transposition des conditions de réaction préalablement établies a réussi, et la conversion totale de ces deux stilbènes par réaction dans le méthanol en présence d'acétate d'argent a conduit à la formation de plus de treize oligomères différents, dont sept trimères cités précédemment, et plusieurs tétramères. De plus, la formation de la δ -viniférine et de la vitisine B apporte une valeur ajoutée à l'extrait obtenu, de par leur forte activité antifongique relatée dans la littérature. A l'image des mécanismes observés lors de la réaction sur le resvératrol, les couplages mis en jeu sont de types C – O, ou C – C de types 3 – 8', ou encore une combinaison des deux. Cette augmentation du nombre d'oligomères produits et du degré d'oligomérisation, ainsi que la production de quatre nouveaux trimères sont autant d'atouts favorables à une activité antifongique accrue (voir paragraphe 2. Application phytosanitaire contre *Plasmopara viticola* et *Botrytis cinerea*) et représentent une avancée en termes d'hémisynthèse des stilbènes.

2. Application phytosanitaire contre *Plasmopara viticola* et *Botrytis cinerea*

2.1. Efficacité des oligomères et des extraits obtenus

2.1.1. Effets des oligomères

Les activités d'inhibition de la sporulation de *P. viticola* sur disques foliaires de vigne et d'inhibition du développement mycélien de *B. cinerea* ont toutes deux été étudiées *in vitro*. Les composés testés sont ceux formés par couplage oxydatif du resvératrol et de l' ϵ -viniférine dans le méthanol, en plus des mélanges d'oligomères bruts issus des deux réactions. Les résultats obtenus et exposés dans le chapitre I de cette thèse confirment une fois de plus l'efficacité supérieure des oligomères par rapport au resvératrol dans la lutte contre *P. viticola* et *B. cinerea*. Outre la δ -viniférine et la vitisine B, connues pour leur activité antifongique élevée (Pezet et al., 2004) (Gabaston et al., 2017), ce travail a permis la production de quatre trimères au moins aussi efficaces, contre *P. viticola*. En effet, la *cis*-oxistilbénine E et la *trans*-oxistilbénines E sont deux trimères présentant des CI₅₀ légèrement inférieures à celles de la δ -viniférine, contre *P. viticola*. La *trans*-oxistilbénine B et la *trans*-oxistilbénine C suivent avec une activité légèrement inférieure. Cependant, dans le cas de l'activité inhibitrice contre *B. cinerea*, bien que certains oligomères présentent des CI₅₀ relativement basses, aucun n'est aussi actif que la δ -viniférine et la vitisine B. Parmi ces oligomères efficaces contre *B. cinerea*, citons la *trans*-oxistilbénine E et la *cis*-oxistilbénine E, qui conservent approximativement les mêmes CI₅₀ que celles calculées contre *P. viticola*, et la resviniférine A, particulièrement active contre *B. cinerea*, avec une CI₅₀ de 18 mg/L. Dans tous les cas, tous les oligomères formés dans le méthanol, mise à part la parthénostilbénine B, ont présenté des CI₅₀ plus basses que le resvératrol, contre les deux agents pathogènes. Ce résultat montre

donc l'importance de l'hémisynthèse dans la production rapide de stilbènes efficaces à fort potentiel antifongique, à partir du resvératrol, stilbène abondant et disponible commercialement.

2.1.2. Effets des extraits

L'étude de l'activité des mélanges bruts d'oligomères formés par la réaction de couplage montre que ces mélanges exercent une activité inhibitrice importante. Dans certains cas, l'efficacité de ces mélanges bruts est supérieure à celle des deux molécules les plus actives, la δ -viniférine et la vitisine B. Ainsi, le mélange réactionnel obtenu après couplage oxydatif du resvératrol dans le méthanol présente une CI_{50} de 24 mg/L contre *P. viticola*, inférieure à celle de la δ -viniférine et à celle de tous les oligomères du mélange pris séparément. De même, le mélange réactionnel formé par le couplage de la fraction d'extrait de sarment est plus actif que la δ -viniférine et la vitisine B contre *B. cinerea*, et par conséquent plus actif que les oligomères qui le composent, avec une CI_{50} de 5 mg/L. Ces cas reflètent un probable effet de synergie résultant de l'action concomitante des différents oligomères, permettant d'atteindre une efficacité maximale sous forme de mélange plutôt que sous forme pure. Dans une optique d'application à l'échelle industrielle de ces travaux, cet effet synergique a non seulement des avantages en termes d'efficacité, mais également au niveau technique, économique et environnemental, étant donné qu'il dispenserait le fabricant de procéder à des étapes supplémentaires de purification et de fractionnement du mélange, réduisant à la fois la durée de fabrication, les dépenses financières et l'utilisation de solvants organiques nocifs pour l'environnement. D'ailleurs, comparés à l'extrait de sarment de vigne non modifié, le mélange d'oligomères obtenu par le couplage du resvératrol et le mélange obtenu par le couplage de la fraction d'extrait de sarments sont trois fois et dix fois plus actifs contre *P. viticola*, respectivement, et jusqu'à seize et soixante-six fois plus actifs contre *B. cinerea*, respectivement. Ces résultats soulignent encore une fois l'importance majeure de l'oligomérisation par hémisynthèse des stilbènes dans l'augmentation de leur potentiel phytosanitaire et l'intérêt de les employer sous forme combinée par rapport à leur forme pure.

2.1.3. Application à grande échelle : obstacles et stratégies

Le principal obstacle face à l'utilisation à grande échelle, une fois que l'effet biologique aura été validé au vignoble, serait l'aspect législatif. En effet, les stilbènes ne faisant pas partie de la liste des produits phytosanitaires utilisables en viticulture, il faudra procéder aux différentes démarches législatives nécessaires pour l'obtention de leur autorisation. De plus, certains de ces oligomères n'étant pour l'heure pas identifiés dans la nature, que ce soit dans les organes de la vigne ou d'autres espèces végétales, ils ne peuvent pas être considérés comme des produits naturels à juste titre. Ils seront plutôt répertoriés sur la liste des pesticides chimiques. Dans un contexte de réduction des intrants chimiques, les composés issus de ces réactions de couplage et présents naturellement dans les plantes, comme la δ -viniférine et la vitisine B, devraient être prioritaires dans tout développement de ces produits, étant donné qu'ils seront des candidats plus adaptés pour le remplacement éventuel de certains produits chimiques. Le

choix de l'origine du resvératrol impacte également la classification des produits obtenus ; ainsi, la réaction utilisant le resvératrol de synthèse est purement chimique, alors que la réaction utilisant le resvératrol extrait de la vigne ou d'autres plantes repose sur un produit naturel. A l'heure actuelle, bien que l'extrait de sarments de vigne brut ne soit pas autorisé en tant que produit phytosanitaire, une étude a été menée sur le potentiel fongicide en viticulture de cet extrait. Des dépôts de demande d'autorisation sont en cours, ce qui pourrait ouvrir la porte à l'autorisation d'autres stilbènes et de produits dérivés (www.itab.asso.fr) (www.vinopole.cvdl.com).

Dans tous les cas, l'obtention de ces produits en grande quantité nécessite de procéder à leur hémisynthèse, ils se trouvent donc à cheval entre les produits naturels et les produits de synthèse et nécessiteraient la création d'un cadre juridique spécial régissant leur utilisation au même titre que les deux autres catégories de produits. D'ailleurs, l'autre grand obstacle qui pourrait freiner leur développement serait l'utilisation de l'acétate d'argent dans le procédé d'hémisynthèse. Métal précieux, il est toxique sous forme salifiée. De plus, la réalisation des réactions de couplage oxydatif dans des conditions cinétiques optimales, permettant des rendements élevés, nécessite la mise en jeu d'importantes quantités de sels de métaux, notamment d'acétate d'argent dans ce cas, avec des proportions supérieures à celles du resvératrol ou du stilbène destiné à subir l'oxydation. Cette contrainte soulève à la fois la question du coût économique de ce procédé, ainsi que le recyclage nécessaire des métaux résiduels libérés de leur forme salifiée. L'un des moyens envisageables pour éviter l'utilisation de l'acétate d'argent serait de mettre au point la réaction de couplage en utilisant les sels de cuivre présents dans la bouillie bordelaise, préparation antifongique traditionnelle autorisée en viticulture, composée de sulfate de cuivre et de chaux. Comme évoqué dans l'introduction de ce travail, le cuivre est l'un des métaux capables de catalyser le couplage oxydatif des stilbènes. En cas de réussite, cette stratégie servirait à la fois à écarter l'acétate d'argent, et préparer une bouillie bordelaise enrichie en oligomères à potentiel antifongique élevé, et dotée d'une efficacité supérieure.

Une dernière contrainte qui freinerait le développement futur de ce type de couplages oxydatif concerne le mécanisme réactionnel en soi. L'une des principales caractéristiques de ces réactions est l'impossibilité du contrôle de la régio-sélectivité et la stéréosélectivité des couplages. Le mécanisme et les conditions orientant le couplage sont en effet inconnus à ce jour, et la grande diversité des couplages possibles, qu'ils soient de type C – C ou C – O, auxquels s'ajoutent des substitutions électrophiles sur le pont éthylène et les cyclisations intramoléculaires sont autant de facteurs qui rendent difficile voire impossible le contrôle du type de couplage ou de la nature des produits obtenus. Cependant, les types de couplages réalisés et la nature des produits obtenus semblent être reproductibles et stables pour un couple solvant/sel de métal donné. L'optimisation des conditions réactionnelles permet quant à elle surtout d'améliorer les rendements de la réaction. Une fois les conditions optimales maîtrisées, le choix de produire un oligomère spécifique devrait donc se baser sur le choix du couple solvant/sel de métal qui favorise sa formation. Autrement, la maîtrise de l'orientation du couplage devra être effectuée par

modification de la structure chimique du stilbène initial. En effet, avoir recours à la fonctionnalisation ou la protection de certains groupements du resvératrol permet de contrôler la réaction de couplage et d'obtenir des oligomères ciblés (Snyder et al., 2011) (Zhong et al., 2013).

En somme, malgré le fort potentiel antifongique et antimicrobien de ces stilbènes, leur formation via le recours à la chimie nous empêche de les considérer comme des substances naturelles. L'hémisynthèse reste cependant un moyen d'exploration majeure de cette famille de composés, permettant de les produire, les isoler et les caractériser, en vue de procéder à leur recherche dans la nature. Les isoler à l'état naturel serait le meilleur moyen de valoriser ce travail, en mettant ces stilbènes en position de force pour des applications phytopharmaceutiques et en santé humaine, dans un contexte de désapprobation croissante des produits de synthèse. Cette valorisation sera plus amplement discutée dans les paragraphes suivants.

2.2. Relation Structure-Activité

Le niveau d'activité inhibitrice contre *P. viticola* et *B. cinerea* plus élevé des dimères et trimères obtenus par rapport aux molécules de départ confirme la corrélation positive liant le potentiel antifongique et le degré d'oligomérisation des stilbènes. Les différents oligomères étudiés ont présenté des CI_{50} inférieures à celle du resvératrol et dans la plupart des cas inférieures à celles de l' ϵ -viniférine, contre les deux agents pathogènes. Cependant, au sein de ces structures oligomériques, des éléments distinctifs peuvent être corrélés avec le niveau d'activité spécifique à chaque composé, et permettraient d'affiner notre compréhension de leur relation structure-activité.

Dans la catégorie des dimères, les formes issues du couplage C – C de deux molécules de resvératrol comme la δ -viniférine semblent être plus actives que celles issu d'un couplage C – O comme les oxistilbénines A et B. De plus, le couplage en 3 – 8' de la δ -viniférine semble doter la molécule d'une configuration spatiale propice à son activité biologique, plus avantageuse que celle obtenue par le couplage 8 – 10' permettant la formation de l' ϵ -viniférine, moins active. Cependant, la présence du groupe *O*-méthyle au niveau des oxistilbénines A et B en position 7 semble compenser les effets du couplage C – O, et serait responsable de leur efficacité supérieure à celle de l' ϵ -viniférine. Enfin la stéréoisomérisation au niveau des oxistilbénines A et B, en position 8, semble également jouer un rôle dans l'activité biologique. Ainsi, l'oxistilbénine B est environ deux fois plus active que l'oxistilbénine A.

Dans la catégorie des trimères, parmi les sept composés obtenus, les plus efficaces sont la *trans*-oxistilbénine E, la *cis*-oxistilbénine E et la resviniférine A. Ces trois composés se distinguent des autres trimères par leur couplage de type C – C en 3 – 8' ou 8 – 3', comme ce qui est observé chez la δ -viniférine. Le couplage de type C – C préserve la fonction OH en position 12, qui semble propice à une activité biologique plus importante. Aussi, ce type de couplage a conféré à ces trois trimères deux

noyaux furane au niveau de leur structure, alors que les autres trimères n'en possèdent qu'un seul. Cette structure serait donc plus propice à l'activité antifongique.

Enfin, la vitisine B, seul tétramère identifié et testé, est globalement la molécule la plus efficace parmi les différents oligomères formés, soulignant ainsi l'avantage de la structure tétramérique pour l'activité antifongique.

Dans tous les cas, les stilbènes semblent être des substances antimicrobiennes et antifongiques de contact, exerçant leur activité inhibitrice à la surface de l'organe sur lequel ils sont appliqués. Ainsi, dans le cas de *Plasmopara viticola*, les observations lors des essais *in vitro* ont montré que les stilbènes semblent inefficaces une fois que le parasite a entamé son développement mycélien à l'intérieur de la feuille. En effet, leur activité inhibitrice n'a été observée que lorsque leur application a précédé la germination des zoospores, indiquant leur rôle de produits préventifs plutôt que curatifs. Ceci pourrait être dû à leur difficulté à traverser la cuticule des organes verts, ou encore à leur incapacité à agir sur le mycélium. Ces hypothèses restent à vérifier, et de plus amples études de l'activité des stilbènes sont nécessaires pour étayer ces observations et pouvoir en tirer les conclusions sur le mécanisme d'action antifongique des stilbènes et leur relation structure-activité.

3. Applications en œnologie et effets potentiels sur la santé

3.1. Transformation oxydative du resvératrol dans le vin

La seconde application du couplage oxydatif du resvératrol fut réalisée dans le vin. Dans ce cas, c'est la réaction menée dans l'éthanol qui a servi de modèle, d'autant plus qu'elle est possible en présence de chlorure de fer, l'éthanol et le fer étant tous les deux des substances constitutives du vin. La faisabilité de la réaction à 30°C a été un élément encourageant, vu que le vin pourrait naturellement se trouver à de telles conditions de températures, lors de la vinification, du transport ou dans certaines conditions de conservation. En effet, le but de cette étude dans le vin était de prouver que le resvératrol pouvait subir un couplage oxydatif directement dans le vin en conditions naturelles, et d'étudier les produits obtenus. Une fois leurs caractéristiques spectrales et leur structure identifiées, les oxistilbénines F et G, ainsi que la quadrangularine B et la δ -viniférine ont été recherchées dans un vin rouge témoin, et dans ce même vin chauffé à 30°C, température minimale nécessaire pour le déroulement de la réaction. Sachant que l'argent est absent du vin, c'est un autre métal, le fer, présent à des concentrations équivalentes à celles du resvératrol, allant de 1 à 10 mg/L (Riganakos and Veltsistas, 2003), qui doit jouer le rôle de catalyseur métallique dans la réaction de couplage. Pour compenser la complexité de la matrice du vin, la dilution des réactifs et la lenteur de la cinétique observée avec le fer, la durée du chauffage a été fixée à 24 heures. Le dosage des oligomères et du resvératrol dans le vin témoin et le vin chauffé a été réalisé par spectrométrie de masse. La transformation oxydative du resvératrol a été prouvée en comparant diverses

données : la diminution de la quantité de *trans*-resvératrol dans le vin chauffé par rapport au vin témoin, l'augmentation de la concentration de δ -viniférine et la formation d'oxistilbénine G, ces deux oligomères étant des produits du couplage oxydatif du resvératrol dans l'éthanol. Les résultats indiquent la diminution de la concentration du *trans*-resvératrol de moitié, passant de 330 à 160 $\mu\text{g/L}$ après chauffage, alors que la δ -viniférine voit sa concentration multipliée d'un facteur 5, passant de 20 à 100 $\mu\text{g/L}$. De plus, l'oxistilbénine G, absente du vin témoin, a pu être quantifiée dans le vin chauffé, donnant une concentration de 6 $\mu\text{g/L}$. C'est la première fois que cette transformation du resvératrol dans l'éthanol, donnant la formation de la δ -viniférine et de l'oxistilbénine G, est attestée dans le vin. Le résultat est d'autant plus intéressant que la concentration initiale en *trans*-resvératrol du vin utilisé est relativement plus faible comparée à ce qui est observé dans la littérature, augmentant l'effet de dilution des réactifs et diminuant ainsi la probabilité du couplage oxydatif. Malgré ces facteurs défavorables, le couplage oxydatif du resvératrol a pu avoir lieu, ce qui ouvre la porte à de nouveaux essais à plus grande échelle, permettant de manipuler un plus grand nombre de vins, contenant des concentrations plus fortes en resvératrol. Dans ces vins, la réaction de couplage devrait pouvoir se faire plus facilement, et ceci pourrait aboutir à la formation de l'oxistilbénine F, aux côtés de l'oxistilbénine G. Aussi, la formation de ces oligomères dans un vin chauffé modérément rappelle d'autres conditions de chaleur et d'oxydation que peuvent subir le moût et le vin. Citons par exemple la thermovinification du vin rouge évoquée dans l'introduction de ce manuscrit, au cours de laquelle la température peut atteindre 60°C, ou encore des conditions d'oxydation du vin durant son vieillissement, autant de situations propices au couplage oxydatif des stilbènes qui pourraient être explorées. Enfin, notons que la formation de ces dimères dans le vin chauffé mise en lumière à travers ce travail de thèse n'explique qu'une part de la diminution de la concentration du *trans*-resvératrol. En effet, ce composé voit sa concentration passer de 330 à 160 $\mu\text{g/L}$ (1.50 à 0.94 μM , respectivement), avec en contrepartie une augmentation de la concentration des autres stilbènes identifiés équivalente à 86 $\mu\text{g/L}$. Une part au moins équivalente de *trans*-resvératrol n'a pas été retrouvée. Ces molécules de resvératrol pourraient avoir réagi avec d'autres stilbènes, pour former des oligomères non identifiés à ce jour, qui passent inaperçus au moment de la quantification. L'un des candidats les plus probables serait le picéide, monomère glycosylé en position 3, et stilbène le plus abondant du vin. L'identification de ces composés devrait permettre de les rechercher et de les doser dans le vin, à l'instar des produits du couplage du resvératrol. D'autres hypothèses sur le devenir du resvératrol dans le vin peuvent être émises, comme par exemple de possibles réactions avec d'autres polyphénols comme les acide-phénols, à l'instar des couplages observés entre les flavanols et les anthocyanes. En effet, au cours de l'élevage du vin, les anthocyanes monomériques se condensent avec d'autres polyphénols, des flavan-3-ols ou réagissent avec des aldéhydes, pour se transformer en polymères d'anthocyanes ou en pyrano-anthocyanes plus stables (He et al., 2012).

3.2. Oligomères à activité anti-inflammatoire et autres applications potentielles

3.2.1. Activité anti-inflammatoire

Les oligomères produits dans l'éthanol et retrouvés dans le vin ont été évalués *in vitro* pour leur activité anti-inflammatoire sur des cellules de macrophages murins. Ces molécules étant issues du resvératrol, il nous a semblé important de savoir si leur formation apporterait des effets bénéfiques supplémentaires sur la santé humaine, ou au contraire, réduirait ceux apportés par le resvératrol initialement. L'activité anti-inflammatoire est un critère facilitant l'identification des composés à fort potentiel biologique, vu que l'inflammation chronique est l'un des facteurs de risque principaux des maladies métaboliques majeures. Traiter l'inflammation chronique revient donc à diminuer le risque de la survenue de ces maladies. Ce processus se traduisant en premier lieu par la synthèse de NO et de ROS, leur inhibition par les oligomères étudiés serait le signe d'un potentiel anti-inflammatoire. Ainsi, comme évoqué précédemment, les oligomères formés dans l'éthanol présentent un niveau d'activité anti-inflammatoire plus élevé que celui du resvératrol, avec des CI_{50} environ deux fois plus basses pour l'inhibition du NO ; ainsi, la δ -viniférine, l'oxistilbénine F et l'oxistilbénine G présentent des CI_{50} de 8,7 ; 9,2 et 9,8 μM , respectivement pour l'inhibition du NO, contre une CI_{50} de 17,9 μM pour le resvératrol. Ce résultat montre d'emblée que la transformation oxydative du resvératrol dans le vin n'élimine pas pour autant son effet bénéfique pour la santé humaine, mais au contraire, elle participerait à son amélioration via la formation de stilbènes plus actifs. De plus, sachant que la δ -viniférine est le produit majoritaire de cette transformation oxydative, elle semble également être la plus efficace pour l'inhibition des ROS, avec une CI_{50} de 7,6 μM , ce qui renforce cette amélioration du potentiel anti-inflammatoire. Les oxistilbénines F et G sont également aussi actives que la δ -viniférine pour l'inhibition du NO, mais moins actives quant à l'inhibition des ROS. Comparées à d'autres dimères, les oxistilbénines F et G et la δ -viniférine présentent une capacité d'inhibition du NO des plus élevées par rapport à ce qui est rapporté dans la littérature. Ainsi, elles sont quasiment aussi actives que l' ϵ -viniférine, qui présente une CI_{50} de 8,6 μM pour l'inhibition du NO sur les cellules microgliales. Dans cette même étude, les autres dimères évalués semblent être deux fois moins actifs que l' ϵ -viniférine. Ainsi, le pallidol, la ω -viniférine et la scirpusine A inhibent la production de NO à des CI_{50} allant de 16,6 à 23,4 μM (Nassra et al., 2013). Une étude de l'activité anti-inflammatoire de dimères glycosylés du resvératrol sur le même modèle cellulaire utilisé lors de cette thèse, les macrophages RAW 264.7 murins, montre que la glycosylation des dimères serait en défaveur de l'inhibition de la production de NO. Les dimères les plus actifs ont présenté des CI_{50} de 31 et 36 μM (Li et al., 2019), soit environ 5 et 6 fois plus élevées que les CI_{50} de la δ -viniférine, l'oxistilbénine F et l'oxistilbénine G. Ces composés sont issus d'un couplage C – C de type 8 – 12' entre les deux molécules de resvératrol, contrairement à la δ -viniférine issue d'un couplage C – C de type 3 – 8', ou encore aux oxistilbénines F et G, issues d'un couplage C – O entre le carbone en position 8 du premier resvératrol et la *p*-quinone formée sur la position 4' du second resvératrol. L'efficacité des dimères obtenus par le couplage oxydatif réalisé lors de cette thèse pourrait ainsi être due non seulement

à l'absence de glycosylation au niveau de leur structure, mais également au type de couplage, qui confère à la molécule une configuration plus favorable à l'inhibition des NO-synthases et par conséquent renforce l'inhibition de la production de NO.

3.2.2. Applications potentielles

La formation de la δ -viniférine et de l'oxistilbénine G sans ajout de réactifs dans le vin est une preuve que ces oligomères peuvent se former naturellement sans intervention chimique du manipulateur. Par extrapolation, d'autres oligomères issus du couplage oxydatif de stilbènes dans l'éthanol pourraient également se former naturellement dans le vin. D'une part, ce statut de molécules naturelles retrouvées dans le vin serait un argument en faveur de l'utilisation de ces oligomères dans les traitements phytosanitaires en tant qu'alternative aux pesticides, et une façon de les distinguer des molécules de synthèse non retrouvées dans la nature. Encore faut-il que ces oligomères formés dans l'éthanol soient aussi actifs que ceux obtenus dans le méthanol. En tout cas, la δ -viniférine, dont la présence dans le vin est attestée dans la littérature, et dont la formation dans le vin par couplage du resvératrol vient d'être prouvée dans ce travail, est l'un des oligomères antifongiques les plus actifs et répond à ce critère de naturalité.

D'autre part, prouver la formation naturelle d'un stilbène dans le vin faciliterait son application en santé humaine, et le favorise par rapport à un produit de synthèse. En effet, malgré sa richesse en stilbènes, le vin n'a pas vocation première à servir de complément alimentaire ou de source de principes actifs potentiels. C'est avant tout un produit du terroir associé aux traditions et à l'Histoire des populations qui l'élaborent et le consomment, et dont la consommation présente une dimension sociale et culturelle importante. De plus, une fois consommés et absorbés, les stilbènes peuvent rapidement être métabolisés, étant donné leur structure chimique phénolique, et par conséquent présentent une biodisponibilité réduite. Ceci impacte négativement leur action pharmacologique qui est à son tour diminuée voire empêchée. En attendant la mise au point de moyens galéniques capables de protéger ces composés contre le métabolisme accéléré en vue d'augmenter leur efficacité thérapeutique *in vivo*, l'une des principales applications actuelles des stilbènes chez l'homme se trouve être en cosmétique, notamment le resvératrol qui se trouve en première ligne. Plusieurs marques de produits cosmétiques intègrent ces stilbènes sous le terme d'extrait de vigne dans leurs produits, jusqu'à en faire le principe actif principal. Cette utilisation des stilbènes repose sur leur pouvoir antioxydant permettant de protéger la peau contre l'attaque de radicaux libres, et de lutter contre son vieillissement en diminuant la formation des produits de glycation qui altèrent les tissus. Cette application à grande échelle et bénéficiant du cadre juridique nécessaire est propice à l'introduction de nouveaux stilbènes dans les produits cosmétiques. Ceci nous ramène aux oligomères formés dans le vin, qui mériteraient d'être évalués pour leur activité protectrice au niveau de la peau.

Conclusion générale et perspectives

1. Conclusion générale

Ces travaux de thèse ont d'abord permis d'optimiser des réactions de couplage oxydatif du resvératrol et de l' ϵ -viniférine en présence d'acétate d'argent et de chlorure de fer, dans le méthanol et l'éthanol. L'ensemble de ces réactions a permis la production de plus de dix-sept oligomères différents selon divers modes de couplage : sept dimères, sept trimères et divers tétramères. Parmi ces composés, deux dimères et quatre trimères sont identifiés pour la première fois. La majeure partie de ces stilbènes ont été caractérisés et purifiés en vue de les valoriser en santé végétale et humaine, ainsi qu'en œnologie.

Une première application de ces travaux d'hémisynthèse fut d'évaluer le potentiel phytopharmaceutique des oligomères obtenus, contre *Plasmopara viticola* et *Botrytis cinerea*. Le couplage oxydatif appliqué à une fraction d'extraits de sarments de vigne composée de resvératrol et d' ϵ -viniférine, dans le méthanol, a permis l'obtention d'un mélange d'oligomères à forte activité inhibitrice contre les deux agents pathogènes. En plus de la δ -viniférine et de la vitisine B, l'oxistilbénine B, l'oxistilbénine E et la resviniférine A semblent particulièrement actives.

Une seconde application de ces travaux fut l'étude de la transformation oxydative du resvératrol dans le vin. Le chauffage du vin à 30°C pendant 24 heures a permis de mettre en évidence le déroulement de cette réaction, probablement catalysée par les métaux présents dans le vin. Effectuée dans l'éthanol contenu dans le vin, la réaction a généré un dimère spécifique, l'oxistilbénine G, en plus de la δ -viniférine, dont la concentration était cinq fois plus élevée après chauffage, par rapport au vin témoin. Ce type de transformation et la production d'oligomères qui en résulte sont attestés pour la première fois dans le vin.

Enfin, l'étude de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des composés formés dans l'éthanol, susceptibles de se former dans le vin et d'y remplacer le resvératrol, a permis d'évaluer l'effet potentiel de ces stilbènes sur la santé. La δ -viniférine et les oxistilbénines F et G semblent plus actives que le resvératrol, inhibant la production de NO et de ROS avec des CI_{50} plus basses. La transformation oxydative du resvératrol dans le vin produirait donc des molécules plus efficaces que leur précurseur, avec un niveau d'activité anti-inflammatoire plus élevé.

2. Perspectives

Dans la continuité de ce travail, il serait envisageable d'appliquer le couplage oxydatif à un extrait brut de sarments de vigne. Sachant que les deux stilbènes majoritaires dans cet extrait sont le resvératrol et l' ϵ -viniférine, la réaction devrait être réalisable après optimisation des conditions. La réussite de ce couplage pourrait considérablement réduire le temps et les coûts de production et faciliter l'usage du produit, dans le cadre d'une application industrielle. Elle permettrait aussi de profiter de l'action inhibitrice des autres oligomères de l'extrait brut, bien que présents en faible quantité, et de créer un effet de synergie. Quant aux sels de métaux utilisés pour catalyser ces réactions, il serait utile d'évaluer la capacité du sulfate de cuivre ou d'autres sels de cuivre pour remplacer l'acétate d'argent tout en produisant les mêmes oligomères antifongiques. D'ailleurs, l'argent résiduel sous forme métallique obtenu à la fin de la réaction de couplage pourrait être utilisé pour régénérer le catalyseur sous forme salifiée après mise au point d'un protocole complet permettant cette salification.

Concernant la valorisation du potentiel phytosanitaire des oligomères produits, les essais en vignoble s'imposent pour évaluer l'efficacité réelle de ces composés dans des conditions naturelles sous lesquelles ils sont amenés à agir. Il sera notamment nécessaire d'étudier les moyens d'application sur la plante (formulation, dose, fréquence), leur devenir après application sur la plante (risque de lessivage par la pluie, oxydation ou dégradation), mais également leur capacité à prévenir les attaques de *P. viticola* et de *B. cinerea*. Leur usage conjointement aux pesticides chimiques peut également être une piste prometteuse, au cas où cette combinaison permettrait la réduction de la dose du pesticide utilisé tout en maintenant voire améliorant l'activité biologique globale, dans le cadre du contexte actuel de réduction de l'usage des pesticides chimiques. D'autre part, les composés se formant dans l'éthanol sont tout aussi intéressants, de par leur présence naturelle dans le vin. Ayant des structures chimiques similaires aux oligomères formés dans le méthanol, ils pourraient être dotés du même potentiel antifongique. Leurs activités antimicrobienne et antifongique doivent également être évaluées. Aussi, le potentiel phytosanitaire des différents oligomères pourrait être évalué contre d'autres pathogènes et mis au service d'autres type de cultures, les travaux menés au sein de l'équipe MIB ayant déjà prouvé l'efficacité des stilbènes contre le doryphore, coléoptère ravageur des Solanacées, notamment de la pomme de terre (Gabaston et al., 2018).

Dans les perspectives de l'application de ces travaux dans le vin, l'étude de la transformation oxydative du resvératrol dans l'éthanol devrait d'abord se faire sur un grand nombre d'échantillons de vin, contenant différentes concentrations initiales de resvératrol, avec une variation des conditions de vinification, de température et de conservation, en vue de comprendre l'impact de ces variations sur le déclenchement et le rendement de la réaction de couplage. Ensuite, nous pourrions nous intéresser au couplage du resvératrol avec d'autres stilbènes dans l'éthanol, notamment le picéide, stilbène majoritaire du vin. De même, le couplage du resvératrol avec l' ϵ -viniférine dans l'éthanol peut être envisageable, vu que ce dimère est également présent dans le vin, et que ce type de couplage est maîtrisé dans le

méthanol. L'ensemble de ces réactions devrait permettre de déterminer le devenir des stilbènes dans le vin en identifiant les réactions de couplage qu'ils subissent et la nature des oligomères qu'ils produisent. D'autre part, les stilbènes formés naturellement dans le vin seraient des candidats adaptés pour de futures applications en cosmétique et en pharmacologie, et leur efficacité mérite donc d'être évaluée dans ce contexte.

Références bibliographiques

- Adrian, M., Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.C., Tesson, L., Bessis, R., 2000. Stilbene Content of Mature *Vitis vinifera* Berries in Response to UV-C Elicitation. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6103–6105. <https://doi.org/10.1021/jf0009910>
- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L.A., Bessis, R., 1997. Biological Activity of Resveratrol, a Stilbenic Compound from Grapevines, Against *Botrytis cinerea*, the Causal Agent for Gray Mold. *J. Chem. Ecol.* 23, 1689–1702. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006444.79951.75>
- Andrivon, D., Savini, I., 2018. Peut-on se passer du cuivre en protection des cultures biologiques - Synthèse de l'expertise scientifique collective INRA.
- Basly, J.-P., Marre-Fournier, F., Le Bail, J.-C., Habrioux, G., Chulia, A.J., 2000. Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol. *Life Sci.* 66, 769–777. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00650-5](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00650-5)
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Couteur, D.L., Shaw, R.J., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, D.K., Cabo, R. de, Sinclair, D.A., 2006. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444, 337–342. <https://doi.org/10.1038/nature05354>
- Biais, B., Krisa, S., Cluzet, S., Da Costa, G., 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>
- Blouin, J., 2007. *Les parasites de la vigne, stratégies et protection raisonnée*. Dunod.
- Blouin, J., Cruege, J., 2013. *Analyse et composition des vins*, 2e édition. ed. Dunod.
- Boubakri, H., Poutaraud, A., Wahab, M.A., Clayeux, C., Baltenweck-Guyot, R., Steyer, D., Marcic, C., Mliki, A., Soustre-Gacougnolle, I., 2013. Thiamine modulates metabolism of the phenylpropanoid pathway leading to enhanced resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine. *BMC Plant Biol.* 13, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-31>
- Breuil, A.-C., Adrian, M., Pirio, N., Meunier, P., Bessis, R., Jeandet, P., 1998. Metabolism of stilbene phytoalexins by *Botrytis cinerea*: 1. Characterization of a resveratrol dehydrodimer. *Tetrahedron Lett.* 39, 537–540. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)10622-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)10622-0)
- Breuil, A.C., Jeandet, P., Adrian, M., Chopin, F., Pirio, N., Meunier, P., Bessis, R., 1999. Characterization of a Pterostilbene Dehydrodimer Produced by Laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 89, 298–302. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.4.298>
- Bruisson, S., Maillot, P., Schellenbaum, P., Walter, B., Gindro, K., Deglène-Benbrahim, L., 2016. Arbuscular mycorrhizal symbiosis stimulates key genes of the phenylpropanoid biosynthesis and stilbenoid production in grapevine leaves in response to downy mildew and grey mould infection. *Phytochemistry* 131, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.09.002>
- Bruneton, J., 2009. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 4ème. ed. Lavoisier.
- Burns, J., Gardner, P.T., Matthews, D., Duthie, G.G., Lean, J., Crozier, A., 2001. Extraction of Phenolics and Changes in Antioxidant Activity of Red Wines during Vinification. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5797–5808. <https://doi.org/10.1021/jf010682p>
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E.J., Crozier, A., 2002. Plant Foods and Herbal Sources of Resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3337–3340. <https://doi.org/10.1021/jf0112973>
- Cantos, E., Espín, J.C., Fernández, M.J., Oliva, J., Tomás-Barberán, F.A., 2003. Postharvest UV-C-Irradiated Grapes as a Potential Source for Producing Stilbene-Enriched Red Wines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1208–1214. <https://doi.org/10.1021/jf020939z>

- Cantos, E., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., 2002. Postharvest Stilbene-Enrichment of Red and White Table Grape Varieties Using UV-C Irradiation Pulses. *J. Agric. Food Chem.* 50, 6322–6329. <https://doi.org/10.1021/jf020562x>
- Castellari, M., Spinabelli, U., Riponi, C., Amati, A., 1998. Influence of some technological practices on the quantity of resveratrol in wine. *Z. Für Leb. -Forsch. A* 206, 151–155. <https://doi.org/10.1007/s002170050232>
- Chalal, M., Klinguer, A., Echairi, A., Meunier, P., Vervandier-Fasseur, D., Adrian, M., 2014. Antimicrobial Activity of Resveratrol Analogues. *Molecules* 19, 7679–7688. <https://doi.org/10.3390/molecules19067679>
- Chang, C.-I., Chien, W.-C., Huang, K.-X., Hsu, J.-L., 2017. Anti-Inflammatory Effects of Vitisinol A and Four Other Oligostilbenes from *Ampelopsis brevipedunculata* var. Hancei. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22071195>
- Chitarrini, G., Soini, E., Riccadonna, S., Franceschi, P., Zulini, L., Masuero, D., Vecchione, A., Stefanini, M., Di Gasparo, G., Mattivi, F., Vrhovsek, U., 2017. Identification of Biomarkers for Defense Response to *Plasmopara viticola* in a Resistant Grape Variety. *Front. Plant Sci.* 8, 1524. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01524>
- Chung, E.Y., Kim, B.H., Lee, M.K., Yun, Y.-P., Lee, S.H., Min, K.R., Kim, Y., 2003. Anti-Inflammatory Effect of the Oligomeric Stilbene α -Viniferin and its Mode of the Action through Inhibition of Cyclooxygenase-2 and Inducible Nitric Oxide Synthase. *Planta Med.* 69, 710–714. <https://doi.org/10.1055/s-2003-42787>
- Cichewicz, R.H., Kouzi, S.A., Hamann, M.T., 2000. Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.* 63, 29–33. <https://doi.org/10.1021/np990266n>
- Clare, S.S., Skurray, G.R., Shalliker, R.A., 2005. Effect of yeast strain selection on the concentration of *cis*- and *trans*-resveratrol and resveratrol glucoside isomers in wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 9–14. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00274.x>
- Cottart, C.-H., Nivet-Antoine, V., Laguillier-Morizot, C., Beaudoux, J.-L., 2010. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 7–16. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900437>
- Davin, L.B., Wang, H.-B., Crowell, A.L., Bedgar, D.L., Martin, D.M., Sarkanen, S., Lewis, N.G., 1997. Stereoselective Bimolecular Phenoxy Radical Coupling by an Auxiliary (Dirigent) Protein Without an Active Center. *Science* 275, 362–367. <https://doi.org/10.1126/science.275.5298.362>
- De Bona, G.S., Adrian, M., Negrel, J., Chiltz, A., Klinguer, A., Poinssot, B., Héloir, M.-C., Angelini, E., Vincenzi, S., Bertazzon, N., 2019. Dual Mode of Action of Grape Cane Extracts against *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* 67, 5512–5520. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07098>
- Denis, J.Noel., Greene, A.E., Guenard, Daniel., Gueritte-Voegelein, Françoise., Mangatal, Lydie., Potier, Pierre., 1988. Highly efficient, practical approach to natural taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 5917–5919. <https://doi.org/10.1021/ja00225a063>
- Dercks, W., Creasy, L.L., 1989. The significance of stilbene phytoalexins in the *Plasmopara viticola*-grapevine interaction. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34, 189–202. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(89\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0885-5765(89)90043-X)
- Dubos, B., 2002. *Maladies cryptogamiques de la vigne: champignons parasites des organes herbacés et du bois de la vigne*. Éd. Féret.
- Dvorakova, M., Landa, P., 2017. Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacol. Res.* 124, 126–145. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.002>
- Earhart, R.H., 1999. Docetaxel (Taxotere): preclinical and general clinical information. *Semin. Oncol.* 26, 8–13.
- Egea, J., Fabregat, I., Frapart, Y.M., Ghezzi, P., Görlach, A., Kietzmann, T., Kubaichuk, K., Knaus, U.G., Lopez, M.G., Olaso-Gonzalez, G., Petry, A., Schulz, R., Vina, J., Winyard, P., Abbas, K., Ademowo, O.S., Afonso, C.B., Andreadou, I., Antelmann, H., Antunes, F., Aslan, M., Bachschmid, M.M., Barbosa, R.M., Belousov, V., Berndt, C., Bernlohr, D., Bertrán, E., Bindoli, A., Bottari, S.P., Brito, P.M., Carrara, G., Casas, A.I., Chatzi, A., Chondrogianni, N., Conrad, M., Cooke, M.S., Costa, J.G., Cuadrado, A., My-Chan Dang, P., De Smet, B., Debelec-Butuner, B., Dias, I.H.K., Dunn, J.D., Edson, A.J., El Assar, M., El-Benna, J., Ferdinandy, P., Fernandes, A.S., Fladmark, K.E., Förstermann, U., Giniatullin, R., Giricz, Z., Görbe, A., Griffiths, H.,

- HAMPL, V., Hanf, A., Herget, J., Hernansanz-Agustín, P., Hillion, M., Huang, J., Ilikay, S., Jansen-Dürr, P., Jaquet, V., Joles, J.A., Kalyanaraman, B., Kaminsky, D., Karbaschi, M., Kleanthous, M., Klotz, L.-O., Korac, B., Korkmaz, K.S., Koziel, R., Kračun, D., Krause, K.-H., Křen, V., Krieg, T., Laranjinha, J., Lazou, A., Li, H., Martínez-Ruiz, A., Matsui, R., McBean, G.J., Meredith, S.P., Messens, J., Miguel, V., Mikhed, Y., Milisav, I., Milković, L., Miranda-Vizuete, A., Mojović, M., Monsalve, M., Mouthuy, P.-A., Mulvey, J., Münzel, T., Muzykantov, V., Nguyen, I.T.N., Oelze, M., Oliveira, N.G., Palmeira, C.M., Papaevgeniou, N., Pavičević, A., Pedre, B., Peyrot, F., Phylactides, M., Pircalabioru, G.G., Pitt, A.R., Poulsen, H.E., Prieto, I., Rigobello, M.P., Robledinos-Antón, N., Rodríguez-Mañas, L., Rolo, A.P., Rousset, F., Ruskovska, T., Saraiva, N., Sasson, S., Schröder, K., Semen, K., Seredenina, T., Shakirzyanova, A., Smith, G.L., Soldati, T., Sousa, B.C., Spickett, C.M., Stancic, A., Stasia, M.J., Steinbrenner, H., Stepanić, V., Steven, S., Tokatlidis, K., Tuncay, E., Turan, B., Ursini, F., Vacek, J., Vajnerova, O., Valentová, K., Van Breusegem, F., Varisli, L., Veal, E.A., Yalçın, A.S., Yelisyeyeva, O., Žarković, N., Zatloukalová, M., Zielonka, J., Touyz, R.M., Papapetropoulos, A., Grune, T., Lamas, S., Schmidt, H.H.H.W., Di Lisa, F., Daiber, A., 2017. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biol.* 13, 94–162. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.05.007>
- Eisenmann, B., Czermel, S., Ziegler, T., Buchholz, G., Kortekamp, A., Trapp, O., Rausch, T., Dry, I., Bogs, J., 2019. *Rpv3-1* mediated resistance to grapevine downy mildew is associated with specific host transcriptional responses and the accumulation of stilbenes. *BMC Plant Biol.* 19, 343. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1935-3>
- El Khawand, T., Courtois, A., Valls, J., Richard, T., Krisa, S., 2018. A review of dietary stilbenes: sources and bioavailability. *Phytochem. Rev.* 17, 1007–1029. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9578-9>
- Fabbrocini, G., Staibano, S., De Rosa, G., Battimiello, V., Fardella, N., Ilardi, G., La Rotonda, M.I., Longobardi, A., Mazzella, M., Siano, M., Pastore, F., De Vita, V., Vecchione, M.L., Ayala, F., 2011. Resveratrol-Containing Gel for the Treatment of Acne Vulgaris. *Am. J. Clin. Dermatol.* 12, 133–141. <https://doi.org/10.2165/11530630-000000000-00000>
- Fan, G.-J., Liu, X.-D., Qian, Y.-P., Shang, Y.-J., Li, X.-Z., Dai, F., Fang, J.-G., Jin, X.-L., Zhou, B., 2009. 4,4'-Dihydroxy-*trans*-stilbene, a resveratrol analogue, exhibited enhanced antioxidant activity and cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.*, Special Issue: Natural Products in Medicinal Chemistry 17, 2360–2365. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.02.014>
- Fleurat-Lessard, F., Panneton, B., Vincent, C., 2000. *La lutte physique en phytoprotection*. Quae.
- Fornara, V., Onelli, E., Sparvoli, F., Rossoni, M., Aina, R., Marino, G., Citterio, S., 2008. Localization of stilbene synthase in *Vitis vinifera* L. during berry development. *Protoplasma* 233, 83–93. <https://doi.org/10.1007/s00709-008-0309-8>
- Fritzemeier, K.-H., Kindl, H., 1981. Coordinate induction by UV light of stilbene synthase, phenylalanine ammonia-lyase and cinnamate 4-hydroxylase in leaves of vitaceae. *Planta* 151, 48–52. <https://doi.org/10.1007/BF00384236>
- 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>
- Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., Mattivi, F., Velasco, R., 2008. Ripening and Genotype Control Stilbene Accumulation in Healthy Grapes. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11773–11785. <https://doi.org/10.1021/jf8017707>
- Gerós, H., Chaves, M., Delrot, S., 2012. *The Biochemistry of the Grape Berry*. Bentham Science Publishers.

- 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. https://dx.doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-9360
- Gindro, K., Schnee, S., Righi, D., Marcourt, L., Nejad Ebrahimi, S., Codina, J.M., Voinesco, F., Michellod, E., Wolfender, J.-L., Queiroz, E.F., 2017. Generation of Antifungal Stilbenes Using the Enzymatic Secretome of *Botrytis cinerea*. *J. Nat. Prod.* 80, 887–898. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00760>
- Godard, S., Slacanin, I., Viret, O., Gindro, K., 2009. Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin- and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. *Plant Physiol. Biochem.* 47, 827–837. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.04.003>
- González-Sarriás, A., Gromek, S., Niesen, D., Seeram, N.P., Henry, G.E., 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>
- 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>
- Grillo, M.A., Colombatto, S., 2008. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and in neurodegenerative diseases. *Amino Acids* 35, 29–36. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0606-0>
- Guebailia, H.A., Chira, K., Richard, T., Mabrouk, T., Furiga, A., Vitrac, X., Monti, J.-P., Delaunay, J.-C., Mérillon, J.-M., 2006. Hopeaphenol: The First Resveratrol Tetramer in Wines from North Africa. *J. Agric. Food Chem.* 54, 9559–9564. <https://doi.org/10.1021/jf062024g>
- Guéritte-Voegelein, F., Sénilh, V., David, B., Guénard, D., Potier, P., 1986. Chemical studies of 10-deacetyl baccatin III: Hemisynthesis of taxol derivatives. *Tetrahedron* 42, 4451–4460. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)87285-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)87285-9)
- Guerrero, R.F., Biais, B., Richard, T., Puertas, B., Waffo-Teguo, P., Merillon, J.-M., 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>
- Guerrero, R.F., Valls-Fonayet, J., Richard, T., Cantos-Villar, E., 2020. A rapid quantification of stilbene content in wine by ultra-high pressure liquid chromatography – Mass spectrometry. *Food control* 108. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106821>
- Guichard, L., Dedieu, F., Jeuffroy, M.-H., Meynard, J.-M., Reau, R., Savini, I., 2017. Le plan Ecophyto de réduction d'usage des pesticides en France : décryptage d'un échec et raisons d'espérer. *Cah. Agric.* 26, 14002. <https://doi.org/10.1051/cagri/2017004>
- Harikumar, K.B., Aggarwal, B.B., 2008. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle* 7, 1020–1035. <https://doi.org/10.4161/cc.7.8.5740>
- Harm, A., Kassemeyer, H.-H., Seibicke, T., Regner, F., 2011. Evaluation of Chemical and Natural Resistance Inducers against Downy Mildew (*Plasmopara viticola*) in Grapevine. *Am. J. Enol. Vitic.* 62, 184–192. <https://doi.org/10.5344/ajev.2011.09054>
- He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M.J., Duan, C.-Q., 2012. Anthocyanins and their variation in red wines. II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Mol. Basel Switz.* 17, 1483–1519. <https://doi.org/10.3390/molecules17021483>
- He, S., Wu, B., Pan, Y., Jiang, L., 2008. Stilbene oligomers from *Parthenocissus laetevirens*: isolation, biomimetic synthesis, absolute configuration, and implication of antioxidative defense system in the plant. *J. Org. Chem.* 73, 5233–5241. <https://doi.org/10.1021/jo8001112>
- Houillé, B., Besseau, S., Courdavault, V., Oudin, A., Glévarec, G., Delanoue, G., Guérin, L., Simkin, A.J., Papon, N., Clastre, M., Giglioli-Guivarc'h, N., Lanoue, A., 2015a. Biosynthetic Origin of E-Resveratrol Accumulation in Grape Canes during Postharvest Storage. *J. Agric. Food Chem.* 63, 1631–1638. <https://doi.org/10.1021/jf505316a>
- Houillé, B., Besseau, S., Delanoue, G., Oudin, A., Papon, N., Clastre, M., Simkin, A.J., Guérin, L., Courdavault, V., Giglioli-Guivarc'h, N., Lanoue, A., 2015b. Composition and Tissue-Specific Distribution of Stilbenoids in Grape Canes Are Affected by Downy Mildew Pressure in the Vineyard. *J. Agric. Food Chem.* 63, 8472–8477. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02997>
- Ingham, J.L., 1976. 3,5,4'-trihydroxystilbene as a phytoalexin from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Phytochemistry* 15, 1791–1793. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)97494-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)97494-6)

- Jaillard, B., Deloivre, A., Carbonneau, A., 2015. *Traité de la vigne*, 2e édition. ed. Dunod.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M., 1997. Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science* 275, 218–220. <https://doi.org/10.1126/science.275.5297.218>
- Jeandet, P., Bessis, R., Maume, B.F., Meunier, P., Peyron, D., Trollat, P., 1995. Effect of Enological Practices on the Resveratrol Isomer Content of Wine. *J. Agric. Food Chem.* 43, 316–319. <https://doi.org/10.1021/jf00050a010>
- Jiang, L., He, S., Sun, C., Pan, Y., 2012. Selective (1)O(2) quenchers, oligostilbenes, from *Vitis wilsonae*: structural identification and biogenetic relationship. *Phytochemistry* 77, 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.01.021>
- Jung, H.J., Hwang, I.A., Sung, W.S., Kang, H., Kang, B.S., Seu, Y.B., Lee, D.G., 2005. Fungicidal Effect of Resveratrol on Human Infectious Fungi. *Arch. Pharm. Res.* 28, 557–560. <https://doi.org/10.1007/BF02977758>
- Kelloniemi, J., Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Simon, A., Dalmais, B., Frettinger, P., Cimerman, A., Fermaud, M., Roudet, J., Baulande, S., Bruel, C., Choquer, M., Couvelard, L., Duthieuw, M., Ferrarini, A., Flors, V., Le Pêcheur, P., Loisel, E., Morgant, G., Poussereau, N., Pradier, J.-M., Rasclé, C., Trdá, L., Poinssot, B., Viaud, M., 2015. Analysis of the Molecular Dialogue Between Gray Mold (*Botrytis cinerea*) and Grapevine (*Vitis vinifera*) Reveals a Clear Shift in Defense Mechanisms During Berry Ripening. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 28, 1167–1180. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-15-0039-R>
- 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>
- Kingston, D.G.I., 2007. The Shape of Things to Come: Structural and Synthetic Studies of Taxol and Related Compounds. *Phytochemistry* 68, 1844–1854. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.11.009>
- Krzyzaniak, Y., Negrel, J., Lemaitre-Guillier, C., Clément, G., Mouille, G., Klinguer, A., Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Adrian, M., 2018. Combined enzymatic and metabolic analysis of grapevine cell responses to elicitors. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 123, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.12.013>
- 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>
- Lamuela-Raventos, R.M., Romero-Perez, A.I., Waterhouse, A.L., de la Torre-Boronat, M.C., 1995. Direct HPLC Analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol and Piceid Isomers in Spanish Red *Vitis vinifera* Wines. *J. Agric. Food Chem.* 43, 281–283. <https://doi.org/10.1021/jf00050a003>
- Landrault, N., Larronde, F., Delaunay, J.-C., Castagnino, C., Vercauteren, J., Merillon, J.-M., Gasc, F., Cros, G., Teissedre, P.-L., 2002. Levels of Stilbene Oligomers and Astilbin in French Varietal Wines and in Grapes during Noble Rot Development. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2046–2052. <https://doi.org/10.1021/jf010794g>
- Langcake, P., 1981. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiol. Plant Pathol.* 18, 213–226. [https://doi.org/10.1016/S0048-4059\(81\)80043-4](https://doi.org/10.1016/S0048-4059(81)80043-4)
- Langcake, P., J. Pryce, R., 1977. Oxidative dimerisation of 4-hydroxystilbenes *in vitro* : production of a grapevine phytoalexin mimic. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 0, 208–210. <https://doi.org/10.1039/C39770000208>
- Langcake, P., Pryce, R.J., 1977. A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia* 33, 151–152. <https://doi.org/10.1007/BF02124034>
- Langcake, Peter, Pryce, R.J., 1977. The production of resveratrol and the viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Phytochemistry* 16, 1193–1196. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94358-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94358-9)

- Lee, J.-H., Cho, H.S., Joo, S.W., Regmi, S.C., Kim, J.-A., Ryu, C.-M., Ryu, S.Y., Cho, M.H., Lee, J., 2013. Diverse plant extracts and *trans*-resveratrol inhibit biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* O157:H7. *Biofouling* 29, 1189–1203. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.832223>
- Li, C., Lu, J., Xu, X., Hu, R., Pan, Y., 2012. pH-switched HRP-catalyzed dimerization of resveratrol: a selective biomimetic synthesis. *Green Chem.* 14, 3281–3284. <https://doi.org/10.1039/C2GC36288K>
- Li, S.-G., Huang, X.-J., Zhong, Y.-L., Li, M.-M., Li, Y.-L., Wang, Y., Ye, W.-C., 2019. Stilbene Glycoside Oligomers from the Roots of *Polygonum multiflorum*. *Chem. Biodivers.* 16, e1900192. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900192>
- Li, W., Li, H., Luo, Y., Yang, Y., Wang, N., 2010. Biosynthesis of Resveratrol Dimers by Regioselective Oxidative Coupling Reaction. *Synlett* 2010, 1247–1250. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1219787>
- Liu, H., Gu, L., 2012. Phlorotannins from brown algae (*Fucus vesiculosus*) inhibited the formation of advanced glycation endproducts by scavenging reactive carbonyls. *J. Agric. Food Chem.* 60, 1326–1334. <https://doi.org/10.1021/jf204112f>
- Liu, Y., Zhou, J., Qu, Y., Yang, X., Shi, G., Wang, X., Hong, Y., Drlica, K., Zhao, X., 2016. Resveratrol Antagonizes Antimicrobial Lethality and Stimulates Recovery of Bacterial Mutants. *PLOS ONE* 11, e0153023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153023>
- Lopez-Lluch, G., Cruz-Calvo, S.S., Navas, P., 2012. Resveratrol in cancer: cellular and mitochondrial consequences of proton transport inhibition. *Curr. Pharm. Des.* 18, 1338–1344. <https://doi.org/10.2174/138161212799504849>
- Malacarne, G., Vrhovsek, U., Zulini, L., Cestaro, A., Stefanini, M., Mattivi, F., Delledonne, M., Velasco, R., Moser, C., 2011. Resistance to *Plasmopara viticola* in a grapevine segregating population is associated with stilbenoid accumulation and with specific host transcriptional responses. *BMC Plant Biol.* 11, 114. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-114>
- Marel, A.-K., Lizard, G., Izard, J.-C., 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. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 538–548. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700185>
- Matsuura, B.S., Keylor, M.H., Li, B., Lin, Y., Allison, S., Pratt, D.A., Stephenson, C.R.J., 2015. A scalable biomimetic synthesis of resveratrol dimers and systematic evaluation of their antioxidant activities. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 54, 3754–3757. <https://doi.org/10.1002/anie.201409773>
- Mattivi, F., Reniero, F., Korhammer, S., 1995. Isolation, Characterization, and Evolution in Red Wine Vinification of Resveratrol Monomers. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1820–1823. <https://doi.org/10.1021/jf00055a013>
- 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>
- 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. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27, 1815–1827. <https://doi.org/10.1002/rcm.6636>
- Muhtadi, Hakim, E.H., Juliawaty, L.D., Syah, Y.M., Achmad, S.A., Latip, J., Ghisalberti, E.L., 2006. Cytotoxic resveratrol oligomers from the tree bark of *Dipterocarpus hasseltii*. *Fitoterapia* 77, 550–555. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.07.004>
- Müller, C., Ullmann, K., Wilkens, A., Winterhalter, P., Toyokuni, S., Steinberg, P., 2009. Potent Antioxidative Activity of Vineatrol@30 Grapevine-shoot Extract. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 1831–1836. <https://doi.org/10.1271/bbb.90213>
- Nassra, M., Krisa, S., Papastamoulis, Y., Kapche, G.D., Bisson, J., André, C., Konsman, J.-P., Schmitter, J.-M., Mérillon, J.-M., Waffo-Téguo, P., 2013. Inhibitory activity of plant stilbenoids against nitric oxide production by lipopolysaccharide-activated microglia. *Planta Med.* 79, 966–970. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1328651>

- Nøhr-Meldgaard, K., Ovsepian, A., Ingmer, H., Vestergaard, M., 2018. Resveratrol enhances the efficacy of aminoglycosides against *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 52, 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.06.005>
- Ohguchi, K., Akao, Y., Matsumoto, K., Tanaka, T., Ito, T., Inuma, M., Nozawa, Y., 2005. Vaticanol C-Induced Cell Death Is Associated with Inhibition of Pro-Survival Signaling in HL60 Human Leukemia Cell Line. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 353–356. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.353>
- Ohyama, M., Tanaka, T., Ito, T., Inuma, M., Bastow, K.F., Lee, K.-H., 1999. Antitumor agents 200.1 cytotoxicity of naturally occurring resveratrol oligomers and their acetate derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 3057–3060. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(99\)00520-X](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(99)00520-X)
- Packer, L., 2001. *Handbook of Antioxidants*. CRC Press.
- Pawlus, A.D., Sahli, R., Bisson, J., Rivière, C., Delaunay, J.-C., Richard, T., Gomès, E., Bordenave, L., Waffo-Tégou, P., Mérillon, J.-M., 2013. Stilbenoid Profiles of Canes from *Vitis* and *Muscadinia* Species. *J. Agric. Food Chem.* 61, 501–511. <https://doi.org/10.1021/jf303843z>
- Pawlus, A.D., Waffo-Tégou, 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>
- Pedneault, K., Provost, C., 2016. Fungus resistant grape varieties as a suitable alternative for organic wine production: Benefits, limits, and challenges. *Sci. Hortic.*, Recent advances in organic horticulture technology and management - Part 1 208, 57–77. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.016>
- Pezet, R., 1998. Purification and characterization of a 32-kDa laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. *FEMS Microbiol. Lett.* 167, 203–208. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13229.x>
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., Richter, H., 2004. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis* 43. <https://doi.org/10.3390/nu8040222>
- Pezet, R., Perret, C., Jean-Denis, J.B., Tabacchi, R., Gindro, K., Viret, O., 2003. δ -Viniferin, a Resveratrol Dehydrodimer: One of the Major Stilbenes Synthesized by Stressed Grapevine Leaves. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5488–5492. <https://doi.org/10.1021/jf030227o>
- Qiao, H., Chen, X., Xu, L., Wang, J., Zhao, G., Hou, Y., Ge, H.M., Tan, R.-X., Li, E., 2013. Antitumor effects of naturally occurring oligomeric resveratrol derivatives. *FASEB J.* 27, 4561–4571. <https://doi.org/10.1096/fj.13-231613>
- Qin, N., Tan, X., Jiao, Y., Liu, L., Zhao, W., Yang, S., Jia, A., 2014. RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm inhibition by ursolic acid and resveratrol. *Sci. Rep.* 4, 5467. <https://doi.org/10.1038/srep05467>
- Quiney, C., Dauzonne, D., Kern, C., Fourneron, J.-D., Izard, J.-C., Mohammad, R.M., Kolb, J.-P., Billard, C., 2004. Flavones and polyphenols inhibit the NO pathway during apoptosis of leukemia B-cells. *Leuk. Res.* 28, 851–861. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2003.12.003>
- Rappoport, Z., 2004. *The Chemistry of Phenols*. John Wiley & Sons.
- Ratz-Lyko, A., Arct, J., 2019. Resveratrol as an active ingredient for cosmetic and dermatological applications: a review. *J. Cosmet. Laser Ther.* 21, 84–90. <https://doi.org/10.1080/14764172.2018.1469767>
- Ribeiro de Lima, M.T., Waffo-Tégou, P., Teissedre, P.L., Pujolas, A., Vercauteren, J., Cabanis, J.C., Mérillon, J.M., 1999. Determination of Stilbenes (*trans*-Astringin, *cis*- and *trans*-Piceid, and *cis*- and *trans*-Resveratrol) in Portuguese Wines. *J. Agric. Food Chem.* 47, 2666–2670. <https://doi.org/10.1021/jf9900884>
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2017. *Traité d'oenologie - Tome 2, 7e édition*. ed. Dunod.
- Richard, T., Abdelli-Belhad, A., Vitrac, X., Waffo-Tégou, P., Mérillon, J.-M., 2016. *Vitis vinifera* canes, a source of stilbenoids against downy mildew. *OENO One* 50. <https://doi.org/10.20870/oenone.2016.50.3.1178>
- Riganakos, K.A., Veltsistas, P.G., 2003. Comparative spectrophotometric determination of the total iron content in various white and red Greek wines. *Food Chem.* 82, 637–643. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00120-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00120-1)

- Rimando, A.M., Cuendet, M., Desmarchelier, C., Mehta, R.G., Pezzuto, J.M., Duke, S.O., 2002. Cancer Chemopreventive and Antioxidant Activities of Pterostilbene, a Naturally Occurring Analogue of Resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 50, 3453–3457. <https://doi.org/10.1021/jf0116855>
- 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, 1317–1333. <https://doi.org/10.1039/C2NP20049J>
- Rodríguez-Cabo, T., Rodríguez, I., Ramil, M., Cela, R., 2018. Assessment of alcoholic distillates for the extraction of bioactive polyphenols from grapevine canes. *Ind. Crops Prod.* 111, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.011>
- Roldán, A., Palacios, V., Caro, I., Pérez, L., 2010. Evolution of resveratrol and piceid contents during the industrial winemaking process of sherry wine. *J. Agric. Food Chem.* 58, 4268–4273. <https://doi.org/10.1021/jf9038666>
- Romero-Pérez, A.I., Ibern-Gómez, M., Lamuela-Raventós, R.M., de la Torre-Boronat, M.C., 1999. Piceid, the Major Resveratrol Derivative in Grape Juices. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1533–1536. <https://doi.org/10.1021/jf981024g>
- Romero-Pérez, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., Andrés-Lacueva, C., de la Torre-Boronat, M.C., 2001. Method for the Quantitative Extraction of Resveratrol and Piceid Isomers in Grape Berry Skins. Effect of Powdery Mildew on the Stilbene Content. *J. Agric. Food Chem.* 49, 210–215. <https://doi.org/10.1021/jf000745o>
- Romero-Pérez, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., Waterhouse, A.L., de la Torre-Boronat, M.C., 1996. Levels of *cis*- and *trans*-Resveratrol and Their Glucosides in White and Rosé *Vitis vinifera* Wines from Spain. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2124–2128. <https://doi.org/10.1021/jf9507654>
- Rotolo, C., De Miccolis Angelini, R.M., Dongiovanni, C., Pollastro, S., Fumarola, G., Di Carolo, M., Perrelli, D., Natale, P., Faretra, F., 2018. Use of biocontrol agents and botanicals in integrated management of *Botrytis cinerea* in table grape vineyards. *Pest Manag. Sci.* 74, 715–725. <https://doi.org/10.1002/ps.4767>
- Sako, M., Hosokawa, H., Ito, T., Iinuma, M., 2004. Regioselective oxidative coupling of 4-hydroxystilbenes: synthesis of resveratrol and epsilon-viniferin (E)-dehydrodimers. *J. Org. Chem.* 69, 2598–2600. <https://doi.org/10.1021/jo035791c>
- 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>
- Shen, J., Zhou, Q., Li, P., Wang, Z., Liu, S., He, C., Zhang, C., Xiao, P., 2017. Update on Phytochemistry and Pharmacology of Naturally Occurring Resveratrol Oligomers. *Molecules* 22, 2050. <https://doi.org/10.3390/molecules22122050>
- Shen, T., Xie, C.-F., Wang, X.-N., Lou, H.-X., 2013. Stilbenoids, in: Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M. (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 1901–1949. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_63
- Singh, D., Mendonsa, R., Koli, M., Subramanian, M., Nayak, S.K., 2019. Antibacterial activity of resveratrol structural analogues: A mechanistic evaluation of the structure-activity relationship. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 367, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.025>
- Snyder, S.A., Gollner, A., Chiriac, M.I., 2011. Regioselective Reactions for Programmable Resveratrol Oligomer Synthesis. *Nature* 474, 461–466. <https://doi.org/10.1038/nature10197>
- Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M., 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 30, 91–113. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(96\)00155-5](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(96)00155-5)
- Song, T., Zhou, B., Peng, G.-W., Zhang, Q.-B., Wu, L.-Z., Liu, Q., Wang, Y., 2014. Aerobic oxidative coupling of resveratrol and its analogues by visible light using mesoporous graphitic carbon nitride (mpg-C(3)N(4)) as a bioinspired catalyst. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 20, 678–682. <https://doi.org/10.1002/chem.201303587>
- Szewczuk, L.M., Lee, S.H., Blair, I.A., Penning, T.M., 2005. Viniferin Formation by COX-1: Evidence for Radical Intermediates during Co-oxidation of Resveratrol. *J. Nat. Prod.* 68, 36–42. <https://doi.org/10.1021/np049702i>
- Takaoka, M., 1940. Of the phenolic substances of white hellebore. *J Fac Sci Hokkaido Univ* 1–16.

- Takaya, Y., Terashima, K., Ito, J., He, Y.-H., Tateoka, M., Yamaguchi, N., Niwa, M., 2005. Biomimic transformation of resveratrol. *Tetrahedron* 61, 10285–10290. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.023>
- Takaya, Y., Yan, K.-X., He, Y.-H., Terashima, K., 2002. Biogenetic reactions on stilbene tetramers 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)
- Tanaka, T., Ohyama, M., Morimoto, K., Asai, F., Inuma, M., 1998. A resveratrol dimer from *Parthenocissus tricuspidata*. *Phytochemistry* 48, 1241–1243. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00898-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00898-4)
- Toda, F., Tanaka, K., Iwata, S., 1989. Oxidative coupling reactions of phenols with iron(III) chloride in the solid state. *J. Org. Chem.* 54, 3007–3009. <https://doi.org/10.1021/jo00274a007>
- Trela, B.C., Waterhouse, A.L., 1996. Resveratrol: Isomeric Molar Absorptivities and Stability. *J. Agric. Food Chem.* 44, 1253–1257. <https://doi.org/10.1021/jf9504576>
- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P., Mahajan, R.T., 2009. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 65–74. <https://doi.org/10.2174/157015909787602823>
- Vannozzi, A., Dry, I.B., Fasoli, M., Zenoni, S., Lucchin, M., 2012. Genome-wide analysis of the grapevine stilbene synthase multigenic family: genomic organization and expression profiles upon biotic and abiotic stresses. *BMC Plant Biol.* 12, 130. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-130>
- Velu, S.S., Buniyamin, I., Ching, L.K., Feroz, F., Noorbacha, I., Gee, L.C., Awang, K., Wahab, I.A., Weber, J.-F.F., 2008. Regio- and stereoselective biomimetic synthesis of oligostilbenoid dimers from resveratrol analogues: influence of the solvent, oxidant, and substitution. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 14, 11376–11384. <https://doi.org/10.1002/chem.200801575>
- 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>
- Versari, A., Parpinello, G.P., Tornielli, G.B., Ferrarini, R., Giulivo, C., 2001. Stilbene Compounds and Stilbene Synthase Expression during Ripening, Wilting, and UV Treatment in Grape cv. Corvina. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5531–5536. <https://doi.org/10.1021/jf010672o>
- Vestergaard, M., Ingmer, H., 2019. Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *Int. J. Antimicrob. Agents* 53, 716–723. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.02.015>
- Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Valls, J., Richard, T., Delaunay, J.-C., Mérillon, J.-M., Teissédre, P.-L., 2005. Determination of stilbenes (*delta*-viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, *epsilon*-viniferin) in Brazilian wines. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5664–5669. <https://doi.org/10.1021/jf050122g>
- Vogt, T., 2010. Phenylpropanoid Biosynthesis. *Mol. Plant* 3, 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Vrhovsek, U., Malacarne, G., Masuero, D., Zulini, L., Guella, G., Stefanini, M., Velasco, R., Mattivi, F., 2012. Profiling and accurate quantification of *trans*-resveratrol, *trans*-piceid, *trans*-pterostilbene and 11 viniferins induced by *Plasmopara viticola* in partially resistant grapevine leaves. *Aust. J. Grape Wine Res.* 18, 11–19. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2011.00163.x>
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M.H., Oatis, J.E., Walle, U.K., 2004. High Absorption but Very Low Bioavailability of Oral Resveratrol in Humans. *Drug Metab. Dispos.* 32, 1377–1382. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000885>
- Wang, M., Jin, Y., Ho, C.T., 1999. Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3974–3977. <https://doi.org/10.1021/jf990382w>
- Wang, P., Sang, S., 2018. Metabolism and pharmacokinetics of resveratrol and pterostilbene. *BioFactors Oxf. Engl.* 44, 16–25. <https://doi.org/10.1002/biof.1410>
- Wang, W., Tang, K., Yang, H.-R., Wen, P.-F., Zhang, P., Wang, H.-L., Huang, W.-D., 2010. 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.* 48, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.12.002>

- Waterhouse, A.L., 2002. Wine Phenolics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957, 21–36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02903.x>
- Weiskirchen, S., Weiskirchen, R., 2016. Resveratrol: How Much Wine Do You Have to Drink to Stay Healthy? *Adv. Nutr.* 7, 706–718. <https://doi.org/10.3945/an.115.011627>
- Wenzel, E., Somoza, V., 2005. Metabolism and bioavailability of *trans*-resveratrol. *Mol. Nutr. Food Res.* 49, 472–481. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500010>
- Wiese, W., Vornam, B., Krause, E., Kindl, H., 1994. Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment. *Plant Mol. Biol.* 26, 667–677. <https://doi.org/10.1007/BF00013752>
- Wilkens, A., Paulsen, J., Wray, V., Winterhalter, P., 2010. Structures of Two Novel Trimeric Stilbenes Obtained by Horseradish Peroxidase Catalyzed Biotransformation of *trans*-Resveratrol and (–)- ϵ -Viniferin. *J. Agric. Food Chem.* 58, 6754–6761. <https://doi.org/10.1021/jf100606p>
- Xiao, K., Zhang, H.-J., Xuan, L.-J., Zhang, J., Xu, Y.-M., Bai, D.-L., 2008. Stilbenoids: Chemistry and bioactivities, in: Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry, Bioactive Natural Products (Part N)*. Elsevier, pp. 453–646. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(08\)80032-4](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(08)80032-4)
- Xu, D., Yu, G., Xi, P., Kong, X., Wang, Q., Gao, L., Jiang, Z., 2018. Synergistic Effects of Resveratrol and Pyrimethanil against *Botrytis cinerea* on Grape. *Mol. Basel Switz.* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23061455>
- Yoshiyuki, K., Hiromichi, O., Shigeru, A., 1985. Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* 834, 275–278. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(85\)90167-5](https://doi.org/10.1016/0005-2760(85)90167-5)
- Zambrano, A., Molt, M., Uribe, E., Salas, M., 2019. Glut 1 in Cancer Cells and the Inhibitory Action of Resveratrol as A Potential Therapeutic Strategy. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20133374>
- Zhang, J.-Q., Li, G.-P., Kang, Y.-L., Teng, B.-H., Yao, C.-S., 2017. Biomimetic Synthesis of Resveratrol Trimers Catalyzed by Horseradish Peroxidase. *Mol. Basel Switz.* 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22050819>
- Zhong, C., Liu, X.-H., Chang, J., Yu, J.-M., Sun, X., 2013. Inhibitory effect of resveratrol dimerized derivatives on nitric oxide production in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 4413–4418. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.058>
- Zordoky, B.N.M., Robertson, I.M., Dyck, J.R.B., 2015. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis., Resveratrol: Challenges in translating pre-clinical findings to improved patient outcomes* 1852, 1155–1177. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.016>

Sites Web :

<https://agriculture.gouv.fr/le-plan-ecophyto-quest-ce-que-cest>

https://www.ecophyto-pro.fr/fiches/fiche/25/le_plan_ecophyto_ii/n:304

www.ephytia.inra.fr

<https://inra-dam-front-resources-cdn.brainsonic.com/ressources/afile/445373-27663-resource-expertise-cuivre-en-ab-rapport-final-fr.pdf>

<http://www.inra.fr/Chercheurs-etudiants/Systemes-agricoles/Toutes-les-actualites/Le-plan-Ecophyto-2025-de-reduction-de-l-usage-des-pesticides-est-il-realiste>

www.itab.asso.fr/activites/biocontrole-projets.php

<https://mib-polyphenol.eu/>

<http://www.vinopole-cvdl.com/amboise-viticulture-durable-vins/biocontrole-methode-alternative/substances-naturelles-vins/>

Extraction et hémisynthèse des stilbènes de la vigne et du vin pour une application en santé humaine et végétale

Les stilbènes sont des molécules de défense que produit la vigne pour lutter contre les agents pathogènes. Retrouvés dans le vin, ils acquièrent une valeur ajoutée pour leurs effets bénéfiques avérés en santé humaine. Sachant que l'efficacité des stilbènes contre certains oomycètes et champignons qui infectent la vigne augmente avec leur degré d'oligomérisation, cette thèse avait pour premier objectif d'optimiser et de procéder à des réactions de couplage oxydatif du resvératrol et de l' ϵ -viniférine extraits de sarments de vigne, en présence de sels de métaux, pour la production d'oligomères. Ces réactions d'hémisynthèse ont conduit d'une part à la formation de stilbènes à haut poids moléculaire, et à la production d'extraits à forte activité antifongique contre deux agents pathogènes majeurs de la vigne, *Plasmopara viticola* et *Botrytis cinerea*. D'autre part, ces réactions de couplage oxydatif appliquées au vin ont permis d'y étudier les mécanismes de la transformation oxydative du resvératrol, d'identifier les oligomères qui en découlent et de déterminer les conditions favorisant leur formation. Enfin, les effets potentiels de ces oligomères sur la santé humaine ont été étudiés, en évaluant leur niveau d'activité anti-inflammatoire *in vitro*.

Mots-clés : stilbènes ; couplage oxydatif ; vigne ; activité antimicrobienne ; vin ; activité anti-inflammatoire

Extraction and hemisynthesis of grapevine and wine stilbenes for an application in human and plant health

Stilbenes are a group of defence molecules produced by grapevine to fight against pathogens. They are consequently found in wine, where they acquire an added value through their proven positive effects on human health. Knowing that the efficacy of stilbenes against some oomycetes and fungus pathogens that attack grapevine increases with their oligomerization degree, the first objective of this thesis was to optimize and proceed to oxidative coupling reactions of resveratrol and ϵ -viniferin extracted from grapevine canes, in the presence of metal salts, in order to produce stilbene oligomers. On the one hand, these hemisynthesis reactions led to the formation of stilbenes with high molecular weight, and to the production of extracts with high antifungal activity against two major grapevine pathogens, *Plasmopara viticola* and *Botrytis cinerea*. On the other hand, these oxidative coupling reactions carried out on wine helped study the mechanisms of the oxidative transformation of resveratrol in wine, identify the resulting oligomers and determine the conditions conducive to their formation. Finally, the potential effects of these oligomers on human health were studied, by evaluating the level of their anti-inflammatory activity.

Keywords: stilbenes; oxidative coupling; grapevine; antimicrobial activity; wine; anti-inflammatory activity

Unité de Recherche Œnologie – Axe Molécules d'Intérêt Biologique

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