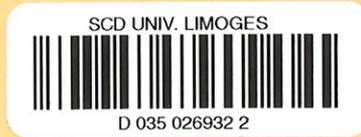


UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

ANNEE 1999



THESE N° 321/1

**OLIGOMERES FLAVANOLIQUES DE *CUPRESSUS*
SEMPERVIRENS L., *PINUS MARITIMA* L. ET *VITIS VINIFERA* L.**

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE



présentée et soutenue publiquement le: 21 Juin 1999

PAR

Karine REBEIX

Née le 22 Avril 1974 à Saint-Junien (87)

EXAMINATEURS DE LA THESE

- Monsieur le Professeur Albert- José CHULIA..... - Président
Madame Daovy ALLAIS..... - Juge
Monsieur Jean-Luc DUROUX..... - Juge
Madame Martine BOYER..... - Juge

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE:

Monsieur le Professeur GHESTEM Axel

ASSESEURS:

Monsieur le Professeur HABRIOUX Gérard
Monsieur DREYFUSS Gilles - Maître de Conférences

PROFESSEURS:

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
BERNARD Michel	PHYSIQUE-BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE PARASITOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE CHIMIE THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE
LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESCH Christian	HYGIENE-HYDROLOGIE-ENVIRONNEMENT
OUDART Nicole	PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A Monsieur CHULIA

Professeur de Pharmacognosie.

Vous avez accepté de présider le jury de cette thèse.

Veillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

A Madame ALLAIS

Maître de Conférences.

Vous m'avez apporté votre expérience et votre soutien tout au long de ce travail.

Que cette thèse soit l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur DUROUX

Maître de Conférences.

Vous avez accepté de consacrer une partie de votre temps à juger cette thèse.

Veillez recevoir l'expression de ma reconnaissance.

A Madame BOYER

Pharmacien.

Veillez recevoir l'expression de ma sincère reconnaissance, pour vos conseils lors de mon stage officinal et pour avoir accepté de juger ce travail.

A mes parents, à Jean-Philippe, à mes amis.

Un grand merci pour le soutien et la patience que vous m'avez témoigné tout au long de mes études.

PLAN

INTRODUCTION

CHAPITRE I: DESCRIPTION BOTANIQUE

I- LE PIN MARITIME

- 1- Classification systématique
- 2- Description de la famille abietacées
- 3- Description du genre *Pinus*
- 4- Description de l'espèce *Pinus maritima* L.
 - 4-1- Répartition et milieu
 - 4-2- Description
 - 4-3- Particularités

II- LE CYPRES

- 1- Classification systématique
- 2- Description de la famille cupressacées
- 3- Description du genre *Cupressus*
- 4- Description de l'espèce *Cupressus sempervirens* L.
 - 4-1- Répartition et milieu
 - 4-2- Description
 - 4-3- Particularités

III- LA VIGNE ROUGE

- 1- Classification systématique
- 2- Description de la famille vitacées
- 3- Description du genre *Vitis*
- 4- Description de l'espèce *Vitis vinifera* L.
- 5- Les espèces vinifiées

IV- LES DIFFERENTS PRODUITS DERIVES DU VIN

- 1- Le vin
 - 1-1- Les cépages rouges
 - 1-2- Les cépages blancs
- 2- Le jus de raisin
- 3- Les raisins
- 4- Les produits issus des résidus

CHAPITRE II: COMPOSITION CHIMIQUE

I- LE PIN MARITIME

- 1- La drogue
- 2- Composition chimique
- 3- Propriétés

II- LE CYPRES

- 1- La drogue
- 2- Composition chimique
- 3- Propriétés

III- LA VIGNE ROUGE

- 1- Les glucides
- 2- Les lipides
- 3- Les vitamines
- 4- Les acides organiques
- 5- Les enzymes
- 6- Les dérivés azotés
- 7- Les terpènes et les constituants volatils
- 8- La cire

9- Les substances pectiques

10- Les composés phénoliques

10-1- Phénols et acides phénoliques

10-2- Phytoalexines

10-3- Anthocyanes

10-4- Flavonoïdes

10-5- Tanins

10-5-1- Mise en évidence et quantification des tanins
catéchiques10-5-1-1- Méthode colorimétrique utilisant un
aldéhyde10-5-1-2- Méthode colorimétrique par relargage
dans une solution acide

10-5-1-3- Quantification par HPLC

10-5-1-3-1- HPLC couplée à une détection
colorimétrique10-5-1-3-2- HPLC couplée à une détection
électrochimique10-5-1-3-3- HPLC couplée à une
spectrométrie de masse10-5-2- Composition flavanolique de *Vitis vinifera* L.10-5-2-1- Composition flavanolique des parties de la
vigne10-5-2-2- Composition flavanolique de plusieurs
variétés de vigne

11- Variation phénolique durant la maturation

12- Influence des conditions climatiques sur la concentration phénolique des
raisins

CHAPITRE III: EXTRACTION DES COMPOSES FLAVANOLIQUES

A- METHODES D'EXTRACTION DES DIFFERENTES ETUDES D'ANALYSE

I- METHODES UTILISANT LE METHANOL

- 1- Première technique d'extraction
- 2- Deuxième technique d'extraction
- 3- La formation des oligomères
- 4- Les principes de la galloylation

II- METHODE UTILISANT DES MELANGES HYDROALCOOLIQUES

- 1- Extraction
- 2- Analyse

III- METHODES UTILISANT DES SOLVANTS ORGANIQUES

- 1- Etude de l'influence du taux d'humidité sur l'extraction
- 2- Schéma d'extraction
 - 2-1- Avec de l'acétate d'éthyle
 - 2-2- Avec le mélange eau/acétone

B- METHODES D'EXTRACTION DES BREVETS

I- METHODES PERMETTANT DE LIMITER LE TAUX DE MONOMERES

- 1- Traitement supplémentaire par précipitation
- 2- Traitement supplémentaire par extraction solide/liquide
- 3- Exemples de mise en oeuvre du procédé d'extraction

II- METHODE PERMETTANT D'ELIMINER LES POLYMERES

- 1- Mise en oeuvre du procédé à partir de *Vitis vinifera* L.
- 2- Mise en oeuvre du procédé à partir de *Pinus maritima* L.
- 3- Pour un usage pharmaceutique

C- METHODE D'EXTRACTION DES OPC GLYCOSYLES

CHAPITRE IV: PREPARATION DES EXTRAITS EN VUE

DE LEUR UTILISATION EN THERAPEUTIQUE,
COSMETIQUE ET DIETETIQUE

CHAPITRE V: ETUDE DES PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES

DES COMPOSES FLAVANOLIQUES

A- AU NIVEAU DES RADICAUX LIBRES PROPREMENT DIT

I- RAPPEL SUR LES RADICAUX LIBRES

II- MISE EN EVIDENCE DES PROPRIETES ANTIRADICALAIRES

III- COMPARAISON DES CAPACITES ANTIOXYDANTES DES
PROANTHOCYANIDINES, DES VITAMINES ET DES ENZYMES

IV- ACTIVITE ANTIOXYDANTE DU VIN ET ALCOOL

V- COMPARAISON DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES COMPOSES
ISSUS DU VIN OU DES RAISINS

B- ACTIONS DES PROCYANIDINES

I- L'ATHEROSCLEROSE ET LES PROCYANIDINES

II- EFFET ANTIRADICALAIRE ET INHIBITION DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE

III- ACTIVITES INHIBITRICES ENZYMATIQUES DES PROCYANIDINES

- 1- Vieillessement cutané et procyanidines
- 2- Activités antiprotéasique et anti-élastasique des OPC
- 3- Action antiagrégante plaquettaire des procyanidines

IV- EFFETS PROTECTEURS DES PROCYANIDINES

ENVERS LES MALADIES CARDIO-VASCULAIRES ISCHEMIQUES

- 1- Effets vasodilatateurs des OPC
- 2- Activité angioprotectrice des OPC
- 3- Etudes cliniques

CHAPITRE VI: TOLERANCE, PHARMACOCINETIQUE

ET METABOLISME DES PROCYANIDINES

I- TOLERANCE

II- PHARMACOCINETIQUE ET METABOLISME

CHAPITRE VII: APPLICATIONS THERAPEUTIQUES, DIETETIQUES
ET COSMETIQUES DES PROCYANIDINES

I- TRAITEMENT DES TROUBLES VEINOLYMPHATIQUES

II- PRODUITS COSMETIQUES

III- COMPLEMENTS ALIMENTAIRES

CONCLUSION

ABREVIATIONS

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

Les radicaux libres, déchets toxiques du métabolisme de l'oxygène, sont responsables de nombreux méfaits dans l'organisme humain. Leurs principales cibles sont les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires et les éléments structuraux du tissu conjonctif (collagène, élastine, acide hyaluronique). Ainsi, les radicaux libres sont impliqués dans les maladies cardio-vasculaires liées à l'athérosclérose et dans le vieillissement cutané.

A l'état normal leur taux est contrôlé par deux modes de régulation. Il s'agit d'une part d'une neutralisation par des enzymes cellulaires et d'autre part d'une action protectrice par des piègeurs de radicaux libres apportés par une alimentation riche en vitamines et oligo-éléments.

Cependant, le taux des enzymes diminue avec l'âge et les vitamines antioxydantes, en particulier la vitamine C, sont elles-mêmes oxydables. Oxydées, elles ne peuvent plus jouer leur rôle antiradicalaire. De plus, notre alimentation est souvent déséquilibrée et pauvre en vitamines.

Ainsi, depuis la découverte de ces phénomènes l'intérêt des antiradicalaires, tels que les oligomères flavanoliques, s'est développé, atteignant à l'heure actuelle beaucoup de secteurs comme l'agro-alimentaire, la cosmétique, les nutriceutiques, la pharmacie... Ces composés agissent non seulement en protégeant les tissus de l'oxydation, mais également en protégeant les antiradicalaires classiques. Préservant ces derniers de l'oxydation, ils leur permettent de jouer leur rôle de protecteur cellulaire.

Les oligomères flavanoliques sont présents dans de nombreux végétaux, notamment l'écorce de pin maritime et les cônes de cyprès, mais la source la plus utilisée reste les sous-produits de la vinification comme le marc ou les pépins de raisins.

Dans un premier temps, notre travail se portera sur l'étude des caractères botaniques et de la composition chimique de ces trois sources végétales, et en particulier celle de la vigne rouge. Viendront ensuite les méthodes d'extraction et d'analyse des oligomères flavanoliques avec, souvent, une comparaison de la composition soit entre plusieurs cépages, soit entre les différentes parties de la vigne.

Puis, seront étudiées les différentes propriétés des oligomères flavanoliques qui sont à l'origine de leurs effets protecteurs envers les dommages oxydatifs.

Ces composés luttent contre l'athérogénèse et les maladies cardio-vasculaires qui en découlent. Ceci est connu sous le nom de "French Paradox" qui montre que l'absorption modérée de vin rouge protège des maladies cardio-vasculaires grâce en partie à l'action bénéfique, à différents niveaux, des oligomères flavanoliques.

Les oligomères flavanoliques sont également capables de freiner le vieillissement cutané. Pour cela, ils inhibent la peroxydation lipidique au niveau des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires. De même, ils protègent la peau en préservant l'intégrité des différentes parties constitutives du tissu conjonctif. Cette protection est assurée par une action sur les enzymes de dégradation de ce tissu.

Ce travail se terminera avec la présentation des principaux produits commercialisés renfermant des oligomères flavanoliques. Ces produits se différencient selon leur indication principale, c'est à dire comme spécialité veinotonique, comme produit cosmétique ou comme complément alimentaire antioxydant.

CHAPITRE I

DESCRIPTION BOTANIQUE

I- LE PIN MARITIMEPIN MARITIME *Pinus maritima* L. ABIETACEES1-Classification systématique (12)

<u>Embranchement:</u>	Spermaphytes ou Phanérogames (plantes à fleurs et à graines)
<u>Sous-embranchement:</u>	Gymnospermes (graine nue)
<u>Classe:</u>	Coniférales
<u>Famille:</u>	Abiétacées (Pinacées)
<u>Genre:</u>	<i>Pinus</i>
<u>Espèce:</u>	<i>Pinus maritima</i> L. (<i>Pinus pinaster</i> S.)

2-Description de la famille Abietacées (12, 21, 104)

Selon la nouvelle nomenclature la famille des abietacées est nommée pinacées.

Cette famille est composée d'arbres, des résineux, à ramification verticillée, à feuilles simples, étroites et allongées, généralement persistantes.

Les fleurs sont sans calice ni corolle, de sexes séparés. Elles sont groupées en petits cônes portés par un même pied. Il s'agit d'une espèce monoïque.

Ces cônes sont de différentes sortes:

Les cônes staminés (fleurs mâles) sont constitués d'un axe qui porte les étamines. Celles-ci sont insérées en spirale et sont réduites à une écaille présentant en dessous deux sacs polliniques.

Les cônes pistillés (fleurs femelles) sont formés d'un axe qui porte des bractées disposées en spirale. A l'aisselle de chaque bractée se trouve une écaille-carpelle représentant le pistil avec à sa base deux ovules nus, droits et pendants.

Les cônes fructifères sont constitués d'écailles qui grandissent, deviennent coriaces ou ligneuses puis persistent ou tombent à maturité.

Les graines sont pourvues d'une aile et sont réunies par deux sur chaque écaille. Elles renferment une substance de réserve, l'endosperme, et un embryon droit à cotylédons en nombre variable.

3-Description du genre *Pinus* (12, 21, 104)

Les arbres appartenant à ce genre sont caractérisés par des ramifications disposées en verticilles et par des feuilles persistantes réunies par 2, 3 ou 5 et entourées d'une gaine écailleuse.

Les cônes staminés sont réunis en groupe à la base des pousses de l'année.

Les cônes pistillés sont solitaires, opposés ou verticillés au sommet des mêmes pousses.

Les cônes fructifères ont des écailles ligneuses, épaissies à l'extrémité et persistantes.

4-Description de l'espèce *Pinus maritima* L. (12, 21, 92, 104)

4-1-Répartition et milieu

Le pin maritime (figure 1) est originaire des régions méditerranéennes occidentales et vit dans des régions où l'humidité atmosphérique est élevée, où les hivers sont doux et les printemps chauds.

Contrairement à ce que suggère son nom, il préfère l'intérieur des terres au littoral.

En France, il est présent dans les Landes.

4-2-Description

Selon la nouvelle nomenclature, le pin maritime est nommé *Pinus pinaster* S.. Son ancienne dénomination *Pinus maritima* L. est encore souvent trouvée dans la littérature.

Il s'agit d'un arbre de deuxième grandeur, il atteint 20 à 30 mètres de haut.

Son tronc est droit et élancé, ses branches sont verticillées, subhorizontales et forment une partie aérienne étalée, ovoïdo-pyramidale.

L'arbre peut fructifier dès l'âge de 15 ans mais les graines ne sont capables de germer que beaucoup plus tard.

L'écorce est rouge violacé, épaisse, profondément gercée avec de larges écailles chez les individus adultes.

Les feuilles sont réunies par paires et entourées d'une gaine de 2 cm de long. Elles sont persistantes, dures, linéaires et aciculaires.

Ces feuilles sont de couleur vert foncé plus ou moins brillant. Elles mesurent jusqu'à 20 cm de long et sont concentrées à l'extrémité des rameaux.

Les fleurs sont de sexes séparés mais portées par le même individu (monoïque).

Les fleurs mâles ou cônes staminés sont de couleur jaune, elles sont disposées en nombreux chatons.

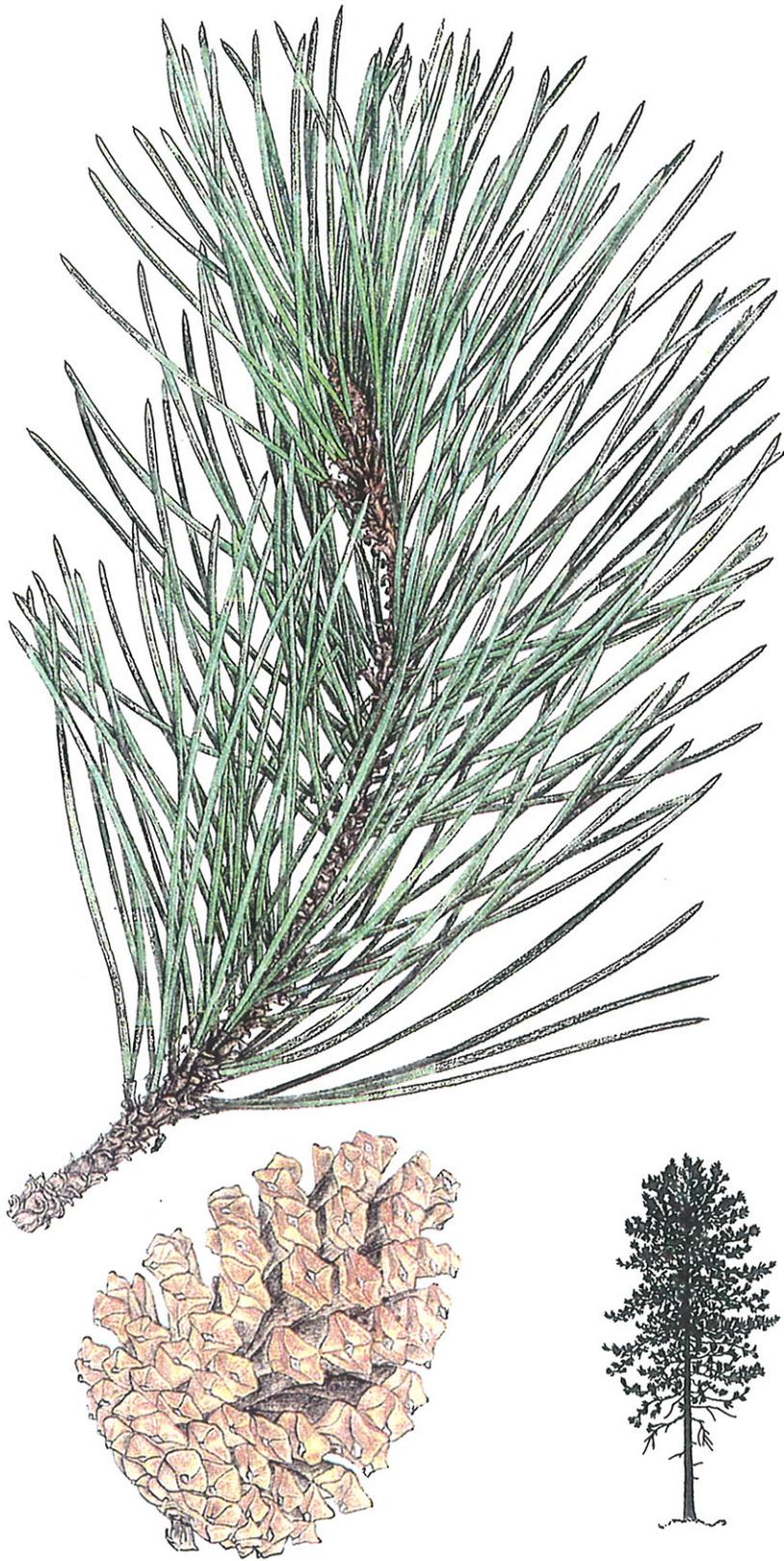


Figure 1: *Pinus maritima* L. (92)

rameau - cône fructifère - port

Les fleurs femelles ou cônes pistillés, jaune violacé, roses ou pourpres sont peu visibles car situées à l'extrémité des nouvelles pousses.

Cet arbre fleurit d'avril à juin, les fruits sont à maturité à l'automne de l'année suivante.

Les fruits correspondent aux cônes fructifères, il s'agit de pignes (strobiles).

Ces fruits sont ovoïdo-coniques, souvent asymétriques, de couleur brun clair, brillants, non résineux, rassemblés en verticilles. Ils sont portés par un court pédoncule et poussent vers le bas et en oblique.

Les écailles montrent un écusson bombé muni en travers d'une carène saillante et au centre d'un mamelon d'où rayonnent plusieurs fines arêtes.

Les graines mesurent environ 1 cm avec une aile environ 4 fois plus longue qu'elles.

4-3-Particularités (12, 21)

Le pin maritime est un arbre à croissance rapide, sans exigences particulières en matière de sol, mais il est sensible au froid et à la sécheresse.

Sa grande résistance au sel de mer en fait une plante importante dans les associations boisées des littoraux où elle joue une fonction de brise-vent.

Grâce à ses grandes capacités de dissémination, cet arbre peut repeupler rapidement des territoires détruits par des incendies.

Son bois de couleur rougeâtre et à grain grossier est utilisé dans les travaux de menuiserie et dans l'industrie du papier.

C'est l'un des pins qui produit le plus de résine et il a longtemps été cultivé dans ce but.

La résine, extraite par la technique du gemmage, fournit l'essence de térébenthine, cependant l'extraction de cette résine est préjudiciable à la qualité du bois.

La longévité du pin maritime est moyenne, il peut vivre environ deux cents ans.

II- LE CYPRES

CYPRES *Cupressus sempervirens* L. CUPRESSACEES

1-Classification systématique (12)

<u>Embranchement:</u>	Spermaphytes ou Phanérogames (plantes à fleurs et à graines)
<u>Sous-embranchement:</u>	Gymnospermes (graine nue)
<u>Classe:</u>	Coniférales
<u>Famille:</u>	Cupressacées
<u>Genre:</u>	<i>Cupressus</i>
<u>Espèce:</u>	<i>Cupressus sempervirens</i> L.

2-Description de la famille Cupressacées (12, 22, 104)

Il s'agit d'arbres et d'arbrisseaux à feuilles persistantes, étroites, en forme d'écailles, verticillées ou opposées et imbriquées.

Les plantes de cette famille ont des fleurs sans calice ni corolle. Les unes sont staminées, les autres sont pistillées et disposées en petits cônes cylindriques, ovoïdes ou globuleux, portés par un même pied ou par des pieds différents.

Les cônes staminés renferment les étamines qui sont réduites à des écailles insérées sur un petit axe et portant dessous 2 à 5 sacs polliniques.

Les cônes pistillés sont formés d'un axe sur lequel s'insèrent des écailles-carpelles, les pistils, qui portent à leur base un ou plusieurs ovules nus, droits et dressés.

Les cônes fructifères sont globuleux et constitués par des écailles épaissies qui sont devenues ligneuses ou charnues, libres ou soudées et toujours persistantes.

Les graines contiennent une plantule avec un nombre variable de cotylédons et une matière de réserve, l'endosperme.

3-Description du genre *Cupressus* (12, 22, 104)

Les arbres de ce genre ont des feuilles persistantes en forme d'écailles imbriquées sur 4 rangs et recouvrant entièrement les rameaux.

Les cônes staminés et les cônes pistillés sont sur le même pied et ils terminent les rameaux.

Les cônes staminés sont très petits et cylindriques alors que les cônes pistillés sont globuleux et constitués de 6 à 12 écailles portant chacune de nombreux ovules.

Les cônes fructifères sont formés par la lignification des écailles qui prennent la forme d'une tête de clou polygonale et qui ne se soudent pas.

Les graines sont munies d'une aile peu développée.

4-Description de l'espèce *C. sempervirens* L. (12, 22, 92, 104)

4-1-Répartition et milieu

Le cyprès (figure 2) est originaire des pays méditerranéens orientaux. Il est depuis longtemps présent dans les pays qui bordent la Méditerranée.

4-2-Description

Arbre de deuxième grandeur, il atteint 20 à 30 mètres environ.

Il s'agit d'un arbre de couleur vert sombre, à tronc droit qui porte de nombreuses branches et des petits rameaux dressés en une pyramide allongée et pointue.

L'écorce gris-rougeâtre est lisse ou fendillée en long.

Les feuilles, en forme d'écailles triangulaires sont persistantes et imbriquées sur les branches. Elles sont de couleur vert foncé opaque et présentent des glandes résinifères.

Il s'agit d'une plante monoïque, les fleurs mâles sont nombreuses et réunies sous forme d'inflorescences, en épis isolés de couleur jaune au sommet des branches.

Les fleurs femelles sont des strobiles ligneux. La floraison a lieu en mars.

Les fruits sont des galbules ovoïdes d'environ 3 cm de diamètre.

Les galbules sont vert brillant quand elles sont jeunes, puis elles se lignifient et deviennent gris plombé ou brunes. Elles sont constituées de 8 à 12 écailles en forme de têtes de clou polygonales.

Les fruits parviennent à maturité dans l'année et leurs écailles écartées libèrent de petites graines, irrégulières, ovoïdes, aplaties et bordées d'une aile étroite.

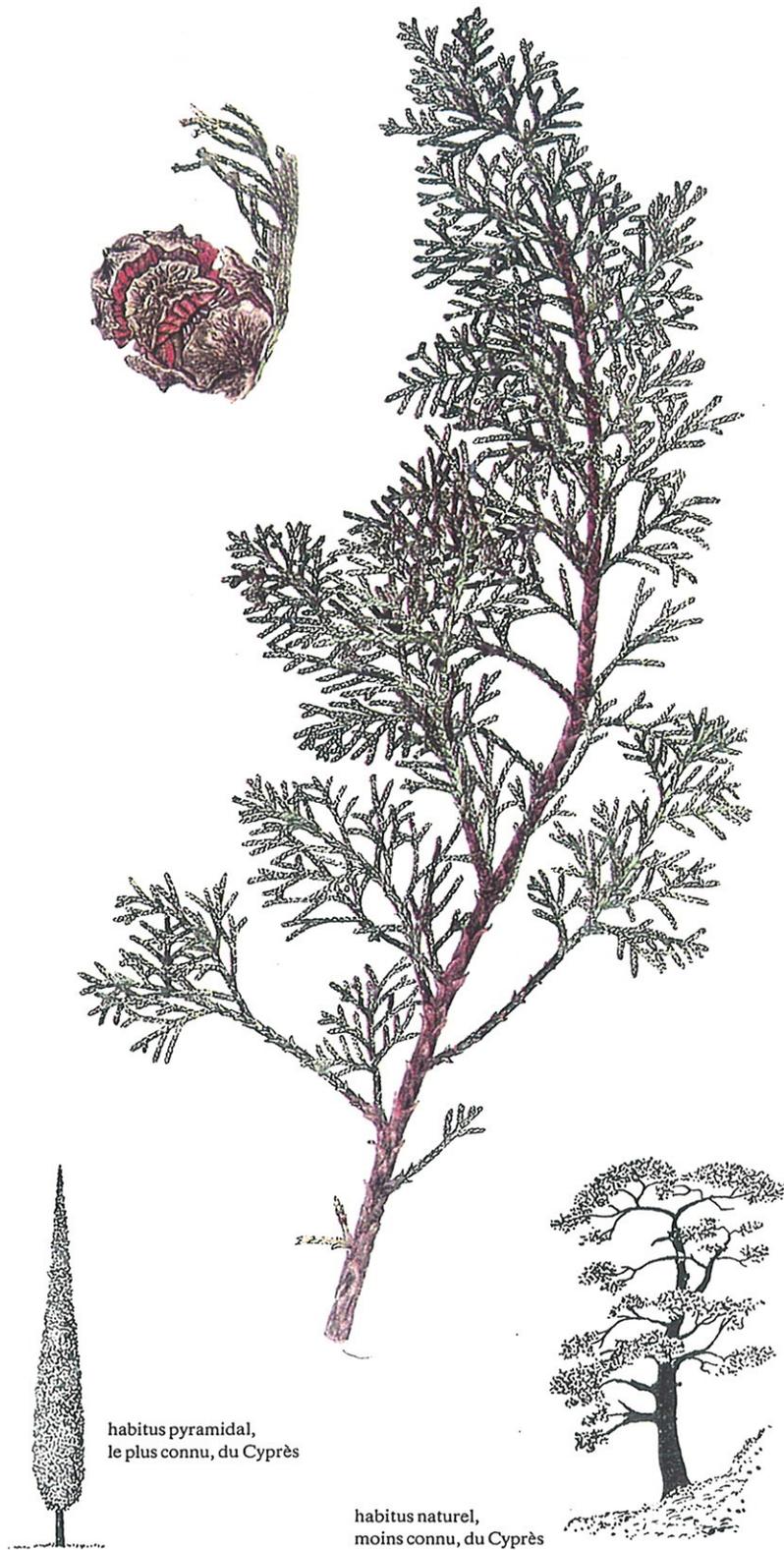


Figure 2: *Cupressus sempervirens* L. (92)

rameau - cône fructifère - port classique (pyramidal) - port inhabituel (horizontal)

4-3-Particularités (12, 22)

Le cyprès d'Italie se prête au reboisement des sols arides jusqu'à une altitude d'environ 700 m.

Cet arbre est très utilisé dans un but ornemental, en raison de son port et de sa résistance à la pollution.

Le cyprès d'Italie est une des plantes médicinales les plus anciennes, il est en effet mentionné dans un texte assyrien datant de plus de 35 siècles.

Son bois est très utilisé dans la fabrication des meubles car il est très dur et il ne pourrit pas.

C'est un arbre d'une grande longévité qui peut vivre deux mille ans.

III- LA VIGNE ROUGEVIGNE ROUGE: *Vitis vinifera* L. VITACEES1-Classification systématique (12)

Embranchement: Spermaphytes ou Phanérogames
(plantes à fleurs et à graines)

Sous-embranchement: Angiospermes
(graine protégée)

Classe: Dicotylédones

Sous-classe: Dialypétales

Série: Disciflores

Ordre: Célastrales

Famille: Vitacées

Genre: *Vitis*

Espèce: *Vitis vinifera* L.

2-Description de la famille Vitacées (104, 109)

Les plantes de cette famille sont des arbrisseaux grimpants, à feuilles non opposées et possédant de petites stipules écailleuses.

Les fleurs sont très petites, régulières, bisexuées ou unisexuées, la plante étant généralement monoïque. Elles se présentent sous forme de cymes ou de racèmes, les inflorescences étant opposées aux feuilles.

La fleur possède 4 ou 5 sépales soudés presque entièrement entre eux ou formant 4 ou 5 petites dents et 4 ou 5 pétales accolés qui ne se recouvrent pas les uns les autres dans le bouton.

Les étamines sont aussi nombreuses que les pétales et sont opposées à ceux-ci, elles sont insérées sur un disque annulaire ou lobé, les anthères étant libres ou soudées.

L'ovaire est supère et généralement formé de 2 carpelles soudés avec 2 à 6 loges, renfermant chacune 2 ovules érigés. Le style est court, terminé par un stigmate discoïde.

Le fruit charnu et juteux est une baie, renfermant 2 à 6 graines dures, les pépins.

Les graines renferment un embryon droit entouré d'un abondant albumen corné et oléagineux.

3-Description du genre *Vitis* (104, 109)

Il s'agit d'arbrisseaux grimpants grâce à la présence de vrilles.

Les fleurs sont verdâtres ou jaunâtres de par la couleur des étamines.

Les inflorescences ou les rameaux transformés en vrilles sont opposés aux feuilles.

Les 5 pétales de la fleur restent soudés entre eux par leur sommet lorsque la fleur s'ouvre.

Le calice, court, porte 5 dents peu marquées qui correspondent aux 5 sépales.

Les 5 étamines sont opposées aux pétales et semblent sortir d'un anneau nectarifère dont les 5 lobes sont plus ou moins bien indiqués.

L'ovaire est formé de 1 ou 2 loges renfermant chacune 1 ou 2 graines.

Le fruit mûr charnu ne renferme qu'une ou deux graines et ne présente plus de trace des loges.

4-Description de l'espèce *Vitis vinifera* L. (92, 104, 109)

La vigne (figure 3) est une plante grimpante, elle se fixe grâce à des vrilles sur d'autres arbrisseaux, sur les branches des arbres ou sur des supports autres.

Les feuilles sont longuement pétiolées et leur limbe, à découpures variables, le plus souvent à 5 lobes principaux, a des nervures disposées en éventail.

Les fleurs apparaissent en juin, elles sont verdâtres, petites, odorantes et disposées en une sorte de grappe formée de ramifications assez complexes.

Les fruits arrivent à maturité à la fin de l'été ou en automne, ils sont alors charnus et recouverts d'une fine poussière. Leur couleur est variable.

Le développement de la tige est complexe, elle est constituée de portions successives de rameaux placées bout à bout. Chaque entre-noeud produit une feuille et le bourgeon terminal forme soit une grappe de fleurs, soit une vrille et devient latéral.

C'est le rameau né à l'aisselle de la feuille qui prédomine et qui semble continuer l'entre-noeud précédent.

L'écorce est grise et se détache irrégulièrement par de larges filaments plus ou moins déchiquetés.

5-Les espèces vinifiées

Toutes les espèces de vigne ne sont pas utilisées pour la vinification.

En fait, parmi la quarantaine d'espèces du genre *Vitis*, divisé en deux sous-genres, *Euvitis* et *Muscadinia*, seul un nombre infime porte des grappes suffisantes pour être vinifiées.

Le tableau présenté ci-après, donne la classification des espèces les plus connues du genre *Vitis* (81).

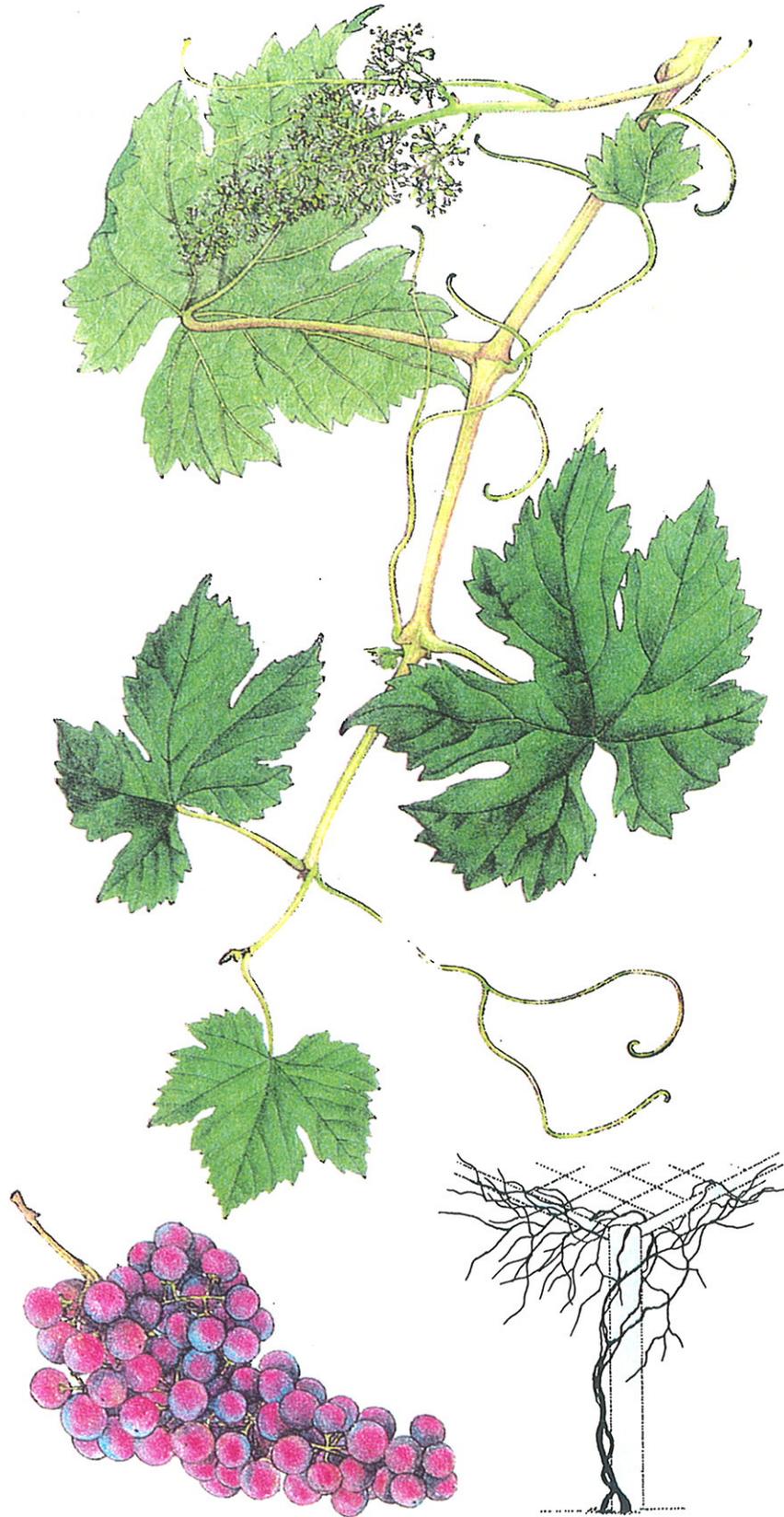


Figure 3: *Vitis vinifera* L. (92)

rameau - fruit - port

SOUS-GENRE: *EUVITIS***Espèces américaines:**Régions tempérées: zone atlantique*Vitis aestivalis* *Vitis labrusca**Vitis bicolor* *Vitis linecunici*Régions tempérées: zone centrale*Vitis berlandieri* *Vitis monticola**Vitis candicans* *Vitis riparia**Vitis cinerea* *Vitis rubra**Vitis cordifolia* *Vitis rupestris*Régions tempérées: zone pacifique*Vitis arizonica* *Vitis californica*Régions torrides: Floride et Bahamas*Vitis coriacea* *Vitis gigas*Régions torrides: zones tropicales et équatoriales*Vitis bourgoeana* *Vitis cariboea***Espèces extrême orientales (partiellement):**Régions tempérées:*Vitis amurensis* (Japon)*Vitis armata* (Chine)*Vitis coignetiae* (Corée, Japon)*Vitis davidii* (Chine)*Vitis flexuosa* (Corée, Inde, Japon, Vietnam)*Vitis pagnucii* (Chine)*Vitis pentagona* (Chine)*Vitis piasezkii* (Chine)*Vitis romaneti* (Chine)*Vitis romanetia* (Chine)

Vitis rutilans (Chine)

Vitis thunbergii (Chine, Corée, Japon, Taïwan)

Vitis wilsonae (Chine)

Régions sub-tropicales:

Vitis balansaeana (Vietnam)

Vitis lanata (Chine, Inde)

Vitis pedicellata (Himalaya)

Vitis rotordi (Vietnam)

Espèces européennes et de l'Asie centrale et orientale

Vitis vinifera

SOUS-GENRE: MUSCADINIA

Espèces nord-américaines:

Vitis munsoniana

Vitis popenoei

Vitis rotundifolia

Plus de 99,99% du vin produit dans le monde est tiré du raisin d'une espèce unique, *Vitis vinifera*, la seule originaire d'Europe et d'Asie centrale.

Quelques autres espèces sont utilisées comme porte-greffes, pour créer des hybrides ou comme producteurs directs. Ce sont les suivantes.

Vitis aestivalis:

Sa résistance au phylloxéra est insuffisante pour faire un porte-greffes mais ce cépage est utilisé pour hybrider *V. labrusca* et *V. rupestris*.

Vitis amurensis:

Cette espèce tient son nom du fleuve Amour qui sert de frontière sino-soviétique.

Ce cépage résiste très bien au froid et a servi à créer des hybrides de *V. amurensis* et de *V. vinifera*.

Vitis berlandieri:

Cette vigne américaine résiste au phylloxéra et à la chlorose, son enracinement laborieux empêche de l'utiliser seule comme porte-greffes mais elle sert à en hybrider.

Vitis cinerea:

Il participait à la formation d'hybrides avec *V. aestivalis* et *V. vinifera*, mais les hybrides obtenus, "black spanish" et "herbemont", ont été éliminés des vignobles français.

Vitis labrusca:

Il s'agit de la première vigne américaine identifiée en 1763 et qui fut responsable de l'introduction du phylloxéra en Europe au XIX^e siècle.

Sa résistance au puceron n'est pas suffisante pour s'en servir comme porte-greffes en Europe.

Ce cépage est connu en Amérique pour le vin qu'il donne, le concord.

L'hybride naturel de *V. labrusca* et *V. vinifera*, appelé "isabella", est cultivé notamment à Madère.

V. labrusca sert aussi à créer des hybrides comme "baco blanc", "catawba" et "delaware".

Vitis riparia:

Autre cépage américain, il résiste au phylloxéra et sert à hybrider des porte-greffes comme le "baco noir".

Vitis rotundifolia:

Il s'agit d'une espèce du sous-genre *Muscadinia* dont les quelques vignes sont toutes originaires du golfe du Mexique.

Cette espèce est une des rares de ce sous-genre à être cultivée et commercialisée.

Vitis rupestris:

Une des rares espèces ayant donné son nom à un cépage, le rupestris du Lot, qui se place au quatrième rang des porte-greffes utilisés en France.

La création des hybrides et l'utilisation de porte-greffes découlent des ravages créés par le phylloxéra au siècle dernier.

Ce minuscule puceron, *Phylloxera vastatrix*, vit en se nourrissant du suc cellulaire, notamment celui des racines. Il détruit ainsi la presque totalité des vignobles européens et tous les vignobles qui avaient comme espèce *Vitis vinifera*.

Deux parades sont connues pour lutter contre l'attaque des racines.

La première est l'utilisation de porte-greffes résistant au phylloxéra, ce qui revient à utiliser des espèces d'origine américaine qui sont par nature résistantes au phylloxéra contrairement à

V. vinifera.

La création d'hybrides par croisement de plusieurs espèces est une autre méthode pour lutter contre les maladies.

IV- LES DIFFERENTS PRODUITS DERIVES DU RAISIN

1-Le vin

Dans la production de vin rouge, les raisins écrasés sont d'abord soumis à une pré-fermentation ou à une macération carbonique puis ils subissent une fermentation alcoolique.

La qualité du vin rouge dépend alors de la diminution d'acidité obtenue au cours de la fermentation malolactique, après la fermentation alcoolique.

Le vin blanc est obtenu par la fermentation du jus de raisin seul, les principes de base sont d'éviter un contact direct entre les peaux et les raisins et de réduire la fermentation malolactique.

La concentration alcoolique du vin (8 à 24%) dépend de la concentration en sucre des raisins utilisés, de la quantité de sucre ajoutée durant ou après la fermentation et des pertes occasionnées pendant la fermentation ou pendant les procédés de maturation (9).

Seuls les cépages cités dans les différentes études évoquées dans ce mémoire sont présentés ici.

Les cépages utilisés pour la vinification des vins rouges sont des cépages teinturiers.

Il s'agit d'un groupe de cépages à pulpe rouge qui sert à renforcer la couleur des assemblages lors de la vinification, ils sont donc par principe exclus de la vinification en blanc.

A l'origine, le premier cépage teinturier appelé Teinturier ou Teinturier du Cher, était utilisé aux XVII^e et XVIII^e siècles pour donner aux vins rosés et pâles une intensité appréciable.

En 1828, Louis Bouschet croisa les cépages Aramon et Teinturier du Cher pour obtenir un cépage teinturier, le petit Bouschet.

Puis, d'autres croisements furent réalisés comme entre petit Bouschet et Grenache conduisant au teinturier très coloré et très célèbre, Alicante-Bouschet (82).

1-1-Les cépages rouges (81, 82)

Alicante-Bouschet:

Ce teinturier est présent en France mais aussi en Italie, dans les pays du Maghreb, en Afrique du Sud et en Californie.

Barbera:

C'est l'un des cépages rouges les plus cultivés dans le monde.

Il est surtout présent en Italie et en Californie.

Cabernet sauvignon:

Il s'agit du cépage rouge du Bordelais par excellence, il s'est imposé dans les régions du Médoc et des Graves.

Ce cépage s'est également très bien adapté dans d'autres régions froides du monde comme la Nouvelle-Zélande ou chaudes comme le Liban.

Les baies du Cabernet sauvignon sont petites, bleu-noir, poussiéreuses et elles présentent un rapport pépins-pulpe élevé.

La forte concentration des pépins et des rafles, partie ligneuse qui supporte les baies, dans ce cépage explique sa teneur remarquable en polyphénols et notamment en tanins.

Les pellicules sont épaisses et bleues, elles permettent au Cabernet sauvignon de lutter contre la pourriture.

Cependant, ce cépage est sensible à l'oïdium et aux maladies du bois.

Carignan:

Ce cépage rouge, est essentiellement cultivé dans le sud de la France et en Californie.

Il est de qualité moyenne mais est très largement utilisé dans les assemblages de par son rendement de production qui est très élevé.

Cinsault:

Ce cépage rouge est cultivé depuis des siècles dans le Languedoc.

Il est présent dans le sud de la France, en Afrique, en Australie et au Liban.

Il s'agit d'un cépage de qualité moyenne qui est surtout utilisé en association avec d'autres cépages.

Gamay:

Ce cépage rouge réputé est associé à une seule région française, le Beaujolais.

En Europe, le Gamay est cultivé en Suisse et dans le Val d'Aoste.

Ce cépage est également trouvé en Californie.

Le vrai Gamay est officiellement appelé Gamay noir à jus blanc pour attirer l'attention sur la pulpe blanche de ses baies.

Grenache:

Ce cépage est cultivé dans le monde entier mais il est originaire d'Espagne.

Il s'agit du deuxième cépage le plus planté dans le monde.

Les baies de Grenache sont fines et peu colorées ce qui les rend idéales pour la vinification en rosé.

Merlot noir:

Ce cépage rouge du Bordelais est associé aux grands vins de Saint-Emilion et de Pomerol.

Ce cépage est souvent comparé au Cabernet, ses baies noir-bleuté sont moins poussiéreuses, à peau moins épaisse et sont moins tanniques que celles du Cabernet.

La finesse de la peau des baies les rend sensibles à la pourriture, ce cépage est également sensible au mildiou.

Hors de France, l'influence du Merlot est à la fois universelle et faible.

Nebbiolo:

Ce cépage très réputé est peu cultivé hors de sa région d'origine, le Piedmont, au nord ouest de l'Italie.

Pinot noir:

Ce cépage rouge est originaire de Bourgogne.

Ses teneurs en tanins et en pigments sont plus faibles que celles des autres grands cépages rouges.

Le Pinot noir est sensible à l'oïdium de par la finesse des pellicules.

Ce cépage est présent dans d'autres régions du monde telles que l'Europe, l'Europe de l'Est et l'Amérique du Nord.

Syrah:

Ce cépage rouge est une vigne relativement productrice et résistante aux maladies.

Il est présent en Australie et commence à s'implanter en Californie.

Une confusion est souvent réalisée entre les cépages Syrah et Petite Sirah.

Petite Sirah est le nom donné en Amérique du Nord et du Sud à un cépage rouge moins noble que la vraie Syrah et qui est apparemment d'origine différente. Le rôle de la Petite Sirah est assez développé dans les régions viticoles californiennes.

Tempranillo:

Ce cépage rouge espagnol est présent dans le sud de la France, au Portugal et en Argentine.

1-2-Les cépages blancs (81, 82)

Chardonnay:

Ce cépage blanc originaire de la Bourgogne s'accommode de tous les climats et est présent dans le monde entier.

La pellicule fine des baies favorise le développement de la pourriture.

Muscat d'Alexandrie:

Il s'agit d'un des cépages les plus anciens mais ses qualités sont médiocres ce qui explique que ses baies soient principalement utilisées comme raisins secs ou raisins de table.

Ce cépage est largement cultivé dans le Midi de la France, en Europe occidentale et en Californie.

Riesling:

C'est l'un des cépages blancs les plus prestigieux, il est originaire d'Allemagne mais il est également cultivé en France près de la frontière franco-allemande, en Europe de l'Est et en Californie. Il est de qualité moindre.

Ce cépage est caractérisé par des petites baies réunies en grappes compactes.

2-Le jus de raisin

La composition chimique du jus de raisin est similaire à celle des raisins utilisés, sauf en ce qui concerne la concentration en fibres et en matières grasses qui sont principalement présentes dans la peau et les pépins (9).

3-Les raisins

Les raisins déshydratés sont obtenus à partir de variétés telles que le Muscat d'Alexandrie et le Corinthe noir. Une analyse d'échantillons de ces raisins déshydratés a permis d'identifier les protéines, les sucres, les acides organiques, les tanins, le calcium, le phosphore et le fer (9).

4-Les produits issus des résidus

Un alcool dénommé "grappa" en Italie est obtenu par distillation de la pulpe (peaux et pépins).

Les pépins, séparés des peaux par séchage de la pulpe, contiennent une huile utilisée dans les savons et dans les industries de la peinture.

Les anthocyanes sont extraits de la peau des raisins et sont utilisés comme colorant de boissons (9).

CHAPITRE II

COMPOSITION CHIMIQUE

L'intitulé du chapitre "composition chimique" est valable seulement pour la vigne. Par contre, pour le pin maritime et le cyprès, nous avons volontairement tout associé, la description de la drogue, la composition chimique ainsi que les propriétés. Ceci vient du fait que, pour ces plantes, les études réalisées dans ces domaines sont quasi-inexistantes.

I- LE PIN MARITIME

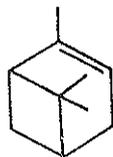
1-La drogue

La drogue est constituée de l'écorce du pin à partir de laquelle on obtient, par gemmage, la gemme ou oléo-résine. Il s'agit de la térébenthine, sécrétion résineuse du pin, et de ses produits de distillation, l'essence de térébenthine et la colophane. L'essence de térébenthine est une huile essentielle incolore, mobile, à forte odeur caractéristique et la colophane est un résidu formant une masse résineuse brun clair, friable (75).

2-Composition chimique

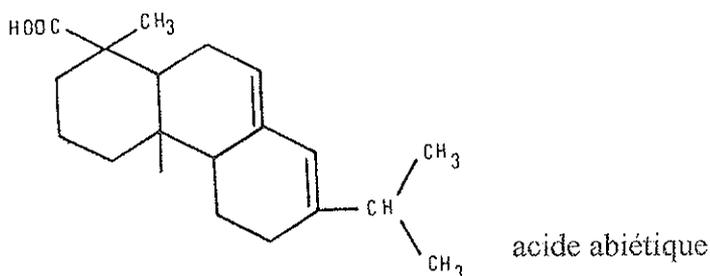
L'oléo-résine comporte une phase aqueuse et une phase hydrophobe constituée de 20% d'essence et de près de 80% de résine.

L'essence de térébenthine contient surtout les α et β pinènes, avec une prédominance de l' α pinène:



α -pinène

La colophane, produit de distillation de la térébenthine, renferme des acides résiniques comme l'acide dextropimarique stable et un isomère de l'acide lévopimarique instable, l'acide abiétique:



La colophane résulte de la transformation de ces acides résiniques. En effet, les acides pimariques restent stables vis à vis de l'oxygène de l'air mais l'acide abiétique s'oxyde.

L'écorce de pin sert aussi à l'obtention de proanthocyanidols. Elle renferme du leucocyanidol ou tétrahydroxy-5,7-3',4'-flavane-3,4-diol.

L'écorce de pin, comme celle de nombreux conifères, peut contenir jusqu'à 5% de procyanidines dimères B1 et B4, dont les formules sont présentées page 50 (15, 22).

3-Propriétés

L'essence de térébenthine possède, en usage externe, des propriétés révulsives.

En usage interne, elle modifie les sécrétions bronchiques, elle stimule les sécrétions urinaire et biliaire, elle est antiseptique et anthelminthique.

En thérapeutique, la térébenthine est utilisée dans les affections respiratoires et l'essence de térébenthine est employée comme rubéfiant en usage externe.

Les produits d'oxydation comme le camphre, obtenu par hémisynthèse à partir de l'essence de térébenthine, sont également utilisés comme antiseptiques respiratoires.

La colophane est utilisée à titre d'excipient.

L'écorce de pin, de par la présence de procyanidines, possède des propriétés "vitaminiques P" et antioxydantes, mises à profit en thérapeutique dans le traitement des affections circulatoires (15, 75).

II- LE CYPRES

1-La drogue

La drogue est constituée des cônes femelles récoltés avant maturité appelés galbules ou noix de cyprès et parfois des rameaux.

Les cônes constituent une source d'oligomères flavanoliques (75).

2-Composition chimique

Les cônes renferment plusieurs principes actifs tels qu'une huile essentielle, des dimères et des oligomères proanthocyanidoliques, des acides diterpéniques.

L'huile essentielle (0,2 à 1%) contient des hydrocarbures terpéniques (β -pinène, camphène, Δ -3 carène) et des alcools terpéniques (cédrol appelé camphre de cyprès, bornéol...) (21).

Les feuilles renferment des bis-flavonoïdes (amentoflavone, cupressuflavone) et une huile essentielle (0,2%). Les rameaux sont caractérisés par la présence de biflavones et d'une huile essentielle (0,3 à 0,8%) à carbures mono-, sesqui-, et diterpéniques (15).

3-Propriétés

L'essence des feuilles et des rameaux a été préconisée comme antispasmodique dans la toux quinteuse de la coqueluche et comme antiseptique.

L'utilisation des cônes, la plus fréquente en thérapeutique, correspond au traitement des troubles circulatoires veineux (15, 75).

III- LA VIGNE

La drogue est représentée par les feuilles rouges, la couleur est liée à une concentration importante en anthocyanes.

Les pépins de raisins sont utilisés comme source d'huile ainsi que pour leurs proanthocyanidols.

Vitis vinifera L. contient de nombreux composés chimiques issus de différentes classes chimiques.

1- Les glucides

La variété des raisins et les facteurs environnementaux influencent la concentration en sucre des baies mûres (9,7 à 18,9 % du poids frais).

Les baies des variétés sélectionnées pour la production de raisins et de vins contiennent de hauts pourcentages de sucres, glucose et fructose en sont les principaux.

Le glucose prédomine dans les raisins qui ne sont pas mûrs, par contre il existe généralement un petit excès de fructose dans les raisins mûrs.

La pulpe des raisins contient un hémicellulose qui peut être séparé en deux fractions, une soluble et une difficilement soluble. Après hydrolyse, la concentration en monosaccharides des deux fractions apparaît qualitativement similaire avec xylose et glucose comme principaux sucres (9).

2- Les lipides

Une huile est obtenue à partir des pépins dans une proportion variant de 6 à 20%, en fonction des matières premières et du procédé d'extraction employé. Les acides gras présents sont les acides palmitique, stéarique, oléique (37%) et linoléique (55%).

L'huile contient également du sitostérol et des tocophérols (9).

3- Les vitamines

Les baies de raisins sont considérées comme étant une source pauvre en vitamines.

Cependant, le raisin est connu comme renfermant de la vitamine C (1 mg/100 g de portion comestible), des carotènes et des vitamines B telles que la thiamine (vitamine B₁), la riboflavine (vitamine B₂), la niacine (vitamine B₃), l'acide pantothénique (vitamine B₅), la pyridoxine (vitamine B₆), la biotine (vitamine B₈) et l'acide folique (vitamine B₉).

Les feuilles sont plus riches en vitamine C que les baies, elles sont également plus riches en caroténoïdes, surtout lorsqu'elles sont en plein épanouissement.

Les taux de vitamines B sont variables en fonction de la variété de raisin et des facteurs environnementaux. En général, les taux des vitamines augmentent pendant la maturation, sauf pour la biotine (9).

4- Les acides organiques

Les baies de la vigne contiennent beaucoup d'acide malique et d'acide tartrique, ils représentent à eux seuls environ 90% de la concentration totale en acides. L'acide citrique est présent en faible concentration.

Le tartrate acide de potassium est principalement présent au niveau de la peau et apparaît sous forme de dépôt cristallin dans les raisins mûrs.

Les fruits immatures contiennent de l'acide oxalique.

Les feuilles renferment les acides tartrique, malique, oxalique, fumarique, succinique, citrique et glycérique (9).

5- Les enzymes

L'augmentation typique de la concentration en sucre, apparaissant pendant le développement des baies, est précédée par une augmentation d'activité des enzymes intervenant dans le métabolisme des oses.

D'autres enzymes interviennent chez *Vitis vinifera* L. en proportions variables comme la catalase ou la peroxydase (9).

6-Les dérivés azotés

La teneur et la composition en produits azotés (azote total et acides aminés) apparaissent totalement différentes en fonction de la variété des raisins, de la nature du sol et des techniques de culture utilisées.

La concentration totale des baies en azote augmente, principalement sous forme d'ions ammoniums, durant la maturation. Ces ions ammoniums sont utilisés pour la synthèse d'acides aminés, de peptides et de protéines. Durant les 6 à 8 dernières semaines de développement, ils représentent plus de la moitié de l'azote total dans les baies immatures et seulement 1/4 dans les baies mûres. Les acides aminés libres augmentent de 2 à 5 fois durant les différents stades de la croissance.

Le jus qui représente 75% du poids des baies, contient seulement 1/5 de l'azote total alors que les 4/5 restants sont dans la peau et les pépins. Dans la plupart des variétés de raisin, l'arginine et la proline sont les principaux acides aminés présents.

La concentration des protéines dans les baies atteint ses valeurs maximales (109 à 188 mg/l) durant le développement, mais, à pleine maturité, cette concentration diminue et ceci jusqu'aux vendanges.

Les protéines des baies, séparées par électrophorèse puis hydrolysées, renferment la glycine, l'alanine, la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine, la tyrosine, la thréonine...

Les pépins contiennent 7 à 10% de protéines. La leucine est l'acide aminé le plus abondant (11,4%) (9).

7- Les terpènes et les constituants volatils

Dans les différentes parties de la plante, plusieurs triterpènes ont été isolés comme l'acide 16 β -hydroxyoléanolique et ses dérivés, les α - et β -amyrines, le taraxérol, le taraxastérol, l'acide oléanolique.

Les composés responsables de l'arôme des raisins sont principalement trouvés dans la peau des baies. Terrier et al. ont décrit ceux responsables de l'arôme de la variété Muscat, parmi lesquels on retrouve le linalol, l' α -terpinéol et le géraniol.

Des composés volatils sont également trouvés dans les feuilles de plusieurs variétés de vigne (9).

8- La cire

La quantité de cire présente dans les couches cireuses qui recouvrent les baies varie dans les différentes variétés. Le principal constituant de cette cire est l'acide oléanolique (50 à 70%), elle renferme aussi des acides aliphatiques, des alcools, des aldéhydes et des esters (9).

9- Les substances pectiques

Le jus de raisin contient une pectine soluble alors que les cellules des parois contiennent une pectine insoluble. Les substances pectiques des cellules des parois sont responsables du ramollissement de la baie durant la maturation.

Les substances pectiques totales du jus de raisin, comprenant les acides pectiques libres, les acides pectiques estérifiés ainsi que les gommes varient de 0,25 à 4,43 g/l.

La pulpe de la baie peut contenir jusqu'à 2% de pectine, les feuilles de vigne en contiennent également une part non négligeable (6,9% de la matière sèche est sous forme de pectate de calcium) (9).

10-Les composés phénoliques

La vigne rouge contient de nombreux composés phénoliques: phénols, acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanes..., la concentration de ces composés varie en fonction des parties considérées, des cépages étudiés et de nombreux facteurs environnementaux.

De nombreuses études se sont attachées à définir ces variations (19, 40, 48, 86, 99, 117).

10-1-Phénols et acides phénoliques

Concernant les phénols et les acides phénoliques, les différentes parties du raisin ainsi que les variétés ont été étudiées. Les résultats varient d'une partie à l'autre mais aussi d'une variété à l'autre.

Les baies des raisins contiennent des acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique comme l'acide *p*-coumarique, l'acide férulique, l'acide caféique et des acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque tel que l'acide *p*-hydroxybenzoïque, l'acide *o*-hydroxybenzoïque, l'acide protocatéchique, l'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide syringique et l'acide ellagique.

Des aldéhydes sont également présents comme la vanilline, l'aldéhyde protocatéchique et le cinnamaldéhyde (9).

Les feuilles et les baies renferment des esters des acides phénoliques dérivés de l'acide cinnamique avec l'acide tartrique:

l'acide caftarique (acide monocaféyl-L-(+)-tartrique)

l'acide coutarique (acide *p*-coumaryl-L-(+)-tartrique)

et l'acide fertarique (acide férulyl-L-(+)-tartrique) (9).

Les pépins renferment une quantité négligeable voire indétectable d'acides phénoliques et d'aldéhydes dérivés des acides benzoïque et cinnamique comme le montre l'étude de la variété Cencibel (33). Mais ce n'est pas le cas de l'acide gallique qui est présent en quantité assez importante.

Les acides phénoliques sont principalement présents dans la peau des baies et sont retrouvés en quantité moindre dans les moûts.

Les deux acides phénoliques majoritaires de la peau sont l'acide syringique (dérivé de l'acide benzoïque) et l'acide caféique (dérivé de l'acide cinnamique) (19, 33).

Les acides hydroxycinnamyl-tartriques sont absents de la peau des baies, probablement parce qu'ils subissent une baisse de concentration au cours de la véraison. Par contre, l'étude de la variété Cencibel montre que la caractéristique essentielle du moût est la présence de ces acides (19, 33).

L'étude des cépages piedmontais a permis de différencier les concentrations phénoliques de plusieurs variétés.

Les résultats de cette étude montrent que les phénols sont concentrés dans les baies pour les variétés blanches et dans les peaux pour les variétés rouges.

La variété Nebbiolo, utilisée pour les vins vieux, a un taux phénolique plus faible que les variétés Dolcetto et Freisa utilisées pour les vins jeunes (19).

10-2-Phytoalexines

La vigne renferme d'autres composés phénoliques appartenant au groupe du stilbène, les phytoalexines qui sont douées de propriétés antimicrobiennes.

Leur production correspond à un mécanisme de résistance envers une attaque.

Parmi ces substances, le resvératrol et les viniférines (oligomères du resvératrol) sont synthétisés dans les feuilles de la vigne durant les infections par *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola*, *Uncinola necator* ou par irradiation UV.

Le resvératrol est également présent dans la peau des baies. Les feuilles saines n'en contiennent pas (9).

10-3-Anthocyanes

L'étude de la variété Cencibel montre que les anthocyanes sont présents dans la peau des baies en quantité équivalente aux acides phénoliques (33).

L'étude de 4 cépages marocains: Alicante-Bouschet, Cinsault, Carignan et Grenache noir met en évidence une prédominance des dérivés de la malvidine avec notamment une forte concentration en dérivés coumariques. La teneur de ces dérivés dépasse celle du dérivé non acylé pour les cépages Carignan et Alicante-Bouschet. Ces cépages sont également caractérisés par l'absence de composés diglycosylés (48).

10-4-Flavonoïdes

Deux études ont défini la composition flavonoïdique de la feuille de vigne (9, 48).

Ces deux études montrent qu'elle renferme 3 flavonols: kaempférol, quercétine, myricétine.

L'analyse des feuilles de vigne marocaines a signalé la présence des dérivés mono et diglycosylés de flavones et de flavonols.

La fraction glycosylée est prédominée par des dérivés de la quercétine avec comme composés majoritaires, la quercétine-3-glucoside et la quercétine-3-glucuronoside.

Cette prédominance existe dans la majorité des cépages de *Vitis vinifera* L., quelque soit leur provenance (48).

Concernant la vigne, les pigments tels que flavonoïdes et anthocyanes ainsi que les tanins, sont les principales substances phénoliques trouvées dans les baies. Leur rôle est essentiel dans la couleur, le goût et le corps des vins.

Les composés responsables de la couleur des raisins sont principalement localisés dans les cellules de la peau.

Les raisins immatures sont verts de par la présence de chlorophylle, puis au cours de la maturation la concentration en chlorophylle va diminuer et les raisins vont prendre leur couleur définitive. La couleur blanche est due aux flavonoïdes tels que la quercétine et son glucoside la quercitrine et les couleurs rouge ou noire sont dues aux anthocyanes tels que les 3-monoglucosides acylés ou non de la delphinidine, la pétunidine, la malvidine, la cyanidine et la péonidine.

Concernant les flavonoïdes, les variétés rouges renferment des 3-monoglucosides de quercétine, de kaempférol et de myricétine. Les variétés blanches diffèrent des noires par une absence de dérivés de myricétine (9).

10-5-Tanins

Les oligomères flavanoliques font partie des tanins catéchiques et c'est pour cette raison que notre intérêt se porte plus particulièrement sur ce groupe de tanins.

Dans un premier temps, seront évoquées les différentes méthodes de mise en évidence et de caractérisation de ces substances.

Dans un second temps, par l'intermédiaire de plusieurs études, sera étudiée la composition flavanolique des différentes parties et des différentes variétés de la vigne, ainsi que l'influence du degré de maturation et des conditions climatiques sur la composition phénolique générale de la vigne.

Les oligomères flavanoliques, comme les tanins, sont des substances polyphénoliques extraites des végétaux et caractérisées par leur propriété astringente.

Les tanins sont des "composés phénoliques hydrosolubles ayant un poids moléculaire compris entre 500 et 3000 présentant, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et les autres protéines" (21).

Les tanins se subdivisent en deux groupes:

-les tanins hydrolysables: Ce sont des esters du glucose (ou d'autres oses) et d'acides phénols, l'acide gallique ou l'acide ellagique. Leur hydrolyse peut se faire en milieu acide, basique ou par voie enzymatique.

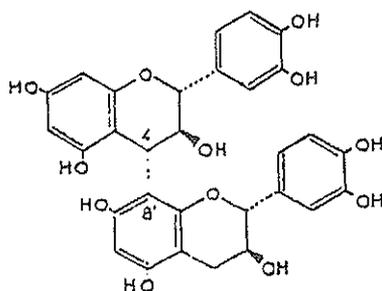
Suivant la nature de cette partie acide, les tanins hydrolysables sont classés en deux catégories, les tanins galliques vrais qui, par hydrolyse, libèrent de l'acide gallique et les tanins ellagiques qui libèrent par hydrolyse de l'acide gallique, de l'acide ellagique et des oses.

-les tanins condensés ou tanins catéchiques: Ce sont des polymères de flavan-3-ols et de flaven-3-4-diols.

Les monomères flavan-3-ols et flaven-3-4-diols ont une masse moléculaire inférieure à 500, ils ne constituent pas des tanins *stricto sensu* car leur faible poids moléculaire ne leur permet pas d'avoir des propriétés tannantes.

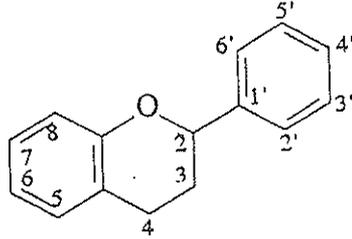
Ces monomères n'existent jamais sous forme hétérosidique et sont uniquement condensés sous forme d'oligomères ou de polymères.

Un exemple de dimère (procyanidol) est présenté avec la formule suivante:

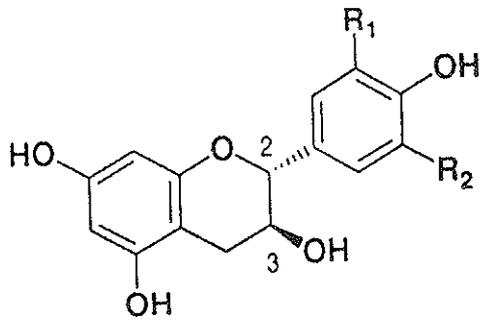


Exemple de dimère procyanidol (61)

D'après BRUNETON, les flavan-3-ols qui nous intéressent ici sont constitués d'un hétérocycle central phényl-2-chromane et d'un groupement hydroxyle OH en position 3 (15).



Le groupe des flavan-3-ols ou catéchines est formé de plusieurs molécules qui varient selon la nature des substituants:



$R_1=OH$ $R_2=H$ CATECHINE

$R_1=R_2=OH$ GALLOCATECHINE

Ces composés ont deux carbones asymétriques (C2 et C3) ce qui laisse prévoir l'existence de 4 isomères optiques dont les configurations ont été établies par Whalley (1962). Dans le cas de la catéchine, les 4 isomères sont:

(+)-catéchine (-)-catéchine
 (+)-épicatéchine (-)-épicatéchine

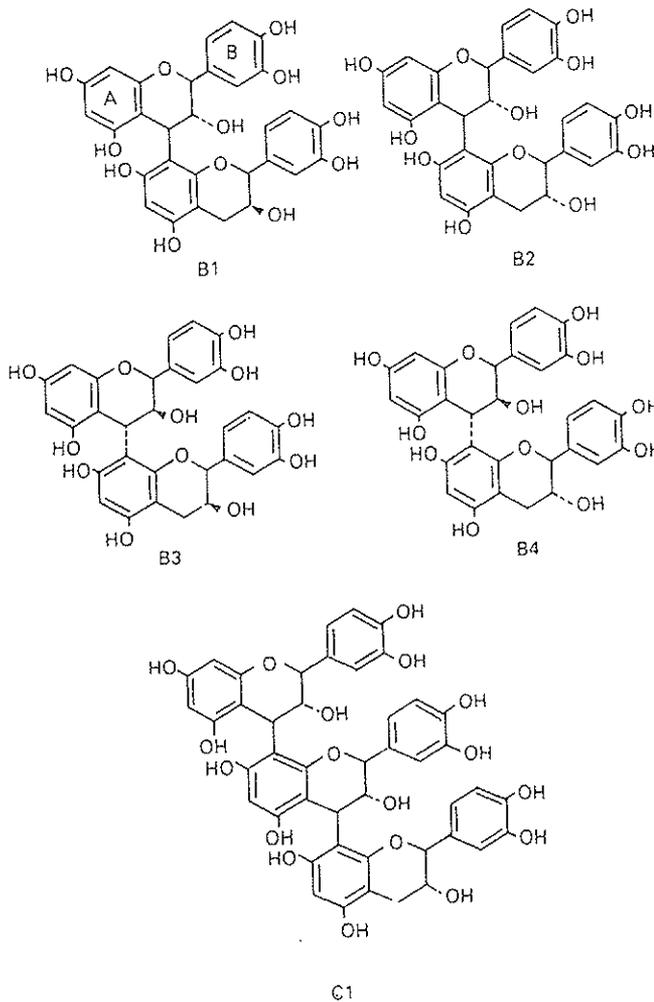
Du fait d'un empêchement partiel de rotation autour de la liaison interflavanique, l'oligomère possède une hélicité variable selon le précurseur:

- gauche: (-)-épicatéchine, dimères B1 et B2
- droite: (+)-catéchine, dimères B3 et B4

Ainsi, les monomères catéchine et épicatechine diffèrent par la stéréochimie des carbones 2 et 3. Les flavanols catéchine et épicatechine sont la base des oligomères, les procyanidines.

En fonction de la stéréochimie des carbones en position 3 et 4, les procyanidines peuvent exister selon différents stéréoisomères.

Les structures des 4 procyanidines dimères et de la procyanidine trimère communément rencontrées dans le vin sont présentées ci-dessous (58).



10-5-1-Mise en évidence et quantification des tanins catéchiques.

La caractérisation des tanins catéchiques est basée sur des méthodes classiques comme:

- la chromatographie couches minces (CCM) sur cellulose ou sur gel de silice avec visualisation des composés par fluorescence sous lumière UV ou par réaction colorimétrique avec divers réactifs. Ainsi, les tanins catéchiques forment des précipités brun verdâtre en présence de sels ferriques, ils deviennent rouges en présence de vanilline et d'acide chlorhydrique.

-la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse (15).

La quantification des tanins est délicate car la plupart des méthodes basées sur le caractère phénolique de ces composés ne sont pas spécifiques.

Les méthodes les plus classiques pour quantifier les procyanidines sont basées sur des réactions de coloration. Les produits dans du méthanol, sont mis en présence de vanilline ou de *p*-diméthylbenzaldéhyde et d'acide chlorhydrique.

Une autre technique de quantification est basée sur la mesure de la coloration obtenue (mesure de l'absorbance) après conversion des proanthocyanidines en anthocyanes par ébullition dans du *n*-butanol en présence d'acide chlorhydrique. La reproductibilité de cette réaction est améliorée par addition de sels ferriques au milieu réactionnel (15).

Les méthodes de quantification utilisées dans les différentes études concernant la vigne peuvent être une mesure colorimétrique après réaction avec un aldéhyde ou après relargage des anthocyanes dans une solution acide chaude. Cependant, en fonction du mélange flavanolique de départ, les résultats sont parfois incomplets de par la présence de réactions cinétiques liées aux structures des composés et aux solvants.

Ainsi, la méthode la plus sélective de quantification des flavanols correspond à une séparation par HPLC couplée à un système de détection post-colonne qui peut être une méthode colorimétrique (24, 25, 44, 98, 105), une méthode électrochimique (58) ou une spectrométrie de masse (95).

10-5-1-1-Méthode colorimétrique utilisant un
aldéhyde (99, 105)

L'aldéhyde utilisé est soit la vanilline, soit le diméthylaminocinnamaldéhyde (DMACA). Ce type de réaction n'est pas spécifique des flavanols, une large gamme de composés secondaires peuvent réagir pour former des produits colorés. Cependant, comme spécificité de la méthode, on peut dire que la plupart des produits de la réaction peuvent être identifiés par leur spectre d'absorption et les risques d'interférences avec la catéchine à 640 nm sont limités.

De plus, la sensibilité relative des différents substrats pour l'aldéhyde est très faible comparée à celle de la catéchine (figure 4). Il faudrait des concentrations cent ou mille fois supérieures pour atteindre l'absorbance obtenue avec le complexe DMACA-flavanol. Il existe une exception avec l'indole mais il est volatile et donc facilement éliminé par évaporation.

Les mêmes remarques concernant les sensibilités relatives des différents substrats peuvent être faites avec la vanilline.

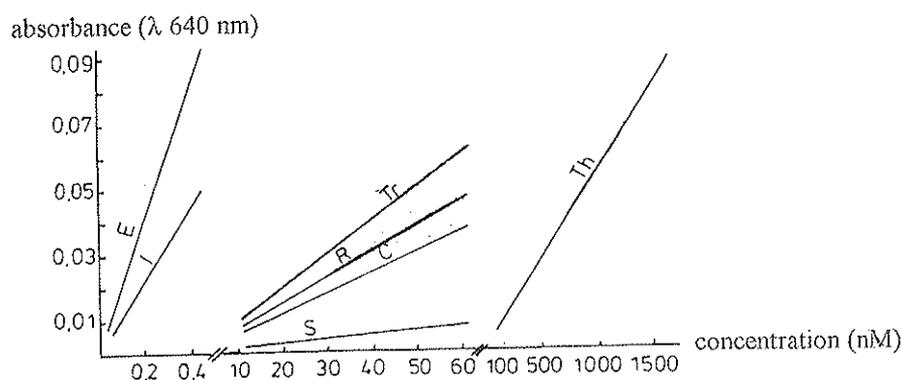


Figure 4: Sensibilité relative de divers substrats envers le DMACA (105).

E: épicatechine ; C: catéchol ; I: indole ; R: résorcine ; S: sérotonine ;

Tr: tryptamine ; Th: thymol

Ainsi, la vanilline et le DMACA sont les principaux réactifs utilisés, avec cependant, une nette préférence pour la vanilline malgré la sensibilité bien connue du DMACA.

La figure 5 permet de comparer les résultats obtenus avec les deux réactifs (A 510 nm: la vanilline, A 640: le DMACA) et présente les différences de réponse des flavanols monomères, dimères et trimères.

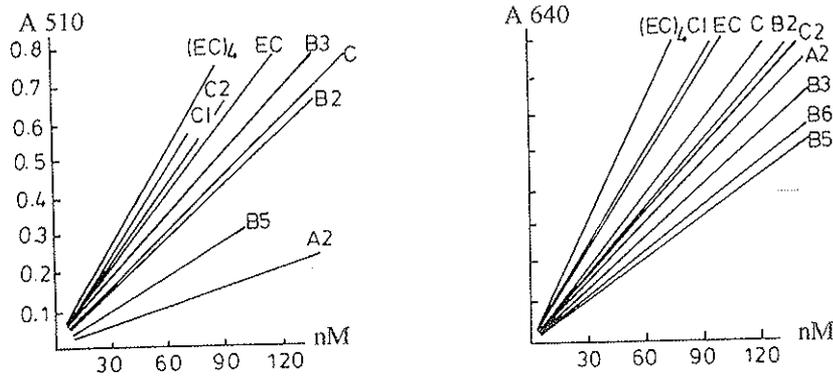


Figure 5: Comparaison des résultats obtenus avec la vanilline et avec le DMACA (105).

Les mesures sont réalisées respectivement à 510 nm après 5 minutes ou à 640 nm après 30 minutes.

EC, épicatechine; B2, épicatechine-(4 β ,8)-épicatechine; C1, épicatechine-(4 β ,8)-épicatechine-(4 β ,8)-épicatechine; EC₄, épicatechine-(4 β ,8)-épicatechine-(4 β ,8)-épicatechine-(4 β ,8)-épicatechine; A2, épicatechine-(4 β ,8,2 β ,7)-épicatechine; B5, épicatechine-(4 β ,6)-épicatechine;
C, catéchine; C2, catéchine-(4 β ,8)-catéchine-(4 β ,8)-catéchine;
B3, catéchine-(4 β ,8)-catéchine; B6, catéchine-(4 β ,6)-catéchine.

La réaction menée avec le DMACA présente des cinétiques dépendantes de la structure du flavanol concerné (figure 6) et de la concentration en acide chlorhydrique du mélange réactionnel (figure 7).

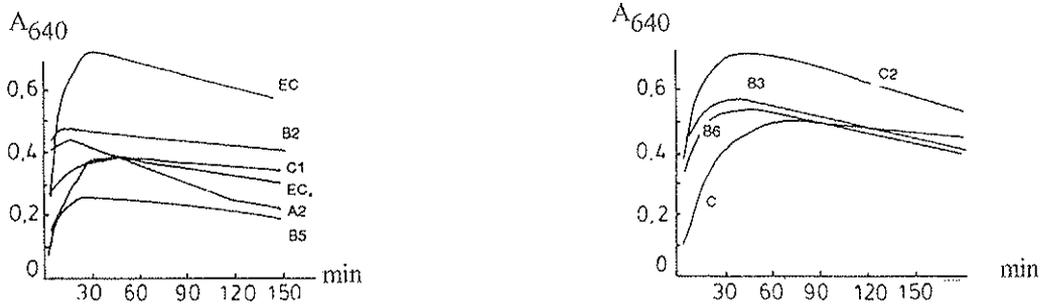


Figure 6: Cinétiques de divers flavanols obtenues avec le DMACA (105).
Conditions: Concentration finale en HCl 0,1M; DMACA 0,02%; EC 1,7 $\mu\text{g/ml}$;
 B2 2,8 $\mu\text{g/ml}$; C1 2,5 $\mu\text{g/ml}$; EC₄ 3,3 $\mu\text{g/ml}$; A2 2,5 $\mu\text{g/ml}$; B5 1,65 $\mu\text{g/ml}$;
 C 1,65 $\mu\text{g/ml}$; C2 7,8 $\mu\text{g/ml}$; B3 5,7 $\mu\text{g/ml}$; B6 5,3 $\mu\text{g/ml}$.

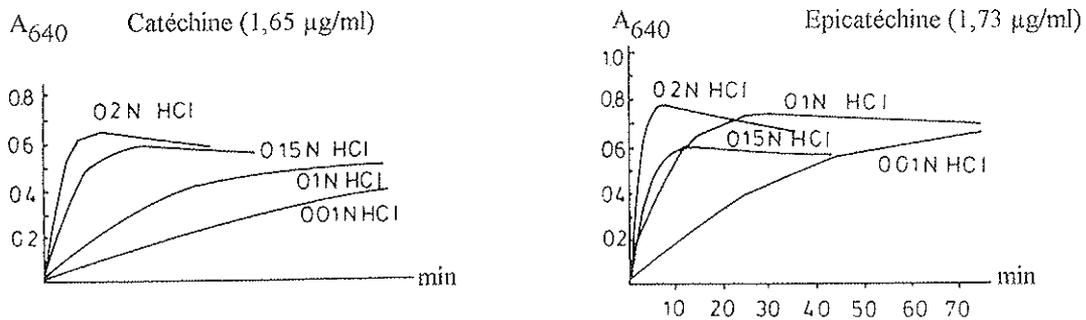


Figure 7: Influence de la concentration en acide chlorhydrique sur les cinétiques obtenues avec le DMACA (105).

Ainsi, les pics de l'épicatéchine et de la plupart de ses dérivés apparaissent plus tôt sur le chromatogramme que ceux de la catéchine et de ses oligomères. Lorsque l'épicatéchine prédomine dans la solution, le maximum d'absorption est obtenu après 30 minutes (figure 8), alors qu'une prédominance de la catéchine déplace le pic vers un temps réactionnel beaucoup plus long et modifie la forme de la courbe.

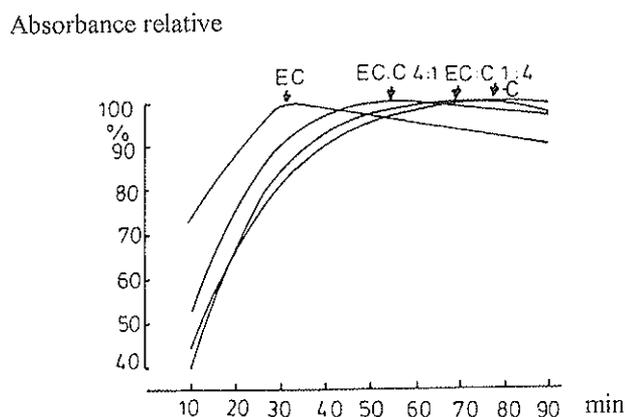


Figure 8: Différentes réponses de l'épicatéchine et de la catéchine avec le DMACA dans un milieu réactionnel de 100 mM de HCl et de 0,02% de DMACA (105).

EC, épicatéchine ; C, catéchine ; EC:C 4:1, épicatéchine:catéchine 4:1 ;

EC:C 1:4, épicatéchine:catéchine 1:4

Les résultats évoqués ci-dessus sont obtenus avec une concentration finale en acide chlorhydrique de 100 mM, une concentration acide plus faible (10 mM) permet de stabiliser plus longtemps la coloration bleue des produits formés.

10-5-1-2-Méthode colorimétrique par relargage
dans une solution acide

Le fait de porter à ébullition les proanthocyanidines dans de l'acide chlorhydrique rompt les liaisons interflavanes et entraîne le relargage des anthocyanes après oxydation de la partie supérieure de la molécule.

Comme pour la réaction aldéhydique, le niveau de coloration des produits obtenus est fonction de la structure (figure 9), cette remarque avait déjà été confirmée par Bate-Smith (8).

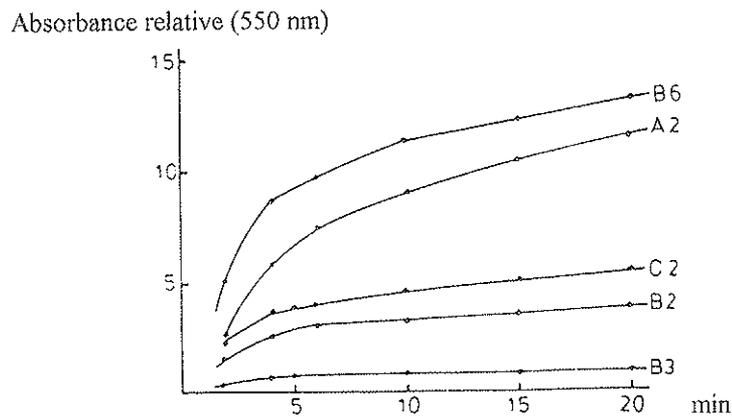


Figure 9: Cinétiques de production des anthocyanes à partir des procyanidines (1 mM) (105).

10-5-1-3-Quantification par HPLC

(24, 25, 44, 58, 95)

Une mesure colorimétrique seule apparaît peu sélective à cause des interférences avec d'autres composés.

Par conséquent la méthode de choix pour détecter des variations quantitatives concernant un composé précis, est une séparation par HPLC.

De manière classique, la méthode HPLC est couplée à une détection par spectrométrie UV, il existe cependant d'autres méthodes de détection qui peuvent s'avérer plus avantageuses.

Ainsi, la technique HPLC peut être couplée à une analyse colorimétrique, à une détection électrochimique ou à une spectrométrie de masse.

10-5-1-3-1-HPLC couplée à une détection

colorimétrique (24, 44, 54)

La figure 10 présente une comparaison de séparation des composés d'un extrait de vin rouge espagnol obtenue par HPLC à 280 nm et par HPLC couplée à une réaction en post-colonne avec le DMACA et mesurée à 640 nm.

La comparaison de ces deux spectres montre l'augmentation de sélectivité obtenue avec la dérivation en post-colonne. Cette dérivation permet en effet de visualiser nettement les pics des flavan-3-ols présents et qui étaient cachés sur l'autre spectre par la présence d'autres composés.

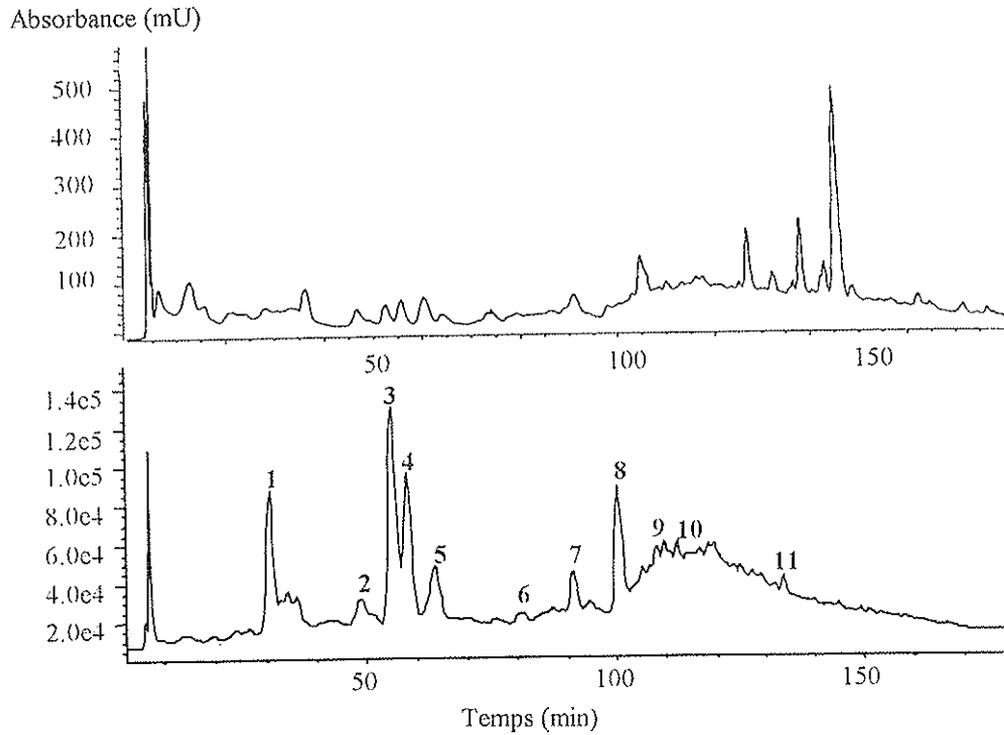


Figure 10: Séparation HPLC d'un extrait de vin rouge (24).
 Partie supérieure: chromatogramme avec simple détection à 280 nm.
 Partie inférieure: chromatogramme à 640 nm, après réaction chimique avec le DMACA.

1: GC (+)-gallocatechine, 2: dimère B3, 3: dimère B1, 4: C (+)-catéchine,
 5: (-)-épigallocatechine, 6: dimère B4, 7: dimère B2, 8: (-)-épicatéchine, 9: dimère B7
 10: trimère C1, 11: dimère B5.

10-5-1-3-2-HPLC couplée à une détection électrochimique

Ce système de détection analyse le comportement électrochimique des composés séparés par HPLC en appliquant un courant électrique aux solutions témoins et aux solutions contenant les composés à identifier.

Cette méthode de détection présente plusieurs avantages par rapport à une détection UV classique. Elle peut être réalisée avec de très faibles quantités de substances et les comportements électrochimiques diffèrent en fonction des degrés d'oxydation ce qui permet de différencier des substances dont les spectres UV sont similaires (58).

10-5-1-3-3-HPLC couplée à une spectrométrie de masse

Cette technique a été utilisée pour analyser les proanthocyanidines issues des pépins de raisin de la variété Merlot (95).

Une simple séparation par HPLC a permis de détecter seulement la présence des monomères flavanoliques. Dans le cas d'un couplage HPLC-spectrométrie de masse, d'autres pics peuvent être identifiés (84, 95).

En conclusion, d'une manière générale les méthodes de mesure colorimétrique restent les plus utilisées pour apprécier les concentrations relatives en flavanols des tissus végétaux.

Cependant, pour obtenir une quantification précise des catéchines et des procyanidines, une séparation par HPLC associée à une dérivation en post-colonne est indispensable.

10-5-2-Composition flavanolique de *Vitis vinifera* L.

La composition flavanolique de la vigne est variable selon la partie considérée mais aussi selon la variété.

10-5-2-1-Composition flavanolique des différentes

parties de la vigne

Plusieurs études montrent que les composés flavanoliques sont principalement présents dans les pépins de raisins (9, 33).

La composition chimique des pépins est d'ailleurs totalement différente de celle des autres parties des baies. Les composés identifiés dans les pépins comprennent les flavan-3-ols tels que la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine, l'épicatéchine-gallate, suivis de l'acide gallique. Par contre, les aldéhydes et les acides phénoliques dérivés des acides benzoïque et cinnamique, comme nous l'avons déjà signalé, sont indétectables (9, 33).

Les monomères de flavan-3-ols correspondent à la majeure partie des composés phénoliques des pépins. Leurs concentrations sont beaucoup plus élevées que celles des autres composés identifiés dans les pépins ou dans les autres parties de la baie (de l'ordre de 5 fois la concentration de l'acide syringique, constituant principal des composés phénoliques dans la peau).

Les oligomères et les polymères de catéchines et épicatéchines sont également plus abondants dans les pépins que dans la peau des baies.

Les dimères représentent environ 15% de la fraction totale des oligomères (9).

Ces remarques suggèrent que la nature des composés présents dans les pépins exerce une influence majeure sur la composition phénolique totale de la baie, même si les pépins ne représentent que environ 5% du poids total (33).

Les pépins renferment également des leucoanthocyanes (flavan-3,4-diols) sous forme dimère ou substituée (9).

Une autre étude, réalisée sur des cépages marocains a confirmé que les pépins sont la partie de la vigne la plus riche en procyanidols et a défini la composition des procyanidols majeurs des pépins et des autres parties de la vigne (48).

Les résultats montrent que les pépins renferment surtout du dimère B2 qui représente 20% de leur teneur totale proanthocyanidolique.

Les pellicules des baies sont plus riches en dimère B1 (25 à 35%) et les rafles contiennent surtout du digallate de B2 qui est leur composé majoritaire (30 à 60%).

Les feuilles contiennent essentiellement des dimères avec une prédominance du dimère B1, suivi du dimère B2. Les dimères B3 et B4 sont présents à peu près aux mêmes pourcentages et les trimères ne dépassent pas 11%. Les dérivés galloylés sont les composés minoritaires de la composition des feuilles.

Le tableau suivant montre le proanthocyanidol majoritaire de chaque partie de la vigne:

partie	composé le plus abondant
pépins	dimère B2
pellicules	dimère B1
rafles	digallate de B2
feuilles	dimère B1

Tableau 1: Proanthocyanidol majoritaire des différentes parties de la vigne (48).

Le récapitulatif de la distribution des composés phénoliques tout confondus en fonction des différentes parties des baies est présenté dans le tableau 2 (33).

-Les acides phénoliques sont principalement présents dans la peau des baies, leur concentration y est à peu près la même que celle des anthocyanes.

-La pulpe et le moût contiennent surtout des acides benzoïque et cinnamique, les composés phénoliques y sont minoritaires.

-Les catéchines et les proanthocyanidines sont surtout concentrées dans les pépins, à la fois pour les variétés blanches et pour les variétés rouges.

N°	Composés phénoliques	peau	moût	pépins
1	Acide gallique	+	+	+
2	Acide protocatéchique	+	+	-
3	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	+	+	-
4	Acide vanillique	+	+	-
5	Acide syringique	+	+	-
6	Acide caféique	+	+	-
7	Acide <i>cis-p</i> -coumarique	+	+	-
8	Acide <i>trans-p</i> -coumarique	+	+	-
9	Acide <i>cis</i> -férulique	+	+	-
10	Acide <i>trans</i> -férulique	+	+	-
11	Aldéhyde <i>p</i> -hydroxybenzoïque	+	+	-
12	<i>p</i> -vanilline	+	+	-
13	aldéhyde syringique	+	+	-
14	Aesculétine	+	+	-
15	(+) catéchine	+	-	+
16	(-) épicatechine	-	-	+
17	Acide méthylgallique	+	-	-
18	Acide <i>cis</i> -caféyl tartrique	-	+	-
19	Acide <i>trans</i> -caféyl tartrique	-	+	-
20	Acide <i>cis-p</i> -coumaryl tartrique	-	+	-
21	Acide <i>trans-p</i> -coumaryl tartrique	-	+	-
22	Acide <i>cis</i> -férulyl tartrique	-	+	-
23	Acide <i>trans</i> -férulyl tartrique	-	+	-
24	Catéchine-catéchine gallate	-	-	+
25	Epicatechine gallate	-	-	+

Tableau 2: Distribution des composés phénoliques dans les différentes parties de la baie (33).

10-5-2-2-Composition flavanolique de plusieurs variétés de vigne

Plusieurs études ont comparé la composition flavanolique de différentes variétés.

Une de ces études a comparé la composition phénolique de 17 variétés de raisin, cultivées dans les principales régions de Castille-Léon (Espagne) (86).

L'extraction est réalisée avec du méthanol et du *n*-hexane, l'analyse des composés se fait par HPLC et par hydrolyse.

Les techniques d'extraction et d'analyse sont détaillées plus loin (page 75).

Les résultats obtenus montrent que les différences de composition les plus marquées concernent la distribution des monomères flavan-3-ols.

La (+)-catéchine est nettement majoritaire dans les variétés blanches alors que dans les variétés rouges, les composés majoritaires sont soit la (+)-catéchine et la (-)-épicatéchine à une teneur à peu près équivalente, soit la (-)-épicatéchine seule.

L'étude des pépins issus de 17 variétés de raisins, tous hybrides de la variété Labrusca rouge et cultivés dans la région Niagara dans l'Ontario (Canada) a permis de quantifier 11 flavan-3-ols (40).

Les résultats obtenus confirment ceux définis auparavant avec une prédominance des monomères (+)-catéchine et (-)-épicatéchine dans les variétés rouges étudiées et une présence non négligeable de dimères et de dérivés galloylés.

L'étude des cépages marocains Alicante-Bouschet, Cinsault, Carignan et Grenache noir, a permis de définir leurs teneurs en dimères et trimères (48).

En ce qui concerne les dimères, le dimère B1 est en général le plus abondant, il représente 18 à 22% sauf pour le Cinsault qui est dominé par le dimère B2 avec une teneur de 18%.

Les dérivés galloylés sont présents en quantité importante, leur teneur est de 32% pour le Grenache noir, 24% pour l'Alicante-Bouschet, 20% pour le Cinsault et 19% pour le Carignan. Leur présence est surtout importante dans les rafles.

Les trimères sont présents à des concentrations proches de celles des dimères, les teneurs trouvées dans chaque variété sont de 26% pour le Cinsault, 21% pour le Carignan, 19% pour l'Alicante-Bouschet et 18% pour le Grenache noir.

La composition et la concentration des différents composants de la vigne varient selon les cépages, ces variations sont dues en partie aux variations climatiques et écologiques.

Quelques études ont été menées pour étudier les facteurs qui influencent les variations de composition des raisins, de façon à optimiser les récoltes et la qualité des raisins (11, 33, 101, 106).

11-Variation phénolique durant la maturation

Pendant la maturation les raisins développent les propriétés intrinsèques propres à chaque variété. Au cours de cette période, les composés phénoliques présents subissent des variations de concentration.

L'étude citée ici examine les variations de concentration de toutes les substances phénoliques présentes dans le vin en fonction de la maturité des baies (33).

Les échantillons étudiés sont issus de la variété Cencibel, variété cultivée sur des terrains expérimentaux de "l'Ecole et du Musée du Vin et de la Vigne" (Madrid). Les baies utilisées sont choisies au hasard, de tailles différentes, à des niveaux différents de la grappe et sur des pieds différents de raisins.

L'échantillonnage est réalisé à des intervalles de temps réguliers, environ 3 jours, de la véraison jusqu'à la maturité, pendant 3 années successives: 1985, 1986, 1987.

Le raisin est utilisé en entier, seules les rafles sont éliminées.

2 groupes de 100 baies sont pressés pour séparer les peaux et les pépins de la pulpe, les peaux sont lyophilisées.

Les peaux lyophilisées et les pépins écrasés sont mis à macérer dans une solution hydroalcoolique (pH 3,5) réalisée avec:

0,7 g/l d'acide tartrique

1,11 g/l de bitartrate de potassium

20% d'éthanol

Le moût et le liquide de macération sont soumis à une extraction liquide/liquide avec de l'éther éthylique, ceci afin d'éviter l'extraction des procyanidines et des anthocyanes qui auraient pu créer des interférences dans les analyses ultérieures.

Le taux d'extraction des acides hydroxy-cinnamyl tartriques et de l'acide gallique sont plus faibles avec ce solvant qu'avec l'acétate d'éthyle, cependant les taux extraits des autres composés phénoliques de bas poids moléculaires sont équivalents à ceux obtenus avec l'acétate d'éthyle. La reproductibilité, quant à elle, est supérieure avec l'éther éthylique.

La solution extraite est analysée par HPLC selon la méthode décrite par FERNANDEZ DE SIMON (32). Les identifications des pics sont réalisées par comparaison des temps de rétention et des taux d'absorbance à différentes longueurs d'onde avec ceux des solutions témoins pures (Aldrich, Sigma, Carlo Erba).

Les composés issus des pics de HPLC sont aussi comparés avec les substances pures par chromatographie couche mince (CCM).

Lorsque les témoins ne sont pas disponibles, l'identification est réalisée par hydrolyse enzymatique ou chimique des substances correspondant aux pics. Puis, les résultats d'hydrolyse sont analysés par HPLC et CCM.

La figure 11 présente les chromatogrammes des différentes parties de la baie: pépins (A), peau (B) et moût (C). Ces chromatogrammes ont été réalisés pour chaque partie, au moment où la concentration des composés majeurs était maximale. Ils montrent qu'effectivement la composition des pépins est différente de celles de la peau et du moût.

Elle est surtout caractérisée par une forte concentration en composés flavanoliqes alors que la peau et le moût renferment respectivement des acides phénoliques et des esters hydroxycinnamiques.

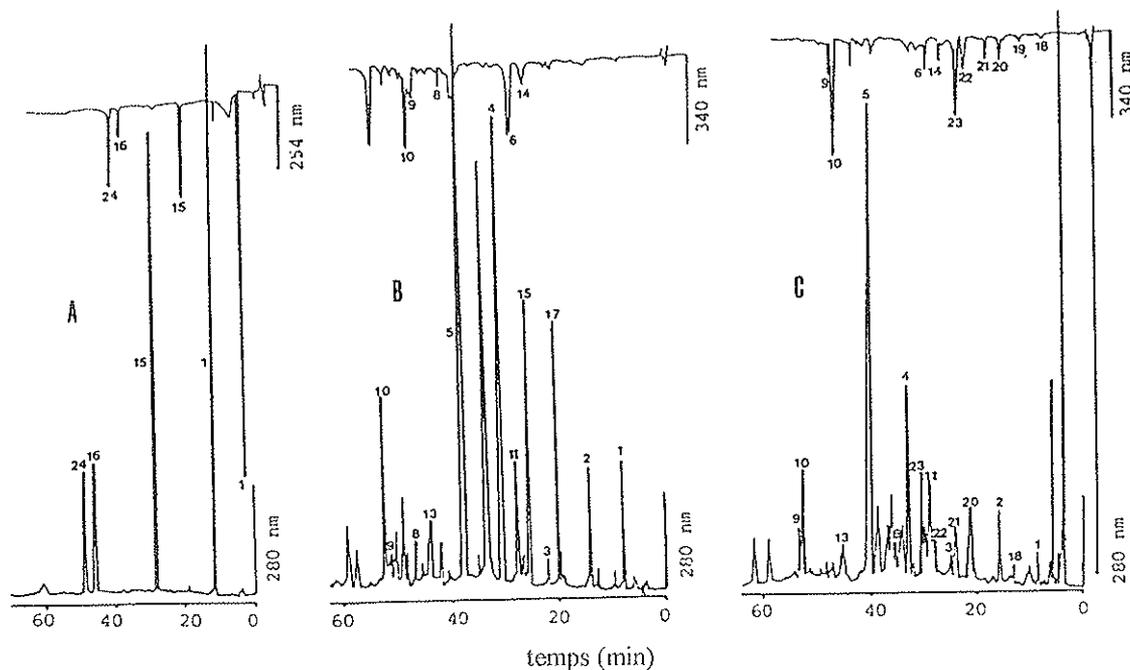


Figure 11 : Chromatogrammes des pépins (A), de la peau (B) et du moût (C).
Les numéros des pics correspondent aux noms des composés donnés dans le tableau 2 (33).

Les résultats de l'étude montrent que la variation de concentration des composés phénoliques durant la maturation présente deux phases (33, 101):

- une autour de la véraison, étape importante du développement de la baie marquant le début de la maturation: c'est le moment où les baies perdent de leur dureté, commencent à se colorer et à se charger en sucres.

- une vers la maturité.

La variation de concentration des différents composés est mise en évidence par des dosages successifs de ces différents composés au cours du temps.

Les figures 12 et 13 présentent la variation de concentration des acides hydroxycinnamiques et des flavan-3-ols.

Ces composés ont des concentrations décroissantes au cours du temps avec une baisse importante dans la première phase. Ensuite, cette diminution est plus faible, elle se stabilise à un minimum puis elle subit peu de variation durant la deuxième phase.

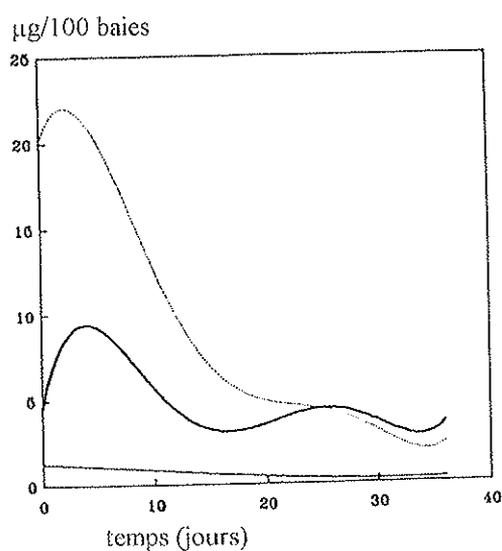


Figure 12: Variation de la concentration en esters hydroxycinnamiques dans le moût au cours de la maturation (33).

(—) caféyl, (—) p-coumaryl, (.....) férulyl.

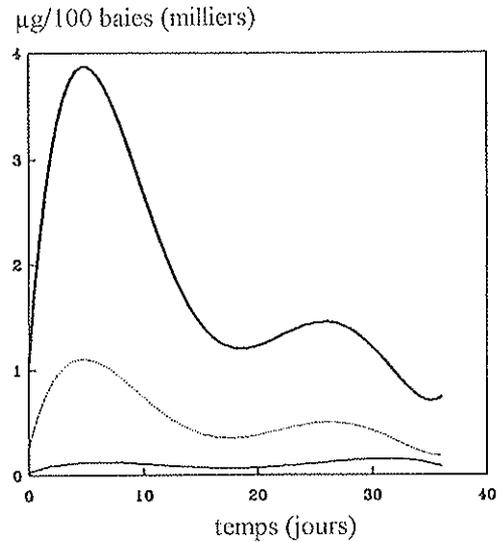


Figure 13: Variation de la concentration en acide gallique, (+)-catéchine et (-)-épicatéchine dans les pépins au cours de la maturation (33).
 (—) acide gallique, (---) (+)-catéchine, (.....) (-)-épicatéchine.

La figure 14 présente la variation de concentration des composés phénoliques de bas poids moléculaire, l'acide benzoïque, l'acide cinnamique ainsi que leurs aldéhydes.

Ces composés ont une concentration croissante subissant peu de variation au cours de la première phase mais une forte augmentation durant la deuxième phase, avec passage par un maximum élevé.

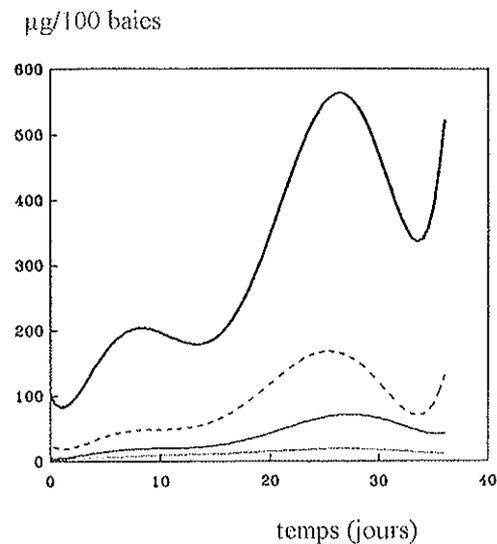


Figure 14: Variation de la concentration en acides phénoliques dérivés de l'acide benzoïque dans la peau au cours de la maturation (33).
 (—) acide gallique, (....) acide-*p*-OH-benzoïque, (----) acide vanillique, (-.-.-) acide syringique.

12-Influence des conditions climatiques sur la concentration phénolique des raisins (106)

La richesse en composés phénoliques est une caractéristique essentielle de la qualité des raisins noirs.

La variation quantitative de ces composés dépend des cépages, des parties considérées, du degré de maturation comme nous venons de le voir, mais elle dépend également des conditions climatiques.

Afin d'acquérir des données supplémentaires sur ce sujet, une étude a été réalisée de 1993 à 1995 à l'Institut de Recherches Viti-Vinicoles Valea Calugareasca (Roumanie).

Cette étude a consisté à noter l'évolution quantitative des polyphénols des raisins noirs, la date de la teneur maximale en polyphénols ainsi qu'à établir une corrélation entre cette concentration et les conditions climatiques.

Les cépages étudiés, Cabernet sauvignon, Merlot et Pinot noir, sont issus du centre viticole Valea Calugareasca.

Les échantillons sont réalisés en prélevant seulement une baie de raisin sur chaque cep, en alternant les orientations.

Ces échantillons servent à déterminer l'indice de maturation qui sera ensuite utilisé pour établir la date de début de la véraison mais également à évaluer la réserve en composés phénoliques grâce à la mesure de la densité optique à 280 nm.

Les échantillons sont analysés tous les 5 jours de la véraison jusqu'aux vendanges.

Les différentes caractéristiques telles que la température moyenne, la température maximale, la durée de l'insolation et le niveau des pluies sont notées tous les jours.

Cette étude a conduit aux conclusions suivantes:

-la date de début de véraison est très variable selon les années et les cépages:

Cabernet sauvignon: 12-23 août

Merlot: 4-15 août

Pinot noir: 4-15 août

-la quantité des polyphénols varie en fonction des cépages et est largement influencée par l'année de vendange donc par les conditions climatiques et par l'aptitude de chaque variété vis à vis de ces conditions.

Les valeurs maximales des composés polyphénoliques des différentes variétés se situent dans les périodes suivantes:

Cabernet sauvignon et Merlot: 10-25 septembre

Pinot noir: 5-20 septembre

Cette teneur, en fonction des conditions climatiques et selon les variétés, peut varier de 1 à 4 voire 5 fois la teneur minimale.

De même, d'après cette étude, il est possible de déterminer la date des vendanges en fonction de la teneur en composés phénoliques.

CHAPITRE III

EXTRACTION DES COMPOSES
FLAVANOLIQUES

A- METHODES D'EXTRACTION DES DIFFERENTES ETUDES D'ANALYSE

De nombreuses techniques d'extraction existent, elles diffèrent essentiellement par leurs modalités et par les solvants utilisés. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients, le choix est fonction des buts poursuivis et des produits que l'on désire extraire préférentiellement.

Ainsi, il existe plusieurs méthodes pour optimiser l'extraction et ces méthodes sont plus ou moins compliquées.

D'après BRUNETON (15), l'extraction des tanins doit être réalisée par un mélange d'eau et d'acétone.

Les résultats sont maximum à partir de tissus frais, lyophilisés ou congelés et moindres à partir d'extraits secs où les tanins sont combinés de manière irréversible avec d'autres polymères.

Après l'extraction, l'acétone est éliminée par distillation puis les pigments et les lipides sont éliminés de la solution aqueuse par un solvant tel que le dichlorométhane.

La phase aqueuse est ensuite traitée par de l'acétate d'éthyle pour séparer les proanthocyanidines dimères et la plupart des tanins galliques. Les proanthocyanidines polymères et les tanins galliques de haut poids moléculaires restent dans la phase aqueuse.

Pour obtenir des composés purs, des méthodes chromatographiques appropriées doivent être utilisées telles qu'une filtration sur gel et une chromatographie en phase inverse avec soit de l'eau et de l'alcool, soit avec des mélanges d'eau, d'alcool et d'acétone.

Deux études ont montré que les extractions des procyanidines diffèrent en fonction des solvants utilisés (74, 99).

L'une de ces études, réalisée au Portugal, a comparé les efficacités d'extraction des procyanidines issues de pépins de raisin avec différents solvants classiquement utilisés et notamment, l'éther éthylique, l'acétate d'éthyle, le méthanol à différentes concentrations dans l'eau (50%, 80%, 100%), l'acétone, l'acétone à 75% dans l'eau et l'eau (99).

Trois extractions séquentielles sont réalisées pour chaque solvant, sous azote et à température ambiante, les résultats d'extraction sont présentés sur la figure 15.

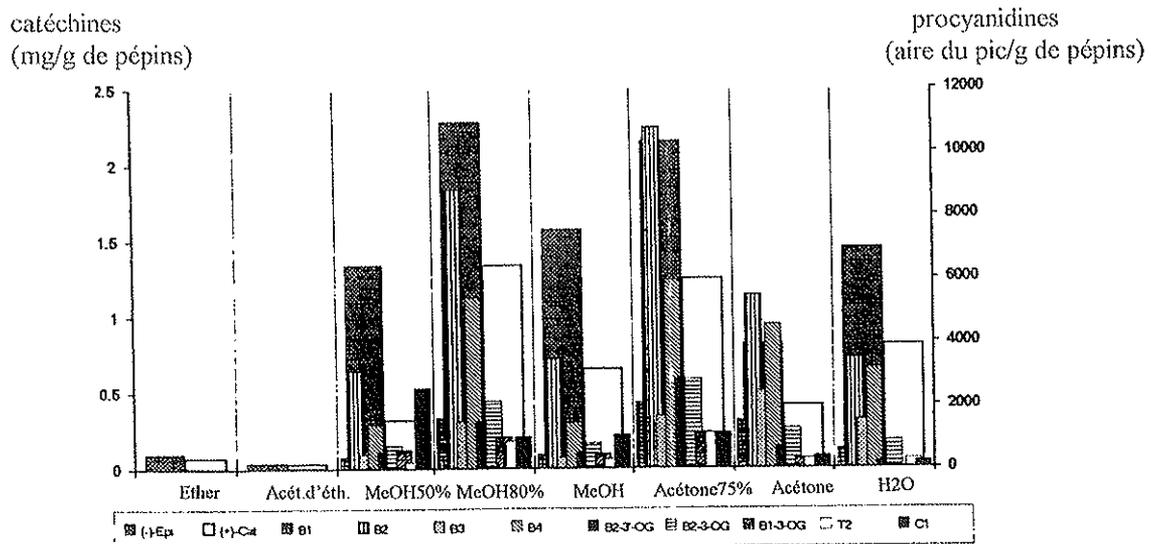


Figure 15: Histogramme réalisé après analyse par HPLC des catéchines et des procyanidines extraites par les différents solvants (99).

Les extraits obtenus sont séparés, grâce à une carte Sep-Pak C18, en trois fractions contenant respectivement les catéchines, les procyanidines oligomères et les procyanidines polymères.

La quantification de chaque catéchine et procyanidine (dimères ou trimères) est réalisée par HPLC couplée à un test à la vanilline.

Les résultats des tests à la vanilline sont présentés sur la figure 16.

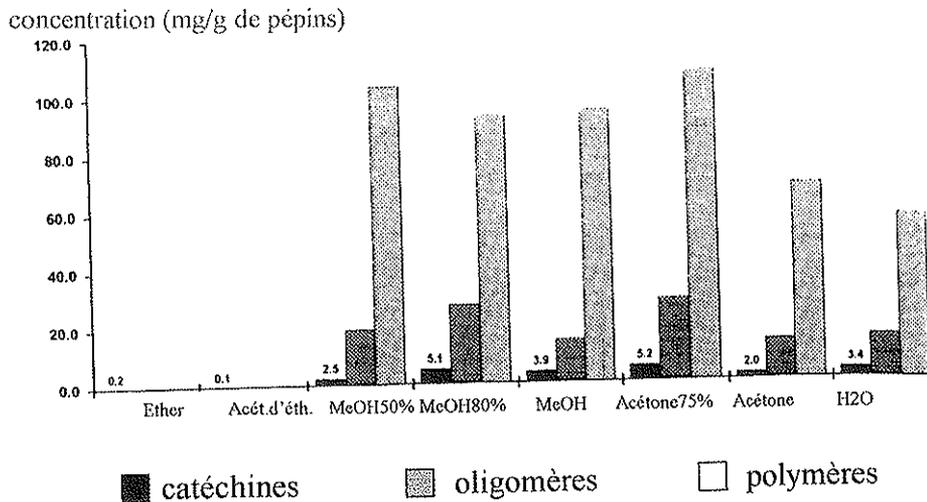


Figure 16: Evaluation des catéchines et des procyanidines extraites par différents solvants en utilisant le test à la vanilline (99).

Les résultats présentés sur les deux figures montrent que l'extraction des catéchines et des procyanidines oligomères est optimale en utilisant le méthanol à 80% et l'acétone à 75%. Par contre, ces substances sont très peu extraites par l'acétate d'éthyle et l'éther éthylique (97, 99).

Pour les polymères, le méthanol, le méthanol à 50%, le méthanol à 80% et l'acétone à 75% fournissent des extractions similaires.

Ainsi, une extractibilité identique des procyanidines totales est obtenue avec ces quatre derniers solvants puisque la majorité des procyanidines des pépins de raisins existe sous forme polymère.

Les résultats de cette étude suggèrent qu'il faut choisir les solvants en fonction des composés que l'on veut extraire.

Cependant, les études citées ci-après montrent qu'il faut souvent coupler les solvants de manière à purifier l'extrait obtenu.

Les méthodes d'extraction de ces études font appel à des solvants communément utilisés et notamment le méthanol, les mélanges hydro-alcooliques et les solvants organiques.

Ces différentes techniques sont classées par type de solvant utilisé.

I-METHODES UTILISANT LE METHANOL

Nous allons différencier deux techniques d'extraction basées sur l'utilisation du méthanol.

La première technique a été utilisée pour une étude comparative de la composition flavanolique de pépins issus de 17 variétés différentes de raisins (86) ainsi que pour l'analyse des pépins de la variété Tempranillo (28).

La deuxième technique a été réalisée sur des pépins de raisins Chardonnay (78).

I-Première technique d'extraction (28, 86)

Les pépins de raisin sont écrasés à -40°C , puis ils sont homogénéisés avec du méthanol en présence d'acide ascorbique (0,5 mg/ml).

Après ajout d'eau, l'ensemble subit une concentration jusqu'à élimination du méthanol.

L'extrait aqueux restant est soumis à un partage liquide/liquide avec de l'hexane de façon à éliminer les substances liposolubles dans la phase organique.

La phase aqueuse subit une évaporation pour éliminer les traces de solvant organique et pour concentrer l'extrait aqueux.

Cet extrait est ensuite filtré puis analysé par HPLC à 280 nm, le chromatogramme obtenu avec les pépins de raisins de la variété Tempranillo est présenté sur la figure 17 (28).

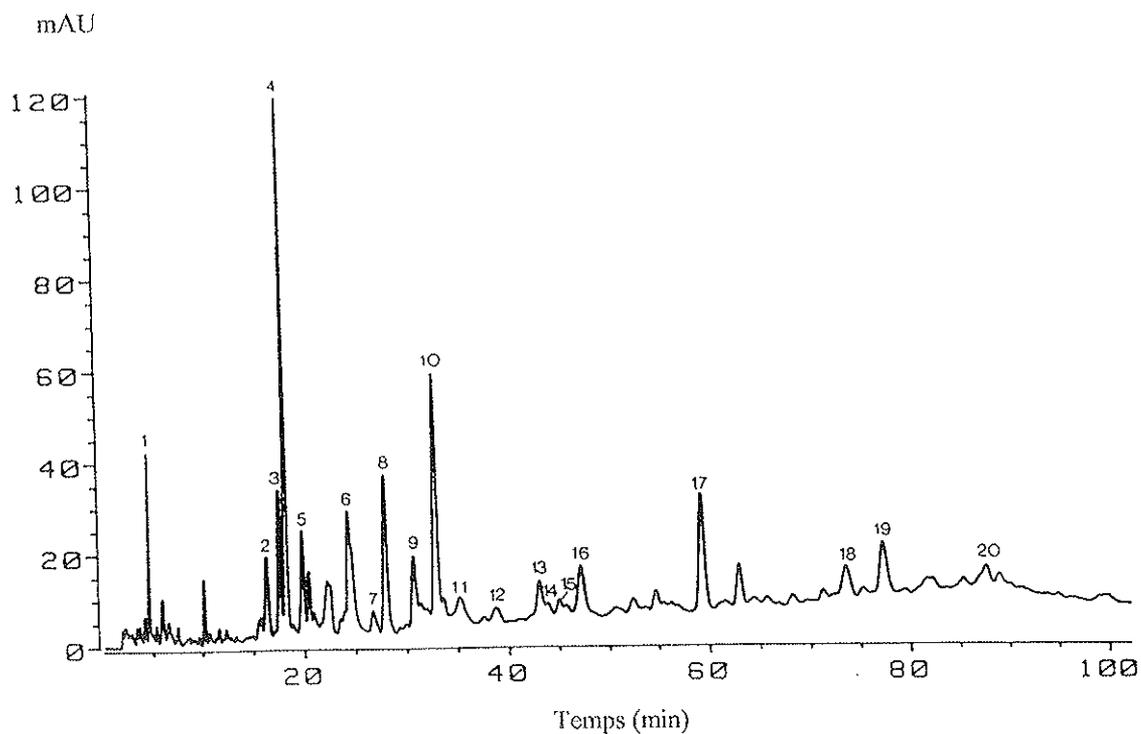


Figure 17: Chromatogramme de l'extrait de pépins de raisins Tempranillo à 280 nm (28).

Les pics correspondant à l'acide gallique (pic 1), à la (+)-catéchine (pic 4), à la (-)-épicatéchine (pic 10), et à l'épicatéchine-3-O-gallate (pic 17) sont identifiés par comparaison avec des témoins.

16 procyanidines sont également isolées par HPLC et leurs structures sont déterminées par différentes méthodes d'hydrolyse (28).

L'hydrolyse acide complète permet de définir le type de proanthocyanidine (procyanidine ou prodelphinidine).

Cette hydrolyse est réalisée avec du *n*-butanol associé à de l'acide chlorhydrique (2/1) sur 10 minutes à 100°C.

L'hydrolyse acide partielle rompt les liaisons interflavaniques, libérant ainsi les sous-unités inférieures qui seront analysées par HPLC.

Cette hydrolyse est réalisée en milieu aqueux avec de l'acide chlorhydrique 0,1N sur 2 minutes.

La thiolyse: les carbocations 4-flavanyl correspondant aux sous-unités supérieures des procyanidines sont capturés par un nucléophile qui peut être soit le phénylméthanéthiol soit le phloroglucinol.

Les thioéthers obtenus par hydrolyse avec le phloroglucinol sont identifiés par HPLC, ceux obtenus avec le phénylméthanéthiol sont désulfurisés pour obtenir les sous-unités supérieures sous forme libre.

L'hydrolyse acide réalisée avec le phloroglucinol utilise une solution contenant un mélange méthanol/acide chlorhydrique, pendant 5 minutes à 100°C.

L'hydrolyse enzymatique permet d'identifier les procyanidines acylées ainsi que l'acide impliqué. Cette hydrolyse utilise une tannase.

Description des différentes étapes de l'analyse en prenant comme exemple l'étude du pic 19 (chromatogramme de la figure 17):

Les figures 18, 19, 20, 21 suivantes montrent les résultats obtenus aux différentes hydrolyses avec le pic 19 correspondant à un trimère: l'épicatéchine-(4 β →8)-épicatéchine-(4 β →8)-épicatéchine-3-O-gallate.

-Hydrolyse acide complète: formation de l'anthocyanidol, il s'agit du type procyanidol.

-Hydrolyse enzymatique: libération du trimère C1 et de l'acide gallique (figure 18).

-Hydrolyse acide partielle: obtention des sous-unités inférieures: (figure 19)

(-)-épicatéchine-3-O-gallate

B2-3'-O-gallate

-Thiolyse avec le phloroglucinol: obtention d'un pic unique correspondant à la (-)-épicatéchine (figure 20).

Désulfuration des thioéthers obtenus par la thiolyse avec le phénylméthanéthiol:

obtention des sous-unités supérieures: (figure 21)

(-) épicatéchine

dimère B2

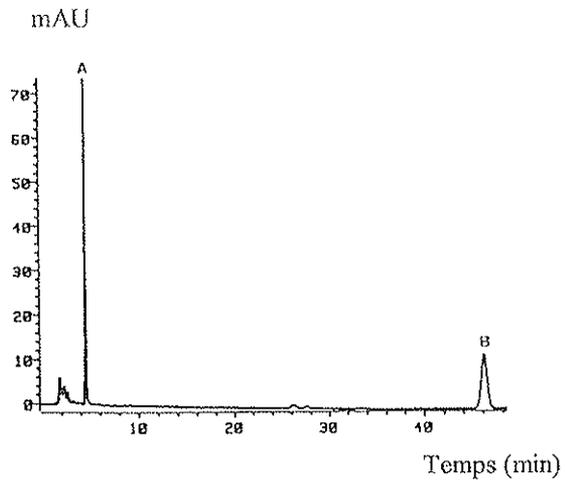


Figure 18: Hydrolyse enzymatique du pic 19 (28).

A: acide gallique ; B: trimère C1

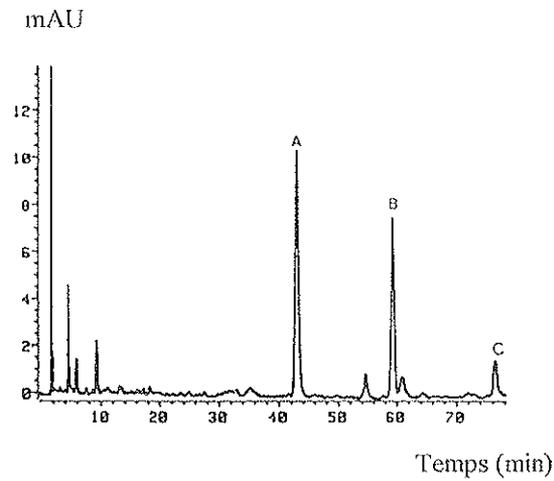


Figure 19: Hydrolyse acide partielle du pic 19 (28).

A: B2-3'-O-gallate ; B: (-)-épicatéchine-3-O-gallate ; C: procyanidine à identifier

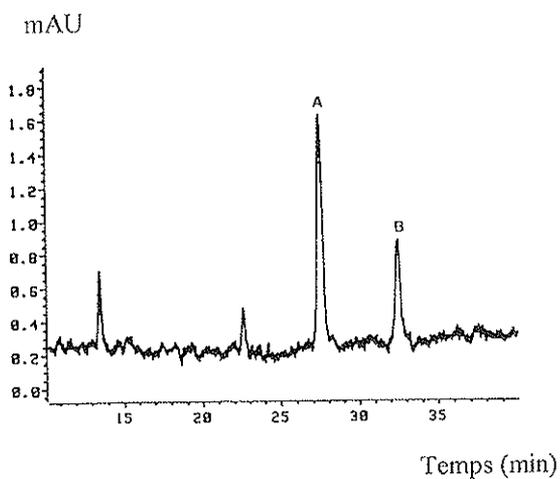


Figure 20: Hydrolyse du pic 19 avec le phloroglucinol (28).
A: phloroglucinol ; B: phloroglucinol lié à la (-)-épicatéchine.

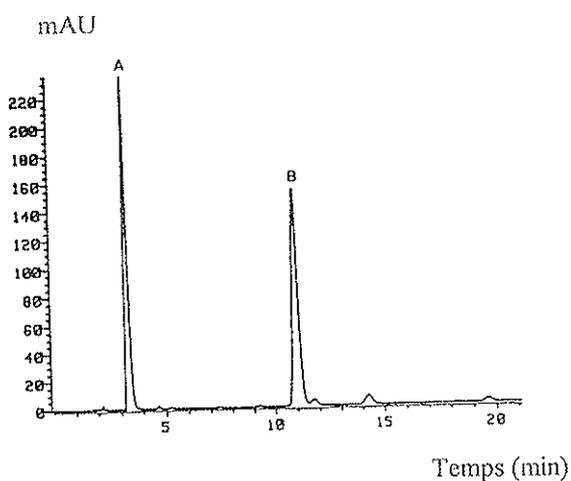


Figure 21: Désulfuration après thiolysse avec le phénylméthanéthiol du pic 19 (28).
A: dimère B2 ; B: (-)-épicatéchine

Cette technique de détermination de structure par différentes hydrolyses est également utilisée pour les autres composés, les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 3.

Pic	Hydrolyse enzymatique	Hydrolyse acide partielle	Désulfuration des thioéthers	Phloroglucinol	Composé
2		Cat	Cat	Cat	Cat-(4 α →8)-Cat (Dimère B3)
3		Cat	Epi	Epi	Epi-(4 β →8)-Cat (Dimère B1)
5		Cat+B1	Epi+B2	Epi	Epi-(4 β →8)-Epi (4 β →8)-Cat
6		Epi	Cat	Cat	Cat-(4 α →8)-Epi (Dimère B4)
7		Cat+B1	Epi+B5	Epi	Epi-(4 β →6)-Epi-(4 β →8)-Cat
8		Epi	Epi	Epi	Epi-(4 β →8)-Epi (Dimère B2)
9	B2	Epi	Epigall	Epigall	Epigall-(4 β →8)-Epi (B2-3-O-gall)
11	B4	Epigall	Epi	Epi	Cat-(4 α →8)-Epigall (B4-3'-O-gall)
12		Cat+B7	Epi	Epi	Epi-(4 β →8)-Epi-(4 β →6)-Cat
13	B2	Epigall	Epi	Epi	Epi-(4 β →8)-Epigall (B2-3'-O-gall)
14	B1	Cat	Epigall	Epigall	Epigall-(4 β →8)-Cat (B1-3-O-gall)
15		Cat	Epi	Epi	Epi-(4 β →6)-Cat (Dimère B7)
16		Epi	Epi	Epi	Epi-(4 β →8)-Epi-(4 β →8)-Epi
18	B2	Epigall	Epigall	Epigall	Epigall-(4 β →8)-Epigall
19	C1	Epigall+13	Epi+B2	Epi	Epi-(4 β →8)-Epi-(4 β →8)-Epigall
20	C1	Epigall+18	Epi+13	Epi	Epi-(4 β →8)-Epigall-(4 β →8)-Epigall

Tableau 3: Composés isolés des pépins: résultats obtenus aux différentes hydrolyses et identification des pics (28).

Cat: (+)-catéchine ; Epi: (-)-épicatéchine ; Epigall: (-)-épicatéchine-3-O-gallate.

Cette même technique a été utilisée avec les extraits de 17 variétés différentes (86).

Les composés apparaissant sur les chromatogrammes sont identifiés soit par comparaison avec des témoins, soit par les différentes méthodes d'hydrolyse. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.

Le chromatogramme obtenu avec l'extrait méthanolique des pépins de raisins de la variété Cabernet sauvignon (figure 22) est légèrement différent de celui obtenu avec la variété Tempranillo (figure 17). Ici, les pics attribuables aux tanins hydrolysables ont été repérés.

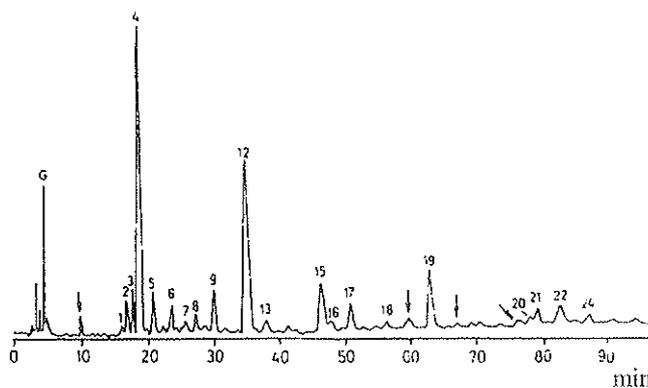


Figure 22: Chromatogramme HPLC de l'extrait des pépins de Cabernet-sauvignon à 280 nm (86).

G: acide gallique, les pics correspondants aux tanins hydrolysables sont marqués d'une flèche.

Pourcentages des aires de l'HPLC ^a												
Variétés des raisins	C	E	EG	B1	B2	B3	B4	C1	EEC	E4	Gall.	(4-6)
Verdejo (n=4)	36 ± 8 ^b	12 ± 5	6 ± 2	2 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	3 ± 1	2 ± 1	4 ± 2		14 ± 2	3 ± 1
Godelo (n=1)	29 ± 1	11 ± 1	5 ± 0	6 ± 0	3 ± 0	5 ± 1	3 ± 1	2 ± 1	4 ± 0		17 ± 3	3 ± 1
Albillo (n=1)	30 ± 1	18 ± 1	5 ± 0	4 ± 0	4 ± 0	4 ± 0	3 ± 0	2 ± 0	4 ± 1	1 ± 0	11 ± 1	4 ± 0
Malvasia (n=2)	15 ± 6	15 ± 5	5 ± 1	4 ± 1	7 ± 1	3 ± 1	7 ± 3	5 ± 1	4 ± 1	2 ± 0	9 ± 3	3 ± 1
Valenciana (n=1)	22 ± 1	21 ± 1	4 ± 0	1 ± 0	9 ± 1	4 ± 0	6 ± 0	4 ± 0	3 ± 0	1 ± 0	6 ± 1	3 ± 0
Palomino (n=1)	34 ± 4	15 ± 1	2 ± 0	5 ± 1	5 ± 0	4 ± 0	3 ± 1	3 ± 0	4 ± 0		9 ± 1	3 ± 1
Sauvignon (n=1)	38 ± 1	12 ± 0	6 ± 1	2 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	1 ± 0	15 ± 1	3 ± 0
Tempranillo (n=4)	27 ± 8	17 ± 4	4 ± 1	2 ± 1	6 ± 1	3 ± 1	5 ± 2	3 ± 1	3 ± 1	1 ± 0	12 ± 4	3 ± 2
Tinta del Pais (n=3)	20 ± 2	17 ± 1	3 ± 2	4 ± 0	8 ± 2	3 ± 0	7 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	1 ± 1	11 ± 2	5 ± 1
Cabernet-Sauv. (n=1)	22 ± 1	22 ± 2	8 ± 1	4 ± 0	4 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	1 ± 0	15 ± 1	3 ± 1
Garnacha (n=2)	22 ± 1	23 ± 2	4 ± 2	4 ± 1	8 ± 0	3 ± 1	5 ± 1	4 ± 0	3 ± 1	1 ± 0	5 ± 2	4 ± 1
Juan Garcia (n=1)	12 ± 4	21 ± 3	7 ± 1	3 ± 0	9 ± 1	2 ± 0	7 ± 1	6 ± 0	3 ± 0	2 ± 1	13 ± 2	5 ± 1
Malbec (n=1)	21 ± 1	24 ± 1	8 ± 1	3 ± 0	4 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	15 ± 1	5 ± 1
Prieto Picudo (n=1)	27 ± 2	9 ± 1	4 ± 0	5 ± 1	6 ± 1	3 ± 0	2 ± 0	3 ± 1	6 ± 1	1 ± 0	15 ± 1	8 ± 1
Mencia (n=1)	15 ± 1	19 ± 0	6 ± 1	4 ± 0	7 ± 1	3 ± 0	4 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	2 ± 0	15 ± 1	8 ± 1
Pinot noir (n=1)	32 ± 1	25 ± 1	1 ± 0	3 ± 1	5 ± 0	2 ± 0	3 ± 0	3 ± 0	4 ± 0	2 ± 0	8 ± 1	6 ± 1
Merlot (n=1)	33 ± 1	33 ± 1	12 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	15 ± 1	5 ± 0

Tableau 4: Distribution des flavan-3-ols dans les pépins de raisin des 17 variétés étudiées (86).

^a seulement les substances qui représentent plus de 1% sur l'aire sont représentées.

^b signifie +/- intervalle de confiance, n: nombre d'échantillons.

C: (+) catéchine; E: (-) épicatechine; EG: (-) épicatechine-3-O-gallate;

EEC: épicatechine-(4 β ,8)-épicatechine-(4 β ,8)-catéchine; E4: tétramère

épicatechine; Gall.: dérivés galloylés sauf (-)-épicatechine-3-O-gallate;

(4-6): dérivés à liaison interflavanolique (4 \rightarrow 6).

L'analyse des résultats obtenus avec les différentes variétés permet de relever plusieurs caractéristiques de la composition des pépins (28, 86):

-une présence presque exclusive de flavan-3-ols, avec également de l'acide gallique et des tanins hydrolysables.

- au total, 27 flavan-3-ols identifiés (tableaux 4 et 5).

-tous les oligomères sont du type "procyanidine".

-les esters galloylés apparaissent caractéristiques de la composition flavanolique des pépins de raisin, l'aire correspondant aux pics des dérivés galloylés représente 18% du total.

-l'analyse des extraits montre une répartition des composés flavanoliques en faveur des monomères (40%) avec une prédominance de (+)-catéchine par rapport à (-)-épicatechine.

-les dimères (28%) sont surtout présents avec des liaisons interflavaniques du type C4-C8, seuls 3% sont caractérisés par des liaisons C4-C6.

-le dimère B2 est la procyanidine la plus abondante, suivie des dimères aux liaisons C4-C8 ainsi que des trimères C1 et épicatechine-(4 β -8)-épicatechine-(4 β -8)-catéchine.

Le tableau suivant présente les 27 flavan-3-ols isolés des pépins de raisins (86).

Numéro du pic ^a	Composé
1	Catéchine-(4 α →8)-catéchine-(4 α →8)-catéchine (C2)
2	Catéchine-(4 α →8)-catéchine (B3)
3	Épicatechine-(4 β →8)-catéchine (B1)
4	(+)-Catéchine
5	Épicatechine-(4 β →8)-épicatechine-(4 β →8)-catéchine
6	Catéchine-(4 α →8)-épicatechine (B4)
7a	Catéchine-(4 α →8)-catéchine-(4 α →8)-épicatechine ^b
7b	Épicatechine-(4 β →6)-épicatechine-(4 β →8)-catéchine
8a	Catéchine-(4 α →6)-catéchine (B6)
8b	Épicatechine-(4 β →6)-épicatechine-(4 β →8)-épicatechine
9	Épicatechine-(4 β →8)-épicatechine (B2)
10	Épicatechine-(4 β →8)-épicatechine-3-O-gallate-(4 β →8)-catéchine
11	Épicatechine-3-O-gallate-(4 β →8)-épicatechine (B2-3-O-gallate)
12	(-)-Épicatechine
13	Catéchine-(4 α →8)-épicatechine-3-O-gallate (B4-3'-O-gallate)
14	Épicatechine-(4 β →8)-épicatechine-(4 β →6)-catéchine
15a	Épicatechine-3-O-gallate-(4 β →8)-catéchine (B1-3-O-gallate)
15b	Épicatechine-(4 β →8)-épicatechine-3-O-gallate (B2-3'-O-gallate)
16	Épicatechine-(4 β →6)-catéchine (B7)
17	Épicatechine-(4 β →8)-épicatechine-(4 β →8)-épicatechine (C1)
18	Épicatechine-(4 β →8)-épicatechine-(4 β →8)-épicatechine-(4 β →8)-épicatechine
19	(-)-Épicatechine-3-O-gallate
20	Épicatechine-3-O-gallate-(4 β →6)-catéchine (B7-3-O-gallate) ^b
21	Épicatechine-3-O-gallate-(4 β →8)-épicatechine-3-O-gallate (B2-3,3'-O-digallate)
22	Épicatechine-(4 β →8)-épicatechine-(4 β →8)-épicatechine-3-O-gallate
23	Épicatechine-(4 β →8)-épicatechine-3-O-gallate-(4 β →8)-épicatechine-3-O-gallate ^b
24	Épicatechine-(4 β →6)-épicatechine (B5)

Tableau 5: Flavan-3-ols isolés des pépins de raisins (86).

^a numéros fonction de l'ordre d'éluion, ^b flavan-3-ols identifiés pour la première fois dans des pépins de raisin lors de cette étude.

2-Deuxième technique d'extraction (78)

L'extraction décrite ici utilise des pépins de raisins Chardonnay issus de Pech Rouge (INRA, France 1989).

Les pépins sont d'abord séparés de la pulpe des raisins, puis ils sont séchés sous CO₂ pour éliminer l'eau de surface.

10 grammes de pépins sont placés dans un flacon avec 40 ml de méthanol, ils sont ensuite réduits en pulpe sous CO₂ à l'aide d'un mixer, puis conservés à -24°C pendant une nuit.

Par la suite, une centrifugation est réalisée à 3000 g, pendant 10 minutes.

Les surnageants sont conservés, les résidus sont extraits séquentiellement avec:

80% de méthanol à température ambiante pendant 4 heures.

50% de méthanol à température ambiante pendant 4 heures.

De l'eau distillée à -24°C pendant 15 heures.

75% d'acétone à température ambiante pendant 1 heure.

Les extraits sont ensuite mixés, le volume est porté à 250 ml.

Le méthanol est éliminé sous vide à 30°C, puis le volume des extraits est porté à 25 ml avec de l'eau distillée.

Les extraits obtenus de cette façon sont ensuite analysés, cette analyse se déroule en trois étapes.

Les différents composés phénoliques sont fractionnés puis analysés par HPLC et pour les cas litigieux, ceci est complété par une analyse par chromatographie couches minces.

-Fractionnement des composés phénoliques:

Il est réalisé grâce à 2 cartouches C18 SEP-PAK Waters connectées par un tube en caoutchouc. Cette méthode est utilisée pour des passages séquentiels de 10 ml de méthanol et de 2,5 ml d'eau distillée ajustés à pH 7 avec de la soude.

En premier lieu, un échantillon de 0,5 ml de l'extrait des pépins de raisins ajusté à pH 7 est injecté pour adsorber les phénols neutres.

Puis, 10 ml d'eau distillée ajustée à pH 7 sont passés sur les cartes pour éluer les composés phénoliques acides.

Les cartouches sont ensuite séchées sous N₂ et 10 ml d'acétate d'éthyle sont passés pour éluer les catéchines et les proanthocyanidines.

Les cartouches sont lavées en passant séquentiellement 2,5 ml d'eau distillée ajustée à pH 2, 2,5 ml d'acétonitrile à 16% ajustés à pH 2 et 10 ml de méthanol pour éluer les autres composés phénoliques et principalement les anthocyanes et les polymères.

La fraction acétate d'éthyle est séchée sous-vide à 30°C, le résidu est dissous dans 0,5 ml de méthanol à 50% puis stocké à 0°C.

-Analyse HPLC:

Cette analyse utilise un système de détection à barettes de diodes.

L'analyse chromatographique des solutions contenant la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine et les procyanidines B1, B2, B3, B4 et C1 offre une séparation convenable de ces substances.

Tous les spectres UV des pics ont une forme similaire et se trouvent dans la zone 250 à 400 nm, tous les maximums d'absorption se trouvent vers 277 nm et la pureté spectrale des pics est supérieure à 95%.

De manière à standardiser la méthode d'estimation quantitative des catéchines et des proanthocyanidines, les solutions des composés mentionnés ci-dessus sont injectées à des concentrations croissantes dans le chromatographe.

Les chromatogrammes des extraits de pépins Chardonnay montrent la présence de substances dont les caractéristiques chromatographiques et spectrales sont proches de celles des témoins.

La figure 23 représente les chromatogrammes obtenus entre 25 et 37 minutes et entre 37 et 63 minutes, selon les conditions données dans l'étude (78). Au total, au moins 22 pics sont présents.

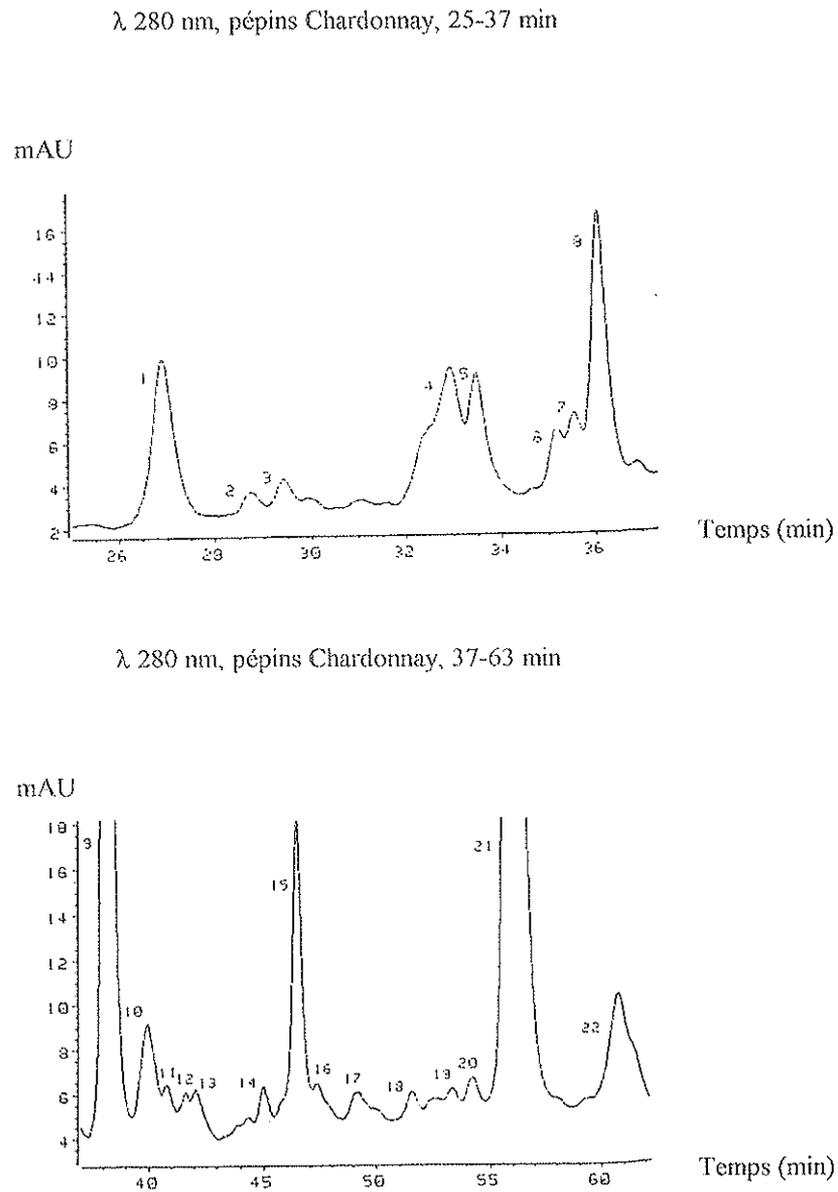


Figure 23: Chromatogrammes des pépins Chardonnay à 280 nm (78).

Les 4 pics majeurs, pics 8, 9, 15 et 21 sont respectivement assimilés à la procyanidine B1, la (+)-catéchine, la procyanidine B2 et la (-)-épicatéchine. Ces rapprochements sont réalisés par comparaison des temps de rétention et des spectres UV des pics et des témoins.

Ainsi, les spectres UV entre 250 et 400 nm de la (+)-catéchine, de la procyanidine B2 et des pics 9 et 15 sont présentés pour comparaison sur la figure 24: ces spectres sont proches.

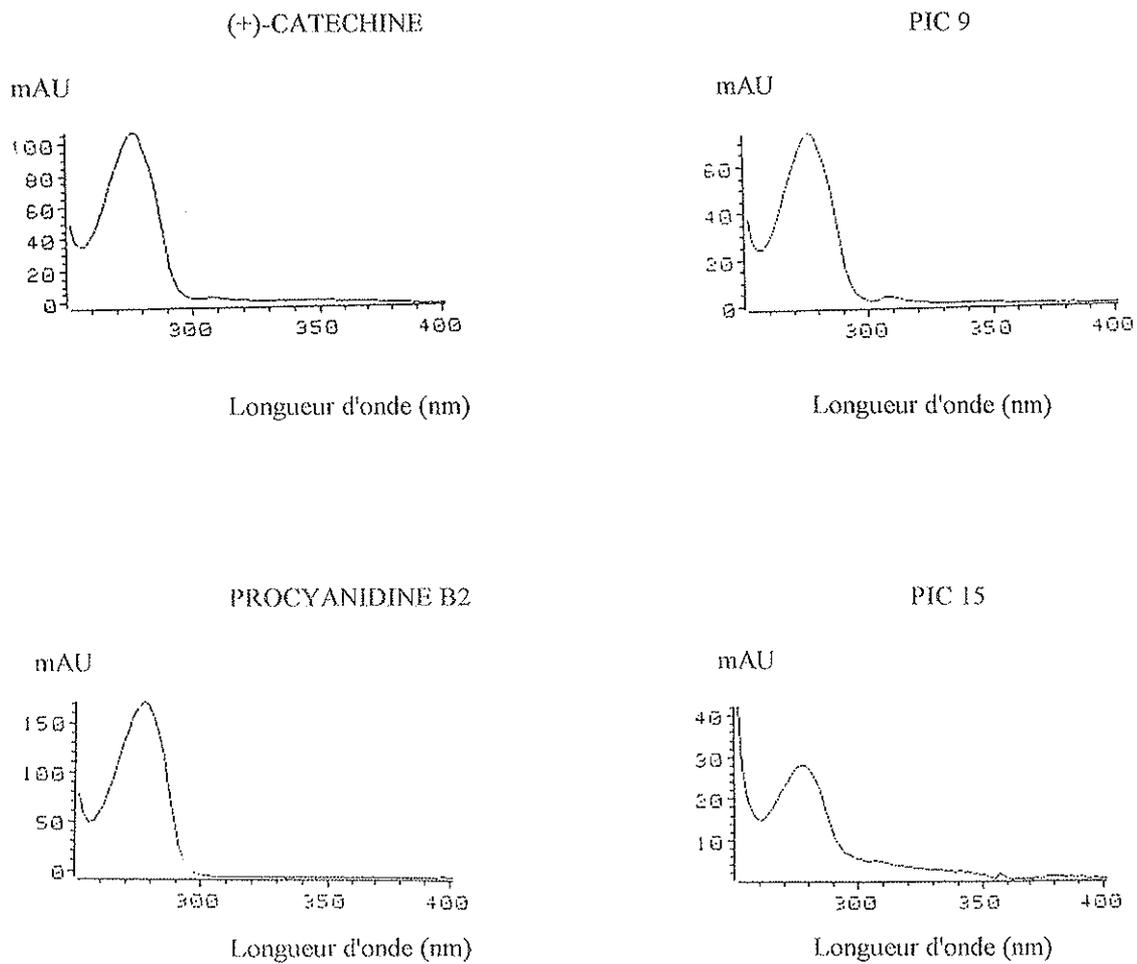


Figure 24: Spectres UV de la (+)-catéchine, de la procyanidine B2, du pic 9 et du pic 15 (78).

De même, les temps de rétention et les spectres des pics 4, 10 et 22 sont proches de ceux de la procyanidine B3, de la procyanidine B4 et de la procyanidine C1 et peuvent être assimilés à ces substances. La pureté de ces 7 pics est supérieure à 95%.

D'autres pics montrent des caractéristiques spectrales proches de celles des catéchines et des proanthocyanidines comme les pics 2 et 3 (figure 25). Pour ces deux pics on note un maximum proche de 280 nm, l'absence d'autre maximum à des longueurs d'ondes supérieures et la pureté spectrale des pics est supérieure à 90%.

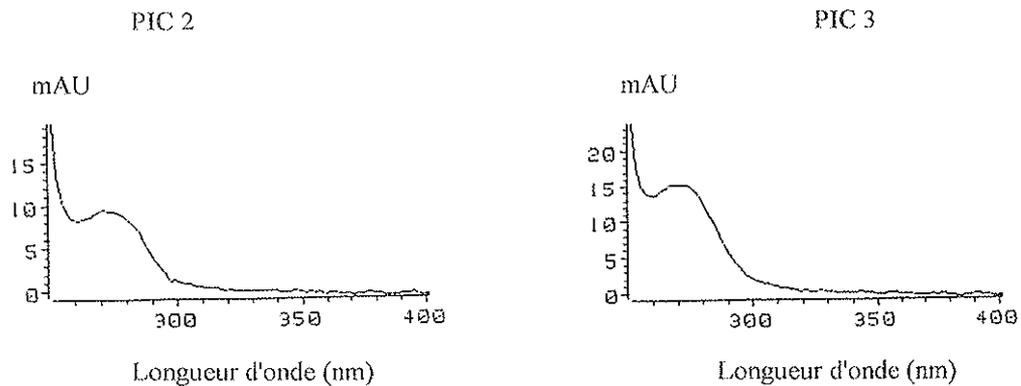


Figure 25: Spectres UV des pics 2 et 3 (78).

-Analyse par CCM:

Pour les cas douteux où les effluents correspondent à plusieurs pics sur les chromatogrammes, ces derniers sont collectés et leur comportement est suivi par un système CCM bi-dimensionnel cellulosique.

Le développement est basé sur l'utilisation des mélanges: *t*-butanol/acide acétique/eau (3:1:1 v/v) et eau/acide acétique (85:15 v/v).

Les composants sont détectés en pulvérisant les plaques avec une solution de vanilline à 1% dans de l'acide chlorhydrique concentré, ils apparaissent sous forme de taches roses.

L'analyse qualitative et quantitative des catéchines et des proanthocyanidines contenues dans les extraits de pépins Chardonnay, montre que ces extraits contiennent principalement des monomères. Les proanthocyanidines sont présentes à des taux plus faibles et la procyanidine C1 semble être la plus abondante, comme le montre le tableau 6.

La quantité totale des monomères et des proanthocyanidines des pépins de raisin Chardonnay, est d'environ 1%.

Substance	Valeur (mg/kg)
(+)-catéchine	3012
(-)-épicatéchine	4175
procyanidine B1	708
procyanidine B2	767
procyanidine B3	679
procyanidine B4	592
procyanidine C1	979

Tableau 6: Concentration en catéchines et proanthocyanidines des pépins Chardonnay (mg/kg) (78).

Les valeurs correspondent à la moyenne obtenue à partir de trois échantillons.

Les deux techniques utilisant le méthanol comme solvant d'extraction ne suivent pas le même schéma de fractionnement des composés flavanoliqes. Chaque méthode a ses avantages:

-la première technique d'extraction met en évidence l'importance de l'estérification et notamment celle de la galloylation qui permet de stabiliser les dérivés flavanoliqes en éliminant les groupements phénoliqes libres. L'inconvénient de cette technique, dans le cas où l'on veut l'appliquer à l'extraction des oligomères est qu'elle favorise l'obtention d'une majorité de monomères moins actifs que les oligomères.

-la deuxième technique d'extraction présence l'avantage de quantifier les oligomères.

Lors de l'étude utilisant la première méthode d'extraction, SANTOS-BUELGA, l'auteur de l'étude, a émis quelques hypothèses concernant la formation des oligomères flavanoliqes et les principes de la galloylation.

3-La formation des oligomères

Selon SANTOS-BUELGA, la formation des oligomères ne résulte pas d'une autocondensation des flavan-3-ols mais d'une addition séquentielle d'unités flavan-3,4-diols, sous leur forme réactive (carbocations), à un monomère flavan-3-ol qui agit comme unité terminale (ou unité d'initiation) (86).

Dans les variétés étudiées ici, l'unité d'extension des oligomères qui prédomine est l'épicatéchine, sur 24 procyanidines identifiées, seules 6 ont une catéchine dans leur unité d'extension.

Par contre, la catéchine est l'élément le plus abondant parmi les flavan-3-ols monomères et parmi les sous-unités d'initiation. Parmi ces 24 procyanidines, 11 ont la catéchine dans leur unité terminale, 8 ont l'épicatéchine, et 5 ont l'épicatéchine-O-gallate.

De plus, les pépins de raisin ayant des taux plus élevés du monomère (-)-épicatéchine présentent aussi des taux supérieurs de procyanidines avec ce composé comme unité d'initiation.

De même, les pourcentages élevés de procyanidols ayant la (+)-catéchine dans leur unité terminale sont généralement liés à de fortes concentrations en ce monomère.

Ces conclusions confirment les observations de certains auteurs sur le fait que les unités d'initiation (notamment les flavan-3-ols) et d'extension proviennent des différents pools métaboliques (86).

La méthode de condensation des unités pour former les oligomères des procyanidines n'est pas encore connue avec précision, les différentes hypothèses émises sur ce sujet sont les suivantes:

Certains auteurs tels que FERREIRA (34) et HASLAM (47) évoquent une synthèse biomimétique.

STAFFORD (96) considère que cette synthèse est réalisée *in vivo* grâce à des enzymes de condensation spécifiques de chaque carbocation. Dans les cas étudiés ici, cela expliquerait l'absence d'oligomères présentant de manière simultanée catéchine et épicatechine dans les unités d'extension.

HASLAM (47) émet un doute vis à vis du contrôle enzymatique direct de la condensation, en considérant l'étroite corrélation qui existe entre les produits formés *in vivo*, et ceux obtenus par synthèse biomimétique réalisée exclusivement sous contrôle thermodynamique.

Au contraire, si cette hypothèse est acceptée, deux points doivent être pris en compte pour justifier le déséquilibre observé entre les unités catéchine et épicatechine, entre les unités d'initiation, les unités d'extension et les monomères.

Le premier point est que la synthèse des monomères et des oligomères peut être faite en des lieux et à des moments différents.

Le deuxième point à considérer est que les carbocations épicatechines ont une tendance plus forte à être stabilisés par liaison avec un autre flavane plutôt que d'évoluer en monomères.

4-Les principes de la galloylation

Les principes de la galloylation sont encore mal connus, cependant plusieurs points peuvent être dégagés grâce à l'étude de SANTOS-BUELGA (86).

Jusqu'à présent, aucun précurseur galloylé des procyanidines n'a été identifié ce qui indique que l'acylation apparaît plus tard que la formation des structures flavan-3-ols.

Dans l'étude évoquée, la galloylation apparaît toujours sur l'épicatechine suggérant une grande spécificité des enzymes estérifiantes (86).

D'après cette étude, les dimères peuvent présenter un groupement gallate à n'importe quelle position, cependant aucun trimère galloylé dans leur sous-unité supérieure n'a été retrouvé.

Ces constatations suggèrent que:

-l'estérfication apparaît préférentiellement sur les composés monomères et sur les sous-unités supérieures des dimères préformés.

-les trimères galloylés sont formés par extension des dimères préalablement galloylés.

La figure 26 présente une proposition de biosynthèse des esters galliques de procyanidines.

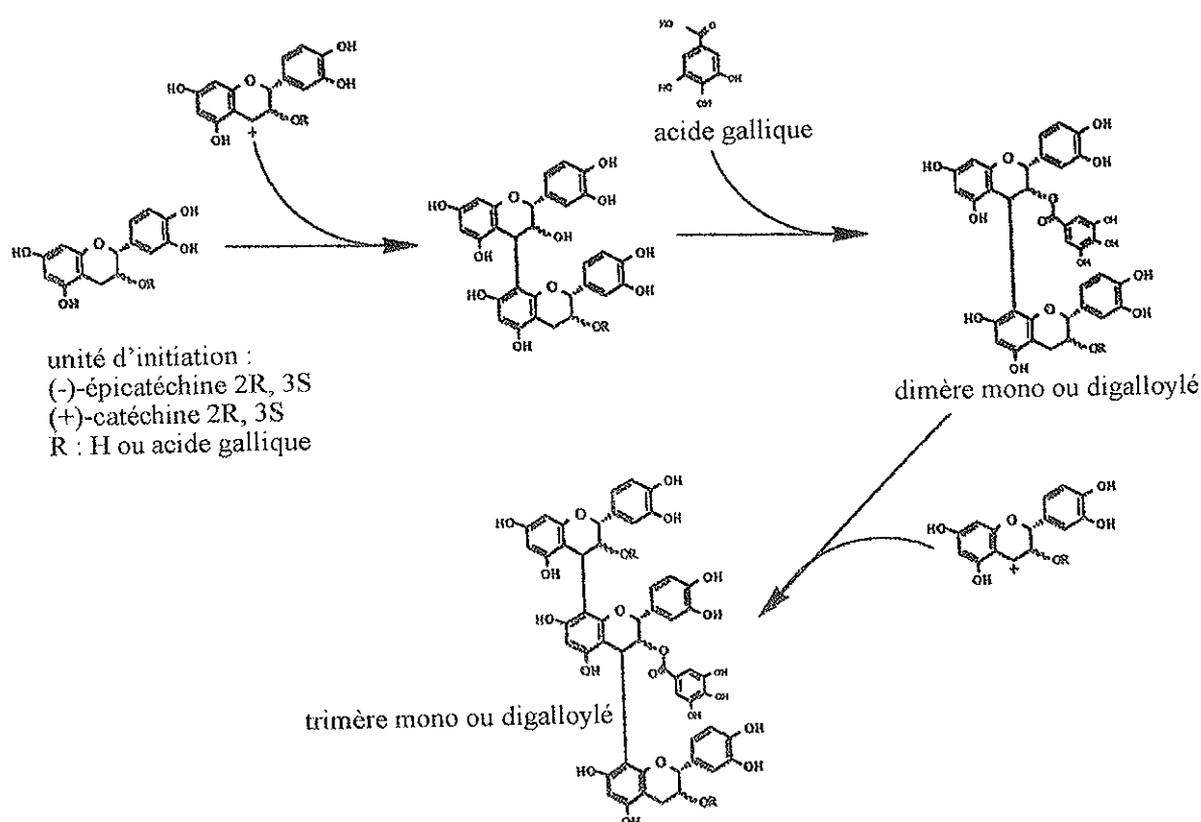


Figure 26: Proposition de biosynthèse d'esters galliques de procyanidines (86).

Les unités d'initiation qui sont des monomères flavan-3-ols peuvent être la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine ou la (-)-épicatéchine-3-O-gallate. A partir d'une unité d'initiation, il y aurait formation d'un dimère par addition d'un carbocation considéré comme unité d'extension, cette unité d'extension peut-être soit la catéchine soit l'épicatéchine. Sur le dimère formé, la galloylation pourrait se faire soit sur l'unité terminale, soit sur l'unité supérieure.

Dans cette proposition, deux suppositions ont été faites:

- l'estérification n'arrive jamais avant l'incorporation du carbocation (unité d'extension).
- la croissance de la molécule apparaît toujours par incorporation d'unités non galloylées.

Dans la figure 26, le trimère terminal a son unité supérieure prête à être galloylée, cependant comme mentionné auparavant aucun trimère ainsi estérifié n'a été retrouvé.

Ceci peut être interprété comme étant la preuve qu'une possibilité de galloylation sur les trimères est peu vraisemblable ou impossible, ce qui est probablement dû à leur taille qui empêche la liaison des enzymes estérifiantes sur leur site actif.

Pour conforter cette hypothèse, les auteurs ont précisé qu'il existe des trimères non galloylés dans les pépins de raisin en quantité équivalente, voire supérieure, aux dimères majoritaires. Ainsi, si leur galloylation était possible directement, la probabilité d'obtenir des trimères estérifiés sur une de leurs sous-unités serait équivalente à celle d'en obtenir à partir des dimères correspondants.

Une autre hypothèse peut être avancée, pour justifier la biosynthèse des procyanidines galloylées et pour expliquer l'absence des trimères estérifiés sur leur sous-unité supérieure.

En effet, il a été présumé que d'une part, l'incorporation du groupe acyl sur la molécule de procyanidine se fait de manière séquentielle et que d'autre part, les sous-unités supérieures sont les dernières à être estérifiées.

Si l'on considère qu'il existe de faibles quantités de trimères galloylés et digalloylés dans les pépins de raisin, il est logique de présumer que les concentrations des triesters correspondants, s'ils existent, sont très faibles expliquant le fait qu'ils soient pour l'instant indétectables.

Cependant, l'existence de quantités notables de dimère B2-3-O-gallate dans lequel la sous-unité inférieure n'est pas galloylée, semble être en désaccord avec l'hypothèse d'une amorce de galloylation séquentielle à partir de la sous-unité inférieure, et peut faire apparaître la première hypothèse comme plus réalisable (86).

II- METHODE UTILISANT DES MELANGES HYDROALCOOLIQUES

Une autre méthode d'extraction des catéchines et des proanthocyanidines fait appel à des mélanges hydroalcooliques, de manière à éviter l'utilisation de solvants organiques considérés comme nocifs pour la santé.

Une étude a été réalisée en 1989, à partir d'échantillons de pépins issus d'une cellule expérimentale de l'INRA, Pech Rouge, en France (77).

Plusieurs variétés de pépins de raisins sont utilisées, le Chardonnay, l'Alicante-Bouschet et un hybride de 3 espèces cultivées (Aramon, Teinturier, Grenache).

L'extraction est réalisée soit avec un mélange hydro-alcoolique pur, soit associé à de l'acide tartrique pour optimiser le rendement.

1-Extraction

Les pépins sont d'abord séparés des peaux et des rafles des raisins, puis ils sont nettoyés sur un papier filtre humide, séchés sous CO₂ et conservés à une température inférieure à 5°C.

L'extraction des catéchines et des proanthocyanidines diffère selon les variétés des pépins.

Ici nous considérons le cas des pépins issus de la variété Alicante-Bouschet et ceux de la variété Chardonnay, dans les deux cas environ 10 grammes de pépins sont placés dans un récipient en verre avec le volume défini de solvant.

2-Analyse

Après l'extraction, les échantillons sont centrifugés à 3000 g pendant 10 minutes.

Une part aliquote de 10 ml est désalcoolisée sous vide à 3°C, à l'aide d'un évaporateur rotatif.

Le résidu aqueux est ajusté à pH 7 avec NaOH puis dilué jusqu'à 20 ml avec de l'eau distillée.

L'analyse est faite par HPLC à 280 nm et la détermination des catéchines et des proanthocyanidines est faite en utilisant des témoins de (+)-catéchine, de (-)-épicatéchine et des procyanidines B1, B2, B3, B4 et C1.

-Pour les pépins issus de la variété Alicante-Bouschet, l'extraction se fait avec des solutions aqueuses contenant 20, 40, 60 et 95% d'éthanol sur des périodes de 3, 6 ou 12 heures à température ambiante (environ 20°C).

Les résultats d'extraction sont donnés dans le tableau 7.

éthanol (%)	temps (heures)	CAT	EPI	B1	B2	B3	B4	C1
20	3	48	62	18	31	7	14	14
	6	184	250	73	96	35	48	95
	12	275	337	141	154	80	95	227
40	3	63	63	19	34	8	26	19
	6	289	374	122	206	73	152	228
	12	396	575	161	314	111	181	385
60	3	86	117	29	52	21	40	29
	6	328	493	147	279	89	189	341
	12	450	614	177	385	142	218	474
95	3	406	462	114	256	68	124	283
	6	451	618	200	453	126	235	516
	12	471	730	238	509	164	262	609

Tableau 7: Extraction des catéchines et des proanthocyanidines des pépins d'Alicante-Bouschet par des mélanges eau/éthanol (77).

Les résultats correspondent à la moyenne obtenue avec trois essais et

ils sont exprimés en mg/kg, CAT: (+)-catéchine ; EPI: (-)-épicatéchine ;

B1: procyanidine B1 ; B2: procyanidine B2 ; B3: procyanidine B3 ;

B4: procyanidine B4 ; C1: procyanidine C1.

Les valeurs du tableau 7 indiquent que l'extraction est plus efficace lorsque le temps d'extraction et la concentration en éthanol augmentent, mais l'évolution n'est pas toujours linéaire.

En effet, l'extraction est très faible pour les 3 premières heures d'extraction, sauf avec 95% d'éthanol puis elle augmente fortement entre 3 et 6 heures et de manière plus progressive entre 6 et 12 heures.

Ces variations peuvent s'expliquer par les temps de contact entre les pépins et le solvant et par l'effet de saturation du solvant.

Les tubes d'extraction n'étant pas changés, un état d'équilibre peut être atteint au bout d'un certain temps. Le rapport entre l'augmentation d'extraction entre 3 et 6 heures et l'augmentation d'extraction de la période 6-12 heures peut être utilisé comme index d'apparition de cet état d'équilibre.

Ainsi, ces constatations permettent de dire que l'efficacité d'extraction des catéchines et des proanthocyanidines réalisée à partir des pépins Alicante-Bouschet peut être considérée comme étant fonction du temps de contact d'une part et de la richesse en éthanol du solvant d'autre part.

-Pour les pépins de la variété Chardonnay, les solutions aqueuses contiennent 8, 10 ou 12% d'éthanol additionné à de l'acide tartrique (4, 6 ou 8 g/l), sur des périodes de 7, 10 ou 14 jours à température ambiante.

Les résultats d'extraction obtenus avec les pépins de raisin Chardonnay montrent que l'extraction est fonction:

- du degré alcoolique,
- de la concentration en acide tartrique de la solution,
- de la durée de contact entre les pépins et le solvant.

L'effet du degré alcoolique est étudié à l'aide d'une série d'expériences menée sur 7 jours, avec des solutions contenant 4 g/l d'acide tartrique et 8, 10 ou 12% d'éthanol.

Les résultats d'extraction des 4 composés majeurs ((+)-catéchine, (-)-épicatéchine, procyanidine B1, procyanidine B2) sont similaires (figure 27).

L'analyse des résultats montre que pour les 4 composés, la quantité extraite augmente avec le degré alcoolique des solutions.

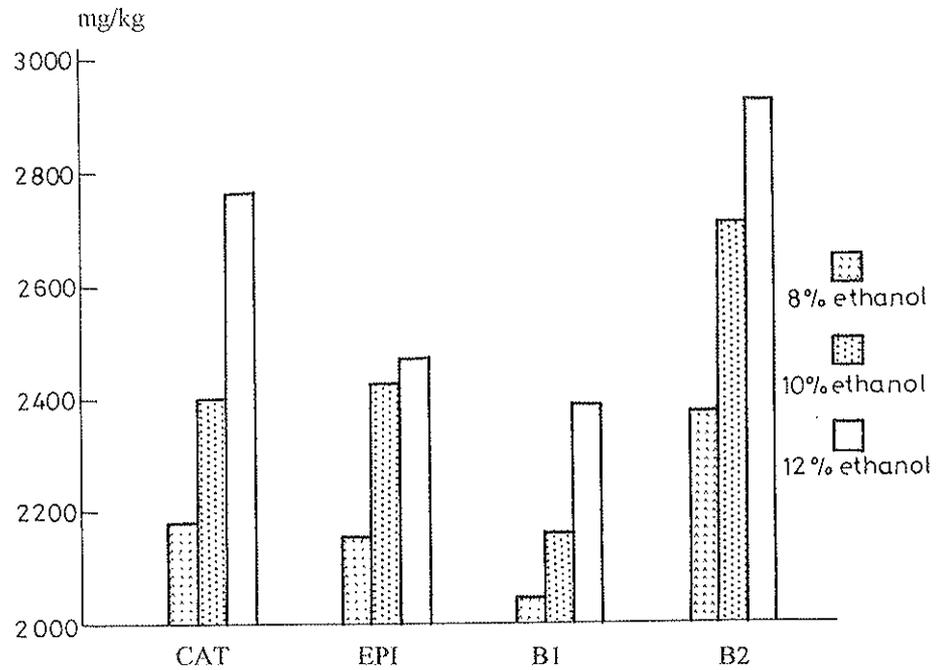


Figure 27: Influence du degré alcoolique sur le taux d'extraction (77).

De même, l'effet de la concentration en acide tartrique de la solution est étudié. L'extraction est menée sur 7 et 10 jours avec des solutions contenant 8% d'éthanol et des quantités différentes d'acide tartrique.

Les résultats obtenus pour la (-) épicatechine et la procyanidine B2 sont présentés sur la figure 28, ils montrent que l'augmentation de la quantité extraite est liée à l'augmentation de la concentration en acide tartrique.

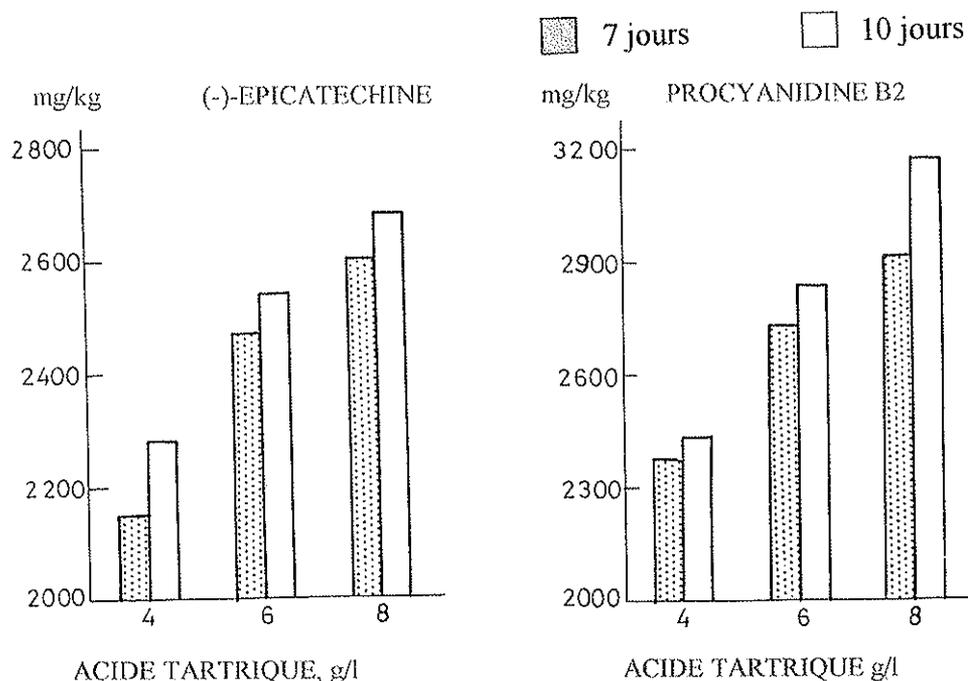


Figure 28: Extraction de (-)-épicatéchine et de procyanidine B2 à partir des pépins Chardonnay en utilisant des solutions contenant 8% d'éthanol et des quantités différentes d'acide tartrique sur 7 et 10 jours (77).

Le dernier effet étudié est l'effet de la durée de contact entre les pépins de raisin et le solvant. L'expérience menée avec des concentrations variables en acide tartrique et décrite ci-dessus a permis également d'observer si la durée de contact intervient dans les différences d'extraction.

La conclusion est que, entre 7 et 10 jours de contact, aucune différence significative n'a été notée (figure 28).

Des expériences supplémentaires ont été menées sur 14 jours avec des compositions variables de solvant. D'une manière générale, les quantités extraites de catéchines et de procyanidines après 14 jours sont inférieures à celles obtenues après 7 et 10 jours de contact.

Cette constatation peut être la conséquence de réactions de condensation, mais ceci n'est qu'une hypothèse proposée par les auteurs (77).

Les résultats de ces différentes expériences montrent que l'efficacité de l'extraction est augmentée par un degré alcoolique et une concentration en acide tartrique plus élevés, mais par contre un temps de contact plus long n'est pas bénéfique.

III-METHODES UTILISANT DES SOLVANTS ORGANIQUES

Plusieurs méthodes d'extraction sont basées sur l'utilisation de solvants organiques tels que l'acétate d'éthyle ou l'acétone, ou sur l'utilisation de mélanges de solvants organiques avec de l'eau (61, 72, 73, 108).

Les extractions des proanthocyanidines obtenues avec le mélange acétone/eau sont souvent présentées comme étant les plus efficaces. Cependant, ces extractions ne sont pas souvent très sélectives et les procédés de purification sont difficiles et diminuent les taux extraits des proanthocyanidines.

L'étude décrite ci-après compare les extractions menées avec l'acétate d'éthyle ou avec le mélange acétone/eau et analyse l'effet des taux d'humidité utilisés pendant les expériences, sur les résultats d'extraction.

Ces derniers ont montré que l'utilisation des pépins de raisins concassés diminue le temps d'extraction mais également la sélectivité des produits extraits, aussi, dans cette étude les pépins utilisés sont entiers (73).

1-Etude de l'influence du taux d'humidité sur l'extraction

L'acétate d'éthyle utilisé seul ne permet pratiquement pas d'extraire les proanthocyanidines des pépins de raisins. Ceci est la conséquence de la faible perméabilité des tissus des pépins envers l'acétate d'éthyle, solvant peu polaire.

L'ajout d'eau à l'acétate d'éthyle augmente le rendement de l'extraction car elle augmente la perméabilité tissulaire et favorise le transport des substances par diffusion moléculaire.

La figure 29 présente les résultats d'extraction obtenus avec l'acétate d'éthyle et différentes concentrations en eau (73).

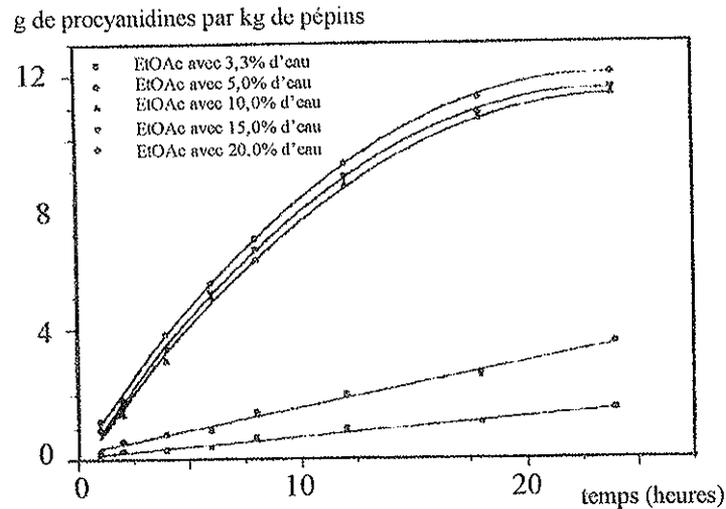


Figure 29: Influence de la concentration en eau dans la fraction de l'acétate d'éthyle sur le taux et le temps d'extraction des procyanidines (73).

L'analyse de cette figure montre que l'augmentation du taux des proanthocyanidines extraites avec de l'acétate d'éthyle saturé en eau (3,3% d'eau) ou avec un mélange acétate d'éthyle/eau (95:5) est linéaire. Par contre, après 24 heures d'extraction, le taux obtenu avec acétate d'éthyle/eau (95:5) est 2,3 fois plus élevé que celui obtenu avec l'acétate d'éthyle saturé en eau.

Les courbes de cinétique d'extraction obtenues avec l'acétate d'éthyle et des concentrations en eau de 10, 15 ou 20% ont une forme parabolique. La première partie est linéaire (jusqu'à 8 h d'extraction), puis la pente s'accroît ce qui correspond à une baisse d'extraction. Ensuite, la pente ainsi que l'extraction des proanthocyanidines se stabilisent et la courbe se termine par une asymptote.

Les quantités extraites avec les mélanges acétate d'éthyle/eau (85:15) ou acétate d'éthyle/eau (80:20) sont similaires aux temps respectifs 7,5 et 7,6. Par contre, les quantités des proanthocyanidines obtenues après 24 heures d'extraction avec le mélange acétate d'éthyle/eau (90:10) sont 73 fois plus élevées que celles obtenues avec l'acétate d'éthyle saturé en eau.

La forte augmentation d'extraction obtenue avec l'acétate d'éthyle et des concentrations croissantes en eau peut s'expliquer par une augmentation de perméabilité des pépins qui se réalise jusqu'à ce que le solvant soit entièrement saturé en eau.

En se basant sur le fait que l'acétate d'éthyle est saturé avec 3,3% d'eau, et que les pépins saturés en contiennent 33-35%, on peut conclure que le système d'extraction acétate d'éthyle/eau/pépins est saturé en eau lorsque le solvant est le mélange acétate d'éthyle/eau (90:10).

Une concentration supérieure en eau dans le solvant (15 ou 20%) fournit seulement une faible augmentation du rendement de l'extraction (2 à 3%). Par contre la sélectivité de l'extraction est alors très affaiblie, car la présence "d'eau libre", solvant très polaire, conduit à l'extraction de quantités importantes de substances concomitantes.

Pour préciser les données concernant l'effet de l'eau sur le taux d'extraction des proanthocyanidines, des études ont été menées avec différents taux d'humidité et en utilisant l'acétate d'éthyle sans addition d'eau.

Pour obtenir les pépins de raisins avec différents taux d'humidité, des pépins frais ont été séchés en fines couches à température ambiante (22°C). Les taux d'humidité des pépins ont été définis avant séchage et après chaque jour d'extraction, à la même heure, jusqu'à 4 jours de séchage.

Les résultats obtenus après 8 heures d'extraction des pépins séchés à différents stades sont présentés dans le tableau 8. Ils confirment qu'une extraction menée avec un taux maximal d'humidité permet d'obtenir un taux inférieur de proanthocyanidines qu'une extraction menée avec le mélange acétate d'éthyle/eau (90:10).

L'analyse du tableau 8 montre aussi que les quantités extraites de proanthocyanidines diminuent fortement lorsque le taux d'humidité des pépins diminue.

	Concentration en eau dans l'acétate d'éthyle (%)		Taux d'humidité dans les pépins (%)		
	33,2 (0) ^a	19,2 (1)	11,8 (2)	7,5 (3)	6,1 (4)
	Taux de proanthocyanidines des pépins (g/kg)				
0	3,196	1,146	0,160	0,123	0,113
10	5,360	5,226	5,210	5,228	4,980

Tableau 8: Résultats d'extraction des pépins avec différents taux d'humidité (temps d'extraction 8 heures) (73).

^a les chiffres entre parenthèses correspondent aux temps de séchage des pépins (en jours).

2-Schéma d'extraction (73, 79)

2-1-Avec de l'acétate d'éthyle

100 g de pépins de raisin sont extraits par 400 ml d'acétate d'éthyle contenant 10% d'eau dans des récipients de 1 litre, durant 24 heures, sous agitation.

L'extrait est ensuite séparé par décantation, séché avec 20 g de sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄) et environ 90% du solvant est éliminé par évaporation sous pression réduite.

L'extrait est repris avec 1/5ème de volume d'éther de pétrole, il se forme un précipité qui est séparé par filtration puis séché dans une cuve de dessiccation.

Cette extraction conduit à une préparation brute de proanthocyanidines (CP-PRO).

2-2-Avec le mélange eau/acétone

Les pépins sont extraits de la même manière en utilisant un mélange acétone/eau (2/3) comme solvant.

Après 24 heures d'agitation, l'extrait est séparé par décantation et l'acétone est éliminé par distillation sous pression réduite.

La solution aqueuse est refroidie 3 heures à +4°C, il se forme un précipité qui sera éliminé par centrifugation. A cette solution est ajouté du chlorure de sodium (NaCl) à raison de 40 g pour 100 ml. Après dissolution du NaCl, suivi d'un refroidissement (3 heures à +4 °C), le surnageant est séparé du précipité par centrifugation puis il subit un partage liquide/liquide avec de l'acétate d'éthyle.

La phase organique est séchée avec 20 g de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) puis la procédure est identique à celle utilisant l'acétate d'éthyle.

Cette extraction conduit à une préparation purifiée de proanthocyanidines (PP-PRO).

L'extrait sec (PP-PRO ou CP-PRO) est dissous dans du méthanol et la concentration en proanthocyanidines est ensuite déterminée par analyse spectrophotométrique ou par HPLC.

L'analyse spectrophotométrique utilise un réactif à la vanilline préparé extemporanément en mélangeant à volume égal une solution de méthanol contenant 30% d'acide sulfurique (H_2SO_4) et une solution de méthanol renfermant 1% de vanilline.

L'extrait sec (CP-PRO ou PP-PRO) dissous dans du méthanol est mis en présence avec le réactif à la vanilline et l'absorbance est mesurée après 5 minutes à 510 nm.

La concentration totale en proanthocyanidines est déterminée sur la base des absorbances mesurées ainsi que sur l'utilisation d'un graphe témoin obtenu en utilisant la (+) catéchine.

L'analyse par HPLC est réalisée sur une colonne C18 (phase inverse), en utilisant un gradient linéaire d'acide acétique à 10% (solvant A) dans de l'eau (solvant B) comme le montre le tableau 9.

Temps (min)	Débit (ml/min)	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	0,8	10	90
47	0,8	82	18
55	0,8	100	0
65	0,8	100	0
70	0,8	10	90

Tableau 9: Gradient linéaire utilisé dans l'analyse HPLC des catéchines et des proanthocyanidines (73).

La quantification des catéchines et des proanthocyanidines est basée sur un protocole utilisant un témoin externe. Les catéchines et les proanthocyanidines sont identifiées à l'aide de leurs temps de rétention déterminés auparavant (79).

Les taux de proanthocyanidines, leurs compositions qualitatives et quantitatives déterminés par ces méthodes sont résumés dans le tableau suivant.

	teneur en g/kg de pépins		PRO en g/100 g de préparation	concentration relative %						
	Préparation	PRO totales		C	E	B1	B2	B3	B4	C1
CP-PRO	11,03	5,18	47,0	35,7	24,7	9,6	11,7	1,8	4,3	12,7
PP-PRO	4,77	2,67	56,0	29,1	21,8	3,3	13,0	4,5	2,9	25,5

Tableau 10: Tableau comparatif des proanthocyanidines extraites par de l'acétate d'éthyle (CP-PRO) et le mélange eau/acétone (PP-PRO) (73).

PRO: proanthocyanidines ; C: (+)-catéchine ; E: (-)-épicatéchine ; B: dimères ;

C1: trimère.

Le taux des proanthocyanidines totales obtenu avec l'acétate d'éthyle (CP-PRO) est 1,9 fois plus élevé que celui obtenu avec le mélange acétone/eau (PP-PRO).

Cette constatation est liée à la procédure complexe de purification réalisée avec le mélange acétone/eau qui conduit à des pertes successives de proanthocyanidines, mais qui ne permet pas d'obtenir une pureté finale supérieure à celle obtenue avec l'acétate d'éthyle.

Ceci est confirmé par les chromatogrammes obtenus après HPLC (figure 30). Les spectres ne diffèrent que dans leur partie initiale (TR: 9 mn) et leur partie finale (TR: 37 mn), ce qui correspond aux flavan-3-ols de hauts poids moléculaires (tétra et pentamères) qui sont présents dans PP-PRO mais pas dans CP-PRO.

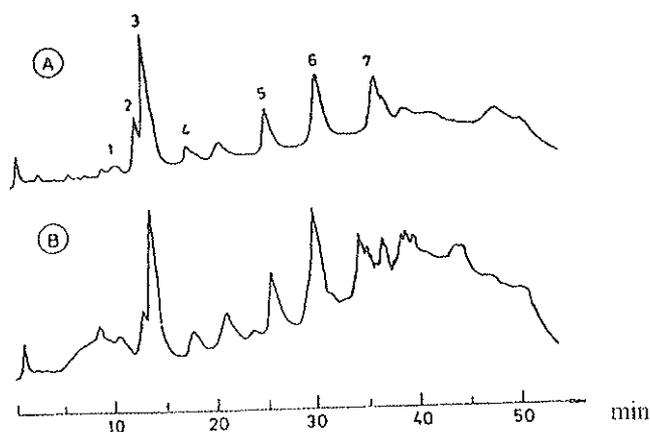


Figure 30: Chromatogrammes des préparations de proanthocyanidines à 280 nm (73).

- (A) CP-PRO ; (B) PP-PRO ; (1) procyanidine B3 ; (2) procyanidine B1 ;
 (3) (+)-catéchine ; (4) procyanidine B4 ; (5) procyanidine B2 ; (6) (-)-épicatéchine ;
 (7) procyanidine C1.

Les concentrations relatives en flavan-3-ols sont également différentes dans ces préparations (tableau 10). En effet, la concentration en monomères totaux est supérieure de 8,9% dans CP-PRO, celle du dimère B₁ est supérieure de 3,7% et celle du trimère est inférieure de 12,3% par rapport aux concentrations obtenues dans PP-PRO.

La présence de proanthocyanidines de haut poids moléculaire dans PP-PRO peut paraître étrange puisque la dernière étape de leur obtention est basée sur l'extraction d'une solution aqueuse par de l'acétate d'éthyle. En fait, ceci est réalisé grâce au chlorure de sodium qui sature la solution aqueuse, ce qui provoque un changement de distribution des proanthocyanidines entre les phases aqueuse et organique.

Cette étude a donc montré qu'entre le mélange acétate d'éthyle/eau et le mélange acétone/eau, le premier avec un rapport 90/10 permet de réaliser une extraction optimale et sélective des flavan-3-ols des pépins de raisins, avec les monomères, les dimères et les trimères.

Il existe de nombreuses méthodes de préparation des extraits d'oligomères flavanoliques, on peut citer par exemple plusieurs brevets: FR-A-1 427 100, FR-A-2 092 743, FR-A-2 372 823, FR-A-2 643 073, US-A-4 698 360, EP-A-348 781, en plus des méthodes citées auparavant.

Les extraits obtenus contiennent souvent des taux non négligeables de monomères moins actifs que les oligomères, de polymères dont les propriétés sont très différentes de celles des oligomères et souvent de produits phytosanitaires dont la présence est inacceptable dans des préparations destinées à des fins pharmaceutiques ou cosmétiques.

Il est donc intéressant de trouver des méthodes de préparation qui permettent à la fois de limiter la présence des monomères et des polymères et d'éliminer les produits phytosanitaires (72).

B- METHODES D'EXTRACTION DES BREVETS

I-METHODES PERMETTANT DE LIMITER LE TAUX DES MONOMERES

Plusieurs méthodes ont été mises en oeuvre dans le but de limiter le taux des monomères, toutefois certaines sont coûteuses et ne tiennent pas compte des produits phytosanitaires qui peuvent être présents.

Nous pouvons citer le brevet EP-A-348 781, procédé de traitement d'un extrait de pépins de raisins permettant de limiter le taux des monomères à un pourcentage très faible (inférieur à 1%).

Ce résultat est obtenu soit par ultrafiltration d'un concentré aqueux sur membrane tubulaire, soit par ultrafiltration, suivie d'une extraction du filtrat par l'acétate d'éthyle après concentration par osmose inverse.

D'autres techniques réussissent à la fois à contrôler le taux des monomères, à éliminer les polymères et à réduire au maximum la présence des produits phytosanitaires.

Nous pouvons citer, par exemple, les brevets EP-0 692 480 A1 (72) et 9307140 (108) dont les méthodes d'élimination des polymères sont basées sur des techniques de précipitation par du chlorure de sodium à saturation.

Ce procédé d'extraction des fractions oligoprocyanidoliques (OPC) est réalisé à partir de la matière végétale, par une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium.

L'extraction est basée sur une double opération, une extraction par un solvant des oligomères (acétate d'éthyle) et une précipitation des OPC par un solvant chloré (chloroforme, chlorure de méthylène) ajouté en excès.

Après filtration, le précipité est repris par de l'acétate d'éthyle puis soumis à une purification supplémentaire par des cycles successifs de reprécipitation par du chloroforme en excès, reprise par de l'acétate d'éthyle.

A la fin le solvant est évaporé.

Les différentes étapes de ce schéma d'extraction sont les suivantes (72, 108):

Le végétal, broyé ou non, est extrait pendant un temps très court par de l'eau chaude à une température comprise entre 75 et 85°C.

Les tanins de la phase aqueuse sont précipités par addition d'un sel minéral, de préférence le chlorure de sodium. La précipitation est effectuée à une température comprise entre 60 et 80°C. Le précipité est éliminé par filtration, réalisée sous pression et à température ambiante.

Le filtrat salé est traité par de l'acétate d'éthyle, solvant organique polaire susceptible de dissoudre préférentiellement les oligomères. La phase organique est ensuite concentrée sous pression réduite puis reprise avec de l'eau distillée.

L'acétate d'éthyle restant est éliminé par évaporation sous pression réduite. Cette étape, réalisée à une température comprise entre la température ambiante et 50°C, permet d'obtenir un extrait aqueux.

La phase aqueuse est lavée au moins une fois avec un solvant chloré, non miscible à l'eau et susceptible de dissoudre les produits phytosanitaires. Il peut s'agir du chloroforme ou du chlorure de méthylène.

Le solvant chloré est ensuite éliminé par évaporation sous pression réduite, à une température ne dépassant pas 50°C et le concentré aqueux est séché par lyophilisation. Ce séchage permet d'obtenir un extrait qui peut être commercialisé tel quel ou qui peut subir un traitement supplémentaire destiné à réduire encore le taux des monomères.

Ce traitement peut correspondre à une précipitation ou à une extraction solide/liquide, il permet d'obtenir un extrait purifié avec un taux contrôlé en monomères.

1- Traitement supplémentaire par précipitation

L'extrait est dissous dans une quantité minimale d'acétate d'éthyle pour dissoudre les oligomères.

La solution est filtrée, puis un grand volume de solvant chloré est ajouté de manière à précipiter les oligomères. Cette étape est réalisée à température ambiante.

Le précipité est filtré, séché à une température inférieure à 40°C, afin d'obtenir un extrait purifié avec une teneur minimale en monomères.

2- Traitement supplémentaire par extraction solide/liquide

Cette méthode est basée sur un traitement continu ou discontinu de l'extrait par un mélange de 2 solvants organiques l'acétate d'éthyle qui dissout les oligomères et le chloroforme ou le chlorure de méthylène pour les précipiter.

La proportion utilisée entre les deux solvants dépend du taux de monomères accepté.

Le produit insoluble obtenu est séché à une température inférieure à 40°C, conduisant à l'extrait purifié avec un taux contrôlé en monomères.

3-Exemple de mise en oeuvre de ce procédé d'extraction (72)

1 kg de pépins de raisins secs non broyés, sont mis en suspension dans 5 litres d'eau contenant du bisulfite de sodium. Le mélange est porté à l'abri de la lumière, à 80°C. La température est maintenue pendant 30 minutes.

Le mélange est filtré à chaud, saturé en chlorure de sodium, puis laissé revenir à température ambiante. Le précipité riche en tanins est filtré, le filtrat limpide est épuisé par de l'acétate d'éthyle (volume: 1/3 de la phase aqueuse).

La phase organique est concentrée sous pression réduite, sans dépasser 40°C, jusqu'à un taux de matières sèches de 20%.

Le concentré est repris par de l'eau distillée (2 fois le volume), puis le mélange est concentré sous vide jusqu'à élimination totale de l'acétate d'éthyle.

La phase aqueuse est lavée 3 fois par du chloroforme exempt de pesticides, puis elle est concentrée sous vide pour éliminer le chloroforme, jusqu'à un taux de matières sèches de 30%.

Le concentré obtenu est séché par nébulisation, le nébulisat est ensuite mis en suspension dans un mélange acétate d'éthyle/chloroforme (7/3), maintenu à 50°C sous agitation, pendant une heure.

Le mélange chaud est filtré sous pression, puis le solide est séché.

Le filtrat ne contient que de la (+)-catéchine et de la (-)-épicatéchine.

Un tel procédé d'extraction limite le taux des monomères, comme le brevet évoqué auparavant (EP-A-348 781), mais a l'avantage par rapport à ce dernier d'éliminer les produits phytosanitaires de l'extrait de manière à pouvoir utiliser celui-ci à des fins thérapeutiques ou cosmétiques.

Par contre, ces méthodes présentent l'inconvénient de provoquer des relargages massifs de solutions salines dans l'environnement et elles ne permettent pas de récupérer les tanins comme sous-produits.

II-METHODE PERMETTANT D'ELIMINER LES POLYMERES

La technique développée dans le brevet 0384796 A1, permet d'obtenir un extrait riche en oligomères flavanoliques tout en évitant les inconvénients cités auparavant (61).

Le solvant utilisé pour l'extraction est l'eau, elle est choisie pour ses nombreux avantages:

- extraction d'un large éventail d'oligomères procyanidoliques.
- exclusion des hauts polymères.
- coût faible par rapport aux solvants organiques.

Le schéma d'extraction suit les étapes suivantes.

La matière végétale est épuisée par l'eau.

Le volume d'eau utilisé dépend de la matière végétale et la température est choisie en fonction de la concentration présumée en oligomères, définie par des essais préliminaires. Le rendement est influencé par la durée de l'extraction car les oligomères ne supportent pas un long séjour à température élevée. Ainsi, plus la température sera élevée, plus le traitement sera court.

Le pH doit rester inférieur à 6 pour respecter le pH du contenu cellulaire végétal et pour ne pas détruire les oligomères.

Une substance réductrice, tel que le sulfite acide de sodium à raison de 0,5 g/l, doit être ajoutée pour éviter l'oxydation des oligomères. Il est conseillé d'utiliser de l'eau distillée ou désionisée pour éviter une auto-oxydation des polymères par le fer ou le cuivre.

La solution aqueuse obtenue est ensuite épuisée par l'acétate d'éthyle, solvant organique sélectif des oligomères qui ne dissout pas les tanins. De plus, son utilisation permet d'éviter la saturation de la solution aqueuse par NaCl.

Le rapport volume de la solution aqueuse/volume d'acétate d'éthyle, varie en fonction de la richesse du végétal en oligomères et des impératifs industriels de rendement.

L'acétate d'éthyle est évaporé sous pression réduite, cette évaporation est poursuivie jusqu'à obtention d'un résidu aqueux privé de toute trace de solvant organique.

La solution est ensuite lyophilisée pour obtenir un extrait destiné aux utilisations diététiques et cosmétologiques.

Pour l'utilisation pharmaceutique, une purification supplémentaire est nécessaire. Elle est réalisée par dissolution dans de l'acétate d'éthyle puis par précipitation par un solvant organique tel que le dichlorométhane. Cette purification peut être renouvelée une seconde fois si nécessaire.

Un dosage spectrophotométrique est réalisé pour apprécier le rendement de l'extraction et le titre en oligomères de l'extrait. Le spectre de l'extrait est comparé avec celui d'un produit de référence.

L'identification des extraits est réalisée par la réaction de Bate-Smith qui consiste à faire réagir 10 ml de solution aqueuse de l'extrait à 1% avec 2 ml d'acide chlorhydrique pur. Ce mélange est chauffé au bain-marie bouillant. En quelques minutes, il y a formation d'une coloration rouge intense, il s'agit de la transformation des oligomères en anthocyanes correspondants. A ce titre, la réaction est spécifique et permet de caractériser les produits obtenus.

1-Mise en oeuvre du procédé à partir de *Vitis vinifera* L.

200 g de pépins entiers de raisins sont mis dans 2 l d'eau distillée contenant 0,5 g/l de sulfite acide de sodium. Cette étape est réalisée à 80°C, sous agitation constante. Le mélange est filtré à chaud. Le filtrat séjourne une nuit à +4°C, puis il est centrifugé.

Le culot de matières insolubles est éliminé et le surnageant est épuisé par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est évaporée sous pression réduite à une température inférieure à 50°C. De l'eau est ajoutée au résidu aqueux.

La lyophilisation de cette solution fournit un produit sec qui constitue l'extrait destiné aux emplois diététiques et cosmétologiques. Le rendement obtenu est de 9,55 g/kg de pépins secs. A titre de comparaison, l'extraction selon une technique conventionnelle incluant un relargage par le chlorure de sodium ne livre que 4,78 g d'extrait.

2-Mise en oeuvre du procédé à partir de *Pinus maritima* L.

200 g d'écorces de pin grossièrement concassées subissent un traitement identique à celui décrit pour *Vitis vinifera* L.

Le rendement est de 6,07 g/kg, et, toujours à titre comparatif, l'extraction par la technique conventionnelle fournit seulement 3 g/kg.

3-Pour un usage pharmaceutique

5 g d'extrait lyophilisé sont mis en solution dans 100 ml d'acétate d'éthyle, puis sont ajoutés 200 ml de dichlorométhane.

Les oligomères précipitent aussitôt, ils sont récupérés par filtration sur verre fritté.

Le filtrat contenant les impuretés est distillé pour récupérer les solvants.

C-METHODE D'EXTRACTION DES OPC GLYCOSYLES

L'extraction des dérivés glycosylés est réalisée à partir de la matière végétale par des méthodes proches de celles décrites ci-dessus. L'extraction peut être réalisée par de l'eau, par un alcool tel que l'éthanol ou le méthanol, ou par un mélange eau-acétone (2/3).

Après lavage par de l'acétate d'éthyle, l'extrait est remis en solution aqueuse.

Puis une extraction liquide/liquide est réalisée avec du *n*-butanol qui sera ensuite éliminé par évaporation.

Le résidu est ensuite soumis à une purification chromatographique à contre-courant.

Selon les techniques d'extraction utilisées, les OPC extraits comportent un motif sucre sous forme d'un ose (glucose ou galactose) ou d'un polyose (108).

Nous venons de voir, au travers d'un certain nombre d'exemples, que plusieurs méthodes d'extraction des oligomères procyanidoliques existent.

Le choix du solvant et des conditions d'extraction seront fonction des impératifs de sélectivité et de rendement que l'on s'impose. Aussi, les solvants sont de nature variée.

Les méthodes qui utilisent un alcool seul, tel que le méthanol, sont surtout intéressantes pour étudier les structures des oligomères estérifiés. Cependant, ces techniques privilégient l'obtention des monomères qui présentent peu d'intérêts en thérapeutique.

L'extraction séquentielle par différents taux de méthanol ou par de l'acétone permet de quantifier les oligomères.

L'extraction peut aussi être réalisée par un mélange hydro-alcoolique. Les avantages de cette technique résident principalement dans l'optimisation du rendement qui peut être augmenté encore par l'ajout d'acide tartrique.

D'après les études citées, de nombreuses extractions sont basées sur l'utilisation de solvants organiques.

Le mélange eau/acétone est souvent considéré comme étant le plus efficace avec un rendement optimal pour les tissus frais ou congelés. Cependant, nous avons vu que ce mélange est peu sélectif. Aussi, pour obtenir les oligomères procyanidoliques, il faut réaliser des purifications en commençant par éliminer l'acétone par distillation. La phase aqueuse restante est débarrassée des pigments et des lipides par un solvant tel que le chloroforme ou le dichlorométhane. Les OPC sont ensuite extraits par de l'acétate d'éthyle.

Le mélange eau/acétate d'éthyle est plus intéressant. Il permet d'obtenir des extractions beaucoup plus sélectives et le rendement est optimisé par la présence d'eau en quantité suffisante pour saturer le système solvant/végétal.

De plus, nous avons vu qu'il existe des méthodes permettant d'optimiser l'extraction des oligomères.

Ces méthodes limitent soit la présence des monomères inactifs, soit la présence des polymères indésirés. Ces techniques sont souvent coûteuses, complexes et entraînent des relargages massifs de chlorure de sodium. En effet, elles utilisent le chlorure de sodium à saturation pour éliminer les tanins, suivi d'un double traitement par deux solvants organiques pour limiter la présence des monomères. Le premier, l'acétate d'éthyle, permet d'extraire les oligomères et le second, le chloroforme, entraîne leur précipitation.

Cependant, il existe une variante permettant de pallier aux inconvénients de ces techniques.

Le solvant utilisé est l'eau. Ceci présente l'avantage d'un faible coût et évite les relargages massifs de chlorure de sodium dans l'environnement. La purification de l'extrait obtenu est réalisée de la même manière que dans la technique précédente, par un traitement par deux solvants organiques.

CHAPITRE IV

PREPARATION DES EXTRAITS EN VUE
DE LEUR UTILISATION EN THERAPEUTIQUE,
COSMETIQUE ET DIETETIQUE

Les oligomères des flavan-3-ols possèdent des propriétés antiradicalaires qui leur confèrent de nombreuses applications.

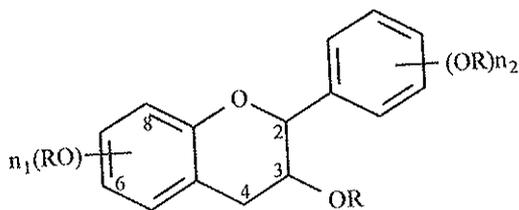
Ainsi, ces composés peuvent être la base de formulations pharmaceutiques, cosmétiques ou diététiques, orales ou topiques, destinées à protéger l'homme des méfaits des radicaux libres.

Cependant, leur utilisation pratique se heurte à leur instabilité, liée à la présence de groupements phénoliques libres. Ceci favorise une oxydation conduisant à une coloration brune ou rose incompatible à de nombreuses utilisations. De plus, ces produits sont hydrosolubles ce qui pose des problèmes d'incompatibilités avec de nombreux excipients qui sont liposolubles.

La recherche de techniques permettant de stabiliser ces substances et de les rendre liposolubles, a mis en évidence l'importance de l'estérification pour protéger les groupes -OH libres (3, 61, 72).

L'invention décrite dans le brevet 93 07140 a pour but de fournir des dérivés phénoliques stables par l'intermédiaire d'une mise en oeuvre aisée et exploitable à l'échelle industrielle. Ces composés renferment au moins un groupe phénolique protégé: $-\text{OCOR}_1$ (108).

L'invention vise en particulier des compositions flavanoliques caractérisées par un motif ester de flavanol. Leur structure répond à la formule I suivante, il s'agit du premier groupe.



Formule I

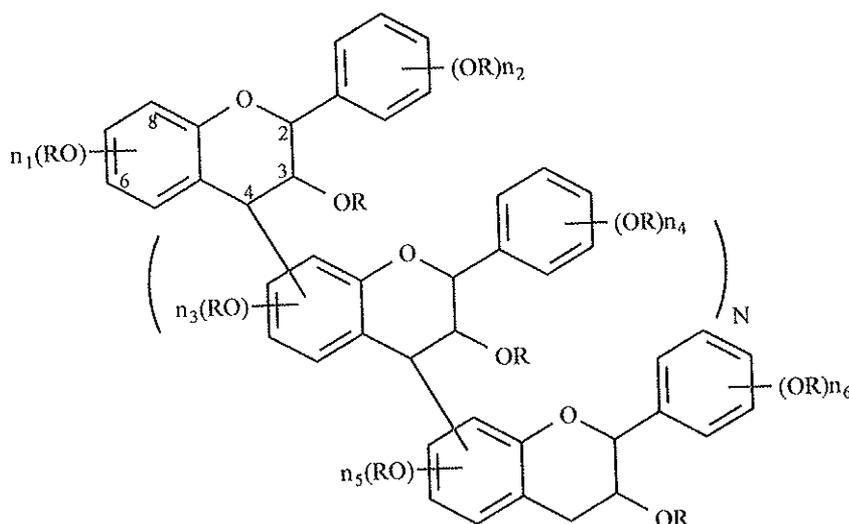
Dans cette formule au moins un des substituants R représente un groupe $-\text{COR}_1$.

$-\text{R}_1$ est un radical alkyle d'au moins deux atomes de carbone, linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé. Il peut s'agir d'un radical aryle, aralkyle ou aralkylène.

-le ou les autres représentants R éventuellement présents représentent un atome d'hydrogène, un groupe galloyle $-\text{O}-\text{CO}-\text{C}_6\text{H}_2-(\text{OH})_3$, un ose ou un polyose.

$-n_1$ et n_2 , identiques ou différents l'un de l'autre, sont des nombres de 1 à 3, correspondant au nombre de substitutions sur ce cycle.

Cette invention peut s'appliquer à un deuxième groupe de produits correspondant aux oligomères et aux polymères des esters du premier groupe. Ils répondent à la formule II:



Formule II

Dans cette formule R est tel que défini ci-dessus.

$-n_1$ à n_6 , identiques ou différents les uns des autres, sont des nombres de 1 à 3, représentant le nombre de substituants sur un cycle.

$-N$ est un nombre de 0 à 100 représentant la taille de l'oligomère ou du polymère.

Dans une famille de ce type, les liaisons interflavanoliques font intervenir les atomes de carbone des motifs successifs. Elles sont situées entre les carbones C4 et C6 ou entre les carbones C4 et C8.

Dans certains groupes de produits, les compositions sont en mélange et renferment des esters monomères et des esters oligomères et/ou des esters polymères.

Dans les compositions phénoliques du brevet, R_1 représente un radical d'acide gras saturé ou insaturé. Des exemples d'acides gras sont donnés ci-après. Selon la nomenclature classique, on indique pour chacun d'eux le nombre d'atomes de carbone C, puis le nombre de doubles liaisons, et l'emplacement de ces doubles liaisons. Le nom des acides gras est indiqué pour les plus classiques.

Il s'agit des radicaux des acides:

butyrique C4:0 , valérique C5:0 , hexanique C6:0 , sorbique C6:2(n-2) , C8:0 , C11:1 , C11:2 , laurique C12:0 , C13:0 , C13:2 , C14:0 , C15:0 , C15:2 , palmitique C16:0 , C16:1(n-7) , C16:2(n-4) , C16:2(n-7) , C16:3(n-4) , C16:4 , C17:0 , stéarique C18:0 , oléique C18:1(n-9) , C18:1(n-7) , linoléique C18:2(n-6) , γ -linoléique C18:3(n-6) , α -linoléique C18:3(n-3) , C18:4(n-3) , C20:0 , C20:1(n-9) , C20:2(n-6) , C20:3(n-6) , C20:4(n-6) , arachidonique C20:4(n-3) , éicosapentaénoïque C20:5(n-3) , C22:0 , C22:1 , C22:1(n-5) , C22:3(n-3) , C22:4(n-6) , C22:4(n-3) , C22:5(n-3) , C22:5(n-6) , docosahexaénoïque C22:6(n-3) et C24:1(n-9).

Les radicaux des acides gras en C18 et au delà sont particulièrement préférés en vue d'applications en cosmétologie. A côté du radical d'acide gras saturé ou insaturé, cas le plus fréquent, R_1 peut également représenter, comme nous l'avons déjà cité, un groupe aryle.

Ainsi, les compositions définies ci-dessus sont obtenues en faisant réagir des compositions phénoliques avec un agent d'acylation susceptible de fournir le radical-COR₁, dans des conditions permettant la substitution d'au moins un groupe -OH libre par un radical acyle -COR₁.

Les dérivés polyphénoliques en phase aqueuse à un pH de 7,5 à 12, sont mis en présence de l'agent acylant dissous en phase organique et d'un agent de transfert de phase.

L'agent d'acylation est choisi parmi les acides ou les dérivés de tels acides, en particulier les chlorures, les anhydrides ou les esters. Les solvants sont choisis parmi le tétrahydrofuranne (THF), des dérivés halogénés comme le chloroforme ou une amine telle que la pyridine. Les agents de transfert de phase sont des halogénures.

Lorsque l'acide est utilisé comme agent d'acylation, la réaction est réalisée en présence d'un agent d'activation qui est en général le dicyclohexylcarbodiimide (DCC). D'autres agents peuvent être utilisés comme le ter-butylchloroformiate. La réaction est réalisée à la température de reflux du solvant.

Les dérivés acylés obtenus sont séparés du milieu réactionnel et purifiés en vue des applications envisagées. L'invention vise en particulier les esters de motifs flavanoliques isolés à partir de la vigne rouge ou du pin maritime. Les compositions flavanoliques ainsi estérifiées sont d'une grande stabilité. Elles peuvent être conservées pendant au moins 2 ans dans des conditions normales de conservation (température de 10 à 22°C, en conditionnement protégeant de la lumière, hygrométrie 40-50%).

Les travaux réalisés sur de telles compositions phénoliques ont montré que la présence de groupes esters protecteurs favorise le transport de ces compositions au travers des membranes biologiques et permet d'atteindre localement des concentrations plus importantes qu'avec des composés non acylés, selon le concept de prodrogue. En effet, au contact d'estérases, présentes dans la plupart des milieux et tissus biologiques, les groupements protecteurs esters sont éliminés en générant la formation des composés phénoliques de départ et des acides. Ces composés exercent leurs activités d'une manière synergique et sont caractérisés par une grande innocuité.

Exemples d'estérification selon la méthode décrite dans le brevet 93.07140 (108):

Les compositions phénoliques de départ sont des fractions d'oligomères procyanidoliques extraites à partir de la vigne rouge ou du pin maritime, extraites par une méthode, décrite précédemment, basée sur l'utilisation d'une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium.

Exemple 1: Synthèse de stéarates de flavanols.

On fait réagir 1 g d'une fraction OPC avec 9 g d'acide stéarique, 7 g de dicyclohexylcarbodiimide et 100 ml de THF.

Le mélange est porté au reflux sous agitation pendant 24 heures.

Il se forme un précipité qui est éliminé par filtration. La phase organique est évaporée en grande partie. La part restante est reprise par du chloroforme (CHCl_3) et le résidu est soumis à une purification chromatographique.

Exemple 2: Variante de synthèse de stéarates de flavanols.

On fait réagir 1 g de la même fraction d'OPC que celle utilisée dans l'exemple 1 avec 17,5 g d'anhydride stéarique ou 9,5 g de chlorure de stéaroyle dans 100 ml de pyridine.

Le mélange est porté à 80°C sous agitation pendant 24 heures. La pyridine est éliminée, en majeure partie, par évaporation et la phase restante est reprise par du chloroforme. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie.

Un procédé identique à celui de l'exemple 2 peut être utilisé pour synthétiser des oléates, des sorbates ou des hexanoates de flavanols.

Il suffit pour cela, de remplacer l'anhydride stéarique ou le chlorure de stéaroyle par l'anhydride ou le chlorure correspondant à l'ester désiré.

Les compositions obtenues grâce à cette invention sont particulièrement appropriées pour l'élaboration de préparations pharmaceutiques d'une composition flavanolique en association avec un véhicule pharmaceutique inerte. Certaines préparations pharmaceutiques renferment ces dérivés seuls ou en association avec des médicaments à effet protecteur vis à vis des réactions d'oxydation, comme par exemple le β -carotène ou la vitamine E.

Ces dérivés, de par leurs propriétés anti-radicalaires et anti-oxydantes peuvent également être utilisés pour l'élaboration de préparations cosmétiques. Dans ces préparations, les produits sont associés à des véhicules appropriés à un usage externe. Leur caractère liposoluble favorise leur incorporation dans les formes galéniques habituellement utilisées en cosmétologie.

CHAPITRE V

ETUDE DES PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES
DES COMPOSES FLAVANOLIQUES

Les radicaux libres sont issus du métabolisme de l'oxygène. Ils sont responsables des attaques oxydatives au niveau des vaisseaux et du derme. Leurs cibles privilégiées sont les acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires et les éléments structuraux des tissus conjonctifs.

Ils sont en particulier impliqués dans le développement de l'athérosclérose et des maladies cardio-vasculaires qui en découlent ainsi que dans le vieillissement cutané.

Les flavonoïdes au sens large sont des piègeurs de radicaux libres, molécules ou atomes formés naturellement lors de diverses réactions biochimiques au sein de la cellule.

Les flavonoïdes, dont les oligomères procyanidoliques ont également montré, grâce à une étude *in vitro*, leurs propriétés d'inhibiteurs enzymatiques (15):

-inhibition de l'élastase et de la collagénase, enzymes de dégradation des fibres élastiques qui constituent les tissus conjonctifs.

-inhibition de la hyaluronidase ce qui permet de conserver l'intégrité de la substance fondamentale de la gaine vasculaire.

-inhibition de la lipoxigénase et de la cyclo-oxygénase ce qui est en relation directe avec leur capacité à piéger les radicaux libres. Ces propriétés démontrées *in vitro* peuvent expliquer leurs activités anti-inflammatoires, anti-allergiques et leur action sur l'activité plaquettaire.

Plus rarement, certains flavonoïdes comme les oligomères flavanoliques peuvent stimuler une activité enzymatique et notamment celle de la proline hydroxylase. Cette activité favoriserait l'établissement de pontages entre les fibres de collagène, renforçant ainsi leur solidité, leur stabilité et s'opposant à leur dénaturation. De plus, l'anion superoxyde semble impliqué dans la protéolyse non enzymatique du collagène et, *in vitro*, les oligomères flavanoliques inhibent ce processus. Ces propriétés mettent en valeur les indications potentielles des oligomères flavanoliques en cosmétologie et notamment dans la protection cutanée contre le vieillissement (15).

L'ensemble des propriétés anti-radicalaires des oligomères procyanidoliques est résumé dans le tableau suivant (62).

MECANISMES	CONSEQUENCES
effet réducteur sur les molécules oxydables	protection de: vitamine C vitamine E acides gras polyinsaturés
effet capteur sur les radicaux libres exogènes	radioprotection cutanée effet anti-inflammatoire
effet capteur sur les radicaux libres endogènes	protection des membranes cellulaires, du tissu conjonctif, de l'ADN.

Les propriétés des procyanidines expliquent leur capacité de protection des vaisseaux et du derme envers les attaques oxydatives des radicaux libres. En fait, ce sont principalement leurs propriétés antiradicalaires et inhibitrices enzymatiques qui leur permettent de lutter contre l'athérogénèse et le vieillissement cutané. Leurs modalités d'action peuvent être divisées en trois pôles.

En premier lieu, les procyanidines grâce à leur capacité antiradicalaire, bloquent la peroxydation lipidique au niveau des acides gras polyinsaturés des membranes cellulaires. Cette action est mise à profit à la fois dans la lutte contre l'athérogénèse et dans la lutte contre le vieillissement du derme.

De même, les procyanidines sont inhibitrices enzymatiques envers les protéases et envers les enzymes de dégradation des fibres conjonctivales. Ainsi, elles protègent les vaisseaux et le derme de la dénaturation.

Le dernier pôle d'action des procyanidines leur permet de s'opposer au développement des maladies cardiovasculaires qui découlent de l'athérosclérose. En effet, elles favorisent la vasodilatation et diminuent la perméabilité des capillaires ce qui leur permet de lutter contre l'hypertension artérielle et d'avoir une action angioprotectrice.

Dans un premier temps sera étudiée sous forme de rappel, la formation de ces radicaux libres ainsi que les différents systèmes de protection antiradicalaires endogène et exogène. Une attention plus particulière sera apportée aux propriétés antioxydantes du vin rouge afin de définir les composés responsables de cette action dont la conséquence est communément appelée le "French Paradox".

Dans un second temps sera étudiée l'action des procyanidines à différents niveaux, en commençant par la physiopathologie de l'athérosclérose. Puis, viendront les propriétés protectrices des procyanidines, soit par inhibition de la peroxydation lipidique, soit par une inhibition enzymatique avec un intérêt particulier dans le vieillissement cutané, soit par un effet au niveau cardio-vasculaire.

A- AU NIVEAU DES RADICAUX LIBRES PROPREMENT DIT

I- RAPPEL SUR LES RADICAUX LIBRES

Un radical libre se définit comme un atome, un groupe d'atomes ou une molécule possédant un électron non apparié, dit électron célibataire, en mouvement sur l'orbitale externe.

En conséquence, ce sont des corps très instables, de demi-vie très courte, mais d'une grande réactivité chimique (16).

Les cellules de notre organisme ont besoin d'oxygène pour fonctionner mais elles n'en utilisent que 98% et la part restante va être réduite en radicaux libres.

Les réactions radicalaires peuvent être décrites en trois étapes:

-la phase d'initiation, au moment de la formation des premiers radicaux. Les atomes d'oxygène inusités vont perdre un électron à la périphérie de leur noyau. Ils deviennent alors toxiques en recherchant cet électron manquant sur les acides gras des membranes cellulaires ou sur les glycoprotéines du collagène.

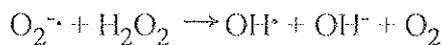
-la phase de propagation, où les premiers radicaux formés engendrent la production de nouveaux radicaux. En effet, ces molécules privées d'un électron en recherchent un sur les cellules voisines et deviennent à leur tour des radicaux libres.

-la phase de terminaison, au moment où deux radicaux libres se recombinent. Ces radicaux libres peuvent être neutralisés par deux types de processus (16, 107).

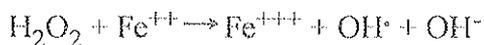
Une production non négligeable de radicaux libres est associée à la respiration où l'oxygène, oxydant par un échange monoélectronique, est transformé en anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Cette production est assurée par différentes enzymes comme la xanthine oxydase, la NADP cytochrome réductase (14, 27).

Bien que l'anion superoxyde réagisse lentement avec les acides gras insaturés, il a été montré que sa présence est liée à l'apparition des peroxydes lipidiques. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce phénomène:

-L'anion superoxyde pourrait permettre la production des radicaux hydroxyles selon la réaction de Haber et Weiss:



Mais cette réaction est très lente et la production des radicaux hydroxyles semble plutôt être assurée par une réaction dérivée, en présence de deux protons H^+ :



L'abondance des ions ferreux à l'échelle cellulaire favorise cette production et les radicaux hydroxyles, très réactifs, sont connus en tant qu'initiateurs de peroxydations (14, 27).

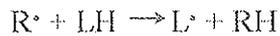
L'inflammation provoque aussi la formation de nombreux radicaux libres tels que les anions superoxydes produits par la NADPH-oxydase membranaire des leucocytes ou le radical hydroxyle formé par dismutation en présence d'ions ferreux (14, 27).

L'auto-oxydation lipidique, en général amorcée par un radical hydroxyle conduit à la formation de peroxydes selon la réaction globale suivante:

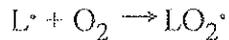


Le mécanisme de cette réaction radicalaire peut être explicité comme suit:

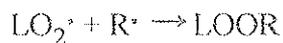
Le radical initiateur R^\bullet , par transfert d'un atome H^\bullet , crée un site radicalaire L^\bullet au sein d'une molécule lipidique LH, il s'agit de la réaction d'initiation:



L'oxygène, de par sa nature biradicalaire, réagit rapidement sur ce site pour former un radical LO_2^\bullet qui peut alors réagir à son tour sur une molécule lipidique LH assurant la propagation de la chaîne de peroxydation:



Le radical LO_2^\bullet peut également réagir avec un autre radical libre LO_2^\bullet ou R^\bullet assurant la terminaison de la chaîne, selon les réactions suivantes (27):



Les différentes possibilités de protection de l'organisme vis à vis de ces radicaux libres sont représentées par une régulation enzymatique endogène et par une protection exogène.

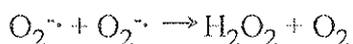
La première protection antiradicalaire est contenue dans l'organisme, il s'agit d'un système de régulation enzymatique avec:

- les superoxydes dismutases (S.O.D.) qui neutralisent les radicaux superoxydes, cependant la production de ces enzymes diminue avec l'âge.

- la catalase et les diverses peroxydases dont la plus active, la glutathion peroxydase sélénodépendante (SeGPx) agit en synergie avec la vitamine E pour détruire les peroxydes (14, 27).

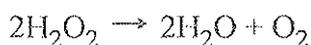
Ce système de régulation endogène agit de la manière suivante:

La superoxyde dismutase catalyse une réaction extrêmement lente, en présence de deux protons H^+ :

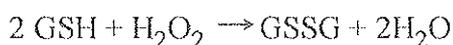


L'eau oxygénée a des propriétés analogues à celles des peroxydes et est capable de générer des radicaux libres OH^{\cdot} très toxiques.

La régulation de l'eau oxygénée implique deux mécanismes, d'une part la mise en jeu d'une enzyme, la catalase, qui catalyse la réaction:



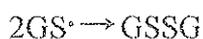
et d'autre part l'action des peroxydases, et en particulier de la glutathion peroxydase, qui catalyse la réaction:



Les divers radicaux initiateurs sont pris en charge par la glutathion peroxydase selon la réaction:



Le radical GS^{\cdot} formé va réagir préférentiellement selon la réaction:



Le deuxième système de protection antiradicalaire est exogène. Il s'agit de piègeurs de radicaux libres tels que les vitamines A, C, E, certains oligo-éléments (sélénium, zinc) et les flavonoïdes avec en particulier les oligomères procyanidoliques. Ces derniers présentent l'avantage de posséder une activité antiradicalaire supérieure à celles des vitamines antioxydantes classiques, la vitamine C et la vitamine E (respectivement 20 et 50 fois). Ils permettent également de protéger les autres antiradicalaires de l'oxydation et d'agir en cofacteur de la vitamine C (16, 107).

II- MISE EN EVIDENCE DES PROPRIETES ANTIRADICALAIRES

L'effet antiradicalaire des procyanidines peut être analysé *in vivo* dans l'organisme humain grâce au test au dithranol.

Le dithranol est une substance qui, à très faible dose, provoque des lésions cutanées secondaires à la formation de radicaux libres.

Le test consiste à déposer en deux endroits distincts de la face interne de l'avant bras de volontaires, 10 µl d'une solution de dithranol chloroformique à 2‰ sur une aire circulaire de 15 mm de diamètre.

Après évaporation du solvant, 10 µl d'une solution alcoolique à 1% de l'extrait à tester sont déposés sur l'une des deux surfaces.

Après 24 heures, la surface témoin est le siège d'une forte réaction inflammatoire due à la production de radicaux libres oxygénés. Par contre, sur la surface traitée par les procyanidines, la réaction inflammatoire est très nettement diminuée voire absente.

Ce test, au cours duquel un même sujet sert à la fois de témoin et de traité, prouve le pouvoir antiradicalaire des procyanidines, confirmant ainsi les propriétés déjà définies *in vitro* (35, 61, 63, 64).

De nombreuses études ont recherché *in vitro* les capacités antioxydantes d'une substance en créant une peroxydation expérimentale et en évaluant les effets de cette substance. Pour ces études, plusieurs méthodes peuvent être appliquées:

-la mesure des radicaux libres produits:

Cette mesure peut se faire par l'intermédiaire de réactions de réduction (réduction du bleu de tétrazolium, réduction du cytochrome C), ou par une mesure de chimiluminescence. Les réactions de peroxydations produisent une lumière de très basse énergie dont la mesure directe est difficile. En général, une chimiluminescence indirecte est réalisée grâce à des composés organiques tels que le luminol ou la lucigénine qui vont amplifier la lumière émise au cours des réactions radicalaires (16, 27, 59, 83).

-la mesure des peroxydes lipidiques:

Cette mesure peut être réalisée par une mesure de chimiluminescence (27).

-la mesure des produits secondaires des réactions de peroxydation:

Il s'agit en général, du dosage des diènes conjugués ou du dosage du malondialdéhyde (MDA). Les diènes conjugués sont des composés formés au cours des peroxydations lipidiques par réarrangement des doubles liaisons des acides gras polyinsaturés. Leur dosage se fait en mesurant leur absorption dans les UV à 235 nm.

Le dosage du MDA est classiquement utilisé pour évaluer les peroxydes lipidiques. En milieu acide (pH 3,5) et à chaud (95-100°C), le MDA forme avec deux molécules d'acide thiobarbiturique, une base de Schiff, molécule colorée, extractible par les solvants organiques et absorbant à 532 nm (27, 66).

III- COMPARAISON DES CAPACITES ANTIOXYDANTES

DES PROANTHOCYANIDINES, DES VITAMINES ET DES ENZYMES

Les proanthocyanidines sont douées de propriétés antiradicalaires au même titre que plusieurs vitamines et enzymes. Plusieurs études ont été menées pour comparer les pouvoirs antiradicalaires de ces différentes substances dont les intérêts thérapeutiques, de par leur caractère antioxydant, sont reconnus (110, 113, 116).

Ces propriétés sont confirmées par plusieurs travaux et notamment par ceux de UCHIDA et al. qui ont démontré que la concentration nécessaire pour faire diminuer de 50% l'oxydation cellulaire était 50 fois moindre avec les oligomères procyanidoliques qu'avec la vitamine E (107).

De même, une étude a montré que les oligomères procyanidoliques ont une activité anti-radicalaire supérieure à celle des anti-radicalaires classiques, comme le cas d'un complément alimentaire et de la vitamine E (16).

Les travaux suivants comparent les capacités antioxydantes des procyanidines avec celles des vitamines et des enzymes.

L'étude de BAGCHI et al. a comparé les capacités antiradicalaires des proanthocyanidines extraites des pépins de raisins (GSPE = grape seed proanthocyanidin extract) avec celles de la vitamine C, du succinate de vitamine E (VSE), de la superoxyde dismutase et de la catalase (7).

Leurs pouvoirs antiradicalaires ont été étudiés vis à vis de l'anion superoxyde et du radical hydroxyle générés biochimiquement. Les résultats sont suivis par un essai de luminescence chimique et par la réduction du cytochrome C.

L'inhibition obtenue avec les proanthocyanidines est dépendante de la concentration. A une concentration de 100 mg/l, l'inhibition des deux radicaux varie de 78 à 81%.

Dans les mêmes conditions, la vitamine C ne permet d'inhiber que 12 à 19% des deux radicaux libres oxygénés et la vitamine E crée une inhibition de 36 à 44%. Quant à l'association des deux enzymes, superoxyde dismutase et catalase, elle fournit une inhibition de 83% de l'anion superoxyde.

Les résultats obtenus montrent que les proanthocyanidines des pépins de raisins fournissent une inhibition des radicaux libres supérieure à celles obtenues avec les vitamines C et E, et de même importance que celle créée par les deux enzymes associées.

Une autre étude a comparé les effets protecteurs des extraits proanthocyanidoliques des pépins de raisins (GPSE) et ceux des vitamines C, E et du β -carotène (6).

Cette étude a analysé les effets de ces produits sur une peroxydation lipidique induite par du tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA) dans les conditions suivantes:

- GPSE: 25 à 100 mg/kg
- Vitamine C: 100 mg/kg
- Succinate de vitamine E (VSE): 100 mg/kg
- β -carotène: 50 mg/kg

Les effets peroxydatifs sont analysés en fonction de la fragmentation d'ADN créée sur des tissus hépatiques et cérébraux de souris ainsi qu'en fonction de la production de radicaux libres provoquée par cette peroxydation lipidique chez des souris.

Un traitement des souris par les substances étudiées entraîne une diminution de la production TPA-induite des radicaux libres. Cette baisse est mise en évidence par une diminution de la réponse par chimiluminescence des macrophages péritonéaux et par une diminution de la réduction du cytochrome C, par comparaison avec des témoins. Les valeurs présentées dans le tableau ci-dessous correspondent aux baisses obtenues grâce à chaque substance (6).

	chimiluminescence	réduction du cytochrome C
GPSE	70%	65%
vitamine C	18%	15%
vitamine E	47%	37%
β -carotène	16%	19%

Le même traitement fournit une baisse de fragmentation d'ADN TPA-induite au niveau des tissus hépatiques et cérébraux. Les valeurs présentées dans le tableau suivant correspondent aux baisses de fragmentation d'ADN obtenues après traitement par les différentes substances antioxydantes et après comparaison avec les contrôles.

	tissus hépatiques	tissus cérébraux
GPSE	47%	50%
Vitamine C	10%	14%
Vitamine E	30%	31%
β -carotène	11%	11%

Ainsi, tous ces antioxydants fournissent une protection efficace contre les dommages oxydatifs TPA-induits. Mais, seules les proanthocyanidines fournissent des inhibitions dose-dépendantes envers la lipoperoxydation, la formation des radicaux libres et la fragmentation de l'ADN.

Une étude, réalisée par FRANKEL, a déterminé les capacités antioxydantes de différents jus de raisins (38).

Cette étude a testé *in vitro*, les pouvoirs antiradicalaires de plusieurs jus de raisins envers une oxydation cuivre-induite des lipoprotéines humaines de basse densité (LDL) et a déterminé l'effet de la vitamine C sur cette activité antioxydante.

Pour comparer les résultats, les échantillons sont standardisés à une concentration phénolique de 10 M d'équivalent en acide gallique (GAE). Selon le jus de raisin, l'inhibition de l'oxydation des LDL varie de 62 à 75% mais les résultats de cette étude ont surtout montré que la vitamine C n'a pas d'effet significatif sur l'activité antioxydante des jus de raisin testés.

Toutes ces études montrent que les procyanidines issues des pépins de raisins sont nettement plus antioxydantes que les vitamines classiques.

De plus, certains auteurs ont montré que les oligomères procyanidoliques sont des cofacteurs de la vitamine C qu'ils protègent de l'oxydation. Ils permettent ainsi à la vitamine C d'exercer son effet activateur de synthèse de collagène par les fibroblastes et d'optimiser l'action préventive des oligomères procyanidoliques.

Ces notions mettent en valeur l'intérêt des procyanidines en thérapeutique antioxydante, d'une part grâce à leur propre activité qui apparaît être 20 fois supérieure à celle de la vitamine C et 50 fois supérieure à celle de la vitamine E et d'autre part grâce à leur action synergique avec la vitamine C (62, 107).

IV- ACTIVITE ANTIOXYDANTE DU VIN ET ALCOOL

Les propriétés antioxydantes des composés phénoliques présents dans le vin sont connues. Ils permettent de prévenir l'oxydation des LDL humaines par augmentation du pouvoir antioxydant réactif total (TRAP) du sérum après leur ingestion. Cette propriété est due à la grande proportion des composés phénoliques présents dans le vin.

Pour confirmer cette propriété, plusieurs études ont été menées pour évaluer les capacités antioxydantes des différentes fractions polyphénoliques des vins et pour analyser le rôle de l'alcool dans ces capacités.

Certaines de ces études ont évalué la capacité antioxydante des phénols présents dans ces vins en déterminant leur valeur TEAC (Trolox[®] Equivalent Antioxidant Capacity) après les avoir extraits et identifiés par HPLC (76, 90, 117).

Trolox[®] est le nom commercial du 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-acide carboxylique. Ce composé, possédant une activité antioxydante, est souvent utilisé comme référence dans les études cherchant à montrer les propriétés antioxydantes de produits.

Une de ces études a été réalisée sur 9 vins italiens, les quantités des composés phénoliques et leur valeur TEAC respective sont présentées dans le tableau 11 (91).

Vin	phénols totaux (mg/l) ¹	flavanols totaux (mg/l) ²	TEAC ³ (mM/Trolox) ³
Cabernet Sauvignon rouge, 1994	3365	805	28,1
Corvo Rosso, rouge, 1993	2173	461	19,3
Barbaresco, rouge, 1991	1850	321	16,8
Barbera d'Alba, rouge, 1993	1684	310	15,2
Barbera Oltrepo, rouge, 1992	1801	307	17,4
Barbera Oltrepo desalcoolisé, rouge, 1992	1781	285	16,7
Chianti, rouge, 1994	2180	496	18,6
Gewurtztraminer, blanc, 1995	268	11	3,8
Colomba Platino, blanc, 1994	327	49	4,0
Torre di Giano, blanc, 1995	219	12	3,6

Tableau 11: Concentrations phénoliques et capacité antioxydante en équivalent Trolox^R (TEAC) des vins italiens (91).

¹phénols totaux exprimés en équivalent d'acide gallique, ² valeurs exprimées en équivalent de (+)-catéchine, ³ TEAC: capacité antioxydante en équivalent Trolox^R

La figure 31 montre la corrélation qui existe entre la présence des phénols et la capacité antioxydante.

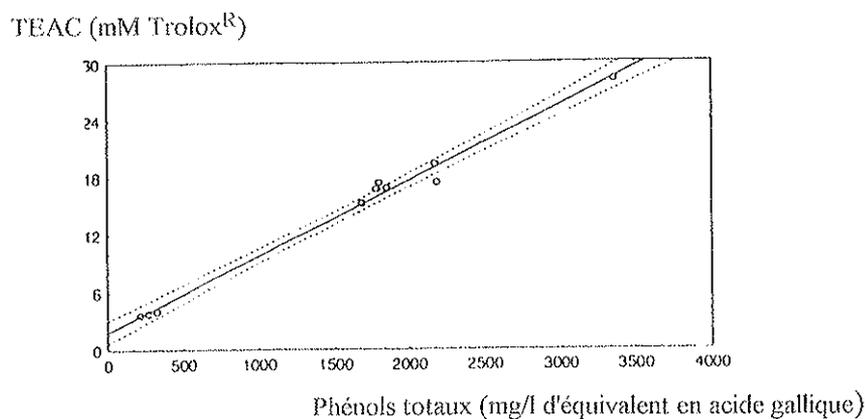


Figure 31: Corrélation entre les phénols totaux et les TEAC (91).

corrélation= 0,99 , risque admis 5%.

L'analyse de la figure 31 et des valeurs présentées dans le tableau 11 montre que les phénols et notamment les flavanols, de par leur forte concentration, jouent un rôle majeur dans le pouvoir antioxydant.

Les résultats obtenus avec Barbera Oltrepo rouge alcoolisé et desalcoolisé suggèrent que l'alcool n'affecte pas les valeurs TEAC.

Une autre étude a comparé les activités antioxydantes de 8 fractions polyphénoliques de vin rouge et a cherché si l'éthanol présent était responsable de cette activité (50).

Pour réaliser cette étude, 10 volontaires sains ont consommé de la Vodka (49% d'éthanol) pendant 2 semaines (jours -14 à 0) puis du vin rouge pendant 2 semaines (jours 0 à 14). La quantité d'éthanol a été régularisée à 0,8 g par jour.

Pendant l'expérimentation, tous les volontaires ont suivi un régime alimentaire contrôlé en apport nutritif et calorique, des prélèvements sanguins ont été réalisés à jeûn aux jours -14, 0, 14.

Les substances polyphénoliques sont séparées par chromatographie liquide et identifiées par des tests colorimétriques à la vanilline.

La capacité antioxydante de chaque fraction est évaluée par deux méthodes:

-par la mesure de leur capacité à fixer les radicaux hydroxyles OH^\cdot et DPPH $^\cdot$ (1,1-DiPhényl-2-Picryl-Hydrazyl).

-par la résistance d'apparition des diènes conjugués obtenue (mesure du "lag time").

La peroxydation lipidique utilisée dans cette étude est induite par une substance azoïque et la mesure de la résistance d'apparition des diènes conjugués ("lag time") est évaluée par la mesure de la densité optique à 235 nm. Cette technique est classiquement utilisée pour mesurer le degré de peroxydation lipidique.

Le "lag time" des LDL déterminé au jour 14, à la fin de la période de consommation de vin (54,7 +/- 2,6 minutes), est significativement plus long que ceux déterminés aux jours 0, avant consommation de vin rouge (49,1 +/- 2,2 minutes), et -14, avant consommation de Vodka (50,4 +/- 2,5 minutes). Ces résultats prouvent que des substances, autres que l'éthanol, sont responsables d'une inhibition de l'oxydation des LDL.

La mesure des capacités des fractions phénoliques à fixer les radicaux OH[·] et DPPH[·] montre que l'activité la plus forte est obtenue avec la fraction correspondant aux masses moléculaires les plus élevées. La capacité de cette fraction à fixer le radical DPPH[·] est aussi forte que celle de la catéchine.

Par contre, en prenant comme base la concentration en polyphénols pouvant fixer 50% du radical OH[·] (C.F. 50%), la fixation du radical OH[·] est plus forte avec cette fraction qu'avec la catéchine. La quantité nécessaire de la fraction est de 0,28 µg/ml et la quantité nécessaire de catéchine est de 0,64 µg/ml.

Les résultats des tests colorimétriques montrent que cette fraction contient essentiellement des procyanidines oligomères.

Une étude plus récente a montré que les effets antioxydants bénéfiques du vin rouge existent dans un concentré de jus de raisin rouge non-alcoolisé (20).

Dans cette étude, 7 sujets ont consommé quotidiennement 125 ml de ce concentré pendant 7 jours. Après la première injection, la capacité antioxydante totale (TAC) du sérum variait de 441 à 478 µmol/l après 60 mn. Au 8^{ème} jour, les valeurs de TAC avaient augmenté de 50 µmol/l.

Ainsi, l'ingestion quotidienne de ce concentré a permis d'améliorer la capacité antioxydante totale du sérum et de protéger les LDL de l'oxydation.

L'ensemble de ces études montre que les effets antioxydants du vin ne sont pas dûs à l'alcool présent mais aux composés phénoliques et principalement aux oligomères flavanoliques.

V- COMPARAISON DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES COMPOSES ISSUS DU VIN OU DES RAISINS

Plusieurs études ont comparé les capacités antioxydantes des composés phénoliques du vin, seules les techniques utilisées varient.

Une étude réalisée par TEISSEDER et al. a comparé *in vitro* les capacités antioxydantes des fractions phénoliques issues du vin Petite Sirah et des pépins de raisins sur l'oxydation des LDL (102).

Les procyanidines dimères et trimères sont extraites des pépins de raisins puis elles sont isolées et identifiées par HPLC.

Le vin Petite Sirah est concentré 10 fois par évaporation sous vide à 25°C puis il est injecté dans un système HPLC. Les fractions phénoliques sont collectées à 6 minutes d'intervalle.

L'effet antioxydant est suivi par la production d'hexanal au niveau de la tête de colonne du système HPLC, après une oxydation cuivre-induite sur des LDL humaines préparées extemporanément.

Les inhibitions relatives obtenues sont exprimées en % d'inhibition, d'après la relation:

$$\frac{(C-S)}{C} \times 100$$

C: hexanal formé avec le contrôle, S: hexanal formé avec l'échantillon.

Les résultats obtenus dans cette étude permettent de classer les substances en fonction de leur activité antioxydante.

L'activité antioxydante la plus élevée est obtenue avec les monomères catéchine et épicatechine, le flavonoïde myricétine, les dimères B2 et B8 ainsi que le trimère C1.

Une activité moins élevée est obtenue avec les dimères B3, B4, B6, avec le trimère C2, avec les flavonoïdes rutine et quercétine et avec les acides phénoliques suivants: l'acide caféique, l'acide ellagique, l'acide gallique et l'acide sinapique.

L'activité la plus basse est obtenue avec l' α -tocophérol.

Les pourcentages d'inhibition les plus élevés, de 60 à 70%, sont obtenus pour 3 fractions contenant des composés de la famille des flavan-3-ols. Ces fractions renferment les monomères catéchine et épicatechine, les dimères B1, B2, B3, B4, B6, B8 et les trimères C1 et C2 (5, 43, 102).

Plus récemment, une étude a recherché les activités antioxydantes d'extraits phénoliques issus de 14 variétés différentes de raisin frais par la mesure, *in vitro*, de l'inhibition de l'oxydation des LDL humaines (70).

Les résultats de cette étude montrent que l'activité antioxydante relative envers les LDL est liée à la concentration totale des extraits en phénols, exprimée en équivalents d'acide gallique (GAE). Ainsi, pour 10 μ M de GAE, l'inhibition des LDL varie de 22 à 60% et pour 20 μ M de GAE, l'inhibition varie de 62 à 91%.

Les mêmes expériences sont menées avec des extraits obtenus à partir de pépins de raisins écrasés et des temps d'extraction plus longs qu'avec des raisins frais.

Ces conditions expérimentales permettent d'extraire des quantités plus importantes de flavan-3-ols. Avec de tels extraits, l'action inhibitrice envers les LDL est plus intense.

Cette étude a permis de faire la relation entre la présence des flavan-3-ols et le pouvoir antioxydant des vins (31, 70).

Toujours dans l'optique de comparer les effets antioxydants de divers composants issus du vin, les auteurs des études suivantes ont analysé, d'une part les résultats d'inhibition des peroxydations lipidiques induites par une irradiation et d'autre part, les effets antiradicalaires des composants étudiés (13, 66, 88).

Une de ces études s'est attachée à différencier les effets antioxydants des proanthocyanidines, des monomères épigallocatechine et gallate d'épigallocatechine (13).

Les effets antioxydants de ces substances sont étudiés dans 3 modèles *in vitro*. Des acides gras polyinsaturés en solution aqueuse et des microsomes de foie et de cerveau de souris sont utilisés comme substrats oxydatifs, une irradiation par UV sert de système pro-oxydant.

L'analyse de la peroxydation lipidique induite par les UV s'appuie sur deux méthodes:

-une analyse des acides gras polyinsaturés résiduels.

-une analyse des substances relarguées et réactives à l'acide thiobarbiturique.

Les résultats de cette étude, donnés par ces deux méthodes, montrent que la peroxydation des acides gras est inhibée par de faibles concentrations de proanthocyanidines issues des pépins de raisins (2 mg/l). Par contre, les monomères épigallocatechine et gallate d'épigallocatechine pour des quantités équivalentes d'épicatéchine, ne présentent aucune efficacité dans les conditions expérimentales utilisées.

Ces conclusions peuvent s'expliquer, d'après les auteurs, par une action synergique des monomères flavan-3-ols, des dimères et des trimères contenus dans l'extrait des pépins de raisins.

Ces études mettent en évidence l'existence d'une relation entre la quantité globale des polyphénols et les activités antioxydantes obtenues. Ce sont les oligomères flavanoliques qui possèdent l'activité la plus forte (13, 66, 88).

Une étude, menée par WATERHOUSE et al., a cherché à déterminer si une consommation usuelle de vin peut changer la concentration plasmatique de catéchine. La catéchine est le principal composant des flavan-3-ols présents dans le vin (114).

Pour cette étude, les sujets volontaires ont évité une alimentation riche en flavonoïdes pendant l'expérience qui a débuté 48h avant toute consommation de vin.

Les échantillons de plasma sont recueillis au début de l'expérience, puis immédiatement avant la consommation de vin et enfin 1h, 3h, 8h et 24h après la consommation de vin.

Les concentrations de catéchine sont établies par extraction à partir du plasma frais suivie d'une concentration et d'une analyse HPLC de l'extrait concentré.

Les concentrations initiales (-48h) varient de 2,6 à 4,7 μM . Le régime pauvre en flavonoïdes provoque une baisse de concentration pendant les 48h. A la fin des 48h (0h), les concentrations varient de 0,2 à 1,4 μM ce qui correspond à 7,7 à 31,2% des valeurs initiales.

1h après la consommation de 300 ml de vin rouge, les concentrations augmentent 2,1 fois par rapport aux valeurs obtenues à 0h. Le pic plasmatique est obtenu 3h après la consommation de vin rouge, il varie de 4,5 à 12 μM . Ces concentrations correspondent à une augmentation de 5 fois des valeurs obtenues à 0h.

Chez tous les sujets, les concentrations de catéchine diminuent, ensuite approchent des valeurs initiales (-48h) au bout de 24h.

Cette étude montre qu'un apport de 300 ml de vin rouge correspond à 80 mg de catéchine, le taux plasmatique dépasse alors 1 μM chez tous les sujets durant les 24h qui suivent. Ceci permet de relier une augmentation plasmatique des substances antioxydantes (catéchine) par une consommation de vin rouge.

Ainsi, la concentration plasmatique des substances antioxydantes commence à augmenter une heure après la consommation de vin rouge et le pic est atteint au bout de 3 heures. Cette concentration décroît ensuite pour atteindre le taux initial au bout d'environ 24 heures.

Ces résultats confirment la notion de "French Paradox" selon laquelle une prise journalière de vin rouge, équivalente à deux verres, est associée à une diminution de l'incidence des maladies cardio-vasculaires, sachant qu'une consommation journalière supérieure est reliée à une augmentation du risque d'infarctus du myocarde (18, 54).

En effet, nous venons de voir qu'un apport journalier est nécessaire pour maintenir une concentration plasmatique suffisante en catéchine et en oligomères procyanidoliques. Ces substances pourront alors inhiber la peroxydation lipidique et agir en tant qu'antiradicalaires (115).

Ce phénomène est retrouvé dans des pays tels que la France ou l'Italie, principaux producteurs et consommateurs de vins rouges où l'incidence des maladies coronariennes est plus faible que dans les autres pays d'Europe et qu'en Amérique du nord malgré une alimentation riche en lipides.

Cette propriété est liée aux polyphénols présents dans le vin rouge, et notamment aux propriétés inhibitrices des procyanidines envers la peroxydation lipidique (11, 41).

Des études épidémiologiques réalisées dans des populations mixtes ou des populations du même sexe, ont montré que ce pouvoir est indépendant de l'âge et du sexe des personnes (45).

L'analyse des différents travaux nous montre les points suivants.

L'étude comparative des propriétés antioxydantes des procyanidines, des vitamines et des enzymes antioxydantes classiques révèle la supériorité des procyanidines. En effet, celles-ci, présentes dans le vin rouge, ont un pouvoir antioxydant nettement supérieur à celui de la vitamine C, de la vitamine E et équivalent au pouvoir de la superoxyde dismutase associé à celui de la catalase. De plus, les procyanidines sont présentées comme cofacteur de la vitamine C mais leur pouvoir antioxydant est indépendant de sa présence.

Ces données mettent en valeur les capacités antioxydantes du vin rouge et plusieurs études ont montré que l'alcool n'intervient pas. Cette propriété du vin rouge est liée à la présence des composés phénoliques et plus précisément aux proanthocyanidines.

Certains auteurs ont évoqué une action synergique entre les monomères, les dimères et les trimères. L'analyse des fractions phénoliques les plus actives a permis de montrer que ce sont principalement les oligomères flavanoliques qui sont responsables du pouvoir antioxydant du vin rouge.

B- ACTIONS DES PROCYANIDINES

I- L'ATHEROSCLEROSE ET LES PROCYANIDINES

L'athérosclérose est une affection dégénérative d'évolution progressive, caractérisée par un épaissement de la paroi artérielle. Cet épaissement est dû à une accumulation de lipides et à une prolifération des cellules musculaires lisses et du tissu conjonctif. L'athérosclérose touche essentiellement l'intima de la paroi et concerne particulièrement l'aorte, les coronaires et les artères cérébrales.

La présence de la plaque d'athérome dans la lumière artérielle entrave la circulation sanguine et diminue l'oxygénation du tissu environnant. Ceci favorise la nécrose, appelée également infarctus, du tissu ou de l'organe irrigué par l'artère obstruée (23).

L'athérosclérose se développe lentement, on peut distinguer trois stades.

La lésion athéroscléreuse la plus précoce est la strie lipidique caractérisée par un dépôt de lipides dans les macrophages, dans le tissu conjonctif et dans les cellules musculaires lisses. Ces macrophages, gorgés de lipides, sont nommés "cellules spumeuses".

Le deuxième stade de l'athérosclérose correspond à l'apparition d'une plaque fibreuse au niveau de l'intima, sous la couche endothéliale. Cette plaque fibreuse est constituée de dépôts lipidiques intra- et extracellulaires, entourés de cellules musculaires lisses et de tissu conjonctif. Contrairement à la strie lipidique, elle fait saillie dans la lumière artérielle.

Au dernier stade d'évolution de l'athérosclérose, la plaque, appelée thrombus, est constituée d'un noyau parfois calcifié, de débris cellulaires, de cristaux de cholestérol ceinturés de cellules spumeuses et de tissu conjonctif. La lumière endothéliale est souvent ulcérée (23).

Plusieurs comportements à risque sont à l'origine de l'athérosclérose et des maladies cardio-vasculaires qui en découlent. Nous pouvons citer notamment une consommation trop importante de graisses saturées qui favorise l'augmentation du LDL-cholestérol ("mauvais cholestérol") au dépens du HDL-cholestérol ("bon cholestérol").

Les LDL (low density lipoproteins) sont des lipoprotéines de taille moyenne riches en cholestérol et en apolipoprotéine B100. Elles sont très athérogènes du fait de leur métabolisme intravasculaire, elles assurent le transport du cholestérol à toutes les cellules et tissus. Les HDL (high density lipoproteins) sont des particules de petite taille riches en lipoprotéine A. Elles assurent le retour du cholestérol tissulaire en excès vers le foie, elles sont donc protectrices vis à vis du risque vasculaire (14).

Ainsi, le processus de l'athérogénèse est étroitement lié à l'attaque de l'intégrité de l'endothélium vasculaire et à l'augmentation de ces lipoprotéines LDL.

A l'état normal, l'endothélium vasculaire est caractérisé par une continuité et est doué de propriétés antithrombotiques par la synthèse de prostacycline (PGI_2). Mais, au cours de ce processus dégénératif, une lésion de la surface endothéliale se produit. Cette lésion notamment liée au vieillissement normal des vaisseaux, a une origine encore aujourd'hui mal connue. Elle met à nu le sous-endothélium riche en collagène et provoque une activation et une agrégation plaquettaires. Le phénomène va être auto-entretenu, il se forme alors dans le vaisseau, un caillot qui va subir une infiltration lipidique liée à l'oxydation des LDL.

En effet, au cours de l'athérogénèse, des enzymes, les lipoxygénases oxydent les acides gras insaturés de la partie lipidique des lipoprotéines LDL. Ces LDL oxydées ne sont plus reconnues par les récepteurs classiques mais par des récepteurs "scavengers" de l'épithélium vasculaire. Elles vont se fixer sur ces récepteurs, pénétrer dans l'endothélium vasculaire et s'accumuler, provoquant ainsi la formation de dépôts lipidiques dans les capillaires et les artères.

Les LDL oxydées ont une action cytotoxique sur l'endothélium et sur les cellules musculaires lisses. Elles agissent par peroxydation lipidique et par action toxique des radicaux libres qui vont entraîner une mort cellulaire, des lésions membranaires et une perméabilité anormale de la paroi. Elles favorisent aussi l'agrégation plaquettaire et, en modifiant les propriétés vasomotrices des vaisseaux, elles participent à l'hypertension artérielle.

Toutes ces actions expliquent les symptômes de l'athérosclérose qui se définit par un durcissement et un rétrécissement des artères concernées dus aux dépôts lipidiques, les athéromes. Ces athéromes augmentent le risque de thrombose qui s'associe à l'hypertension pour favoriser le développement de maladies cardio-vasculaires ischémiques (27).

De plus, un processus inflammatoire se développe au niveau de l'endothélium lésé. Les fibres élastiques et les membranes des cellules endothéliales vont alors être endommagées par les protéases et les radicaux libres libérés.

Dans un premier temps, les protéases et les radicaux libres ont un effet bénéfique sur le site inflammatoire. En effet, l'anion superoxyde intervient dans la phagocytose en tant que précurseur d'espèces bactéricides (OH^\bullet , H_2O_2), puis en tant que générateur d'un processus chimiotactique qui conduit les phagocytes sur le lieu de production des anions superoxydes, c'est à dire sur le site de l'inflammation. Mais ces substances radicalaires et les protéases ont ensuite une action néfaste lorsque les équilibres sont rompus entre la production et l'utilisation. Les protéases, dont l'élastase, peuvent alors détruire les fibres élastiques des membranes vasculaires et les radicaux libres peuvent aggraver les membranes cellulaires par les processus de lipoperoxydation (9). Les cellules endothéliales et notamment l'endothélium vasculaire sont les plus exposés.

Ces processus pathologiques expliquent les divers pôles d'action des procyanidines qui vont pouvoir agir de par leur action sur la peroxydation lipidique, leurs propriétés inhibitrices enzymatiques et leur activité anti-radicalaire. Ces propriétés sont connues sous le nom de "French paradox", correspondant comme nous l'avons déjà évoqué, à une moindre incidence des maladies coronariennes en France par rapport à d'autres pays développés malgré une alimentation riche en lipides athérogènes.

Cette notion est attribuée à une consommation quotidienne et modérée de vin rouge, riche en composés phénoliques (52, 112).

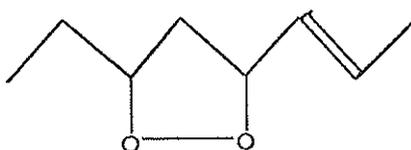
II- EFFET ANTIRADICALAIRE ET INHIBITION DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE PAR LES PROCYANIDINES

Les propriétés antiradicalaire, antioxydante et inhibitrice de la peroxydation lipidique sont étroitement liées. Il est difficile sinon impossible de dissocier ces effets. Ainsi, les études analysées dans ce paragraphe concernent l'une ou l'autre propriété et souvent l'ensemble des trois. Certaines techniques, utilisées dans ces études, pour la mise en évidence de ces effets ont été déjà citées dans le paragraphe "mise en évidence des propriétés antiradicalaires" (voir page 132). Ces techniques seront vues de manière plus détaillée à ce niveau.

Comme nous l'avons déjà évoqué précédemment, plusieurs études suggèrent qu'une consommation modérée de vin réduit le taux de mortalité lié aux maladies cardio-vasculaires.

L'effet bénéfique du vin rouge viendrait d'une inhibition de l'oxydation des LDL, base même de l'athérogénèse, par les polyphénols (11, 70, 94, 102).

En effet, au cours de l'athérogénèse, les lipides membranaires constituant les membranes biologiques sont susceptibles de subir au niveau des acides gras polyinsaturés, des réactions de peroxydation qui aboutissent à l'implantation sur la molécule lipidique d'un groupement hydroperoxyde -OOH ou d'un chaînon peroxyde, comme par exemple ce type de chaînon:



Ces réactions de peroxydation lipidique sont responsables de profonds désordres structuraux et fonctionnels. Aussi, de nombreuses études soulignent les intérêts d'une consommation modérée de vin où les propriétés antiradicalaires des oligomères flavanoliques viendraient renforcer leur action antiprotéasique pour protéger les vaisseaux de l'athérosclérose (37, 49, 67).

Plusieurs études ont cherché à définir les propriétés antioxydantes des procyanidines en mesurant leur effet inhibiteur envers la lipoperoxydation et leur pouvoir antiradicalaire.

La plupart de ces études utilisent une peroxydation lipidique induite par un métal. Nous citerons un autre modèle de lipoperoxydation, induit par les ultra-sons, qui est plus rarement utilisé.

L'effet antiradicalaire des procyanidines est aussi étudié en recherchant leur capacité de protection voire de réparation des dommages oxydatifs créés sur des cellules ou de l'ADN.

La plupart des auteurs évaluent les effets antiradicalaires des procyanidines en utilisant un modèle peroxydatif induit par un métal (4, 13, 53, 57, 66, 67).

Une de ces études a analysé l'activité antioxydante des procyanidines par la mesure de leur propriété:

-de piègeur des radicaux libres envers l'anion superoxyde, généré par la réaction de la phénazine méthosulfate en présence de NADH^+ et d'oxygène moléculaire.

-d'inhibiteur de la peroxydation lipidique induite par le système ADP/ascorbate de fer (FE^{++}) sur des microsomes de foie de rat.

Cette expérience a été menée avec des extraits d'oligomères procyanidoliques issus de pépins de *Vitis vinifera* L. (Endotélon*) et de galbules de *Cupressus sempervirens* L. (Vascuton*). Les produits utilisés sont les principes actifs de spécialités, produits purs sans excipient se présentant sous forme d'une poudre hydrosoluble (67).

-Mesure de l'effet antiradicalaire par la réaction de la phénazine méthosulfate:

La mesure du pouvoir antiradicalaire sur l'anion superoxyde est réalisée *in vitro* grâce à la technique de Slater et Eakins. Le milieu réactionnel utilise les interactions du $NADH + H^+$, de la phénazine méthosulfate (PMS), de l'oxygène moléculaire et du bleu de nitrotétrazolium (NBT).

Le radical superoxyde est formé par oxydation de la phénazine méthosulfate par l'oxygène de l'air. Le bleu de nitrotétrazolium est réduit en formazan, molécule colorée, en présence de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). La présence intermédiaire du radical libre est confirmée en utilisant la superoxyde dismutase qui inhibe la réduction aérobie du bleu de nitrotétrazolium.

Le milieu réactionnel utilisé comprend:

- 200 μ l de tampon phosphate 76 mM, pH 7,4
- 200 μ l de phénazine méthosulfate à 10,8 μ M
- 200 μ l de bleu de nitrotétrazolium à 172 μ M
- 200 μ l de $NADH + H^+$ à 360 μ M

Le milieu réactionnel est soumis à une agitation pendant 5 minutes, puis l'absorbance de la coloration bleue du formazan est mesurée par spectrophotométrie à 578 nm.

Pour étudier l'activité de chaque extrait, des solutions de concentrations différentes sont utilisées dans une solution de tampon phosphate. Les 200 µl de tampon du milieu réactionnel sont alors remplacés par 200 µl de solution tamponnée de l'extrait à étudier.

En parallèle, des dosages blancs et témoins sont réalisés en remplaçant les 200 µl de NADH + H⁺ par 200 µl de solution de tampon phosphate.

Les résultats obtenus montrent que les procyanidines les plus actives contre l'anion superoxyde sont celles issues de *Vitis vinifera* L. (IC₅₀ = 0,01 mg/ml) suivies par celles issues de *Cupressus sempervirens* L..

-Mesure de l'inhibition de la peroxydation lipidique:

La mesure du pouvoir antiradicalaire sur la lipoperoxydation utilise une peroxydation lipidique induite par le complexe ascorbate de fer (Fe⁺⁺)/ADP, dans des microsomes bouillis de foie de rat.

Ce système produit des radicaux hydroxyles OH[·] qui attaquent les acides gras polyinsaturés des membranes microsomiales et qui induisent un cycle d'auto-oxydation des acides gras. Le malondialdéhyde (MDA) libéré par la dégradation des lipoperoxydes formés, est ensuite dosé.

Les microsomes de foie de rats sont préparés selon un protocole bien défini, puis ils sont mis en suspension dans un tampon phosphate de potassium 0,1 M à pH 7,4.

Le milieu réactionnel se compose de:

- 0,2 ml de solution microsomiale
- 0,2 ml de tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH 7,4
- 0,2 ml de solution d'adénosine 5'-diphosphate de sodium à 2 mM
- 0,2 ml de solution de sulfate ferreux à 16 µM
- 0,2 ml d'ascorbate de sodium 0,5 mM

Après agitation, le milieu réactionnel est incubé à 37°C pendant 90 minutes.

La réaction de lipoperoxydation est stoppée par addition de 0,5 ml d'acide trichloracétique à 20% et le MDA formé est dosé par réaction avec l'acide thiobarbiturique.

Comme pour la mesure du pouvoir antiradicalaire, des solutions de concentrations différentes sont préparées dans une solution tampon phosphate de potassium. Les 0,2 ml de tampon du milieu réactionnel sont remplacés par 0,2 ml de solution tamponnée de l'extrait à étudier. En parallèle, des dosages blancs et témoins sont réalisés en remplaçant 0,2 ml d'ascorbate de sodium par 0,2 ml de solution tampon phosphate de potassium.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité restante. Après avoir calculé la moyenne des résultats expérimentaux et l'erreur standard, il a été déterminé la CI_{50} de chaque extrait (tableaux 12 et 13).

Produits expérimentés	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Cupressus sempervirens</i>
Concentration d'extraits en mg/ml de milieu réactionnel	CI_{50} 0,010 mg/ml	CI_{50} 0,041 mg/ml
0,1000 M +/- Δm	0	18 +/- 1
0,0500 M +/- Δm	12 +/- 2	38 +/- 5
0,0250 M +/- Δm	23 +/- 2	85 +/- 6
0,0125 M +/- Δm	45 +/- 4	99 +/- 1
0,0063 M +/- Δm	86 +/- 6	100

Tableau 12: Pourcentage d'activité restante après action des différents extraits sur l'anion superoxyde (67).

Produits expérimentés	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Cupressus sempervirens</i>
Concentration d'extraits en mg/ml de milieu réactionnel	CI ₅₀ 0,016 mg/ml	CI ₅₀ 0,075 mg/ml
1,0000	M +/- Δm	
0,5000	M +/- Δm	
0,2500	M +/- Δm	
0,2000	M +/- Δm	
0,1250	M +/- Δm	
0,1000	M +/- Δm	10 +/- 2
0,0750	M +/- Δm	50 +/- 7
0,0630	M +/- Δm	
0,0500	M +/- Δm	2 +/- 1
0,0250	M +/- Δm	75 +/- 2
0,0125	M +/- Δm	13 +/- 4
0,0063	M +/- Δm	66 +/- 3
0,0032	M +/- Δm	86 +/- 2
		95 +/- 2
		94 +/- 3

Tableau 13: Pourcentage d'activité restante après action des extraits à différentes concentrations sur la lipoperoxydation (67).

Les résultats montrent que les oligomères procyanidoliques issus de *Vitis vinifera* L. sont, ici encore, plus actifs (CI₅₀: 0,016 mg/ml) que ceux issus de *Cupressus sempervirens* L. Les deux sources de procyanidines étudiées ont des propriétés antioxydantes qui se manifestent par leur capacité à piéger l'anion superoxyde O₂^{·-} et à inhiber la peroxydation lipidique des membranes.

Plusieurs autres études, plus récentes, ont également utilisé une peroxydation métal-induite pour analyser les capacités antiradicalaires des procyanidines.

KANNER et al. ont étudié les effets antioxydants de 3 variétés de raisins et de 2 vins rouges.

Les effets des trois variétés de raisins sont suivis grâce à une peroxydation lipidique induite par le cuivre, l'ascorbate de fer ou le cytochrome C. Les IC₅₀ obtenues sont respectivement égales à 0,2 , 0,35 et 0,9 µg de phénols/ml.

Les effets antioxydants des deux vins rouges sont également suivis par inhibition de l'oxydation cuivre-induite des LDL et les résultats obtenus sont comparés à ceux donnés par l' α -tocophérol. Il en résulte des inhibitions IC_{50} inférieures à 1 μ M pour les vins phénoliques et inférieures à 2 μ M pour l' α -tocophérol (53).

LONNINGHAM FOSTER et al. ont cherché à déterminer si un extrait de raisin contenant une fraction polyphénolique est capable de bloquer l'oxydation des LDL humaines induite par le cuivre (57).

Pour cela, l'oxydation des LDL est surveillée par la mesure spectrophotométrique de la différence d'absorption à 235 nm. L'incubation des LDL (0,05 mg de protéines/ml) avec 1,66 μ M de chlorure de cuivre produit un retard de 130 mn du début de la phase de propagation pendant laquelle les acides gras polyinsaturés subissent une transformation en diènes conjugués.

En présence de l'extrait de raisin, le retard de phase obtenu est fonction de la dilution de l'extrait.

dilution	retard de phase
8000 ^e	185 mn
4000 ^e	250 mn
2000 ^e	465 mn
1000 ^e	10 h au minimum

Plus récemment, AVIRAM et al. ont mis en évidence les propriétés inhibitrices des composés phénoliques du vin rouge envers une oxydation cuivre-induite des LDL. Pour cela, les auteurs ont comparé chez des souris, les oxydations cuivre-induites des LDL plasmatiques obtenues avant et après traitement par 50 μ g de polyphénols par jour sur une période de 6 semaines. Les résultats de cette étude montrent une baisse de 54% de concentration des diènes conjugués (4, 20).

Un autre modèle de peroxydation lipidique, induit par les ultra-sons, a également été utilisé pour différencier les phases du procédé peroxydatif (10, 60). Comme cité auparavant, les réactions radicalaires se déroulent en trois étapes:

- une phase d'initiation où se forment les premiers radicaux,
- une phase de propagation où les premiers radicaux formés engendrent la formation de nouveaux radicaux,
- et une phase de terminaison où deux radicaux libres se recombinent.

L'action des procyanidines sur une peroxydation lipidique induite par les ultra-sons permet d'analyser leur effet aux différentes étapes du procédé peroxydatif. Les auteurs ont également établi une comparaison des effets inhibiteurs des procyanidines obtenus avec un système peroxydatif classique (induit par le fer) et obtenus avec leur modèle induit par les ultra-sons. Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

modèle expérimental	Procyanidines IC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)	α -Tocophérol IC ₅₀ ($\mu\text{mol/l}$)
Peroxydation lipidique induite par le fer	2,5	indélectable
Peroxydation lipidique induite par les ultra-sons:		
Activité antioxydante totale	0,1	indélectable
Action sur la phase d'induction	0,1	1,5
Action sur la phase de propagation	0,05	1,25

Tableau 14: Activité antioxydante des procyanidines aux différentes étapes du système peroxydatif (60).

Les résultats montrent que les procyanidines sont capables de réduire nettement la formation des diènes conjugués dans la phase d'induction (IC₅₀: 0,1 $\mu\text{mol/l}$). De même, elles provoquent une inhibition dose-dépendante pendant la phase de propagation (IC₅₀: 0,05 $\mu\text{mol/l}$).

Les concentrations inhibitrices de ce modèle peroxydatif sont nettement inférieures à celles obtenues dans un système classique fer-induit. L' α -tocophérol est nettement moins actif dans les deux phases.

Ainsi, les procyanidines semblent inhiber la peroxydation lipidique à tous les stades et apparaissent même avoir une activité supérieure à la vitamine E pour les deux premières phases.

L'effet des procyanidines est probablement dû à une interaction directe avec les radicaux $\text{OH}\cdot$. Ceci est confirmé par l'analyse par résonance paramagnétique électronique du radical hydroxyle. La comparaison du spectre contrôle (sans procyanidines) et de ceux obtenus avec différentes concentrations de procyanidines montre l'effet inhibiteur qu'elles exercent sur le radical. (figure 32).



Figure 32: Spectre RPE du radical $\text{OH}\cdot$ piégé par le 5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxyle (DMPO) en l'absence (contrôle) ou en présence de différentes concentrations de procyanidines (60).

D'autres auteurs étudient les propriétés antiradicalaires des procyanidines en évaluant leur capacité à réduire la mortalité cellulaire ou à réparer les lésions oxydatives induites par des radicaux libres (16, 71, 83, 85).

Une de ces études a été réalisée pour tester les capacités antioxydantes d'un complément nutritionnel à base d'oligomères procyanidoliques issus de pépins de raisins (OPC), LONGELIA, des laboratoires Sarget Pharma (16).

Les propriétés antiradicalaires de ce produit ont été étudiées sur des cultures de fibroblastes de peau humaine.

En premier lieu, une production *in vitro* d'un flux extracellulaire de radical superoxyde et de peroxyde d'hydrogène a été réalisée en associant selon un protocole bien établi, de l'hypoxanthine (HX) et de la xanthine oxydase (XO).

Les radicaux libres ainsi générés sont responsables de diverses réactions en chaîne de destruction de molécules organiques, notamment des acides gras polyinsaturés des membranes ce qui va entraîner la mort cellulaire.

L'effet antiradicalaire des OPC est évalué *in vitro* par la mesure de leur capacité à piéger le radical hydroxyle. Il en résulte une réduction de la mortalité cellulaire induite par les radicaux libres. Le produit à tester est utilisé à une concentration non cytotoxique. L'innocuité a préalablement été déterminée par le test classique de viabilité du 3-(4,5 diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényltétrazolium bromique (MTT).

Pour évaluer l'influence de produits présumés protecteurs envers l'attaque des radicaux libres générés par hypoxanthine (HX) et xanthine oxydase (XO), les cellules sont pré-incubées pendant une heure avec:

-Hypoxanthine (100 μ M) seule: HX.

-Hypoxanthine (100 μ M) en présence de catalase (500 UI/ml)

(contrôle positif de référence): HX/Cat.

-Hypoxanthine en présence de vitamine E (5×10^{-4} μ M) (contrôle comparatif de référence): HX/Vit E.

-Hypoxanthine (100 μ M) en présence des OPC à la dose non cytotoxique définie préalablement: HX/OPC.

La xanthine oxydase est ensuite ajoutée aux concentrations suivantes: 0, 2, 4, 6 mU/ml.

L'incubation dure une heure. Le mélange expérimental est ensuite substitué par un milieu de culture tamponné à pH 7,35 pour assurer la croissance et la multiplication des cellules.

La culture est réalisée pendant 5 jours et le test de viabilité au MTT est réalisé à l'issue de chaque jour. L'activité antiradicalaire des produits étudiés est évaluée par leur capacité à lever l'inhibition de croissance induite par les radicaux libres.

Les effets des divers produits sont présentés sur les figures 33, 34, 35 et 36. Chaque figure correspond au jour de culture J1, J2, J3 et J5 après l'intoxication qui a lieu au jour 0.

La mortalité cellulaire est exprimée en pourcentage par rapport aux cellules témoins et en fonction de la concentration en xanthine oxydase (les cellules témoins ayant été incubées durant l'expérimentation avec les mêmes produits, mais sans xanthine oxydase).

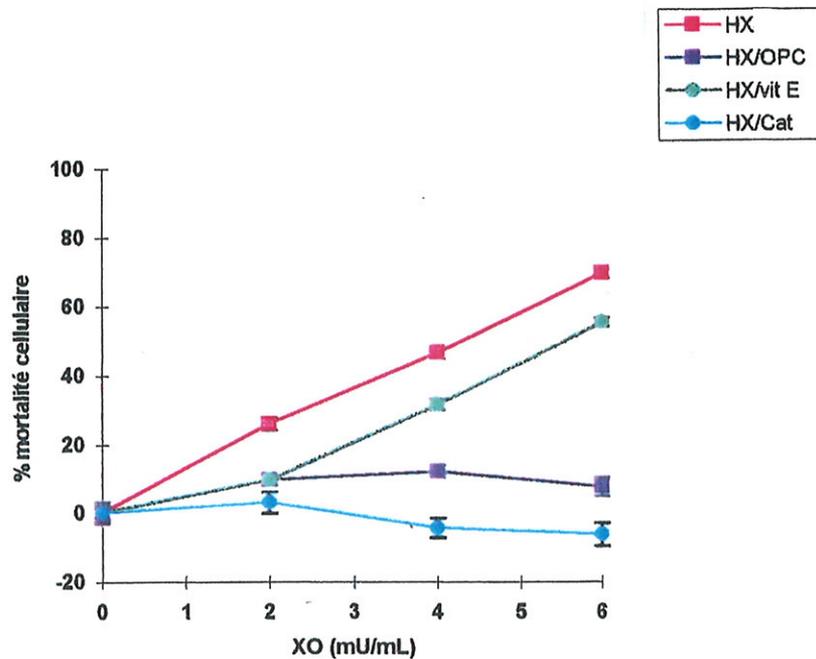


Figure 33: Cellules à J1 (16).

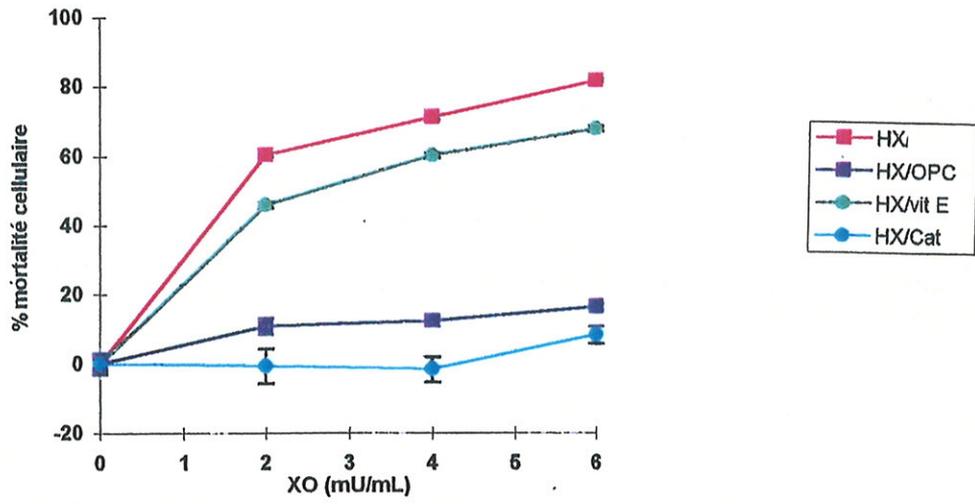


Figure 34: Cellules à J2 (16).

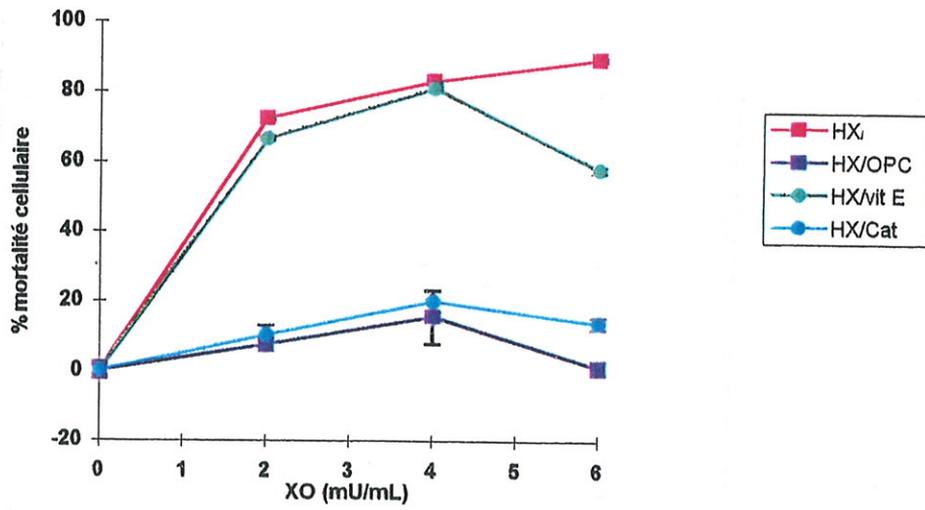


Figure 35: Cellules à J3 (16).

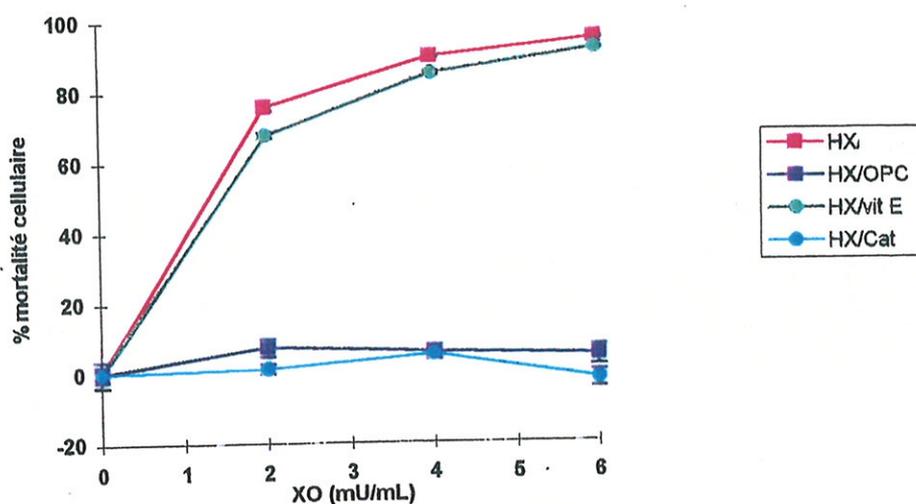


Figure 36: Cellules à J5 (16).

L'étude des figures montre que:

le système HX/XO, dans les conditions contrôles, est remarquable pour induire la formation de radicaux libres oxygénés, ce système entraîne une mortalité cellulaire augmentant avec la quantité de xanthine oxydase présente et avec le temps.

La catalase, produit de référence, présente un effet protecteur important quelle que soit la quantité de xanthine oxydase présente dans le milieu d'incubation. Cette protection persiste jusqu'au cinquième jour après le traitement.

La vitamine E, dans ces conditions expérimentales présente un faible effet protecteur avec des effets proches de ceux du système HX/XO en l'absence d'agent protecteur. Ces résultats sont probablement dûs au long temps d'action de ce protecteur. En effet, la vitamine E est connue comme présentant un effet anti-radicalaire, sur les fibroblastes de peau humaine en culture, seulement au bout de 12 à 14 heures de prétraitement. Or, le temps d'action des conditions expérimentales utilisées ici est de 1 heure.

Le produit OPC testé présente un effet protecteur important quelle que soit la quantité de xanthine oxydase présente et cet effet persiste jusqu'au cinquième jour de traitement. Ces effets ne sont pas significativement différents de ceux obtenus en présence de catalase mais sont supérieurs à ceux obtenus avec la vitamine E.

Une autre étude a analysé l'effet antioxydant des procyanidines extraites de *Pinus maritima* L. en utilisant le même test de viabilité cellulaire que précédemment (test au MTT) (83).

La capacité antiradicalaire de ces procyanidines a été évaluée *in vitro* en utilisant des cellules de l'endothélium vasculaire d'une artère pulmonaire bovine.

Ces cellules sont mises à incuber avec différentes concentrations de procyanidines pendant 16 heures puis elles sont lavées et exposées à un oxydant organique, le t-butyl hydroperoxyde (tBHP), pendant 3 ou 4 heures.

L'attaque cellulaire est suivie par la mesure de la viabilité cellulaire et par la détermination du relargage de lactate deshydrogénase (LDH). Les produits de peroxydation lipidique des cellules sont surveillés par la production du malondialdéhyde (MDA) avec un test à l'acide thiobarbiturique.

Les résultats de cette étude montrent que l'incubation des cellules avec différentes concentrations de tBHP (75, 100 ou 125 μ M) diminue leur viabilité, augmente le relargage de LDH et la production de MDA.

Par contre, une préincubation des cellules avec les procyanidines (10 à 80 μ g/ml) avant l'exposition à l'oxydant augmente la viabilité cellulaire, diminue le relargage de LDH et réduit la production de MDA.

Ces résultats montrent que les procyanidines peuvent protéger les cellules de l'endothélium vasculaire contre une attaque oxydante et suggèrent ainsi que les procyanidines peuvent être utiles dans la prévention des désordres associés aux dommages oxydatifs (83).

Une étude récente a analysé les propriétés antiradicalaires des procyanidines issues de pépins de *V. vinifera* L. par différentes méthodes classiques et par immuno-fluorescence. L'extrait étudié contient un mélange de procyanidines dimères (85).

En premier lieu, les auteurs ont évalué la concentration IC_{50} des procyanidines dimères envers les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) générés par un système hypoxanthine/xanthine-oxydase. Les résultats obtenus ont montré que les procyanidines dimères inhibent les anions superoxydes de manière dose-dépendante. La concentration IC_{50} est de 52 $\mu M/l$.

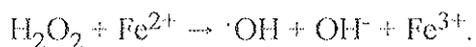
Puis, les auteurs ont étudié les effets de ces procyanidines sur d'autres radicaux libres tels que le radical 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) et les radicaux hydroxyles.

L'étude concernant le radical DPPH \cdot se fait par la mesure de la différence d'absorption à 515 nm. En effet, sous sa forme radicalaire, DPPH \cdot absorbe à cette longueur d'onde. Lorsqu'il est réduit par un antioxydant tel que les procyanidines, l'absorption à 515 nm est proportionnelle à la quantité de radical DPPH \cdot restante. Les résultats obtenus montrent que les procyanidines ont un effet inhibiteur envers le radical DPPH \cdot (IC_{50} : 61 $\mu M/l$) comparable à celui qu'elles ont envers les radicaux superoxydes (IC_{50} : 52 $\mu M/l$).

Cette étude a montré que le pouvoir antiradicalaire des procyanidines est proportionnel à leur concentration et qu'il ne dépend pas de la nature chimique des radicaux libres.

Pour les auteurs de cette étude, les procyanidines sont capables de prévenir et de traiter les dommages cellulaires dus aux radicaux libres. Pour montrer cela, ils utilisent le test 3D (Damaged DNA Detection). Ce test permet de détecter les lésions créées au niveau de l'ADN par une attaque oxydative. Les réparations obtenues après traitement par un antiradicalaire sont également évaluées.

L'attaque oxydative est réalisée par des radicaux hydroxyles générés par du peroxyde d'hydrogène en présence de fer ($FeCl_2$) selon la réaction de Fenton:



L'ADN est adsorbé sur une matrice renfermant un substrat, le méthyl-umbellyféryl-phosphate. Après avoir provoqué des lésions par les radicaux libres, l'extrait contenant les procyanidines est ajouté pour induire la réaction de réparation. Cet extrait contient aussi une phosphatase alcaline conjuguée à un anticorps spécifique du substrat présent dans la matrice.

Une réaction se produit, sur les sites non réparés de la matrice, entre la phosphatase alcaline conjuguée et le substrat. Cette réaction donne naissance à une fluorescence qui est donc inversement proportionnelle à la capacité de réparation des procyanidines.

La figure 37 montre l'importance des lésions d'ADN obtenues après traitement oxydatif et la figure 38 montre l'effet inhibiteur des procyanidines dimères sur la production de lésions oxydatives sur de l'ADN.

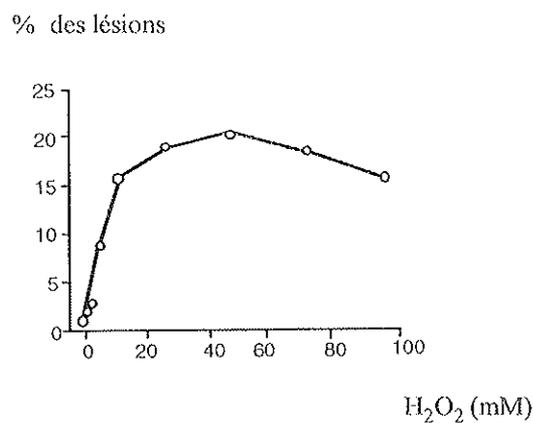


Figure 37: Intensité des lésions d'ADN générées par les radicaux hydroxyles (85).

% de lésions/contrôle

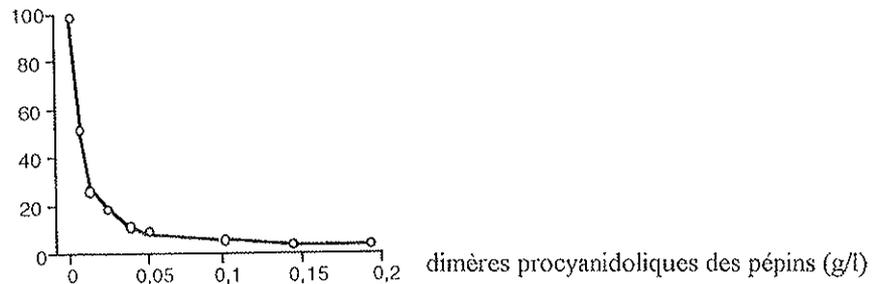


Figure 38: Effet inhibiteur des procyanidines dimères sur la production des lésions d'ADN (85).

Cette étude confirme l'hypothèse émise selon laquelle les procyanidines possèdent d'une part, un effet antiradicalaire indépendant de la nature des radicaux et d'autre part, un effet réparateur sur les dommages provoqués par ces radicaux.

Toutes les techniques citées tendent à mettre en valeur les propriétés antiradicalaires des procyanidines, soit directement sur des radicaux libres générés, soit sur une peroxydation lipidique induite. Seules les modalités des études diffèrent. Il peut s'agir de la mise en évidence d'une baisse d'activité des radicaux libres, d'un retard de phase peroxydative ou d'une baisse de concentration des diènes conjugués. D'autres études évaluent leur capacité à réduire la mortalité cellulaire ou à réparer les lésions oxydatives induites par les radicaux libres.

L'analyse de l'action antiradicalaire des procyanidines par résonance paramagnétique électronique a confirmé leur effet inhibiteur envers les radicaux libres.

Toutes ces techniques se rejoignent pour démontrer que les procyanidines issues des pépins de raisins sont de puissants antiradicalaires, plus efficaces que celles issues des galbules de cyprès et plus efficaces que la vitamine E.

III- ACTIVITES INHIBITRICES ENZYMATIQUES DES PROCYANIDINES

1- Le vieillissement cutané et les procyanidines

Le derme est le tissu de soutien de la peau, il s'agit d'un tissu conjonctif fibreux. Ses cellules, les fibroblastes, ont la propriété de fabriquer de l'élastine et du collagène qui sont responsables de l'élasticité et de l'extensibilité de la peau. Ces fibroblastes sont noyés dans une substance fondamentale constituée d'eau et d'acide hyaluronique. Avec l'âge, c'est au niveau du derme que les rides apparaissent car les fibres d'élastine et de collagène se raréfient, perdent de leur élasticité et le derme ne peut plus jouer son rôle de soutien de l'épiderme. Ce phénomène physiologique est accéléré par une production accrue de radicaux libres liée à une alimentation déséquilibrée, une exposition solaire intense...

Les procyanidines vont agir en s'opposant à la peroxydation lipidique au niveau du derme, empêchant ainsi la dégradation des tissus cutanés.

De même, l'affinité des procyanidines pour les protéines et en particulier pour un acide aminé, la proline, explique l'effet protecteur de ces composés envers le collagène et l'élastine qui ont une teneur élevée en cet acide aminé. Les procyanidines vont créer des ponts supplémentaires entre les fibres de collagène.

Les procyanidines vont également inhiber les enzymes de dégradation du collagène, les collagénases, de l'élastine, les élastases et de l'acide hyaluronique, la hyaluronidase (23).

Ces propriétés mettent en valeur les possibilités d'utilisation des procyanidines en cosmétologie.

2- Activités antiprotéasique et antiélastasique des OPC

Au cours d'un processus inflammatoire, les cellules conjonctives lésées vont libérer des protéases lysosomiales et de nombreuses formes de radicaux libres. Ces protéases et ces radicaux libres, présents en quantité anormale peuvent endommager les fibres élastiques et les membranes des cellules endothéliales. Ce phénomène se produit au cours de l'athérogénèse mais est aussi responsable d'attaques oxydatives au niveau du derme.

Les procyanidines en tant que substances antiradicalaires peuvent être une base de traitement de par leur action vasculoprotectrice et leurs propriétés antiprotéasiques (9, 42, 46 80).

Ces propriétés peuvent être mises à profit en thérapeutique vasculaire et dans certains cas en cosmétologie comme nous allons le voir au travers de plusieurs études.

L'effet protecteur des oligomères procyanidoliques sur les fibres élastiques au niveau pancréatique a été étudié avec des procyanidines extraites de *Cupressus sempervirens* L. (72).

L'étude citée a mis en évidence une interaction des oligomères proanthocyanidoliques (OPC) sur l'élastase et sur l'élastine par formation de complexes.

L'effet inhibiteur envers l'élastase est représenté par une CI_{50} de 0,05 mg/ml. Cette inhibition est due à la formation d'un complexe insoluble OPC/élastase, obtenu avec un rapport de concentration de 2 mg/ml d'oligomères pour 1 mg/ml d'élastase.

De même, l'élastine fixe environ 150 mg d'oligomères par milligramme d'élastine, mais cette dernière n'est que partiellement protégée de l'action ultérieure de l'élastase. Le complexe oligomères/élastine semble être plus stable que celui formé avec l'élastase où l'enzyme peut retrouver une partie de son activité estérasique.

D'autres études ont montré que les oligomères flavanoliques de *Cupressus sempervirens* L. peuvent inhiber jusqu'à 50% l'activité de l'élastase pancréatique (51, 69).

L'une d'entre-elles a été réalisée sur une élastase pancréatique de porc, vis à vis d'un substrat synthétique, le N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine-*p*-nitroanilide (suc (Ala)₃pNA) (51).

L'activité de l'enzyme a été mesurée selon la technique de Bieth et al., le milieu réactionnel comporte:

-0,5 ml de tampon à pH 8

-1 ml de solution enzymatique à 0,5 UI/ml

-1 ml de solution extemporanée de substrat suc (Ala)₃ pNA à 2,5 mM.

L'élévation de l'absorbance par minute, due à la libération de la *p*-nitroaniline, est mesurée à 410 nm et à +25°C. La moyenne des élévations d'absorbance est effectuée sur 3 minutes.

Les procyanidines testées sont divisées en deux groupes:

-les monomères avec la (+)-catéchine, la (-)-épicatéchine et le (+)-cyanidanol-3 qui ne diffèrent que par l'isomérisation.

-les oligomères comprenant une fraction P₂ plus polymérisée qu'une fraction P₁ et un mélange à parties égales de P₁ et P₂.

Pour chacune des fractions, 4 solutions de concentrations différentes ont été utilisées.

Après un contact de 15 minutes, l'activité enzymatique restante est mesurée et les pourcentages sont indiqués pour chaque concentration.

L'examen des résultats (tableau 15) montre le très faible pouvoir inhibiteur des monomères étudiés: (+)-catéchine, (-)-épicatéchine, (+)-cyanidanol-3.

Concentration (mg)	Activité restante %					
	(+)-catéchine		(-)-épicatéchine		(+) -cyanidanol-3	
	m	Δm	m	Δm	m	Δm
0,40	100,0	-	95,3	2,0	97,3	0,8
0,80	92,8	1,6	90,5	3,9	95,4	1,2
1,60	88,2	2,5	86,7	3,1	90,6	3,0
3,20	84,5	3,1	82,0	2,3	86,3	2,4

Tableau 15: Activité de l'élastase, exprimée en pourcentage d'activité restante, après action de la (+)-catéchine, de la (-)-épicatéchine et du (+)-cyanidanol-3 (51).

m: moyenne de 5 mesures ; Δm : intervalle de confiance au risque admis de 5%

L'inhibition relevée en présence des oligomères est au contraire très importante et ceci pour chacune des trois fractions étudiées (tableau 16).

Pour la concentration la plus élevée (0,6 mg), l'inhibition est presque totale et la diminution d'activité est sensiblement rectiligne, indiquant une forte affinité des oligomères.

Pour les fractions P_1 , P_2 , P_1+P_2 , les doses IC_{50} sont sensiblement identiques et sont respectivement de 0,06 mg/ml, 0,05 mg/ml et 0,04 mg/ml. Ces résultats suggèrent qu'à partir d'un certain degré de polymérisation (3 ou 4 maillons), l'activité inhibitrice est peu modifiée et que ce sont les petits polymères (dimères ou trimères), existant à l'état naturel, qui présentent la plus forte activité inhibitrice vis à vis de l'élastase.

Concentration (mg)	Activité restante %					
	Ext. de <i>Cupressus sempervirens</i> L.					
	fraction P ₁		fraction P ₂		fraction P ₁ + P ₂	
	m	Δm	m	Δm	m	Δm
0,075	74,6	5,9	56,4	4,1	59,5	2,8
0,15	50,5	4,3	43,9	4,4	37,7	3,7
0,30	31,1	1,2	17,8	2,2	19,7	2,8
0,60	11,9	0,8	5,6	1,7	11,5	1,5

Tableau 16: Activité de l'élastase, exprimée en pourcentage d'activité restante après action des fractions P₁, P₂, P₁ + P₂ (51).

m: moyenne de 5 mesures ; Δm: intervalle de confiance au risque admis de 5%

La nature de l'interaction enzyme-inhibiteur n'est pas connue. Ici, il s'agit d'une inhibition non compétitive et non spécifique puisque d'autres protéases sont inactivées à des degrés divers. Cette inhibition serait attribuable à l'affinité des inhibiteurs examinés pour les protéines (51).

L'effet inhibiteur de l'élastase a déjà été rapporté par les mêmes auteurs pour les oligomères flavanoliques de *Vitis vinifera* L.. Ces oligomères présentent une IC₅₀ de 0,015 mg/ml pour la fraction renfermant le trimère, donc beaucoup plus faible que celles des fractions de *Cupressus sempervirens* L.

L'intérêt pharmacologique de ces oligomères flavanoliques, inhibiteurs de l'élastase et des protéases, réside donc dans la protection des tissus conjonctifs et élastiques qu'ils assurent.

Au cours d'un processus inflammatoire, les polynucléaires neutrophiles (PMN) sont attirés par chimiotactisme sur le site lésé. Ils vont libérer par dégranulation, des enzymes lysosomiales (les protéases) et des radicaux libres qui participent, comme nous l'avons déjà évoqué, à la dégradation des tissus conjonctifs. Aussi, un contrôle de l'activation des neutrophiles est un élément essentiel dans la prévention des attaques oxydatives.

Ces notions introduisent l'étude suivante qui a mis en valeur les propriétés anti-inflammatoires des procyanidines issues de pépins de *Vitis vinifera* L. (30).

Cette étude a évalué les propriétés d'une fraction, hautement purifiée, d'oligomères de procyanidines par comparaison avec la catéchine et la quercétine. Les auteurs ont étudié en particulier, la capacité de cette fraction à inhiber le relargage des enzymes lysosomiales: la myéloperoxydase, la β -glucuronidase et l'élastase.

Les PMN utilisés sont isolés de souches leucocytaires humaines. La production de l'anion superoxyde ainsi que le relargage des enzymes sont quantifiés et comparés aux valeurs obtenues avec des PMN contrôles.

Les résultats (figure 39) montrent que les procyanidines sont capables d'inhiber la formation de l'anion superoxyde de façon dose-dépendante, avec une concentration minimale efficace de 0,05 μ M (11,3% d'inhibition). L'inhibition maximale de 78% est obtenue à la concentration de 20 μ M et la concentration IC_{50} est de 7,2 μ M.

L'unité monomère catéchine est significativement moins active que les procyanidines.

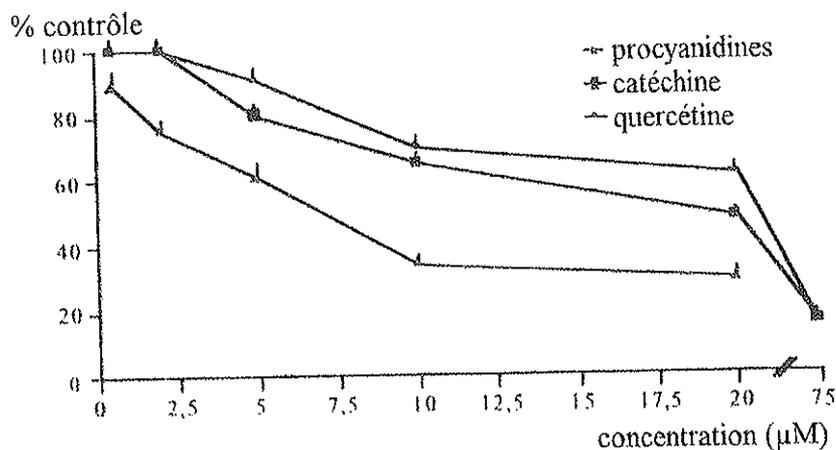


Figure 39: Effet des composés sur la production de l'anion superoxyde (30).

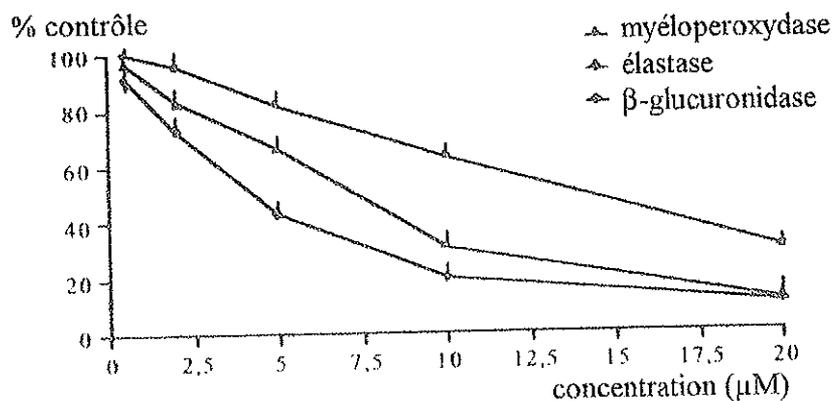


Figure 40: Effet des procyanidines sur la dégranulation des neutrophiles (30).

La figure 40 présente l'effet des procyanidines sur la dégranulation des neutrophiles et montre que les procyanidines inhibent de manière dose-dépendante le relargage de l'élastase (IC_{50} : 5,4 μM), de la myéloperoxydase (IC_{50} : 7,2 μM) et de la β -glucuronidase (IC_{50} : 13,9 μM). Les concentrations minimales efficaces respectives sont de 0,5 μM (10% d'inhibition) et de 2 μM (17,5 et 4,5% d'inhibition respectivement). Le pouvoir d'inhibition des procyanidines est largement supérieur à celui de la catéchine et de la quercétine. L'effet inhibiteur obtenu avec ces deux composés, utilisés ensemble, n'est pas dose-dépendant.

Les activités de l'élastase et de la β -glucuronidase ne sont pas affectées par 1 à 50 μM de procyanidines, alors que l'activité de la myéloperoxydase diminue de manière dose-dépendante, 21% d'inhibition à 1 μM , 52% d'inhibition à 2 μM , 74% d'inhibition à 3 μM . L'inhibition maximale, 82%, est obtenue à 5 μM et la concentration IC_{50} est de 2 μM .

En conséquence, les procyanidines n'inhibent pas la dégranulation des PMN seulement par un effet sur la membrane cellulaire mais aussi par une activité spécifique sur la myéloperoxydase relarguée.

Les mêmes auteurs ont démontré que les procyanidines exercent une puissante inhibition de la collagénase, de l'élastase, de la hyaluronidase et de la β -glucuronidase (tableau 17).

Ces enzymes sont impliquées dans la dégradation du collagène, de l'élastine et de l'acide hyaluronique, principaux constituants des tissus conjonctifs que l'on retrouve au niveau des vaisseaux et du derme (9).

Enzyme	Procyanidines IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)	Enzyme	Procyanidines IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$)
Xanthine-oxydase	2,4	Hyaluronidase	80,0
Elastase	4,2	β -Glucuronidase	1,1
Collagénase	38,0		

Tableau 17: Inhibition enzymatique des procyanidines (9).

D'après cette étude, les procyanidines agissent en piégeant les radicaux libres et en modulant l'activité des enzymes protéolytiques telles que la collagénase et l'élastase. De plus, ces composés protègent l'intégrité de l'acide hyaluronique en maintenant cette macromolécule sous une forme hautement polymérisée. Pour cela, elles inhibent les systèmes enzymatiques spécifiques (hyaluronidase) et non spécifique (β -glucuronidase) impliqués dans sa dépolymérisation physiologique (9).

Ainsi, les procyanidines peuvent prévenir les désordres oxydatifs qui attaquent l'intégrité de l'endothélium. Cette étude montre que les procyanidines présentent un intérêt en thérapeutique vasculaire mais aussi en cosmétologie comme le signale les études qui suivent (64, 65).

Dans ces études, des fibres de collagène plongées dans de l'eau à 75°C subissent une dénaturation se traduisant par une brusque contraction dont la force et la durée sont mesurées.

Comme les fibres témoins qui raccourcissent de 6 cm en moins de 10 secondes, les fibres sont mises à incuber préalablement pendant 24 heures avec des solutions aqueuses à 1 mg/ml d'OPC.

Les résultats obtenus montrent une réduction significative de la puissance et une augmentation de la durée de la contraction des fibres de collagène pré-traitées ce qui confirme le pouvoir protecteur des OPC envers une dénaturation thermique des fibres de collagène.

Le même effet protecteur a été obtenu avec l'élastine *in vivo* chez le lapin. L'expérience a consisté à injecter une solution d'OPC en intra-dermique avant d'injecter au même endroit de l'élastase. Les résultats ont montré à l'examen microscopique et par comparaison avec des témoins, une réduction de 70% de la dégradation des fibres élastiques de la peau (64, 65).

3-Activité antiagrégante plaquettaire des procyanidines

Le vin rouge assure une protection vasculaire contre l'athérogénèse par une action antiagrégante plaquettaire. Cette propriété est liée à une action inhibitrice des procyanidines envers le métabolisme des phospholipides membranaires et notamment celui de l'acide arachidonique qui est régulé par deux voies enzymatiques, la voie de la cyclooxygénase et la voie de la lipoxygénase.

La voie de la cyclo-oxygénase permet la libération d'une substance très agrégante par les plaquettes, le thromboxane, d'une substance anti-agrégante plaquettaire, la prostacycline, libérée par l'endothélium vasculaire et de prostaglandines pro-inflammatoires. La régulation principale de l'agrégation plaquettaire passe par l'antagonisme qui existe entre le thromboxane et la prostacycline.

La voie de la lipoxigénase permet la libération de leucotriènes, substances impliquées dans les phénomènes allergiques, et elle exercerait une action freinatrice sur la libération de thromboxane.

Les procyanidines vont, par leur action inhibitrice envers ces deux voies enzymatiques, lutter contre la libération de thromboxane et donc contre l'agrégation plaquettaire qui intervient dans le processus de l'athérosclérose (14, 15, 27, 115).

Une étude a mis en valeur les capacités anti-agrégantes plaquettaires du vin rouge grâce à une inhibition de synthèse du tromboxane (100).

Cette étude sur la propriété anti-agrégante plaquettaire du vin rouge, a porté sur 24 hommes sains, âgés de 26 à 45 ans. Chacun a consommé les boissons suivantes pendant 4 semaines: un vin rouge, un vin blanc, un jus de raisin commercial et le même jus de raisin enrichi en resvératrol. A part pour cette dernière boisson, une période de 2 semaines d'abstinence est maintenue avant de commencer le programme.

Du sang est prélevé au début et à la fin de chaque programme de manière à doser dans le plasma le thromboxane B2 (TXB-2) et les concentrations IC_{50} nécessaires pour obtenir 50% d'agrégation plaquettaire induite par l'ADP et la thrombine.

Les résultats ont montré que la synthèse de thromboxane B2 par les plaquettes est légèrement augmentée par les deux jus de raisin et fortement inhibée par le vin rouge. Le vin blanc ne présente pas d'effet significatif. Ceci est en accord avec les concentrations IC_{50} obtenues montrant que l'agrégation plaquettaire induite par l'ADP et la thrombine est modérément augmentée par les deux jus de raisins, fortement réduite par le vin rouge et pas du tout par le vin blanc.

V- EFFETS PROTECTEURS DES PROCYANIDINES

ENVERS LES MALADIES CARDIO-VASCULAIRES ISCHEMIQUES

1-Effets vasodilatateurs des OPC

Deux études ont considéré les effets vasculaires d'extraits de *Vitis vinifera* L. contenant des OPC (1, 36).

Cependant, peu d'études ont observé les effets directs de ce type de composés sur la réactivité cellulaire. Récemment, il a été rapporté que certains polyphénols sont capables d'entraîner un relâchement vasculaire dépendant de la présence de l'endothélium et faisant intervenir le monoxyde d'azote (NO) (1, 39).

Une de ces deux études a caractérisé l'effet relaxant de différents composés et a étudié l'implication du NO d'origine endothéliale dans cet effet. Les composés étudiés comprennent un extrait de vin rouge enrichi en dérivés polyphénoliques, le leucocyanidol (tétrahydroxy 5,7,3',4' flavanediol-3,4), l'Endotélon* (oligomères de procyanidines) et un extrait commercial riche en anthocyanes (Enocianina) (1).

Dans un premier temps, les auteurs ont analysé l'effet relaxant de chaque composé. L'étude est réalisée sur des anneaux d'aortes de rat pourvus ou non d'endothélium. La participation du NO d'origine endothéliale est vérifiée en présence d'un inhibiteur de la NO-synthase, le N⁰-nitro-L-arginine-méthyl-ester (L-NAME).

Tous les composés étudiés ont produit, à de faibles concentrations, un effet relaxant en présence de l'endothélium. Le rôle du NO d'origine endothéliale a été vérifié par une inhibition totale de l'effet relaxant en présence de l'inhibiteur de la NO-synthase.

Chaque composé a également créé un effet relaxant en l'absence d'endothélium, avec des concentrations 100 à 1000 fois supérieures à celles produisant une relaxation en présence d'endothélium.

Ainsi, l'effet relaxant bénéfique de ces composés ne semble pas pouvoir être attribué seulement à la relaxation dépendante de l'endothélium.

Dans un second temps, les auteurs ont envisagé différentes hypothèses pour expliquer l'effet relaxant dépendant de l'endothélium.

La première hypothèse est qu'il existe une amplification de l'effet de NO d'origine endothéliale. La seconde hypothèse est une augmentation de la libération de NO par l'endothélium, cette augmentation pouvant être seule ou combinée à l'amplification de l'effet de NO d'origine endothéliale.

Selon les auteurs, cette amplification peut être due à la capacité des procyanidines du vin à capter les radicaux libres, tels que les anions superoxydes, responsables de la dégradation du NO. Cette protection extracellulaire permettrait d'amplifier indirectement l'effet relaxant du NO d'origine endothéliale.

Pour évaluer l'importance de cette protection, les auteurs ont comparé les effets de la superoxyde dismutase (enzyme de dégradation des anions superoxydes), de l'extrait de vin et des dérivés polyphénoliques (à des concentrations où ils n'ont pas d'effet relaxant par eux-mêmes) sur l'effet relaxant d'un donneur exogène de NO. L'effet a été étudié sur des anneaux d'aortes pourvus ou dépourvus d'endothélium. Les résultats obtenus en présence et en l'absence de l'endothélium permettent de différencier les modalités d'action des différents composés étudiés.

Ainsi, en l'absence d'endothélium et contrairement à la superoxyde dismutase, l'extrait de vin ainsi que les autres produits étudiés ne modifient pas l'effet relaxant du donneur exogène de NO. Ceci suggère que l'effet relaxant de ces composés n'est pas lié à une protection extracellulaire du NO vis à vis des anions superoxydes. L'hypothèse d'une protection intracellulaire de NO n'est cependant pas à exclure. Par conséquent, l'hypothèse la plus probable serait que l'extrait de vin polyphénolique et le leucocyanidol stimulent la production de NO par l'endothélium.

Les résultats ont également montré que, en présence d'un endothélium, l'Endotélon* et l'extrait riche en anthocyanes possèdent un effet supplémentaire par rapport à l'extrait de vin et au leucocyanidol. Cet effet, lié à l'amplification de l'effet relaxant du NO, ne semble pas être la conséquence d'une protection extracellulaire de NO vis à vis des anions superoxydes. En effet, même en présence de superoxyde dismutase, les composés concernés sont toujours capables de potentialiser l'effet du NO.

Cette étude montre que l'extrait de vin et les différents composés polyphénoliques étudiés entraînent une relaxation dépendante, seulement en partie, de la présence de l'endothélium vasculaire.

Une autre étude s'est intéressée aux effets vasodilatateurs *in vitro* des oligomères procyanidoliques (OPC) extraits des pépins de raisins (39).

Les auteurs ont utilisé des anneaux d'aortes de rat auxquels l'épithélium avait été, soit enlevé (-E) soit gardé intact (+E).

Les anneaux sont mis dans une solution saline physiologique. L'intégrité de l'endothélium (+E) est vérifiée par l'administration d'acétylcholine et après lavage, les anneaux sont contractés par injection de noradrénaline.

La contraction et la relaxation des anneaux sont assurées par des tensions soumises régulièrement, les réponses sont ensuite enregistrées (figure 41).

Les OPC sont ajoutés sous forme de solutions aqueuses dans le bain, à des concentrations allant de 0,1 à 30 mg/ml.

Pour les anneaux +E, les OPC provoquent une relaxation alors qu'ils sont dénués d'effet sur les anneaux -E. L'effet maximal est obtenu pour une concentration comprise entre 1 et 3 mg/l d'OPC.

De manière à déterminer si le relargage de NO est impliqué dans cette relaxation, un inhibiteur chimique de la NO-synthase, nommé le N⁰-nitro-L-arginine-méthyl-ester (L-NAME), est utilisé. Ajouté au bain à la concentration de 10^{-4} M, ce composé inhibe la relaxation induite par les OPC de $84 \pm 7\%$. De plus, les effets de L-NAME sont partiellement réversibles après addition de L-Arginine, substrat endogène de la NO-synthase conduisant au NO. Ces données confirment que le monoxyde d'azote est principalement impliqué dans la relaxation induite par les OPC.

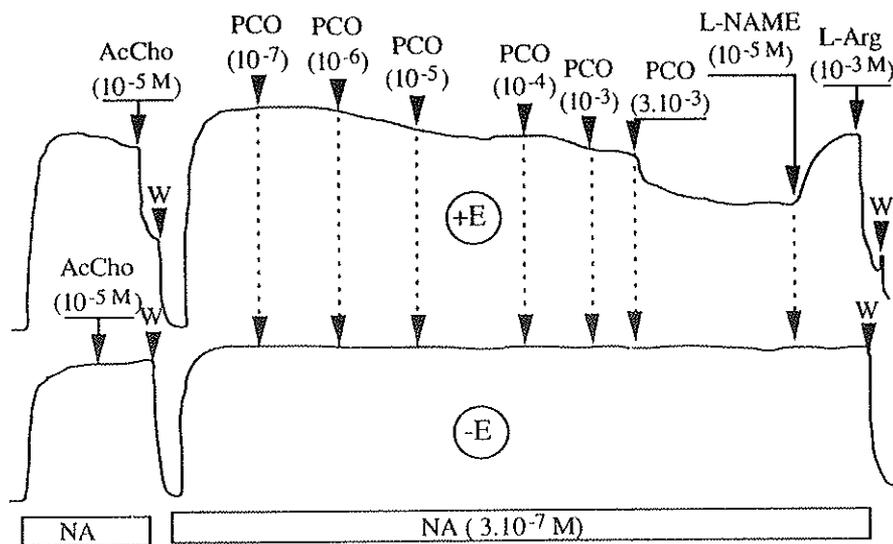


Figure 41: Tracés montrant les effets vasorelaxants des OPC sur +E et -E (39).

Les concentrations des OPC sont exprimées en g/l, les concentrations des autres substances sont exprimées en M.

NA: noradrénaline, AcCho: acétylcholine, L-arg: L arginine,

W: lavage

Les résultats de cette étude montrent que les OPC issus des pépins de raisins peuvent induire une relaxation artérielle dépendante de l'endothélium par l'intermédiaire du NO. Cette activité contribue aux effets bénéfiques du vin sur le système cardiovasculaire.

Récemment, deux études ont montré que les procyanidines issues de *Pinus maritima* L., peuvent agir en tant que piègeur de radicaux libres et comme régulateur du métabolisme du monoxyde d'azote (56, 111).

Les auteurs ont montré qu'une production excessive de monoxyde d'azote dans l'organisme favorise le développement de divers états pathologiques. Aussi, ils ont étudié l'effet des procyanidines issues de *Pinus maritima* L., sur une production accrue de NO liée à une attaque bactérienne, sur des macrophages sensibilisés. Les résultats obtenus ont montré qu'une pré-incubation des cellules par les procyanidines permet de réduire la production de NO (56, 111).

2-Activité angioprotectrice des OPC

Beaucoup d'études ont été faites pour montrer l'efficacité des procyanidines dans le domaine vasculaire.

Ainsi, certains auteurs ont mis en évidence l'effet angioprotecteur des procyanidines qui réduisent l'augmentation de perméabilité des capillaires induite par une injection intradermique d'histamine (9).

D'autres auteurs ont étudié l'activité des procyanidines chez des rats dont la perméabilité des capillaires cérébraux et cardiaques a été augmentée par administration intra-veineuse de collagénase. Il résulte de ces études qu'un traitement oral préalable par 50 mg/kg/j de procyanidines pendant 21 jours, offre une protection totale contre l'augmentation de cette perméabilité induite (9, 26).

Une étude a montré *in vivo* l'activité angioprotectrice des oligomères flavanoliques chez le rat à l'aide du test de Beach et Steinetz (51).

Ce test permet de mesurer la perméabilité capillaire en utilisant la diffusion d'un colorant atoxique et macromoléculaire, le bleu Evans. Il est classiquement utilisé pour apprécier les effets d'agents réduisant la perméabilité capillaire.

Pour cette étude, des rats mâles sont soumis à un même régime alimentaire et sont mis à jeûn 24 heures avant le début de l'expérimentation. Puis, ils reçoivent une injection intra-veineuse de bleu Evans. Après 15 minutes, du sang est prélevé au niveau du sinus rétro-orbitaire et après centrifugation la quantité de colorant restant dans le plasma est évaluée. L'administration d'un facteur angioprotecteur retarde l'élimination du colorant hors de la circulation générale.

Le protocole expérimental est le suivant:

- A T_0 -1h: les témoins reçoivent en intra-péritonéal une solution aqueuse de chlorure de sodium à 0,9% à raison de 0,5 ml pour 100 g de poids corporel. Les animaux traités reçoivent dans les mêmes conditions la solution isotonisée à tester.

- A T_0 : tous les animaux reçoivent par voie intra-veineuse une solution à 1% de bleu Evans isotonisée par du chlorure de sodium, à raison de 0,25 ml pour 100 g de poids corporel.

- A T_0 + 15 mn: le sang des animaux est prélevé au niveau du sinus rétro-orbitaire en vue du dosage du colorant. Le sang est centrifugé pendant 2 minutes à 1 800 g. 50 μ l de surnageant sont prélevés puis dilués dans 2,5 ml de solution isotonique de chlorure de sodium. L'intensité de la coloration du plasma dilué est appréciée par lecture des densités optiques au spectrophotomètre à 623 nm.

Les oligomères flavanoliques testés sont obtenus à partir de *Cupressus sempervirens* L.

Trois fractions sont utilisées comme dans le cas de l'étude de propriété anti-élastasique vue précédemment: une fraction P_1 , une fraction P_2 plus polymérisée que la fraction P_1 et un mélange à parties égales de P_1 et P_2 , ceci en comparaison avec des monomères.

Les résultats sont présentés sous forme des moyennes, m , des valeurs obtenues accompagnées de leur intervalle de confiance Δm au risque 5%. Les pourcentages de variation d'activité sont évalués après traitement angioprotecteur par comparaison avec des rats témoins.

Les variations de l'activité angioprotectrice après administration des monomères et des extraits de *Cupressus sempervirens* (fractions P₁, P₂, P₁+P₂) sont présentées dans le tableau 18.

Substances expérimentées	doses mg/kg/i.p.	nombre d'expériences	D.O.		Variations d'activité angioprotectrice en %
			m	Δm	
Témoins		10	0,430	0,004	
(+)-catéchine	50	10	0,380	0,003	0,0
(-)-épicatéchine	50	10	0,526	0,005	+22,3
(+)-cyanidanol-3	50	10	0,420	0,003	0,0
	100	10	0,416	0,004	0,0
Extrait de <i>Cupressus sempervirens</i> (fraction P ₁)	25	10	0,520	0,004	+21,0
	50	10	0,570	0,003	+32,5
	100	10	0,555	0,004	+29,0
Extrait de <i>Cupressus sempervirens</i> (fraction P ₂)	25	10	0,470	0,004	+9,3
	50	10	0,529	0,004	+23,2
	100	10	0,451	0,004	+4,9
Extrait de <i>Cupressus sempervirens</i> (fraction P ₁ +P ₂)	25	10	0,410	0,005	0,0
	50	10	0,530	0,004	+23,2
	100	10	0,525	0,003	+22,4

Tableau 18: Variations de l'activité angioprotectrice chez le rat après administration de catéchines et d'extraits de *Cupressus sempervirens* L. (fractions P₁, P₂, P₁+P₂) (51).

L'analyse de ces résultats montre que les oligomères flavanoliques présentent une plus forte activité que les monomères, inactifs à l'exception de la (-)-épicatéchine (faible activité à 50 mg/kg).

Par comparaison avec les lots témoins, les lots testés avec la fraction P₁ possèdent une activité angioprotectrice supérieure à celle relevée pour les fractions P₂ et P₁+P₂. La dose optimale pour la fraction P₁ est de 50 mg/kg.

Ces composés diminuent donc la perméabilité des capillaires grâce à un mécanisme très complexe. Pour les oligomères flavanoliques, les auteurs pensent qu'ils agissent grâce à leurs activités anti-élastase, anti-protéase et anti-hyaluronidase. Ces effets inhibiteurs enzymatiques leur permettraient de protéger l'intégrité des capillaires et de limiter la libération de prostaglandines vasodilatatrices.

Récemment, une étude a recherché l'effet des procyanidines, isolées de pépins de raisins, sur une lésion myocardique (29).

Cette étude a été réalisée sur un coeur isolé de lapin, la lésion myocardique a été créée par une ischémie de 40 minutes à bas débit (1 ml/mn).

Les auteurs ont montré qu'une perfusion de 200 µg/ml de procyanidines, au cours des périodes pré- et post-ischémique, est bénéfique pour lutter contre l'irrégularité du rythme. Les procyanidines agiraient en piégeant les radicaux libres impliqués dans les troubles de l'ischémie.

Une autre étude a analysé l'inhibition comparative de l'angiotensine I de l'enzyme de conversion par les procyanidines issues de *Vitis vinifera* L. et de *Cupressus sempervirens* L. (68).

Le système rénine/angiotensine/aldostérone est l'un des principaux systèmes hormonaux impliqués dans la régulation de la pression artérielle. Aussi, les inhibiteurs de ce système parmi lesquels se trouvent les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) sont des antihypertenseurs potentiels.

Ces inhibiteurs, en agissant sur l'enzyme de conversion, empêchent la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II. L'angiotensine II étant responsable de la vasoconstriction et de l'augmentation de la pression artérielle, cette inhibition permet d'obtenir des effets inverses soit une vasodilatation et une baisse de la pression artérielle.

Le but de cette étude est de déterminer, au cours d'expériences *in vitro* et *in vivo* si les oligomères procyanidoliques peuvent être intéressants comme inhibiteurs de cette enzyme et donc comme adjuvants des traitements antihypertenseurs.

Les oligomères procyanidoliques étudiés comprennent deux fractions issues de *Vitis vinifera* L. (une fraction A constituée de monomères, de dimères et d'une faible quantité de trimères et une fraction B formée de monomères et de dimères) et trois fractions de *Cupressus sempervirens* L. (P_1 , P_2 , $P_1 + P_2$). Les différentes fractions sont étudiées en comparaison avec les monomères (+)-catéchine et (-)-épicatéchine.

L'étude *in vivo* consiste à mesurer l'inhibition des réponses pressives chez le lapin après injection des angiotensines I et II (Ang I et Ang II).

Les lapins, pesant environ 3 kg, sont privés de nourriture solide pendant 12 heures. Ils sont anesthésiés, la veine saphène est canulée pour l'injection intraveineuse et la carotide est canulée pour enregistrer la pression artérielle.

Lorsque la pression sanguine est stabilisée, Ang II (100 ng/kg) et Ang I (100, 200 et 400 ng/kg) sont injectées par voie intra-veineuse. Les oligomères procyanidoliques sont ensuite injectés à raison de 5 mg/kg. Puis, Ang II est à nouveau injectée suivie de Ang I aux mêmes doses que précédemment (toutes les solutions sont réalisées dans du NaCl à 0,15 M).

Un exemple des réponses vasopressives aux angiotensines I et II, avant et après injection intra-veineuse de la fraction A de *Vitis vinifera* L. et de la fraction P_2 de *Cupressus sempervirens* L. est donné sur la figure 42.

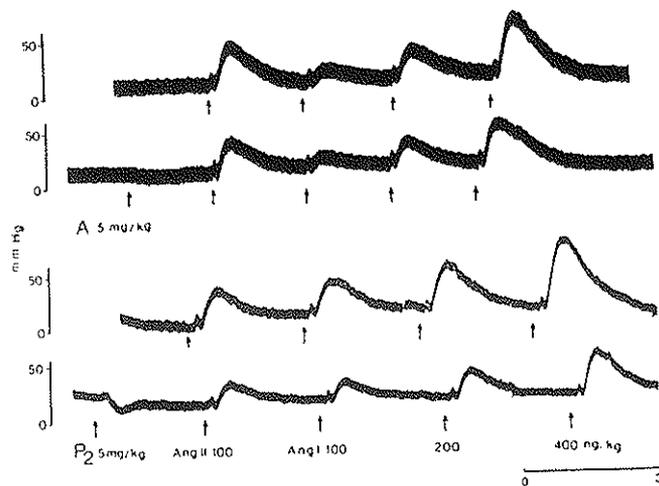


Figure 42: Effets de l'administration intra-veineuse de Ang II (100 ng/kg) et Ang I (100, 200, 400 ng/kg) seules, ou avec la fraction A de *Vitis vinifera* L. ou la fraction P₂ de *Cupressus sempervirens* L., sur la pression artérielle d'un lapin (68).

Les injections intra-veineuses d'Ang I aux doses de 100, 200 et 400 ng/kg produisent une augmentation graduelle de la pression sanguine. Après administration de la fraction P₂, la réponse vasopressive à l'Ang I est inhibée d'environ 40%. Cette inhibition est moindre (20%) après administration de la fraction A (tableau 19).

fractions	% d'inhibition de la réponse hypertensive			
	Ang II	Ang I		
	100 ng/kg	100 ng/kg	200 ng/kg	400 ng/kg
Oligomères procyanidoliques de <i>Vitis vinifera</i> (fraction A)	15,4 +/- 3,9	18,0 +/- 7,6	16,5 +/- 5,9	22,0 +/- 7,3
Oligomères procyanidoliques de <i>Cupressus sempervirens</i> (fraction P ₂)	38,1 +/- 8,9	46,4 +/- 6,6	46,9 +/- 14,8	39,5 +/- 0,9

Tableau 19: Effets des oligomères procyanidoliques sur les réponses hypertensives de Ang I et Ang II chez le lapin (68).

Les valeurs présentées correspondent aux moyennes, +/- un intervalle de confiance, obtenues après 4 expériences.

Pour les deux sources d'oligomères, l'inhibition persiste et même augmente légèrement après d'autres séries d'injections d'Ang I.

Par ailleurs, l'angiotensine II est inhibée plus ou moins proportionnellement ce qui suggère une action supplémentaire, avant ou après l'inhibition de l'enzyme de conversion. Il pourrait s'agir de la formation de complexes entre Ang I, Ang II et les oligomères procyanidoliques. Les angiotensines, présentes dans ces complexes, ne pourraient plus se fixer sur leurs récepteurs physiologiques et agir en tant qu'agents hypertenseurs. Ainsi, la formation de ces complexes permettrait aux oligomères procyanidoliques de limiter l'action des angiotensines.

Pour vérifier cette hypothèse, les auteurs ont réalisé une étude *in vitro*. Cette étude a consisté à mélanger des concentrations de Ang I, Ang II et d'oligomères procyanidoliques, supérieures à celles utilisées pour l'analyse *in vivo* des différentes substances.

Ceci a conduit à la formation de précipités qui sont séparés par centrifugation. La quantité de peptides (Ang I et Ang II) restant dans le surnageant est dosée et le pourcentage de peptides complexés est calculé. Les résultats obtenus avec la fraction A de *Vitis vinifera* sont présentés dans le tableau 20.

	% de complexes formés	
	Ang I 2,5 mg/ml	Ang II 2,5 mg/ml
Oligomères procyanidoliques de <i>Vitis vinifera</i> (fraction A)		
0,5 mg/ml	17,2 +/- 6,8	22,0 +/- 13,7
1 mg/ml	37,2 +/- 11,3	45,0 +/- 11,2

Tableau 20: Pourcentages de complexes formés avec les oligomères procyanidoliques de *Vitis vinifera* (fraction A) (68).

Chaque valeur correspond à la moyenne des résultats obtenus aux 3 expériences, +/- un intervalle de confiance.

L'activité enzymatique du système angiotensine est mesurée en utilisant la technique de Shihabi et Scaro (90) avec l'hippuryl-histidyl-leucine (HHL) comme substrat.

Le milieu réactionnel contient un tampon à pH 8,3, le substrat HHL (2,55 mM) et la solution enzymatique, préparée à partir de poudre de poumon de lapin. Cette solution contient 125 µg de peptides et les substances étudiées à différentes concentrations. La réaction est menée à 37°C pendant 20 minutes. Lorsque l'incubation est terminée, l'acide hippurique formé est extrait puis mesuré par HPLC.

La figure 43 présente les inhibitions du système angiotensine d'un homogénat de poumon de lapin, obtenues avec les catéchines monomères et les oligomères procyanidoliques.

% d'activité restante

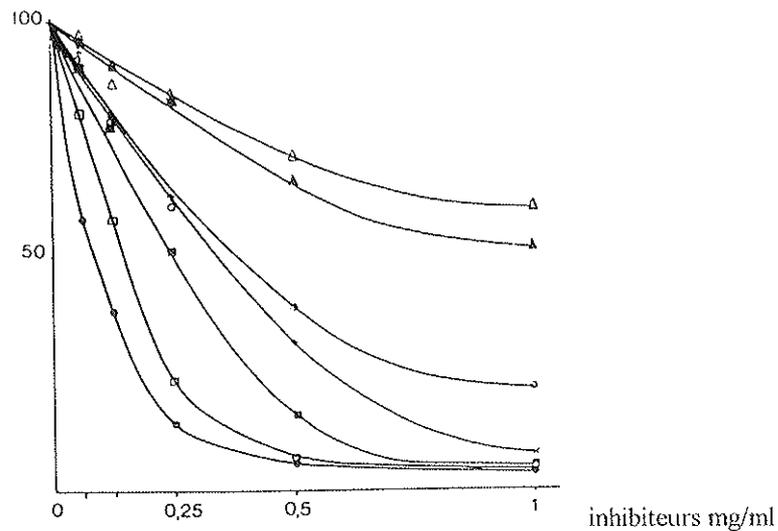


Figure 43: Inhibition de l'enzyme de conversion par les catéchines et les oligomères procyanidoliques sur un homogénat de poumon de lapin (68).
 (+)-catéchine (▲), (-)-épicatéchine (Δ), fraction A (⊙), fraction B (○), fraction P₁ (■), fraction P₂ (□), fraction P₁+ P₂ (×).

Les résultats exprimés en pourcentage d'activité restante montrent que les substances étudiées n'ont pas toutes la même activité. L'inhibition obtenue est approximativement proportionnelle à la concentration en substance utilisée, aucune inhibition totale n'étant obtenue.

La substance la plus active est la fraction A des oligomères procyanidoliques de *Vitis vinifera* L. avec une concentration IC₅₀ de 0,08 mg/ml.

En conclusion de cette étude, les oligomères procyanidoliques inhibent le système angiotensine de manière non compétitive, il n'y a pas fixation sur le site actif de l'enzyme. Ces oligomères semblent agir à plusieurs niveaux. Ils agissent sur l'enzyme de conversion de l'angiotensine puisque son activité est inhibée en utilisant un substrat synthétique, sur Ang I son substrat naturel et sur Ang II, le composé formé. Ces deux dernières actions ont été prouvées par la formation de complexes *in vitro* et par leur action *in vivo*.

3- Etudes cliniques

Les propriétés thérapeutiques des procyanidines, mises à profit dans le traitement de l'insuffisance veineuse, ont également été vérifiées par plusieurs études cliniques (9).

Une de ces études a été réalisée en double-aveugle sur 50 patients ayant des symptômes d'insuffisance veineuse chronique. 25 patients ont reçu pendant un mois des procyanidines (150 mg/j) et 25 patients ont été traités, durant la même période avec une diosmine semi-synthétique (450 mg/j). Des critères subjectifs (paresthésies, douleur...) et objectifs (varicosités) ont été utilisés pour évaluer l'efficacité de chaque drogue. Les résultats de cette étude ont montré que les deux drogues sont bien tolérées et sont efficaces sur l'insuffisance veineuse périphérique. Les procyanidines semblent avoir un effet plus rapide et plus durable (9).

Une autre étude clinique comparable a été réalisée en double-aveugle, avec un contrôle par un placebo, sur 92 patients ayant des manifestations fonctionnelles d'une insuffisance veineuse périphérique. Les procyanidines (300 mg/j) administrées pendant 28 jours ont amélioré la fonctionnalité veineuse en réduisant de plus de 50% les valeurs initiales des paramètres cliniques (douleur, crampes nocturnes, oedème) utilisés pour évaluer l'efficacité du traitement. Cette efficacité du traitement par les procyanidines est observée chez 75% des patients traités, ce taux étant significativement supérieur à celui observé dans le groupe placebo (41%) (9).

Ainsi, les procyanidines agissent à différents niveaux pour lutter contre les effets radicalaires impliqués dans l'athérogénèse, les maladies cardio-vasculaires qui en découlent et les attaques oxydatives au niveau du derme.

En premier lieu, les procyanidines inhibent la peroxydation lipidique par leur propriété antiradicalaire. Cette action est bénéfique à la fois pour lutter contre l'athérogénèse et pour lutter contre le vieillissement cutané.

Par ailleurs, les procyanidines agissent, de par leurs actions antiprotéasique et inhibitrices enzymatiques, pour protéger les fibres conjonctivales des attaques enzymatiques et radicalaires. Les procyanidines, qu'elles soient issues de *Cupressus sempervirens* L. ou de *Vitis vinifera* L., exercent cet effet par inhibition de l'élastase et en protégeant l'élastine par formation de complexes. Mais, il faut remarquer que les procyanidines issues des pépins de raisin sont plus efficaces dans cette protection, comme l'ont montré les valeurs des IC₅₀. Ces propriétés d'inhibition enzymatique expliquent l'effet protecteur des procyanidines envers les tissus conjonctifs, les capillaires et le derme. De la même façon, le vin rouge, par inhibition enzymatique, offre une protection contre l'athérogénèse en s'opposant à l'agrégation plaquettaire.

Enfin, l'effet vasodilatateur et angioprotecteur des procyanidines leur permet de lutter contre les maladies cardio-vasculaires ischémiques qui découlent de l'athérosclérose.

Leur effet vasodilatateur fait intervenir le monoxyde d'azote. Le mécanisme d'action est complexe. Il associe une action directe sur l'endothélium vasculaire et une action indépendante de la présence de l'endothélium. L'action dépendante de l'endothélium semble liée à une amplification de l'effet relaxant du monoxyde d'azote. Quant à l'action indépendante de l'endothélium, elle paraît liée à une stimulation de la production du monoxyde d'azote.

D'autres auteurs relient l'effet vasodilatateur des procyanidines au monoxyde d'azote mais seulement en présence d'un endothélium.

L'action des procyanidines, issues de *Pinus maritima* L. ou de *Vitis vinifera* L. sur le métabolisme du monoxyde d'azote est donc connu mais les modalités d'action ne sont pas encore bien définies. Il est cependant bien établi que les procyanidines agissent sur les vaisseaux en favorisant une vasodilatation. Cet effet trouve tout son intérêt dans le traitement des troubles vasculaires.

Dans l'optique du traitement des maladies cardio-vasculaires liées à l'athérogénèse, certains auteurs ont étudié l'effet des procyanidines en tant qu'agent angioprotecteur. Ils ont montré que les oligomères procyanidoliques du cyprès diminuent la perméabilité capillaire grâce à leurs propriétés d'inhibiteurs enzymatiques. Ces effets sont confirmés par une autre étude réalisée avec des procyanidines issues de pépins de raisin.

Le développement de l'athérosclérose favorise une hypertension artérielle, source de complication des maladies cardio-vasculaires qui en découlent. Aussi, l'étude de l'action des procyanidines sur l'un des systèmes de régulation de l'hypertension, le système rénine/angiotensine/aldostérone a montré qu'elles agissent, ici encore, en tant qu'inhibiteur enzymatique. Elles bloquent l'action de l'enzyme de conversion, empêchant ainsi la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II. La concentration en angiotensine II diminue, développant ainsi les effets contraires c'est à dire une vasodilatation et une baisse de la pression artérielle.

Cet effet est complété par une action directe sur l'angiotensine I et sur l'angiotensine II par formation de complexes. De cette façon, les angiotensines ne peuvent plus se fixer sur leurs sites de liaison physiologiques et leurs actions sont donc inhibées.

Toutes ces propriétés confirment l'effet protecteur des procyanidines dans les troubles liés à l'athérogénèse et dans les maladies cardio-vasculaires ischémiques. De même, l'effet protecteur envers le derme prend toute son importance.

CHAPITRE VI

TOLERANCE, PHARMACOCINETIQUE
ET METABOLISME DES PROCYANIDINES

I- TOLERANCE

La tolérance des procyanidines a été testée chez des animaux de laboratoire pour définir leur toxicité aiguë et chronique.

Les procyanidines ont été administrées oralement à la dose de 60 mg/kg/j pendant 6 mois chez des rats et pendant 12 mois chez des chiens.

La tolérance obtenue a été très bonne puisqu'elles se sont avérées dépourvues d'effets toxiques, d'effets mutagènes et tératogènes. Elles sont aussi sans danger pour la fertilité et les périodes péri et post-natales (9).

II- PHARMACOCINETIQUE ET METABOLISME

Les premières données concernant la biodisponibilité des procyanidines ont été rapportées par Lappara et al., puis revues par Masquelier et al (9).

Ces études ont été réalisées à partir de procyanidines issues de *Vitis vinifera* L., marquées au carbone 14 et conservées pendant 40 jours dans une atmosphère de $^{14}\text{CO}_2$.

Après administration orale de 2 μCi chez des souris et administration intraduodénale de 0,15 μCi chez des rats, la radioactivité est mesurée dans le sang, les tissus des souris et la bile des rats.

Les taux sanguins de radioactivité mesurés chez les souris sont représentés sur la figure 44.

L'analyse des résultats montre que l'absorption gastrointestinale est rapide avec une concentration maximale, C_{max} de 45 minutes et une demi-vie calculée de 5 heures.

La cinétique de l'excrétion biliaire chez les rats (figure 45) montre que 14% de la radioactivité administrée est éliminée dans la bile en 11 heures.

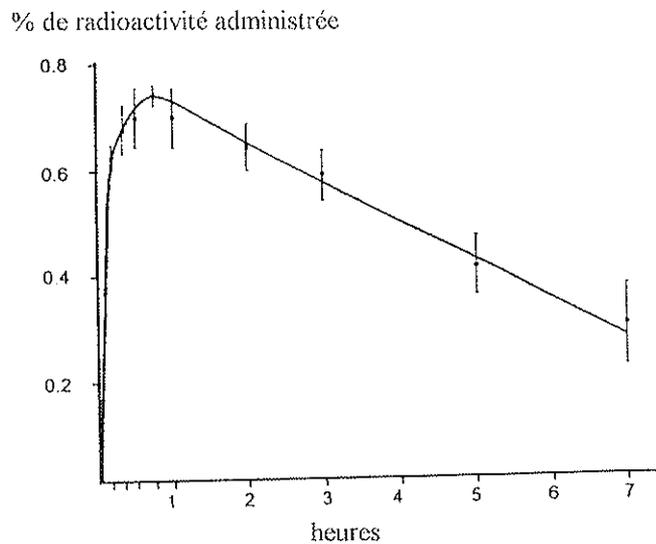


Figure 44: Radioactivité sanguine après administration orale de procyanidines marquées au C^{14} à des souris (9).

Chaque point représente la moyenne des résultats obtenus chez 5 souris +/- un intervalle de confiance.

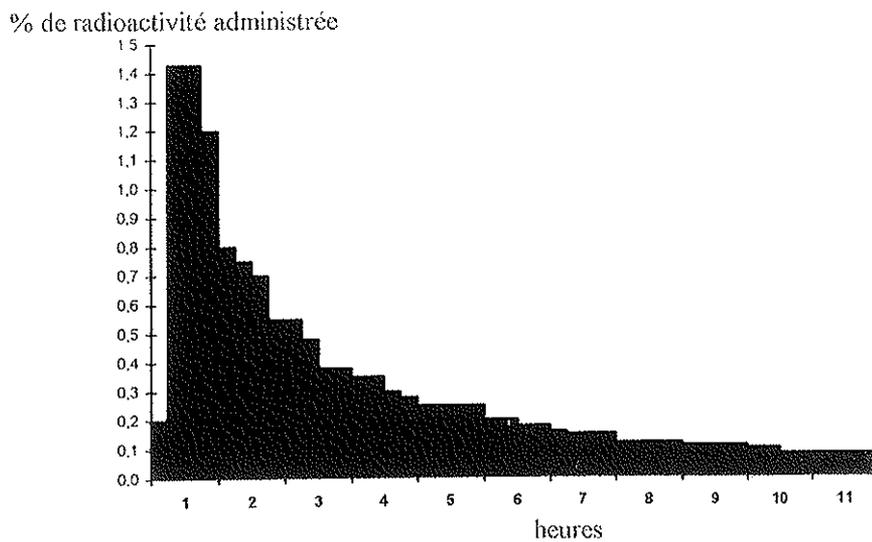


Figure 45: Excrétion biliaire de la radioactivité des rats après administration orale de procyanidines marquées au C^{14} (9).

Chaque valeur représente la moyenne obtenue chez 5 rats.

Les résultats obtenus par la mesure de la radioactivité dans les tissus sont présentés dans le tableau 21. Ils indiquent que les procyanidines sont présentes en 2 sites de liaison préférentiels, un non spécifique (sang, foie, reins...) lié au métabolisme et un spécifique (peau, paroi artérielle...).

Les auteurs soulignent la pertinence de ces résultats en les reliant aux effets pharmacologiques des procyanidines en tant qu'agents protecteurs vasculaires.

Tissus	radioactivité du tissu	
	%	T/S
Sang	6,310 +/- 1,671	1,00
Muscles	6,885 +/- 1,301	1,09
Coeur	7,459 +/- 1,588	1,18
Plasma	8,677 +/- 2,203	1,37
Poumon	10,424 +/- 2,220	1,65
Surrénales	11,370 +/- 3,217	1,80
Rate	12,822 +/- 3,141	2,03
Cartilage	17,504 +/- 4,113	2,77
Peau	17,864 +/- 4,216	2,83
Reins	22,534 +/- 6,399	3,57
Trachée	24,427 +/- 5,740	3,87
Foie	34,056 +/- 9,024	5,40
Duodénum	42,579 +/- 10,346	6,75
Aorte	49,205 +/- 11,513	7,80

Tableau 21: Radioactivité tissulaire des souris après administration orale de procyanidines marquées au C¹⁴ à des souris (9).

T/S: rapport de radioactivité tissu/sang.

Les valeurs présentées correspondent aux moyennes des résultats des mesures

+/- un intervalle de confiance.

Ces données sont confirmées par les résultats d'une autre étude concernant le métabolisme et la distribution de procyanidines-C¹⁴ issues de *Vitis vinifera* L. chez des rats. Les auteurs de cette étude ont administré oralement 50 mg/kg de ces procyanidines-C¹⁴ à des rats (9).

Les résultats ont montré qu'environ 70% de la dose administrée est éliminée dans les 24 premières heures. Sur ces 70%, 6% sont excrétés sous forme de CO₂ dans l'air expiré, 19% sont éliminés dans les urines et 45% sont éliminés dans les fécès. Les principaux métabolites urinaires sont l'acide hippurique, l'éthylcatéchol et l'acide *m*-hydroxyphénylpropionique. Le principal métabolite fécal est l'éthylcatéchol et les principaux métabolites biliaires sont l'acide vanillique et l'acide *m*-hydroxyphénylpropionique.

La distribution de la radioactivité chez le rat confirme que la principale cible des procyanidines est composée des capillaires.

Pfister a aussi cherché *in vivo* sur un cobaye, les sites de liaison des procyanidines après administration intrapéritonéale de procyanidines marquées et analyse au microscope électronique. Les procyanidines ont montré une affinité pour les membranes cellulaires et elles sont apparues liées à la *lamina densa* de la membrane basale. Elles semblent promouvoir la formation de microfibrilles de collagène (9).

Les auteurs de ces études suggèrent que toutes ces données supportent l'activité pharmacologique des oligomères procyanidoliques sur l'augmentation de la résistance capillaire.

Une autre étude a été réalisée dans le but d'étudier la pharmacocinétique de la catéchine.

Pour cela, les auteurs ont analysé les métabolites de la catéchine alimentaire par HPLC et détection UV à 280 nm dans le plasma, la bile et les urines de rats nourris avec une alimentation contenant 0,5% de catéchine. Les expériences ont été effectuées pendant 14 jours (103).

Les métabolites plasmatiques (3'-O-méthylcatéchine) ont été trouvés sous leur forme conjuguée (glucurono et/ou sulfo-conjugaison) et aucune trace de forme libre n'a été détectée. De plus, ces métabolites disparaissent rapidement après la période d'absorption (24 heures).

Dans la bile, aucune trace de forme libre n'a été détectée. Seules les formes conjuguées ont été trouvées à une concentration supérieure à celle des métabolites plasmatiques. En effet, la concentration en métabolites est 15 fois supérieure dans la bile que dans le plasma avec une prédominance de 3'-O-méthylcatéchine (94%).

Au contraire, dans les urines, la catéchine est largement prédominante, avec une concentration 3 fois supérieure à celle de la méthylcatéchine. La faible biodisponibilité plasmatique des métabolites est probablement due à leur forte élimination urinaire.

Ces études confirment que la catéchine est absorbée rapidement et qu'elle est éliminée du sang en 24 heures.

Les propriétés antioxydantes du vin rouge sont mises à profit dans la prévention des maladies cardio-vasculaires, selon le concept du "French-Paradox". Cette notion relie une moindre incidence des maladies cardio-vasculaires à une consommation modérée et journalière de vin rouge.

L'importance d'un apport quotidien en procyanidines antioxydantes est confirmée par l'étude de leur cinétique. Celle-ci nous montre que la concentration plasmatique de la catéchine, après une consommation usuelle de vin rouge, retrouve son taux de base 24 heures après son administration. Ainsi, une consommation journalière et modérée (2 verres de vin rouge) sont nécessaires pour assurer une concentration efficace en composés antioxydants.

L'étude du métabolisme des procyanidines montre qu'elles ont une affinité particulière pour les tissus conjonctifs, le derme et les capillaires. Ceci confirme les pôles d'action des procyanidines en thérapeutique vasculaire, en cosmétologie et en thérapeutique antioxydante nutritionnelle.

CHAPITRE VII

APPLICATIONS THERAPEUTIQUES,
DIETETIQUES
ET COSMETIQUES DES PROCYANIDINES

Compte tenu des propriétés des procyanidines que nous venons d'étudier, et notamment de leurs capacités antioxydantes et antiradicalaires, les applications thérapeutiques, diététiques et cosmétiques de ces substances sont nombreuses (9, 108).

Seront cités ici les principaux produits commercialisés renfermant des oligomères procyanidoliques. En général, ces oligomères proviennent des pépins de raisins mais ils peuvent aussi provenir des cônes de cyprès ou de l'écorce du pin maritime.

Les produits seront séparés en fonction de leur indication principale, c'est à dire soit des spécialités indiquées dans les troubles veinolympatiques, soit des produits cosmétiques, soit des compléments alimentaires à visée antioxydante (55, 17, 87, 93).

I- TRAITEMENT DES TROUBLES VEINOLYMPHATIQUES

Les applications thérapeutiques, avec le traitement des troubles circulatoires, de la fragilité capillaire et des crises hémorroïdaires sont mises à profit dans un brevet d'invention, concernant les dérivés d'OPC estérifiés, cité auparavant dans notre étude (108).

Les auteurs de ce brevet ont évoqué les possibilités de fabrication des préparations pharmaceutiques administrables par voie orale. Ces préparations peuvent renfermer 50 à 200 mg d'équivalent OPC par unité de prise et de préférence 100 à 150 mg. A titre indicatif, les posologies recommandées sont de 100 à 600 mg/j en deux prises pour la phlébologie et de 200 mg à 1 voire 2 g/j pour la crise hémorroïdaire aiguë.

Comme exemple de formulation, le cas d'un médicament veinotonique et vasculoprotecteur est cité. Il se présente sous forme de gélules préparées à partir de 270 mg d'ester hexanoïque d'OPC (correspondant à 100 mg d'OPC) et d'excipients pour un enrobage gastrorésistant comme l'acétophthalate de cellulose.

ARTERASE[®], du laboratoire PPDH est un médicament de phytothérapie renfermant les constituants suivants:

- composés phénoliques de cyprès,
- extrait de prêle,
- extrait d'ail,
- extrait de marron d'inde,
- excipients.

Ces comprimés sont utilisés dans les manifestations fonctionnelles de l'insuffisance veinolymphatique et dans le traitement symptomatique des troubles fonctionnels de la fragilité capillaire.

Pour l'instant, une seule spécialité à base d'oligomères procyanidoliques est commercialisée par le laboratoire, Sanofi-Winthrop. ENDOTELON[®] est commercialisé sous forme de comprimés enrobés gastrorésistants dosés à 50 mg ou à 150 mg. Ces comprimés renferment un extrait purifié de pépins de raisins standardisé en oligomères procyanidoliques.

Comme propriétés, ENDOTELON[®] est un vasculoprotecteur et un veinotonique qui augmente la résistance des vaisseaux et diminue leur perméabilité. Les oligomères procyanidoliques protègent les protéines fibreuses, collagène et élastine, contre la dégradation enzymatique et protègent le collagène d'une dénaturation thermique.

Ce médicament est principalement indiqué dans l'amélioration des symptômes en rapport avec l'insuffisance veinolymphatique (55).

II- PRODUITS COSMETIQUES

Les propriétés antiradicalaires et antioxydantes des procyanidines peuvent être mises à profit dans des préparations cosmétiques. Ces préparations peuvent être conseillées dans le cas des érythèmes solaires.

Les auteurs du brevet concernant les OPC estérifiés ont présenté les possibilités de fabrication de telles préparations. Elles peuvent se présenter sous forme de crème, de pommade, d'émulsion, de gel ou de lotion et elles peuvent renfermer de 0,5 à 5% de produit actif.

Dans ces préparations, les compositions sont associées à des véhicules appropriés pour un usage externe et leur caractère liposoluble favorise leur incorporation dans les formes galéniques classiquement utilisées en cosmétique (108).

Comme exemple de formulation, une émulsion antisolaire à propriété antiviellissement cutané est présentée. Elle peut être obtenue en mélangeant un filtre solaire, un ester oléique d'OPC à raison de 3% et des excipients.

Un autre exemple concerne une crème antiacnéique, astringente et antiseptique pour peaux grasses, elle contient un ester sorbique d'OPC à raison de 1% associé à des excipients.

Les applications cosmétiques des procyanidines ont également été soulignées par Masquelier, concernant la création de cosmétiques ayant pour principe actif des procyanidines encapsulées dans des liposomes. Ces préparations ont toujours pour objet de protéger la peau, les cheveux ou les muqueuses des dommages oxydatifs créés par les radicaux libres (2, 9).

Les produits cosmétiques existant sur le marché et renfermant les oligomères procyanidoliques tendent à se développer de plus en plus. Seuls les produits vendus en parapharmacie vont être cités ici. Dans la plupart des formules les oligomères sont en association avec d'autres composants (55).

COLLOSOL du laboratoire Amido, renferme des polyphénols de pin.

Il s'agit d'une crème, sa formule est la suivante:

- | | |
|----------------------|----------------------|
| -collagène marin, | -extrait de prêle, |
| -polyphénols de pin, | -extrait de citron, |
| -extrait de houblon, | -extrait de romarin, |
| -excipients. | |

Cette crème régénératrice possède des propriétés antioxydantes qui lui permettent de prévenir le vieillissement cutané.

Le laboratoire Caudalie a développé une gamme complète de produits cosmétiques à base de polyphénols de pépins de raisins (17, 55).

Cette gamme de cosmétiques antioxydants comporte plusieurs formes.

Une crème antiride contour des yeux qui renferme dans sa formule les composants suivants:

- | | |
|------------------------------------|--------------------|
| -polyphénols de pépins de raisins, | -calendula, |
| -céramides, | -liposomes, |
| -marron d'inde, | -polyols, |
| -hamamélis, | -protéines de blé, |
| -réglisse, | -excipients. |

Il s'agit d'une crème de soin antioxydant, anticernes, hydratant et tenseur.

Un démaquillant soin aux pépins de raisins composé de:

- polyphénols de pépins de raisins, -lait d'avoine,
- eau de bleuet, -huile d'amande douce,
- beurre de karité, -huile de jojoba,
- excipients.

Ce soin démaquillant est un protecteur antiradicalaire, adoucissant et nourrissant.

Une eau de beauté visage aux huiles essentielles et aux plantes renferme dans sa formule les composants suivants:

- polyphénols de pépins de raisin, -teinture de benjoin,
- teinture de myrrhe, -alcoolat de fleur d'oranger,
- alcoolat de rose, -huile essentielle de romarin,
- huile essentielle de mélisse, -huile essentielle de menthe,
- eau de fleur d'oranger.

Cette eau de beauté est décongestionnante, tonifiante, astringente, adoucissante et cicatrisante.

Un lait corporel aux polyphénols de pépins de raisins. Sa composition est la suivante:

- polyphénols de pépins de raisins,
- NMF (natural moisturising factor),
- acide hyaluronique,
- extrait de Ginkgo biloba,
- huile de bourrache,
- excipients.

Ce lait est raffermissant, antiradicalaire et nourrissant. Il est utilisé en prévention du vieillissement cutané.

Une crème lift'âge aux polyphénols de pépins de raisins: CAUDALIE C80

Cette crème renferme les composants suivants:

- polyphénols de pépins de raisins,
- acides gras essentiels,
- acide hyaluronique,
- extrait d'avoine,
- huile de sésame,
- huile de macadamia,
- excipients.

Cette crème possède un effet tenseur, antioxydant et hydratant. Elle protège la peau contre le vieillissement cellulaire.

Un baume labial aux polyphénols de pépins de raisins a la formule suivante:

- polyphénols de pépins de raisins,
- filtre UVB,
- beurre de karité,
- excipients.

Ce baume labial est antioxydant, apaisant et hydratant.

Les procyanidines de pépins de raisins sont également retrouvées dans un traitement capillaire du laboratoire Phytosolba.

Ce traitement capillaire, PHYTOCYANE, est composé de:

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| -procyanidols de pépins de raisins, | -ginkgo biloba, |
| -viburnum, | -acides aminés soufrés, |
| -stimulateur peptidique, | -polyolosite soufré d'origine marine, |
| -vitamine B6, | -panthénol, |
| -alcool, | -excipients. |

Cette lotion capillaire est un traitement anti-chute pour femme. Elle active la micro-circulation du bulbe pileux et favorise la production de kératine. Cette lotion permet de dynamiser la croissance capillaire et de régénérer le cuir chevelu.

III- COMPLEMENTES ALIMENTAIRES

Les préparations renfermant des procyanidines ont un troisième pôle d'application mis à profit en diététique. De par leurs propriétés antiradicalaires, les procyanidines peuvent être utilisées comme complément alimentaire à visée antioxydante, ceci pour compléter et améliorer les traitements locaux cosmétiques ou thérapeutiques détaillés auparavant (3, 89, 108).

Plusieurs laboratoires sont concernés pour ces compléments nutritionnels antioxydants (17, 55, 87, 93).

Le laboratoire, Arkomédica, commercialise deux compléments alimentaires.

PHYTOBRONZ OPC:

- OPC extraits de pépins de raisins,
- caroténoïdes,
- bêtacarotène,
- excipients.
- poudre de carotte,
- huile de bourrache,
- vitamine E,

Ces gélules antiradicalaires permettent de préparer la peau au bronzage, d'activer et de prolonger le bronzage.

PHYTOPTIC ANTI-AGE OCULAIRE:

- OPC extraits de pépins de raisin,
- hamamélis,
- vitamine C,
- huile de poisson,
- ginkgo,
- zinc,
- vitamine E,
- excipients.

Il s'agit de gélules antiâge pour les yeux. Ce complément nutritionnel antioxydant et protecteur vasculaire permet de protéger les structures membranaires de l'oeil.

Le laboratoire Caudalie complète la gamme de produits à base d'OPC de pépins de raisins avec CAUDALIE OPC renfermant les constituants suivants:

- OPC de pépins de raisins,
- huile de soja hydrogénée,
- excipients.

Ce complément alimentaire est à visée antioxydante et hydratante, il permet de lutter contre le vieillissement cutané lié aux agressions telles que la pollution ou le stress (17).

SUNLIFT, du laboratoire Distrivie est composé de:

- OPC de raisins,
- huile de bourrache,
- bêta-carotène,
- vitamine E,
- excipients.

Ces gélules aux OPC sont indiquées dans la préparation de la peau au soleil, au bronzage et dans la prévention du vieillissement photo-induit.

GEOFORM BEAUTE ANTIRADICALAIRE est commercialisé par le laboratoire Goomar. Sa formule est:

- OPC extraits de pépins de raisins,
- extrait de laminaire,
- zinc,
- excipients.

Il s'agit d'un complément nutritionnel antiradicalaire. Riche en oligo-éléments et en sels minéraux, il est indiqué dans la prévention du vieillissement cutané.

MEDICOMPLEX commercialisé par Métapharm, renferme les composants suivants:

- polyphénols de pépins de raisins,
- huile de germe de blé,
- carotte,
- ail,
- excipients.
- huile d'olive,
- vitamine C,
- tomate,
- vitamine E,

Ce complément alimentaire antioxydant se présente sous forme de capsules. Il permet de protéger l'organisme du vieillissement.

Le laboratoire, Catherine Moreau, commercialise plusieurs compléments alimentaires à base de procyanidines.

AGEVIT AIDE MINCEUR:

- | | |
|----------------------------|---------------|
| -OPC de pépins de raisins, | -guarana, |
| -gluconate de magnésium, | -vitamine B5, |
| -acide folique, | -excipients. |

Ce complément alimentaire est présenté sous forme de gélules. De par la présence de magnésium et des procyanidols, il est indiqué dans la lutte contre le vieillissement, dans les états de convalescence et comme adjuvant dans les régimes minceur.

AGEVIT A + SILICE:

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| -OPC de pépins de raisins, | -bétacarotène, |
| -extrait de carotte, | -acides gras essentiels, |
| -huile de poisson, | -levure de bière, |
| -silice, | -prêle, |
| -excipients. | |

Il s'agit de capsules antiâges, antiradicalaires, réparatrices et protectrices contre le vieillissement cellulaire.

AGEVIT CAPITAL JEUNESSE:

- OPC de pépins de raisins,
- vitamine B2,
- vitamine B6,
- levure de bière,
- vitamine B5,
- excipients.

Ces gélules sont utilisées dans la prévention des vieillissements cutané et photo-induit.

AGEVIT SENIOR OMEGA 3:

- OPC de pépins de raisins,
- vitamine E,
- huile essentielle de basilic,
- excipients.
- huile de poisson titrée en oméga 3,
- vitamine B6,
- lécithine de soja,

Ces capsules alimentaires sont indiquées dans la prévention du vieillissement cellulaire grâce à leurs propriétés antiradicalaire et antioxydante.

AGEVIT SOLEIL:

- OPC de pépins de raisins,
- oligo-éléments,
- vitamine A,
- excipients.
- bétacarotène,
- gluconate de zinc,
- huile d'onagre,

Il s'agit de capsules préparatrices et réparatrices des expositions solaires grâce aux procyanidols et au bétacarotène.

Le laboratoire, **Pharma et Plantes**, commercialise SEB ANTIOXYDANT renfermant les constituants suivants:

- | | |
|---------------------------|--------------|
| -OPC de pépins de raisin, | -mélisse, |
| -vitamine C, | -zinc, |
| -vitamine E, | -excipients. |

Ce sont des gélules antioxydantes utilisées pour lutter contre le vieillissement cellulaire.

IN BEAUTY, du laboratoire **Phytodif** est composé de:

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| -OPC de pépins de raisins, | -huile de germe de blé, |
| -céramides, | -huile de foie de morue, |
| -lécithine de soja, | -bêta-carotène, |
| -excipients. | |

Ces gélules antioxydantes sont riches en acides gras essentiels et en céramides. Ce complément alimentaire antiradicalaire régénère, hydrate, nourrit et tonifie l'épiderme. Il permet ainsi de lutter contre le vieillissement, les rides et les ridules.

KRETO-A du laboratoire, Pierre Fabre Santé est une solution buvable composée de:

- | | |
|------------------|-----------------------|
| -extrait de vin, | -concentré de raisin, |
| -huile d'olive, | -vitamine C, |
| -vitamine E, | -extrait de tomate, |
| -excipients. | |

KRETO-A permet une supplémentation en polyphénols et en vitamines. Cette solution antioxydante et antiradicalaire intervient dans la protection des membranes cellulaires.

Le laboratoire, Yves Ponroy, a élaboré ACTILIFT IRB, un complément alimentaire antiâge et antiradicalaire de formule suivante:

- | | |
|----------------------------|-----------------------------|
| -OPC de pépins de raisins, | -huile de pépins de cassis, |
| -vitamine C, | -bêta-carotène, |
| -vitamine E, | -lécithine de soja, |
| -oxyde de zinc, | -vitamine B2, |
| -vitamine B8, | -excipients. |

LONGELIA est commercialisé par Sarget Pharma. Ce sont des gélules composées de:

- polyphénols extraits des pépins de raisins,
- excipients.

Ces gélules antioxydantes, antiradicalaires sont indiquées dans la prévention du vieillissement cellulaire lié à la pollution, au stress, à une alimentation déséquilibrée (87).

Le laboratoire Socopharm commercialise deux produits à base de procyanidols (93).

ELIMINYL, une solution buvable composée de:

- procyanidols de pépins de raisins,
- extrait sec de pissenlit,
- extrait sec de racine de fenouil,
- eau purifiée,
- atomisat de betterave rouge,
- excipients.

Ce complément alimentaire est diurétique. Il favorise les fonctions d'élimination et les procyanidols antioxydants protègent le tissu conjonctif. Cette solution est indiquée dans l'insuffisance veinolymphatique et dans la rétention d'eau.

PROCYANIDYL OPC composé de:

- OPC extraits de pépins de raisins,
- vitamine C,
- excipients.

Ce complément alimentaire antioxydant se présente sous forme de comprimés. Il est utilisé dans la prévention du vieillissement cellulaire et cutané.

Le laboratoire, Target Pharma, commercialise un complément nutritionnel, le B.E. REGENERATEUR PEAU.

Ce produit est constitué de trois phases dont la composition est la suivante:

-phase 1:

-huile de bourrache,	-huile de soja hydrogénée,
-zinc,	-tocophérol,
-vitamine A,	-vitamine B8,
-biotine,	-excipients.

-phase 2:

-huile de bourrache,	-huile de soja hydrogénée,
-huile de germe de blé,	-tocophérol,
-lécithine de soja,	-vitamine B5,
-vitamine A,	-excipients.

-phase 3:

-polyphénols de raisins,	-huile de germe de blé,
-vitamine C,	-bêtacarotène,
-vitamine E,	-excipients.

Ces capsules de supplémentation nutritionnelle ont une finalité cosmétologique. Il s'agit d'un programme beauté en trois phases qui permet de lutter contre le vieillissement et la déshydratation cutanés.

CONCLUSION

Les oligomères flavanoliques sont présents en grande quantité dans l'écorce du pin maritime, les cônes de cyprès et surtout dans les pépins de raisin.

Les méthodes d'extraction de ces composés sont nombreuses, elles diffèrent essentiellement par les solvants utilisés et par les buts recherchés. Les solvants peuvent être un alcool, un mélange hydro-alcoolique ou un solvant organique pur ou associé à de l'eau. L'extraction optimale des oligomères flavanoliques est obtenue avec le mélange eau/acétate d'éthyle en présence d'eau en quantité suffisante pour saturer le système végétal/solvant. D'autres techniques d'extraction, plus ou moins complexes, existent, certaines pour privilégier les oligomères et d'autres pour limiter la présence des monomères et des polymères.

Les oligomères flavanoliques sont de puissants antiradicalaires et inhibiteurs enzymatiques. Leur capacité antioxydante est supérieure à celle des vitamines et des enzymes. Ces propriétés leur permettent de lutter contre les méfaits des radicaux libres, en particulier au niveau de l'athérogénèse et des troubles cardio-vasculaires qu'elle engendre. Cet effet protecteur se retrouve également au niveau du derme permettant ainsi aux oligomères flavanoliques d'agir efficacement contre le vieillissement cutané. Il se réalise par inhibition de la peroxydation lipidique et en protégeant les fibres constitutives des tissus conjonctifs des attaques radicalaires et enzymatiques.

Par ailleurs, les oligomères flavanoliques peuvent avoir un effet bénéfique dans les troubles cardio-vasculaires grâce à d'autres propriétés telles que vasodilatatrice et angioprotectrice. C'est surtout cette dernière activité qui est recherchée dans les médicaments renfermant les oligomères flavanoliques ou les drogues les contenant.

Ainsi, les propriétés des oligomères flavanoliques sont mises à profit avec le concept du "French Paradox" et dans la lutte contre le vieillissement cutané.

Ces applications expliquent le développement actuel des produits cosmétiques et des compléments alimentaires à visée antioxydante. Ces derniers, utilisés par voie orale, permettent d'augmenter les capacités antioxydantes de l'organisme en lui fournissant des composés antiradicalaires et en protégeant les autres antioxydants présents de l'oxydation.

Ainsi, les oligomères flavanoliques sont souvent associés à la vitamine C avec laquelle ils agissent en synergie. Les compléments nutritionnels antioxydants font partie des nutraceutiques, apports alimentaires adaptés à la prévention d'un risque particulier. Les nutraceutiques sont à mi-chemin entre l'aliment et le médicament.

ABREVIATIONS

AcCho: acétylcholine
ADN: acide désoxyribonucléique
ADP: adénosine dinucléotide phosphorylé
AGE: acides gras essentiels
Ang I: angiotensine I
Ang II: angiotensine II
C¹⁴: carbone marqué au carbone 14
CCM: chromatographie couches minces
CF 50%: concentration fixant 50% des radicaux libres
Ci: curie
C_{max}: concentration maximale
CO₂: dioxyde de carbone
CI₅₀ = IC₅₀: concentration inhibitrice à 50%
CP-PRO: crude preparation of procyanidins (préparation brute de procyanidines)
DCC: dicyclohexylcarbodiimide
DMACA: diméthylaminopyridine
DMPO: 5,5-diméthyl-1-pyrroline-N-oxyde
DO: densité optique
DPPH: radical 1-1-diphényl-2-picrylhydrazyl
EtOAc: acétate d'éthyle
FeCl₂: chlorure de fer
GAE: équivalent en acide gallique
GSPE: grape seed proanthocyanidin extract
HCl: acide chlorhydrique
HDL: high density lipoproteins (lipoprotéines de haute densité)
HHL: hippuryl-histidyl-leucine
HPLC: chromatographie liquide à haute performance
HX: hypoxanthine

IEC: inhibiteur de l'enzyme de conversion
IR: infra-rouge
IV: intra-veineux
L-Arg: L arginine
LDH: lactate déshydrogénase
LDL: low density lipoproteins (lipoprotéines de basse densité)
L-NAME: N^w-nitro-L-arginine-méthyl-ester
MAD: malondialdéhyde
MTT: 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromique
NaCl: chlorure de sodium
NADH: nicotinamide adénosine dinucléotide hydrogéné
NADP: nicotinamide adénine dinucléotide phosphorylé
NaOH: hydroxyde de sodium
Na₂SO₄: sulfate de sodium
NBT: bleu de nitrotétrazolium
NMF: natural moisturising factor (facteur naturel d'hydratation)
N₂: azote
NO: monoxyde d'azote
OH·: radical hydroxyle
O₂^{·-}: radical superoxyde
OPC: oligomères procyanidoliques
PGI₂: prostaglandine I₂ ou prostacycline
PMN: polynucléaires neutrophiles
PMS: phénazine méthosulfate
PP-PRO: pure preparation of procyanidins (préparation purifiée de procyanidines)
RMN: résonance magnétique nucléaire
RPE: résonance paramagnétique électronique
SeGPx: glutathion peroxydase sélénodépendante

SOD: superoxyde dismutase

Suc (Ala)₃pNA: N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine-p-nitroanilide

t-BHP: t-butyl-hydroperoxyde

TEAC: trolox equivalent antioxidant capacity

test 3D: damaged DNA detection (test de détection des lésions d'ADN)

THF: tétrahydrofurane

TPA: tétradécanoylphorbol-13-acétate

TR: temps de rétention

TRAP: pouvoir antioxydant réactif total

TROLOX: 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-acide carboxylique

TXB₂: thromboxane B₂

UI: unité internationale

UV: ultra-violet

UVB: ultraviolet B

VSE: succinate de vitamine E

XO: xanthine oxydase

W: lavage

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ANDRIAMBELOSON (E), STOCLET (J.C), ANDRIANTSITOHAINA (R)
"Effets vasculaires d'extraits végétaux contenant des dérivés polyphénoliques."
18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 2,
421- 422
- 2- ANDRY (M.C), VEZIN (H), DUMISTRACEL (I), BERNIER (J.L), LEVY (M.C)
"Cross-linked proanthocyanidin microcapsules: preparation, properties,
and free radical scavenging activity."
19ème conférence internationale sur les polyphénols, Lille (France), 1998, 2, 547-548
- 3- ARIGA (T)
"Development of an antioxidative substance from grape seeds."
Food Style 21, 1997, 1 (4), 14-15
- 4- AVIRAM (M), FUHRMAN (B)
"Dietary polyphenols inhibit LDL oxidation and reduce the progression of
atherosclerosis."
19ème conférence internationale sur les polyphénols, Lille (France), 1998, 1, 21-22
- 5- BALDI (A), ROMANI (A), MULINACCI (N), VINCIERI (F.F), GHISELLI (A)
"The relative antioxydant potencies of some polyphenols in grapes and wines."
ACS Symp. Ser. 661, 1997, (wine), 166-179
- 6- BAGCHI (D), GARG (A), KROHN (R.L), BAGCHI (M), BAGCHI (D.J),
BALMOORI (J), STOHS, (S.J)
"Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxydants against
TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and
peritoneal macrophage activation in mice."
Gen. Pharmacol., 1998, 30 (5), 771-776
- 7- BAGCHI (D), GARG (A), KROHN (R.L), BAGCHI (M), TRAN (M.X), STOHS
(S.J)
"Oxygen free radical scavenging abilities of vitamins C and E, and a grape seed
proanthocyanidin extract *in vitro*."
Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 1997, 95 (2),
179-189
- 8- BATE-SMITH (E.C)
"Phytochemistry of proanthocyanidins."
Phytochemistry, 1975, 14, 1107-1113
- 9- BOMBARDELLI (E), MORAZZONI (P)
"*Vitis vinifera* L."
Fitoterapia, 1995, 66 (4), 291-317
- 10- BOMBARDELLI (E), MORAZZONI (P), CARINI (M), ALDINI (G), FACINO (R)
"Biological activity of procyanidins from *Vitis vinifera* L."
Biofactors, 1997, 6 (4), 429-431
- 11- BROUILLARD (R), GEORGE (F), FOUGEROUSSE (A)
"Polyphenols produced during red wine ageing."
Biofactors, 1997, 6 (4), 403-410

- 12- BOCK (C)
"Connaître et découvrir les arbres."
Liber, Paris, 1992
- 13- BOUHAMIDI (R), PREVOST (V), NOUVELOT (A)
"High protection by grape seed proanthocyanidins (GSPC) of polyunsaturated fatty acids against UV-C induced peroxidation."
Comptes rendus de l'Académie des Sciences- série III, 1998, 321 (1), 31-38.
- 14- BRUCKERT (E), THOMAS (D)
"Les hypercholestérolémies"
John Libbey Eurotext, Paris, 1997
- 15- BRUNETON (J)
"Pharmacognosy - Phytochemistry - Medicinal Plants"
Tech. et Doc. Lavoisier, Paris, 1995
- 16- CAMBAR (J), POTIER (M)
"Rapport d'étude sur la mise en évidence de l'effet anti-radicalaire de la substance active de LONGELIA sur la cytotoxicité de radicaux libres oxygénés générés par le modèle *in vitro* hypoxanthine/xanthine oxydase sur culture de fibroblastes de peau humaine."
Laboratoire Sarget et Laboratoire de Biologie Cellulaire de l'Université de Bordeaux 2, 1997.
- 17- CAUDALIE
documents fournis par le laboratoire CAUDALIE, Paris.
- 18- CONSTANT (J)
"Alcohol, ischemic heart disease, and the French paradox."
Clinical Cardiology, 1997, 20 (5), 420-424
- 19- CRAVERO (M.C), DI STEFANO (R)
"Phenolic composition of grape varieties cultivated in Piedmont (Italy)."
Vignevini, 1992, 19 (5), 47-54
- 20- DAY (A.P), KEMP (H.J), BOLTON (C), HARTOG (M), STANSBIE (D)
"Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxydant capacity and low-density lipoprotein oxidation."
Annals of nutrition and metabolism, 1997, 41 (6), 353-357
- 21- DELAVEAU (P)
"Les plantes médicinales."
Les Actualités pharmaceutiques, 1976, 123, 17-18
- 22- DELAVEAU (P)
"Les plantes médicinales."
Les Actualités pharmaceutiques, 1986, 230, 65-66
- 23- DENIS DORE (P.D)
"Biochimie clinique"
Maloine, Paris, 1994

- 24- DE PASCUAL (T.S), MENDEZ ARROYO (A), SANTOS BUELGA (C),
RIVAS-GONZALO (J.C)
"Determination of flavan-3-ols in some Spanish wines."
19ème conférence internationale sur les polyphénols, Lille (France), 1998, 2, 333-334
- 25- DE PASCUAL (T.S), TREUTTER (D), RIVAS-GONZALO (J.C),
SANTOS-BUELGA (C)
"Qualitative et quantitative analysis of dietary flavanols."
19ème conférence internationale sur les polyphénols, Lille (France), 1998, 2, 257-258
- 26- DIMOV (S.T), FARTZOV (K), BANKOV (B)
"Quantitative analysis and physiological effect of phenolics acids of wines."
Symposium International d'Oenologie, 1995
Tec. et Doc. Lavoisier, Paris, 1996, 654-659.
- 27- DOUSTE BLAZY (L), MENDY (F), et la commission "Biologie des lipides" du
CNERNA
"Biologie des lipides chez l'homme - de la physiologie à la pathologie"
Tech. et Doc. Lavoisier, Paris, 1988
- 28- ESCRIBANO BAILON (T), GUTIERREZ-FERNANDEZ (Y),
RIVAS-GONZALO (J.C), SANTOS-BUELGA (C)
"Analysis of flavan-3-ol from *Vitis vinifera* variety Tempranillo grape seeds."
Bull. liaison - Groupe Polyphénols, 1992, 16 (2), 129-132
- 29- FACINO (R.M), CARINI (M), ALDINI (G), BERTI (F), ROSSINI (G),
BOMBARDELLI (E), MORAZZONI (P)
"Procyanidines from *Vitis vinifera* seeds protect rabbit heart from
ischemia/reperfusion injury. Antioxidant intervention and/or iron and copper
sequestering ability."
Planta medica, 1996, 62 (6), 495-502
- 30- FACINO (R.M), CARINI (M), SAIBENE (L), STEFANI (R), BOMBARDELLI (E),
MORAZZONI (P)
"Procyanidins from *Vitis vinifera* seeds inhibit the respiratory burst of activated
neutrophils and lysosomal enzyme release."
18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 2,
411-412
- 31- FAUCONNEAU (B), WAFFO-TEGUO (P), HUGUET (F), BARRIER (L),
DECENDIT (A), MERILLON (J.M)
"Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic
compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests."
Life Sci., 1997, 61 (21), 2103-2110
- 32- FERNANDEZ DE SIMON (B), PEREZ-ILZARBE (J), HERNANDEZ (T), GOMEZ-
CORDOVES (C), ESTRELLA (I)
"HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds."
Chromatographia, 1990, 30 (1-2), 35-37

- 33- FERNANDEZ DE SIMON (B), HERNANDEZ (T), ESTRELLA (I), GOMEZ-CORDOVES (C)
"Variation in the phenol content of grapes during ripening: low-molecular-weight phenols."
Z-Lebensm-Unters-Forsch, 1992, 194 (4), 351-354
- 34- FERREIRA (D), STEYNBERG (J.P), BURGER (J.F.W), BEZUIDENHOUDT (B.C.B)
"Diversity of structure and function in oligomeric flavanoids"
Rec. Adv. Phytochem., 1992, 26, 255-256
- 35- FINNEN (M.J), LAWRENCE (C.M), SCHUSTER (S)
"Antioxidants and phytotherapy"
The Lancet, 1994, 344, 1129-1130
- 36- FITZPATRICK (D), MAGGI (D), BING (B), COFFEY (R), FRIES (D).
"Vasorelaxation, endothelium, and wine."
Biofactors, 1997, 6 (4), 455-459
- 37- FRANKEL (E)
"Activity of wine and grape phenolic antioxidants in human LDL"
Biofactors, 1997, 6 (4), 433-435.
- 38- FRANKEL (E.N), BOSANEK (C.A), MEYER (A.S), SILLIMAN (K), KIRK (L.L)
"Commercial Grape juices inhibit the *in vitro* oxidation of human low-density lipoproteins."
J. Agric. Food Chem., 1998, 46 (3), 834-838
- 39- FRESLON (J.L), MORIN (N), MENDES (A), VERCAUTEREN (J)
"In vitro vasodilatator effects of procyanidolic oligomers (PCO) extracted from grape seeds."
18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 1, 205-206
- 40- FULEKI (T), SILVA (J.M)
"Catechin and procyanidin composition from grape cultivars grown in Ontario."
Agric. Food Chem., 1997, 45 (4), 1156-1160
- 41- GABRIELSKA (J), OSZMIANSKI (J), LAMER ZARAWSKA (E)
"Protective effect of plant flavonoids on the oxidation of lecithin liposomes."
Pharmazie, 1997, 52 (2), 170-171
- 42- GAVIGNET (C), GROULT (N), GODEAU (G), ROBERT (L), ROBERT (A.M)
"Study of the effect of procyanidol oligomers on cultured mesenchymal cells. Effect on the attachment, proliferation and detachment of the cells."
Path. biol., 1989, 37, 746-753
- 43- GHISELLI (A), NARDINI (M), BALDI (A), SCACCINI (C)
"Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine."
J. Agric. Food Chem., 1998, 46 (2), 361-367

- 44- GIL-MUNOZ (R), GOMEZ-PLAZA (E), SANTOS-BUELGA (C), RIVAS-GONZALO (J), LOPEZ-ROCA (J.M)
"Identification of the procyanidin fraction in red wines from *Vitis vinifera* C.V. Monastrell."
19ème conférence internationale sur les polyphénols, Lille (France), 1998, 2, 381-382
- 45- GOLDBERG (D.M), HAHN (S.E), FARKES (J.G)
"Beyond alcohol: Beverage consumption and cardiovascular mortality."
Clinica Chimica Acta, 1995, 237 (1-2) 155-187
- 46- GROULT (N), GAVIGNET (J.C), JEANNIN (C), JOUIS (V), ROBERT (L), ROBERT (A.M)
"Study of the effect of procyanidol oligomers on cultured mesenchymal cells. Size and shape of cells and nuclei. Quantitative morphologic study."
Path. Biol., 1991, 39, 277-279
- 47- HASLAM (E)
"Plant polyphenols. Vegetable tannins revisited."
Cambridge University Press, Cambridge, 1989.
- 48- HMAMOUCHE (M), ESSAFI (N), ESSASSI (E.M), MOUTOUNNET (M)
"Les composés phénoliques de la vigne rouge provenant du Maroc."
18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 1, 91-92
- 49- HOSOYAMA (H), ARIGA (T)
"Grape seeds extract, proanthocyanidins"
New Food Ind., 1997, 39 (11), 54-60
- 50- ITAKURA (H), KONDO (K), MATSUMOTO (A), HOSODA (K), SUWA (Y), AMACHI (T)
"Des procyanidines antioxydantes dans le vin rouge pourraient être responsables d'un effet protecteur des LDL chez l'homme."
18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 2, 409-410
- 51- JONADET (M), MEUNIER (M.T), VILLIE (F), BASTIDE (J), BASTIDE (P)
"Catéchines et oligomères flavanoliques de *Cupressus sempervirens* L."
"Activités inhibitrices vis à vis de l'élastase *in vitro* et activités angioprotectrices comparées *in vivo*."
Ann. Pharmaceutiques françaises, 1984, 42 (2), 161-167
- 52- KANNER (J)
"Flavonoids as antioxidants and metal-catalysed reactions."
18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 2, 415-416
- 53- KANNER (J), FRANKEL (E), GRANIT (R), GERMAN (B), KINSELLA (J.E)
"Natural antioxidants in grapes and wines"
J. Agric. Food Chem., 1994, 42 (1), 64-69

- 54- KATAOKA (S), ARIGA (T)
"Proanthocyanidin, active component of red wine."
Farumashia, 1998, 34 (10), 998-1002
- 55- KLIICK A DOC
Logiciel OCP.
- 56- KOBUCHI (H), VIRGILI (F), PACKER (L)
"Assay of inducible form of nitric oxide synthase activity: effect of flavanoids and plant extracts."
Methods enzymol., 301 (C), 504-513.
- 57- LONNINGHAM-FOSTER (L), CHEN (C), CHANCE (D.S), LOO (G)
"Grape extract inhibits lipid peroxydation of human low density lipoprotein."
Biol. Pharm. Bull., 1995, 18 (10), 1347-1351
- 58- LUNTE (S.M), BLANKENSHIP (K.D), READ (S.A)
"Detection and identification of procyanidins and flavanols in wine by dual-electrode liquid chromatography-electrochemistry."
Analyst, 1988, 113 (1), 99-102
- 59- MACRIDES (T.A), SHIHATA (A), KALAFATIS (N), WRIGHT (P.F.A)
"A comparison of the hydroxyl radical scavenging properties of the shark bile steroid 5 beta-scymnol and plant pycnogenols."
Biochemistry and Molecular Biology International, 1997, 42 (6), 1249-1260
- 60- MAFFEI-FACINO (R), CARINI (M), ALDINI (G), BOMBARDELLI (E),
MORAZZONI (P), MORELLI (R)
"Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidins from *Vitis vinifera* L.- A mechanism for their capillary protective action."
Arzneim f'orsch, 1994, 44, 592-601
- 61- MASQUELIER (J)
"Procédé de préparation d'extraits polyphénoliques de type flavane-3-ol purifiés et extraits obtenus."
Eur. Pat. Appl. EP 0 384 796 A1
- 62- MASQUELIER (J)
"Procyanidins determination in pharmaceutical plant extracts."
Bulletin de l'O.I.V.
Office international de la vigne et du vin, Paris, 1992, 177-196 , 733-734
- 63- MASQUELIER (J)
"Les procyanidols du vin. Leur rôle dans l'alcoolisme."
Ile Rencontre Internationale de Coursan, recueil des exposés.
Office international de la vigne et du vin, Paris, 1989, 88-93
- 64- MASQUELIER (J)
"Pharmaceutical containing proanthocyanidins extracted from plants for the prevention of diseases caused by free radicals."
Bulletin de l'O.I.V.
Office international de la vigne et du vin, Paris, 1988, 689-690

- 65- MASQUELIER (J), DUMON (M.C), DUMAS (J)
"Stabilisation du collagène par les oligomères procyanidoliques."
Acta Therapeutica, 1981, 7, 101-105
- 66- MERILLON (J.M), FAUCONNEAU (B), WAFFO (P), BARRIER (L),
DECENDIT (A), HUGUET (F)
"Antioxidant activity of wine phenolic compounds in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins."
18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 2, 435-436
- 67- MEUNIER (M.T), DUROUX (E), BASTIDE (P)
"Antioxidant activity of procyanidol oligomers and anthocyanins with regard to superoxyde anion and lipid peroxydation."
Plant. Med. Phytother., 1989, 23 (4), 267-274
- 68- MEUNIER (M.T), VILLIE (F), JONADET (M), BASTIDE (J), BASTIDE (P)
"Inhibition of angiotensin I converting enzyme by flavanolic compounds: *in vitro* and *in vivo* studies."
Planta Med., 1987, 53 (1), 12-15
- 69- MEUNIER (M.T), VILLIE (F), BASTIDE (P)
"Study of the interaction of *Cupressus sempervirens* L. proanthocyanidolic oligomers on elastase and elastins."
Journal de Pharmacie de Belgique, 1994, 49 (6), 453-461
- 70- MEYER (A.S), YI (O.S), PEARSON (D.A), WATERHOUSE (A.L),
FRANKEL (E.N)
"Inhibition of human Low-Density Lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitis vinifera* L.)."
J. Agric. Food Chem., 1997, 45 (5), 1638-1643
- 71- NELSON (A.B), LAU (B.H), IDE (N), RONG (Y)
"Pycnogenol inhibits macrophage oxidative burst, lipoprotein oxidation and hydroxyl radical induced DNA damage."
Drug development and industrial pharmacy, 1998, 24 (2) 139-144
- 72- NKILIZA (J), MARZELLE (J.C)
"Procédé de préparation d'extraits contenant des composés polyphénoliques oligomères de type catéchiques à partir de sources végétales et extraits obtenus."
Eur. Pat. Appl. EP 0 692 480 A1
- 73- PEKIC (B), KOVAC (V), ALONSO (E), REVILLA (E)
"Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds."
Food Chem., 1998, 61 (1-2), 201-206
- 74- PEYRON (D)
"Polyphenolic potential of Pinot Noir."
Rev. Fr. Oenol., 1998, 170, 42-45

- 75- PINKAS (M), BEZANGER-BEAUQUESNE (L), TORCK (M)
"Les plantes dans la thérapeutique moderne."
Maloine, Paris, 1986.
- 76- PLUMB (G.W), PRICE (K.R), GARCIA-CONESA (M.T), WILLIAMSON (G)
"Effects of glycosylation, esterification and polymerization of flavonoids and hydroxycinnamates on antioxidant properties: a structure-function study."
19ème conférence internationale sur les polyphénols, Lille (France), 1998, 1, 35-36
- 77- REVILLA (E), ALONSO (E), BOURZEIX (M), KOVAC (V)
"Extractibility of catechins and proanthocyanidins of grape seeds-Technological consequences."
Der Food Sci., 1992, 29 (Food Sci. Hum. Nutr.), 437-450
- 78- REVILLA (E), BOURZEIX (M), ALONSO (E)
"Analysis of catechins and proanthocyanidins in grape seeds by HPLC with photodiode array detection."
Chromatographia, 1991, 31 (9-10), 465-468
- 79- REVILLA (E), ESCALONA (J.M), ALONSO (E), KOVAC (V)
"The phenolic composition of table grapes."
in "Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence"
Elsevier Science, Amsterdam, 1579-1596.
- 80- ROBERT (A.M), GROULT (N), SIX (C), ROBERT (L)
Study of the effect of procyanidol oligomers on mesenchymal cells in culture.
Attachment of elastic fibers to the cells."
Path. Biol., 1990, 38, 601-607
- 81- ROBINSON (J)
"Le livre des cépages."
Hachette, Paris, 1988
- 82- ROBINSON (J)
"Encyclopédie du vin."
Hachette, Paris, 1997
- 83- RONO (Y), LI (L), SHAH (V), LAU (B.H.S)
"Pycnogenols protects vascular endothelial cells from *t*-butyl hydroperoxide induced oxidant injury."
Biotechnology Therapeutics, 1994, 5 (3-4), 117-126
- 84- SAINT-CRICQ DE GAUJELAC (N), DE FREITAS (V), GLORIES (Y),
BOURGEOIS (G), VIVAS (N)
"Fractionation and determination of oligomeric procyanidins from grapes and wines: relation to wine quality."
Sci. Aliments, 1998, 18 (1), 59-76
- 85- SAINT-CRICQ DE GAUJELAC (N), PROVOST (C), GLORIES (Y), VIVAS (N)
"Comparative study of polyphenols scavenging activities estimated by different methods."
J. Agric. Food Chem., 1999, 47, 425-431

- 86- SANTOS-BUELGA (C), FRANCIJA-ARICHA (E.M),
ESCRIBANO-BAILON (M.T)
"Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties."
Food Chem, 1995, 53 (2), 197-201
- 87- SARGET-PHARMA
Documents fournis par le laboratoire Sarget-Pharma, Mérignac.
- 88- SATO (M), RAMARATHNAM (N), SUZUKI (Y), OHKUBO (T),
TAKEUCHI (M), OCHI (H)
"Superoxide radical scavenging activities of wines and antioxidative properties
of fractions recovered from Merlot wine pomace."
Food Factors Cancer Prev. (conf. Intern.), 1997, 359-364
- 89- SAURA CALIXTO (F)
"Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient."
J. Agric. Food Chem., 1998, 46 (10), 4303-4306
- 90- SHIHABI (Z.K.), SCARO (J)
"Liquid chromatographic assay of angiotensin-converting-enzyme in serum."
Clin. Chem., 1981, 27 (10), 1669-1671
- 91- SIMONETTI (P), BRUSAMOLINO (A), PELLEGRINI (N), GARDANA (C),
PIETTA (P.G), TESTOLIN (G)
"Polyphenol content and total antioxidant potencial of selected Italian wines."
18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 2,
465-466
- 92- SLAVICEK (G)
"Arbres et arbustes."
Gründ, Paris, 1991
- 93- SOCOPHARM
Documents fournis par le laboratoire Socopharm, Corbigny.
- 94- SOLEAS (G.J), DIAMANDIS (E.P), GOLDBERG (D.M)
"Wine as a biological fluid: History, production, and role in disease prevention."
Journal of Clinical Laboratory Analysis, 1997, 11 (5), 287-313
- 95- SOUQUET (J.M), RIGAUD (J), CHEYNIER (V), MOUTOUNET (M)
"Oligomeric and polymeric tannins from grape skin."
18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 1,
249-250
- 96- STAFFORD (H.A)
"The enzymology of proanthocyanidin biosynthesis."
in "Chemistry and significance of condensed tannins."
Plenum press, New York, 1989.

- 97- SUN (B.S), BELCHIOR (G.P), RICARDO DA SILVA (J.M), SPRANGER (M.I)
"An improved method for isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from grape seeds."
19ème conférence internationale sur les polyphénols, Lille (France), 1998, 2, 365-366
- 98- SUN (B), RICARDO DA SILVA (J.M), SPRANGER (I)
"Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins."
J. Agric. Food Chem., 1998, 46 (10), 4267-4274
- 99- SUN (B.S), SPRANGER (M.I), RICARDO DA SILVA (J.M)
"Extraction of grape seed procyanidins using different organic solvents."
18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 1, 169-170
- 100- TACE ASCIAK (C.R), ROUNOVA (O), HAHN (S.E), DIAMANDIS (E.P), GOLDBERG (D.M)
"Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects."
Clinica Chimica Acta, 1996, 246 (1-2), 163-182
- 101- TANAHASHI (H), KONDO (K), MATSUMOTO (A), IWAMOTO (T), ZENIBAYASHI (Y), ITAKURA (H)
"Activité antioxydante des vins rouges: incidences des durées de vieillissement, région et cépages."
18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 2, 337-338
- 102- TEISSEDDRE (P.L), FRANKEL (E.N), WATERHOUSE (A.L), PELEK (H), GERMAN (J.B)
"Inhibition of *in vitro* human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wines."
J. Sci. Food Agric., 1996, 70 (1), 55-61
- 103- TEXIER (O), MANACH (C), MORAND (C), DEMIGNE (C), REGERAT (F), REMESY (C)
"Comparaison of the bioavailability of dietary quercetin and catechin in rats."
19ème conférence internationale sur les polyphénols, Lille (France), 1998, 1, 73-74
- 104- TICLI (B), FRIGERIO (A.B)
"Encyclopédie des arbres de France et d'Europe"
De Vecchi, Paris, 1989
- 105- TREUTTER (D), FEUTCH (W), SANTOS-BUELGA (C)
"Determination of catechins and procyanidins in plant extracts - a comparaison of methods."
Acta Hortic., International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance, 1994, (2) 789-796

- 106- TUDORACHE (A), BADEA (P)
 "Influence des conditions climatiques du centre viticole Valea Culaareasca sur la biosynthèse et l'accumulation des polyphénols dans les raisins noirs."
 18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 1, 177-178
- 107- UCHIDA (S), EDAMATSU (R), HIRAMATSU (M)
 "Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals."
Med. Sci. Res., 1987, 15, 831-832
- 108- VERCAUTEREN (J), WEBER (J.F), BISSON (J.L), BIGNON (J)
 "Compositions de dérivés phénoliques, leur préparation et leurs applications comme anti-antioxydants."
 Fr. Demande FR 2 706 478
- 109- VERNON (H)
 "Les plantes à fleurs"
 Nathan, Paris, 1996
- 110- VINSON (J.A), YANG (J), HAO (Y)
 "Quality and quantity of phenol antioxidants in the us diet"
 18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 2, 255-256
- 111- VIRGILI (F), KOBUCHI (H), PACKER (L)
 "Procyanidins extracted from *Pinus maritima* L. (pycnogenol): scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism inactivated murine RAW 64.7 macrophages."
Free Radical Biol. Med., 1998, 24 (7/8), 1120-1129
- 112- WALSCH (G.P)
 "Polyphenol antioxidants in tea and wine and coronary heart disease."
 19ème conférence internationale sur les polyphénols, Lille (France), 1998, 1, 57-58
- 113- WANG (H.C), GUOHUA (P), RONALD (L)
 "Total antioxidant capacity of fruits."
J. Agric. Food Chem., 1996, 44 (3), 701-705
- 114- WATERHOUSE (A.L), WALSEM (R.L), TEISSEDRE (P.L), GERMAN (J.B), HANSEN (R.J), FRANKEL (E.N)
 "Absorption of the polyphenolic catechin from red wine."
 18ème conférence internationale sur les polyphénols, Bordeaux (France), 1996, 2, 407-408
- 115- WILLIAMS (R.L), ELLIOTT (M.S)
 "Antioxidants in grapes and wine: chemistry health effects."
Nat. antioxid., 1997, 150-173
- 116- WULFF (H.P)
 "Natural antioxidant composition from grape seed."
 PCT Int. Appl. WO 97 39 632

- 117- YI (O.S), MEYER (A.S), FRANKEL (E.N)
"Antioxidant activity of grape extracts in a lecithin liposome system."
J. Am. Oil Chem. Soc., 1997, 74 (10), 1301-1307

TABLE DES MATIERES

PLAN.....	3
INTRODUCTION.....	11
CHAPITRE I: DESCRIPTION BOTANIQUE.....	14
I- LE PIN MARITIME.....	15
1- Classification systématique.....	15
2- Description de la famille abietacées	16
3- Description du genre <i>Pinus</i>	16
4- Description de l'espèce <i>Pinus maritima</i> L.....	17
4-1- Répartition et milieu	17
4-2- Description.....	17
4-3- Particularités.....	18
II- LE CYPRES.....	19
1- Classification systématique.....	19
2- Description de la famille cupressacées.....	20
3- Description du genre <i>Cupressus</i>	20
4- Description de l'espèce <i>Cupressus sempervirens</i> L.....	21
4-1- Répartition et milieu.....	21
4-2- Description.....	21
4-3- Particularités.....	22
III- LA VIGNE ROUGE.....	23
1- Classification systématique.....	23
2- Description de la famille vitacées.....	24
3- Description du genre <i>Vitis</i>	24
4- Description de l'espèce <i>Vitis vinifera</i> L.....	25
5- Les espèces vinifiées.....	25

IV- LES DIFFERENTS PRODUITS DERIVES DU VIN.....	30
1- Le vin.....	30
1-1- Les cépages rouges.....	31
1-2- Les cépages blancs.....	34
2- Le jus de raisin.....	34
3- Les raisins.....	35
4- Les produits issus des résidus.....	35
CHAPITRE II: COMPOSITION CHIMIQUE.....	36
I- LE PIN MARITIME.....	37
1- La drogue.....	37
2- Composition chimique.....	37
3- Propriétés.....	38
I- LE CYPRES.....	39
1- La drogue.....	39
2- Composition chimique.....	39
3- Propriétés.....	39
III- LA VIGNE ROUGE.....	40
1- Les glucides.....	40
2- Les lipides.....	40
3- Les vitamines.....	41
4- Les acides organiques.....	41
5- Les enzymes.....	41
6- Les dérivés azotés.....	42
7- Les terpènes et les constituants volatils.....	43

8- La cire.....	43
9- Les substances pectiques.....	43
10- Les composés phénoliques.....	44
10-1- Phénols et acides phénoliques.....	44
10-2- Phytoalexines.....	45
10-3- Anthocyanes.....	46
10-4- Flavonoïdes.....	46
10-5- Tanins.....	47
10-5-1- Mise en évidence et quantification des tanins catéchiques.....	51
10-5-1-1- Méthode colorimétrique utilisant un aldéhyde.....	52
10-5-1-2- Méthode colorimétrique par relargage dans une solution acide.....	56
10-5-1-3- Quantification par HPLC.....	57
10-5-1-3-1- HPLC couplée à une détection colorimétrique.....	57
10-5-1-3-2- HPLC couplée à une détection électrochimique.....	59
10-5-1-3-3- HPLC couplée à une spectrométrie de masse.....	59
10-5-2- Composition flavanolique de <i>Vitis vinifera</i> L.....	60
10-5-2-1- Composition flavanolique des parties de la vigne.....	60
10-5-2-2- Composition flavanolique de plusieurs variétés de vigne.....	63
11- Variation phénolique durant la maturation.....	64
12- Influence des conditions climatiques sur la concentration phénolique des raisins.....	69

CHAPITRE III: EXTRACTION DES COMPOSES FLAVANOLIQUES...71

A- METHODES D'EXTRACTION

DES DIFFERENTES ETUDES D'ANALYSE.....72

I- METHODES UTILISANT LE METHANOL.....75

1- Première technique d'extraction.....75

2- Deuxième technique d'extraction.....85

3- La formation des oligomères.....91

4- Les principes de la galloylation.....92

II- METHODE UTILISANT DES MELANGES HYDROALCOOLIQUES.....95

1- Extraction.....95

2- Analyse.....96

III- METHODES UTILISANT DES SOLVANTS ORGANIQUES.....101

1- Etude de l'influence du taux d'humidité sur l'extraction.....101

2- Schéma d'extraction.....104

2-1- Avec de l'acétate d'éthyle.....104

2-2- Avec le mélange eau/acétone.....105

B- METHODES D'EXTRACTION DES BREVETS.....109

I- METHODES PERMETTANT DE LIMITER LE TAUX DE

MONOMERES.....109

1- Traitement supplémentaire par précipitation.....111

2- Traitement supplémentaire par extraction solide/liquide.....111

3- Exemples de mise en oeuvre du procédé d'extraction.....111

II- METHODE PERMETTANT D'ELIMINER LES POLYMERES.....	112
1- Mise en oeuvre du procédé à partir de <i>Vitis vinifera</i> L.....	114
2- Mise en oeuvre du procédé à partir de <i>Pinus maritima</i> L.....	114
3- Pour un usage pharmaceutique.....	115
C- METHODE D'EXTRACTION DES OPC GLYCOSYLES.....	115
CHAPITRE IV: PREPARATION DES EXTRAITS EN VUE DE LEUR UTILISATION EN THERAPEUTIQUE, COSMETIQUE ET DIETETIQUE.....	118
CHAPITRE V: ETUDE DES PROPRIETES PHYSIOLOGIQUES DES COMPOSES FLAVANOLIQUES.....	125
A- AU NIVEAU DES RADICAUX LIBRES PROPREMENT DIT.....	128
I- RAPPEL SUR LES RADICAUX LIBRES.....	128
II- MISE EN EVIDENCE DES PROPRIETES ANTIRADICALAIRES.....	132
III- COMPARAISON DES CAPACITES ANTIOXYDANTES DES PROANTHOCYANIDINES, DES VITAMINES ET DES ENZYMES....	133
IV- ACTIVITE ANTIOXYDANTE DU VIN ET ALCOOL.....	137
V- COMPARAISON DES ACTIVITES ANTIOXYDANTES DES COMPOSES ISSUS DU VIN OU DES RAISINS.....	141
B- ACTIONS DES PROCYANIDINES.....	146

I- L'ATHEROSCLEROSE ET LES PROCYANIDINES.....	146
II- EFFET ANTIRADICALAIRE ET INHIBITION DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE.....	149
III-ACTIVITES INHIBITRICES ENZYMATIQUES DES PROCYANIDINES.....	166
1- Vieillessement cutané et procyanidines.....	166
2- Activités antiprotéasique et anti-élastasique des OPC.....	167
3- Action antiagrégante plaquettaire des procyanidines.....	174
IV- EFFETS PROTECTEURS DES PROCYANIDINES ENVERS LES MALADIES CARDIO-VASCULAIRES ISCHEMIQUES.....	176
1- Effets vasodilatateurs des OPC.....	176
2- Activité angioprotectrice des OPC.....	180
3- Etudes cliniques.....	189
CHAPITRE VI: TOLERANCE, PHARMACOCINETIQUE ET METABOLISME DES PROCYANIDINES.....	192
I- TOLERANCE.....	193
II- PHARMACOCINETIQUE ET METABOLISME.....	193
CHAPITRE VII: APPLICATIONS THERAPEUTIQUES, DIETETIQUES ET COSMETIQUES DES PROCYANIDINES.....	198
I- TRAITEMENT DES TROUBLES VEINOLYMPHATIQUES.....	199

II- PRODUITS COSMETIQUES.....	201
III- COMPLEMENTS ALIMENTAIRES.....	205
CONCLUSION.....	215
ABREVIATIONS.....	218
BIBLIOGRAPHIE.....	222
TABLE DES MATIERES.....	235

BON A IMPRIMER N° 321

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ