

Stabilisation Tanins- Anthocyanes

Données générales

CHEYNIER V., SOUQUET J.M., FULCRAND H., SARNI P., MOUTOUNET M.
Institut Supérieur de la Vigne et du Vin. IPV-INRA. Unité de Recherche des Polymères et des Techniques
Physico-chimiques. 2 place Viala, F 34060 Montpellier cedex

Résumé d'intervention présentée par **M. MOUTOUNET – INRA montpellier**
9, Place Viala – 34060c MONTPELLIER

I - Introduction

Les composés phénoliques sont des constituants majeurs des vins, responsables de certaines de leurs caractéristiques organoleptiques.

Les polyphénols sont des composés très réactifs. Les réactions, qui démarrent dès la rupture de l'intégrité cellulaire des baies de raisin (fouillage, pressurage) et se poursuivent tout au long de la fermentation et du vieillissement des vins, conduisent à une grande diversité de produits, ajoutant à la complexité de la composition phénolique des vins. Les nouveaux composés formés présentent des caractères organoleptiques spécifiques, souvent distincts de ceux de leurs précurseurs. C'est pourquoi la connaissance de leurs structures et des mécanismes par lesquels ils se forment est une base indispensable pour la maîtrise de la qualité des vins.

Les avancées déterminantes réalisées dans le domaine de l'oenologie au cours de la dernière décennie concernent, d'une part la caractérisation structurale des tannins du raisin, d'autre part l'élucidation des mécanismes réactionnels dans lesquels ils sont impliqués au cours de la vinification.

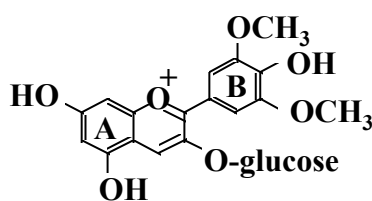
II - Structure des composés phénoliques du raisin

Les composés phénoliques présentent une grande diversité de structures, divisées en flavonoïdes et non flavonoïdes (Figure 1). La première classe, basée sur un squelette en C₆-C₃-C₆ (1), comprend plusieurs groupes, qui se distinguent par le degré d'oxydation de l'hétérocycle central en C₃ (p. ex. anthocyanes, flavonols, flavanols). La seconde est représentée par les acides phénols, qui comprennent les acides benzoïques en C₆-C₁ (2), et les acides hydroxycinnamiques, constitués d'un noyau phénolique et d'une chaîne latérale insaturée en C₃ (3).

Parmi les flavonoïdes, les anthocyanes et les flavane-3-ols (flavanols) sont particulièrement importants en oenologie puisqu'ils constituent respectivement les pigments rouges du raisin et les tannins. Les acides hydroxycinnamiques sont d'autres composés majeurs du raisin du fait de leur rôle dans les phénomènes de brunissement oxydatif intervenant, notamment, dans les moûts blancs.

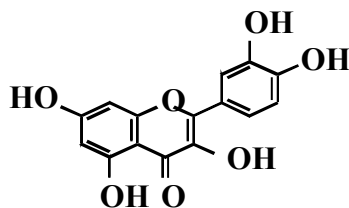
1. flavonoïdes

anthocyanes



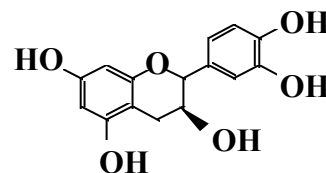
3-glucoside de malvidol
(forme flavylum)

flavonols



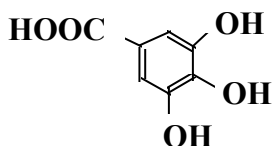
quercétol

flavanols



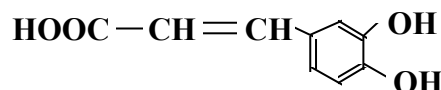
catéchine

2. acides benzoïques



acide gallique

3. acides hydroxycinnamiques

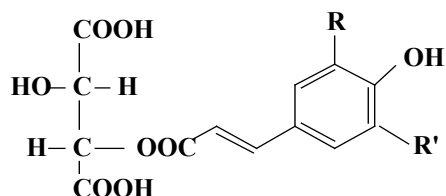


acide caféique

Figure n°1 : Exemples de structures de composés phénoliques

Toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différant par le nombre et la position des groupements hydroxyles et méthoxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent également être diversement substituées (par ex. glycosylées, estérifiées, acylées).

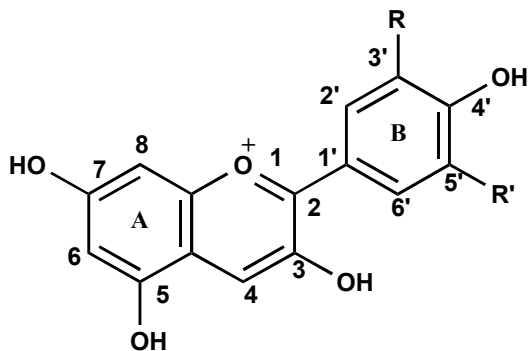
• Le raisin renferme trois dérivés hydroxycinnamiques, sous forme d'esters tartriques (figure 2) : les acides caféoyl tartrique (caftarique), *p*-coumaroyl tartrique (coutarique) et féruloyl tartrique (fertarique). La forme naturelle est le *trans* (E) mais les isomères *cis* (Z), existent en faible quantité .



R = R' = H : acide *trans*-*p*-coumaroyltartrique
 R = OH, R' = H : acide *trans*-caféoyltartrique
 R = OH, R' = OCH₃ : acide *trans*-féruloyltartrique

Figure n° 2 : Structure des acides hydroxycinnamiques du raisin

- Les anthocyanes du genre *Vitis* reposent sur cinq anthocyanidines.



R=OH, R'=H : cyanidol

R=R'=OH : delphinidol

R=H, R'=OCH₃ : péonidol

R=OH, R'=OCH₃ : pétunidol

R=R'=OCH₃ : malvidol

Figure n°3 : Anthocyanidines du raisin sous forme de cation flavylium.

Les anthocyanes de *Vitis vinifera* sont glucosylés uniquement en position 3. Les principaux acides estérifiant le sucre sont chez *V. vinifera* l'acide acétique, l'acide *p*-coumarique et l'acide caféique. La proportion de chaque anthocyanone est essentiellement dépendante du cépage alors que la teneur globale est principalement influencée par les conditions environnementales.

Les propriétés des pigments, et notamment la couleur et la stabilité, sont directement liées à leur structure. Par exemple, le 3-glucoside de cyanidol est plus rouge que le 3-glucoside de malvidol, particulièrement abondant dans le raisin, qui est plus violacé. Par ailleurs, la présence de sucres et leur substitution, en particulier par des acides hydroxycinamiques, modifient la nuance et augmentent la stabilité des molécules anthocyaniques.

- Les flavanols existent sous forme d'oligomères et de polymères, appelés tannins condensés ou proanthocyanidines parce qu'ils libèrent des anthocyanidines par chauffage en milieu acide (Réaction de Bate-Smith).

Les tannins condensés se divisent en plusieurs classes, selon le schéma d'hydroxylation de leurs unités constitutives. Parmi elles, les prodelphinidines, constitués d'unités (épi)gallocatéchine, et les procyanidines, dérivés de l'(épi)catéchine, ont été mis en évidence dans le raisin. De plus, certaines unités sont substituées par de l'acide gallique.

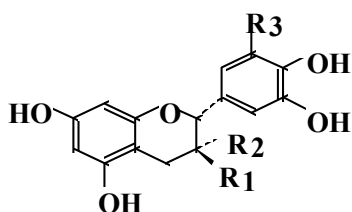
Les tannins du pépin sont des procyanidines, partiellement galloylés, basés sur des unités catéchine, épicatechine et 3-O-gallate d'épicatéchine, liées entre elles par des liaisons C4-C6 ou C4-C8. Les tannins de pellicule comprennent aussi des prodelphinidines et présentent des proportions de gallates inférieures à ceux des tannins de pépins.

Pépins	Pellicules
(+)-catéchine (-)-épicatéchine (-)-épicatéchine gallate	(+)-catéchine (-)-épicatéchine (-)-épicatéchine gallate <u>(-)-épigalocatéchine</u>
PROCYANIDINES	PROANTHOCYANIDINES {PROCYANIDINES {PRODELPHINIDINES

Tableaux n°4 : Monomères majeurs constitutifs des tanins

Les degrés de polymérisations moyens sont de l'ordre de 10 dans les pépins et de 30 dans les pellicules. La concentration des tannins est plus élevée dans les pépins que dans les pellicules, mais la contribution des pellicules à l'ensemble des tannins de la baie excède parfois celle des pépins.

monomères :



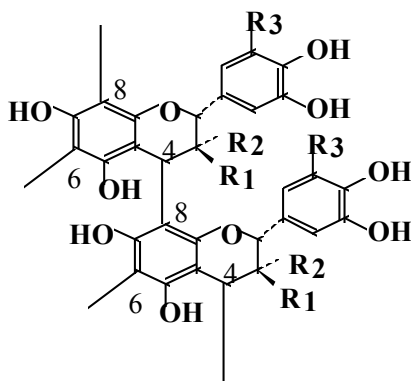
$R_1 = \text{OH}, R_2 = R_3 = \text{H}$: (+)-catechine

$R_1 = R_3 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$: (-)-épicatechine

$R_1 = R_3 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$: (+)-gallocatechine

$R_1 = \text{H}, R_2 = R_3 = \text{OH}$: (-)-épigalocatechine

proanthocyanidols :



$R_3 = \text{H}$: procyanidols

$R_3 = \text{OH}$: prodelphinidols

$R_1, R_2 = \text{H}, \text{OH}, \text{O-G}$

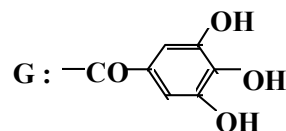


Figure n°5 : Structure des tanins du raisin

III - La composition phénolique des vins

La comparaison de la composition phénolique du raisin et du vin montre qu'à côté des molécules directement issues de la baie, d'autres polyphénols apparaissent dans le vin. Au cours de la vinification et du vieillissement, les composés polyphénoliques participent à divers types de réactions, donnant naissance à une multiplicité de structures nouvelles.

Les processus de dégradation et d'évolution des polyphénols intervenant au cours de la vinification sont principalement régis par deux types de mécanismes. Le premier fait intervenir des réactions biochimiques, catalysées par différentes enzymes, tandis que le second relève de phénomènes chimiques. Toutes ces réactions aboutissent à de nouveaux produits par formation ou rupture de liaisons covalentes. En outre, les polyphénols des vins sont impliqués dans des phénomènes d'interactions moléculaires, faisant appel à des liaisons de faible énergie. Les réactions sous la dépendance d'activités enzymatiques sont de moindre importance en vinification en rouge et ne seront donc pas abordées.

Dans les vins rouges, la couleur évolue constamment au cours de la maturation et du vieillissement, passant progressivement du rouge violacé à une teinte tuilée. Ces modifications visuelles, qui s'accompagnent d'une perte d'astringence, sont imputées à des phénomènes de d'addition, transformant les composés phénoliques du raisin (anthocyanes et flavanols monomères et oligomères) en d'autres espèces moléculaires.

3.1 – FORMATION DE LIAISONS COVALENTES

Les flavanols possèdent trois sites réactionnels : le noyau phénolique A phloroglucinol, l'hétérocycle C, et le noyau phénolique B ortho di (ou tri) hydroxylé. Le noyau B de l'anthocyane largement majoritaire du vin étant diméthoxylé en 3' et 4', la réactivité des anthocyanes portera sur les sites du noyau A et de l'hétérocycle B. En règle générale, les cinétiques des différentes réactions possibles sont relativement lentes, et leurs cinétiques dépendent de la proportion des réactants présents.

Sur le noyau A des anthocyanes comme sur celui des flavanols, les groupements hydroxyles en positions 5 et 7 ont un effet mésomère donneur qui induit des charges négatives au sommet des carbones 6 et 8 et donc favorise les substitutions électrophiles. Dans ce cas, le flavonoïde joue le rôle de nucléophile.

Par ailleurs, la charge positive représentée sur l'oxygène du flavylum A^+ peut se délocaliser en C2 et C4, pour donner des formes carbocations sujettes aux additions nucléophiles. En particulier, l'attaque nucléophile de l'eau et du SO_2 , conduisent respectivement à une base hémiacétal incolore (AOH) et à un composé incolore d'addition du bisulfite. De même, la rupture des liaisons C-C des proanthocyanidines, qui se produit spontanément lors de la vinification et de la maturation des vins, libère des carbocations intermédiaires susceptibles de réagir avec des agents nucléophiles.

Les anthocyanes (A) et les tanins (T) peuvent réagir pour donner naissance à des adduits anthocyane-tanins suivant plusieurs schémas :

- **addition de type A-T (figure n°6) :**

Dans ce cas, l'anthocyane joue le rôle d'électrophile tandis que le tanin joue le rôle de nucléophile. L'anthocyane, sous sa forme flavylum, réagit sur un site électronégatif tel que le carbone 6 ou 8 d'un flavanol pour donner un adduit. Selon la littérature, cette réaction serait suivie d'une oxydation qui réintroduirait une charge positive sur le noyau C de l'anthocyane et qui restaurerait donc sa couleur rouge. A mesure que la réaction progresse, l'équilibre entre la forme flavylum et la base hémiacétal se déplace vers le cation flavylum. D'une manière générale, la substitution en 4 de l'hétérocycle confère une plus grande stabilité au pigment obtenu.

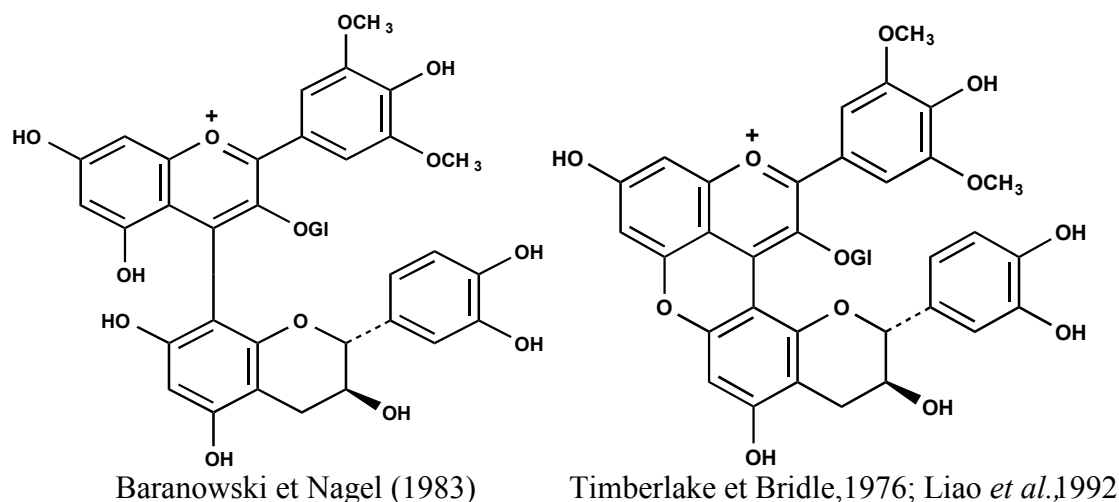


Figure n°6 : Structures hypothétiques des produits d'addition de type A-T

- **condensation de type T-A (ou T-T) (figure n°7)**

Dans ce cas, qui ne concerne que les flavanols oligomères ou polymères, l'électrophile est un carbocation libéré par rupture des liaisons interflavoniques des tanins qui réagit avec le carbone 6 ou 8 d'une anthocyane ou d'une autre molécule de flavanol. La charge étant localisée sur le carbone 4 du carbocation.

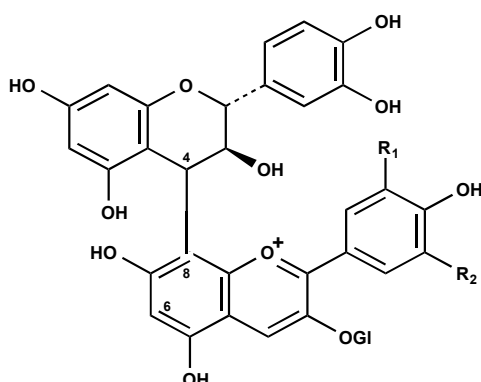


Figure n°7 : Hypothèse de structure de produit d'addition de type T-A

Ces réactions d'addition de ces carbocations avec les flavanols génèrent des nouvelles molécules de proanthocyanidines. Ces processus de rupture et de recombinaison peuvent

conduire soit à une augmentation du degré de polymérisation moyen des proanthocyanidols, soit, en cas d'excès de flavanols monomères dans le milieu, à une diminution de celui-ci.

- **condensation via l'éthanal (figure n°8)**

Les réactions précédentes sont lentes, mais en présence d'éthanal la cinétique de condensation des tanins et anthocyanes se trouve accélérée. L'éthanal participe aux réactions de condensation pour aboutir à des structures polymériques où les noyaux A des flavanols et des anthocyanes sont reliés par l'intermédiaire d'un pont éthyl résultant de la formation d'un complexe intermédiaire flavanol-éthanal. En absence d'anthocyanes la réaction se poursuit pour donner des polymères de masses moléculaires de plus en plus élevées qui, en fonction du temps, finissent par précipiter. En revanche, le processus s'arrête lorsque les deux extrémités de la chaîne sont occupées par des anthocyanes participant ainsi à leur stabilisation.

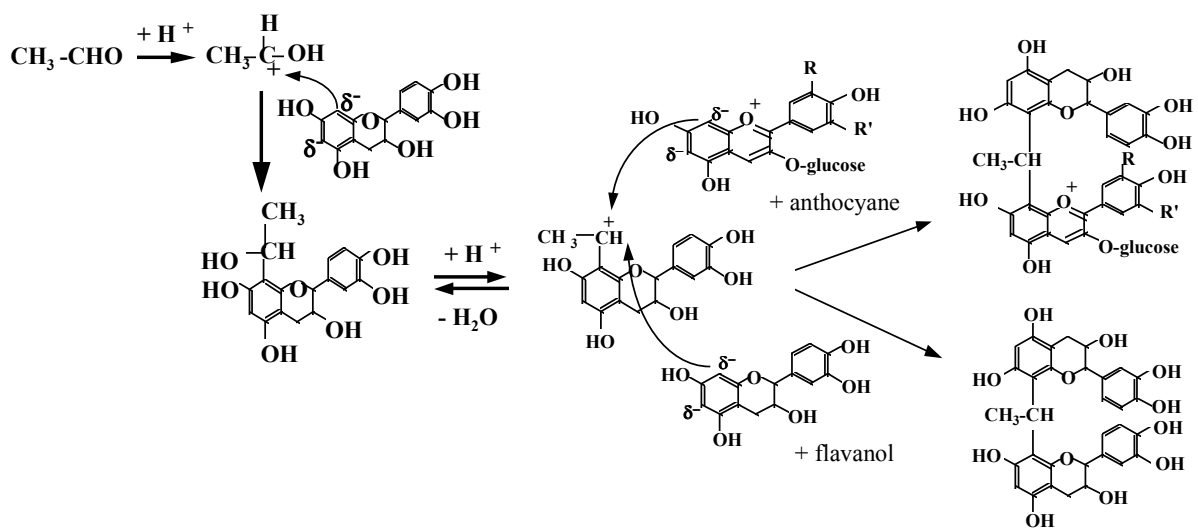


Figure n°8 : Mécanisme d'addition flavanol-flavanol et flavanol-anthocyanine en présence d'éthanal

La vitesse des réactions de complexation des anthocyanes avec les flavanols, en l'absence comme en présence d'éthanal, augmente avec le degré de polymérisation de ceux-ci, de sorte que les complexes colorés formés dans les vins doivent présenter des masses moléculaires élevées.

Tandis que la couleur des combinaisons anthocyanes-tanins est rouge-orangée, plus intense et moins sensible à l'effet du pH et du SO₂ que celle des anthocyanes libres, celles des produits générés par réaction des anthocyanes avec les flavanols en présence d'éthanal est rouge-violet. Cependant, l'évolution de la couleur des vins vers le rouge tuilé est probablement due aussi à d'autres types de complexes et aux produits de condensation des tanins. En effet, toutes les réactions de condensation des tanins s'accompagnent d'un brunissement progressif des solutions, qui peut être lié à des mécanismes oxydatifs.

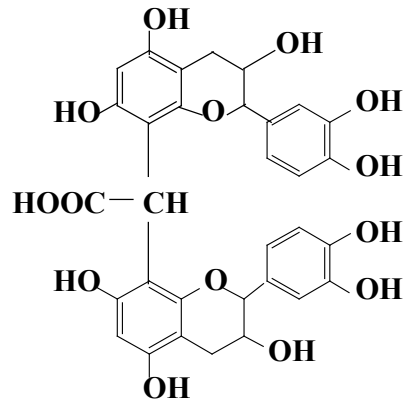


Figure n°9 : Exemple de dimère de catéchine présentant un pont éthanoïque

Un mécanisme similaire, dans lequel l'éthanal est remplacé par l'acide glyoxylique, produit d'oxydation de l'acide tartrique, a été mis en évidence dans des vins synthétiques contenant des traces de fer. Les unités monomériques sont reliées par l'intermédiaire d'un pont éthanoïque. Le principal dimère formé par cette réaction à partir de la catéchine évolue spontanément vers des pigments jaunes-orangés. Ce mécanisme est en compétition avec les réactions d'autoxydation de la catéchine conduisant à d'autres pigments jaunes plus pâles.

• Réaction de cyclo-addition (figure n°10)

Une autre voie réactionnelle établie dans les vins est un mécanisme nouveau qui consiste en une réaction de cycloaddition entre les anthocyanes et d'autres constituants des vins, incluant notamment le vinyl phénol, l'éthanal et l'acide pyruvique. La spécificité de cette réaction réside dans la nuance jaune-orangée des produits formés mais surtout dans leur remarquable stabilité, notamment vis-à-vis des variations de pH et de l'action des sulfites. Bien que ces molécules ne représentent qu'une faible proportion des pigments du vin, elles se maintiennent au cours du temps, à la différence des anthocyanes natives, de sorte qu'elles deviennent rapidement les formes rouges monomères prédominantes. La similitude de leurs propriétés, imputables à la structure particulière du chromophore formé, avec celles des pigments des vins vieux, suggère qu'ils résultent de réactions analogues. De plus, puisque certains des précurseurs de ces nouveaux pigments sont volatils, ce nouveau mécanisme est susceptible de modifier le profil aromatique des vins. En particulier, la réaction des anthocyanes avec le vinylphénol pourrait permettre d'expliquer l'absence de ce composé, responsable d'odeurs animales indésirables, dans les vins rouges.

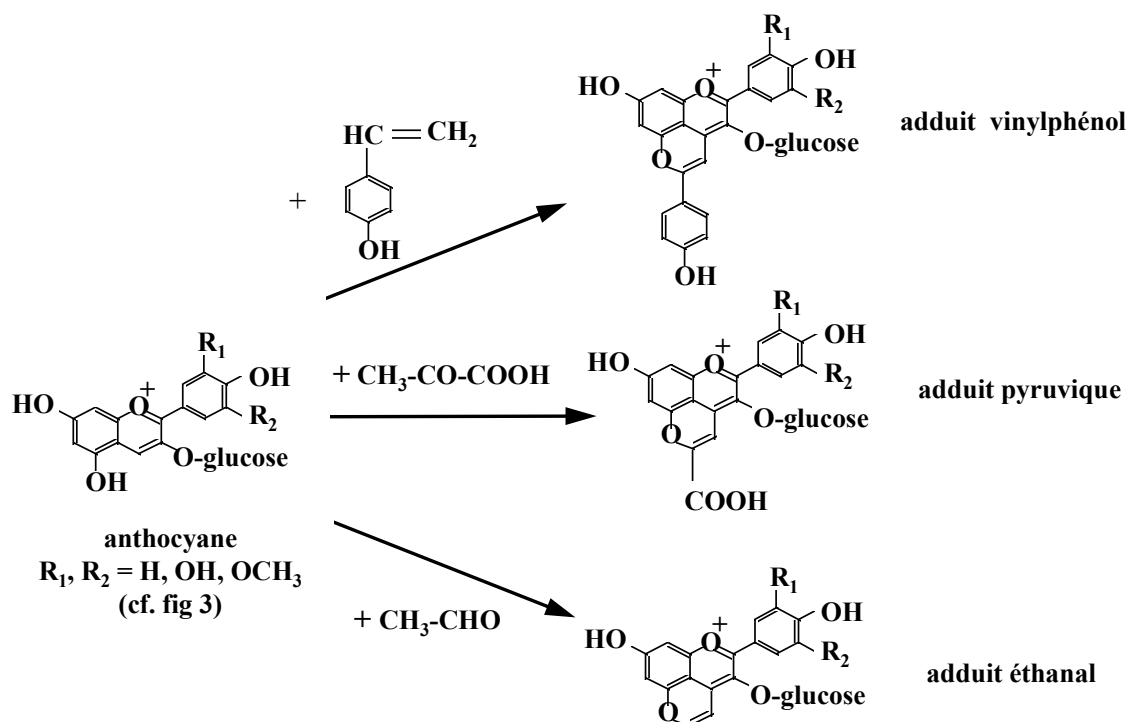


Figure N°10 : Nouvelles réactions des anthocyanes conduisant à des pigments orangés stables.

3.2.- INTERACTIONS MOLECULAIRES (LIAISONS DE FAIBLES ENERGIES)

• Copigmentation

La couleur des pigments anthocyaniques dépend du pH mais aussi de leurs interactions avec d'autres molécules du milieu. Ainsi, dans un vin jeune, la présence d'autres composés phénoliques induit des phénomènes de copigmentation qui se traduisent par un effet bathochrome (déplacement vers les longueurs d'ondes plus élevées : du rouge au violet) et une intensification de la couleur. Ces phénomènes sont régis principalement par des interactions hydrophobes bien que des liaisons hydrogènes puissent dans certains cas intervenir. Ils ont dépendants du pH et plus généralement du milieu. Dans le moût et le vin, le pH est optimum pour la copigmentation et la présence d'éthanol dû à la fermentation en tant que co-solvant n'exerce pas forcément une influence négative. Il semble toutefois que ces associations soient présentes dans un vin jeune seulement. La (-)épicatéchine est le meilleur copigment flavonoïde du vin en ce qui concerne l'intensité de la couleur, mais les flavonols et les acides phénols ont une constante d'association plus forte avec les cations flavylum. De plus, ce phénomène favorise le rapprochement des entités sujettes à la condensation.

• Forme colloïdale des tanins

Récemment, il a été montré (thèse C. SAUCIER) que les tanins ont capacité à s'agréger en particules colloïdales. La concentration à partir de laquelle l'agrégation se produit dépend de la masse moléculaire des différentes structures phénoliques à l'état polymérique. Les particules colloïdales présentes en solution sont susceptibles d'être déstabilisées par les protéines ou au contraire d'être stabilisées par des polysaccharides.

Les vins rouges, sont le siège de très nombreuses réactions conduisant à une multiplicité de nouvelles structures. Les compétitions entre les diverses voies réactionnelles possibles et par conséquent la composition du produit final sont gouvernées par les proportions initiales des différents types de précurseurs polyphénoliques mais aussi par les conditions du milieu. Par exemple, l'orientation des réactions vers la formation d'adduits tannins-anthocyanes ou tannins-tannins dépend vraisemblablement du rapport molaire entre ces deux groupes de molécules mais aussi de la nature exacte des constituants au sein de chacun de ces groupes. Les dérivés des tannins résultant de ces réactions sont incolores mais évoluent très rapidement vers des produits bruns. Les dérivés des anthocyanes sont soit de couleur violette et relativement labiles, soit des pigments orangés particulièrement stables.

Outre leurs effets manifestes sur la couleur, ces réactions sont susceptibles de modifier sensiblement les qualités gustatives des vins, qui sont directement liées à la structure des tannins. En particulier, les tannins deviennent progressivement moins amers et plus astringents, passant ainsi de 'durs' à 'souples', lorsque le degré de polymérisation s'élève. L'influence de la galloylation et de l'état d'hydroxylation du noyau B (procyanidines/prodelphinidines) est inconnue. Cependant, il a été démontré que la galloylation augmente les interactions des tannins avec les protéines, et donc peut-être aussi l'astringence, qui résulte d'une interaction avec les protéines buccales. Les tannins les plus polymérisés interagissent aussi plus fortement avec les protéines, ce qui se traduit par un effet protecteur sur les oligomères, par exemple lors des opérations de collage. La perte d'astringence observée au cours de la maturation des vins pourrait découler des réactions des tannins avec les anthocyanes. De même, les espèces formées par polymérisation des tannins en présence d'éthanal seraient moins astringentes que leurs précurseurs. L'incidence de ces différentes réactions sur l'appréciation gustative des vins reste cependant à confirmer.