

Les anthocyanes des feuilles de différentes variétés de *Vitis vinifera* L. entre la véraison des raisins et la chute des feuilles

par

G. DARNÉ et Y. GLORIES

Anthocyanins in leaves of some *Vitis vinifera* L. cultivars between veraison and leaf fall

S u m m a r y : The contents of total and individual anthocyanins in red leaves of three *Vitis vinifera* L. cvs (Merlot noir, Cabernet Sauvignon and Gamay Fréaux) was determined by HPLC at three stages of seasonal development (veraison and maturity of grapes, leaf fall). The anthocyanin composition of leaves and berries was rather different. There was some variation between cultivars: leaves of the red-juice grape were richer in anthocyanins than leaves of the non-colouring cultivars. In all cultivars, the anthocyanin content of leaves increased during grapeberry maturation, then decreased until leaf fall.

K e y w o r d s : anthocyanin, analysis, red wine, variety of vine, leaf, berry, maturation.

Introduction

La composition en anthocyanes des baies de raisin a été très étudiée en raison de son importance en œnologie, mais peu de recherches ont porté sur celle des feuilles de vigne qui, à l'automne, prennent des colorations rouges.

Dans le cadre d'une étude sur le déterminisme de la synthèse des anthocyanes (DARNÉ et GLORIES 1987), nous avons montré qu'il était possible de modifier expérimentalement l'époque d'apparition de ces pigments dans les feuilles. A titre d'hypothèse, nous pensons qu'il existe un phénomène de compétition entre les feuilles et les raisins pour l'utilisation d'une substance, synthétisée par les feuilles, qui entraîne l'activation du métabolisme anthocyanique.

Un travail préliminaire nous ayant permis de mettre en évidence la présence de très faibles teneurs en anthocyanes dans des feuilles vertes de Cabernet Sauvignon dès la véraison (DARNÉ 1986), nous étudions maintenant la composition anthocyanique des feuilles de différents cépages après la véraison, ainsi que son évolution jusqu'à leur chute.

Matériel et méthodes

A — Prélèvements et préparation du matériel végétal

Des lots de 15 feuilles rouges ont été prélevés en 1986 sur trois cépages de *Vitis vinifera* L., le Merlot noir, le Cabernet Sauvignon et le Gamay Fréaux dans la collection INRA de Bordeaux. Trois stades ont été retenus: la véraison, la maturité des raisins et la chute des feuilles. Nous avons toujours cueilli, sur des rameaux portant deux grappes, uniquement la feuille insérée sur le nœud situé immédiatement au-dessus de la deuxième grappe.

Ces feuilles ont été lyophilisées puis réduites en poudre et l'extraction des anthocyanes a été réalisée sur 1 g d'échantillon selon la technique de DARNÉ et MADERO TAMARGO (1979). Les extraits phénoliques obtenus ont été concentrés sous vide puis repris dans 10 ml de méthanol à 1 % d'HCl (v/v).

B — Dosage des anthocyanes au moyen d'une colonne courte

Les différentes molécules anthocyaniques ont été séparées par CLHP et leurs teneurs ont été calculées par étalonnage externe à partir des courbes établies par DOURNEL (1985).

Pratiquée avec une colonne de 15 cm ou plus, cette opération est relativement longue. Elle nécessite 60—90 min ou davantage selon les auteurs (WILLIAMS *et al.* 1978; WULF et NAGEL 1978; DOURNEL 1985).

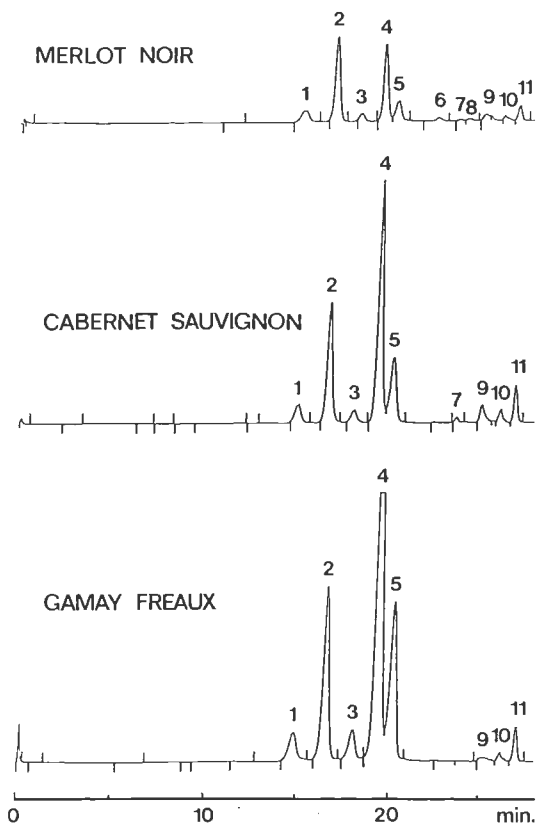


Fig. 1: Séparation chromatographique sur colonne courte des anthocyanes des feuilles rouges de trois cépages de *Vitis vinifera* L. prélevées au stade de la maturité du raisin ($\lambda = 520$ nm).

Short-column chromatographic separation of anthocyanins in red leaves of three *Vitis vinifera* L. cvs sampled at berry maturity ($\lambda = 520$ nm).

Afin de réduire cette durée, nous avons été conduit à utiliser une colonne plus courte (7 cm), de type XL3-ODS C18 Beckman, remplie de particules à granulométrie très fine (3 μm). La phase mobile, circulant avec un débit de 1 ml/min à la température ambiante, est un mélange de deux solvants préalablement filtrés sur membrane de 0,45 μm : eau à 5 % d'acide formique, pH 2,1 (solvant A) et méthanol à 5 % d'acide formique (solvant B). L'éluion est programmée selon le gradient ascendant de solvant B suivant:

Temps en min :	2	6	12	20	30
% de solvant B :	0	15	20	40	100

Ces conditions chromatographiques permettent de séparer les anthocyanes de 20 μl d'extrait en 45 min (temps de rinçage inclus), avec une résolution comparable à celle obtenue avec une colonne plus longue; les premiers pics détectés à 520 nm apparaissent au bout de 12 min, le dernier à 27,5 min (Fig. 1).

Résultats

A — Nature des anthocyanes des feuilles à la maturité du raisin

Suivant les cépages, on obtient 8—11 pics sur les chromatogrammes réalisés à partir des extraits de feuilles rouges prélevées à la maturité des raisins (Fig. 1). Ils sont toujours élués selon deux groupes nettement séparés, d'une part les anthocyanines, d'autre part les anthocyanines acylées.

1° — Cinq anthocyanines, identifiées par co-chromatographie avec des témoins, constituent le premier groupe de pics élué entre 15 et 21 min:

Le monoglucoside-3 de la delphinidine	(MG3-Dp = pic n° 1),
le monoglucoside-3 de la cyanidine	(MG3-Cy = pic n° 2),
le monoglucoside-3 de la pétunidine	(MG3-Pt = pic n° 3),
le monoglucoside-3 de la paéonidine	(MG3-Pn = pic n° 4),
le monoglucoside-3 de la malvidine	(MG3-Mv = pic n° 5).

Ces molécules sont présentes en quantité importante dans les feuilles des trois cépages étudiés (Tableau 1), mais en proportions variables, toujours plus fortes chez le Gamay Fréaux que chez les deux autres cépages.

Ce sont les monoglucosides-3 de la paéonidine et de la cyanidine que constituent l'essentiel de la composition anthocyanique des feuilles de ces trois cépages.

2° — Le second groupe d'anthocyanines mis en évidence correspond à des pigments soit estérifiés par des acides organiques, soit combinés à des tanins (DOURNEL 1985); ces molécules sont éluées entre 22 et 27,5 min. Leur nombre varie avec le cépage: 6 ont pu être détectées dans les feuilles de Merlot noir prélevées à la maturité, elles ne sont plus que 4 chez le Cabernet Sauvignon et seulement 3 chez le Gamay Fréaux à la même date (Fig. 1). Leur identification par co-chromatographie n'a pu être encore confirmée, faute de molécules de référence. Cependant, par analogie avec les résultats obtenus avec une colonne longue, les différents pics doivent correspondre aux molécules suivantes:

Pic n° 6:	l'acétate de MG3-Dp,
pic n° 7:	l'acétate de MG3-Cy,
pic n° 8:	les acétates de MG3-Pn et de MG3-Mv confondus,
pic n° 9:	les caféates de MG3-Cy et de MG3-Mv confondus,
pic n° 10:	le coumarate de MG3-Pn,
pic n° 11:	le coumarate de MG3-Mv.

Tableau 1

Composition en anthocyanines des feuilles rouges de trois cépages de *Vitis vinifera* L. à différents stades du cycle végétatif · Les teneurs sont exprimées en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche, et en pourcentage des anthocyanes totales

Anthocyanin composition in red leaves of three cultivars of *Vitis vinifera* L. at three stages of seasonal development · Contents are expressed as $\mu\text{g/g}$ of dry matter and as percentage of total anthocyanins

Stades	Antho- cyanines	Merlot noir		Cabernet Sauv.		Gamay Fréaux	
		$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%
Véraison	MG3-Dp	200	7,3	159	4,3	—	—
	MG3-Cy	1 174	42,6	1 027	27,6	—	—
	MG3-Pt	0	0,0	63	1,7	—	—
	MG3-Pn	1 110	40,3	1 509	40,5	—	—
	MG3-Mv	0	0,0	354	9,5	—	—
	Total	2 483	90,2	3 112	83,6	—	—
Maturité	MG3-Dp	493	8,0	748	5,2	1 101	5,2
	MG3-Cy	2 069	33,8	3 192	22,1	5 254	18,1
	MG3-Pt	235	3,8	395	2,7	945	3,3
	MG3-Pn	1 853	30,2	6 286	43,6	16 028	55,3
	MG3-Mv	629	10,3	2 131	14,8	4 753	16,4
	Total	5 278	86,2	12 752	88,5	28 082	96,9
Chute f.	MG3-Dp	0	0,0	824	8,2	668	4,4
	MG3-Cy	1 741	60,5	2 205	22,0	5 169	34,2
	MG3-Pt	0	0,0	469	4,7	509	3,4
	MG3-Pn	909	31,6	2 732	27,3	6 645	43,9
	MG3-Mv	60	2,1	1 852	18,5	1 762	11,7
	Total	2 711	94,1	8 082	80,8	14 752	97,6

Le pourcentage représenté par ces pigments est très faible (Tableau 2). Mais les molécules qui prédominent dans les feuilles des trois cépages à l'époque de la maturité sont toujours celles des pics n° 11 et n° 10, puis du pic n° 9. Il semble que ces anthocyanines soient principalement des combinaisons mettant en jeu la paéonidine, la cyanidine et la malvidine qui sont déjà les plus abondantes à l'état non acylé.

B — Composition anthocyanique des feuilles aux trois stades étudiés

1° — Evolution de la teneur en anthocyanes totales

a) Quel que soit le cépage, les teneurs en anthocyanes totales sont maximales à l'époque de la maturité (Tableau 3). Il y a donc eu une augmentation de ces teneurs entre la véraison et la maturité puis une diminution entre la maturité et la chute des feuilles.

b) Quel que soit le stade considéré, les feuilles du Gamay Fréaux, qui est un cépage teinturier, sont plus riches en anthocyanes que les deux autres cépages, non

Tableau 2

Composition en anthocyanines acylées des feuilles rouges de trois cépages de *Vitis vinifera* L. à différents stades du cycle végétatif · Les pics d'anthocyanines acylées sont numérotés selon leur ordre d'éluion · Les teneurs sont exprimées en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche, et en pourcentage des anthocyanes totales

Composition of acylated anthocyanins in red leaves of three cultivars of *Vitis vinifera* L. at three stages of seasonal development · The peaks of acylated anthocyanins are numbered according to the order of their elution · Contents are expressed as $\mu\text{g/g}$ of dry matter and as percentage of total anthocyanins

Stades	Anthocyanines acylées	Merlot noir		Cabernet Sauv.		Gamay Fréaux	
		$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%
Véraison	Pic 6	0	0,0	0	0,0	—	—
	Pic 7	42	1,5	48	1,3	—	—
	Pic 8	0	0,0	0	0,0	—	—
	Pic 9	55	2,0	140	3,8	—	—
	Pic 10	89	3,2	169	4,5	—	—
	Pic 11	84	3,1	254	6,8	—	—
	Total	270	9,8	611	16,4	—	—
Maturité	Pic 6	109	1,8	0	0,0	0	0,0
	Pic 7	47	0,8	83	0,6	0	0,0
	Pic 8	66	1,1	0	0,0	0	0,0
	Pic 9	188	3,1	536	3,7	113	0,4
	Pic 10	131	2,1	302	2,1	190	0,7
	Pic 11	307	5,0	741	5,1	602	2,1
	Total	847	13,8	1 662	11,5	905	3,1
Chute f.	Pic 6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Pic 7	0	0,0	86	0,9	0	0,0
	Pic 8	0	0,0	29	0,3	0	0,0
	Pic 9	23	0,8	449	4,5	0	0,0
	Pic 10	70	2,4	349	3,5	85	0,5
	Pic 11	76	2,6	993	9,9	285	1,9
	Total	169	5,9	1 905	19,1	370	2,4

teinturiers. Les feuilles de Cabernet Sauvignon possèdent également plus d'anthocyanes que celles du Merlot noir.

2° — Evolution de la nature des anthocyanes

a) La cyanidine et la paéonidine sont les composants majeurs des anthocyanes des feuilles indépendamment du cépage et du stade étudiés. Chez le Merlot, c'est la cyanidine qui est la plus abondante, alors que pour le Cabernet Sauvignon et le Gamay Fréaux, c'est la paéonidine.

b) Dans les feuilles de Merlot noir, des molécules sont absentes à la véraison et présentes à la maturité: ce sont les monoglucosides de la pétunidine et de la malvidine, ainsi que les pics n° 6 et n° 8. A la chute des feuilles, les monoglucosides de la delphinidine et de la pétunidine, ainsi que les pics n° 6, n° 7 et n° 8 ont totalement disparu.

Tableau 3

Teneurs en anthocyanes totales des feuilles rouges de trois cépages de *Vitis vinifera* L. à différents stades du cycle végétatif · Les teneurs sont exprimées en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche

Total anthocyanin contents in red leaves of three cultivars of *Vitis vinifera* L. at three stages of seasonal development · Contents are expressed as $\mu\text{g/g}$ of dry matter

Stades	Merlot noir	Cabernet Sauv.	Gamay Fréaux
Véraison	2 753	3 723	—
Maturité	6 126	14 414	28 987
Chute f.	2 880	9 998	15 121

c) Dans les feuilles de Cabernet Sauvignon et de Gamay Fréaux, les 5 anthocyanines sont toujours présentes dans des proportions pratiquement identiques. Mais, en ce qui concerne les anthocyanines acylées, on constate l'apparition du pic n° 8 chez le Cabernet Sauvignon, et la disparition du pic n° 9 chez le Gamay Fréaux à l'époque de la chute des feuilles.

C — Comparaison de la composition anthocyanique des feuilles et des baies

Le Tableau 4 montre qu'il existe des différences importantes entre la composition anthocyanique des feuilles et des baies de Cabernet Sauvignon et de Merlot noir:

1° — Les 5 anthocyanines sont toujours présentes à la fois dans les feuilles et dans les baies de ces deux cépages, mais leurs proportions respectives sont différentes: les structures anthocyaniques les moins substituées (MG3-Pn et MG3-Cy), qui prédominent dans les feuilles, se trouvent au contraire en plus faible quantité dans les baies (Fig. 2). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en 1985 avec les feuilles vertes du Cabernet Sauvignon, bien que ces organes soient très pauvres en anthocyanes.

Tableau 4

Composition anthocyanique des feuilles et des baies du Merlot noir et du Cabernet Sauvignon prélevées au stade de la maturité du raisin · Les résultats sont exprimés en pourcentage des anthocyanes totales

Anthocyanin composition in leaves and berries of Merlot noir and Cabernet Sauvignon at berry maturity · Results are expressed as percentage of total anthocyanins

Anthocyanes	Merlot noir		Cabernet Sauvignon	
	Feuilles	Baies	Feuilles	Baies
MG3-Dp	8,0	21,6	5,2	16,4
MG3-Cy	33,8	2,7	22,1	4,2
MG3-Pt	3,8	10,9	2,7	7,9
MG3-Pn	30,2	2,1	43,6	8,6
MG3-Mv	10,3	28,1	14,8	29,6
% MG3	86,2	65,4	88,5	66,7
% acylées	13,8	34,6	11,5	33,3

2° — Les anthocyanines acylées des feuilles rouges du Merlot et du Cabernet Sauvignon ne représentent que 11—15 % des anthocyanes totales. Elles sont plus nombreuses dans les baies où elles constituent près du tiers du contenu anthocyanique. Les anthocyanines acylées sont donc qualitativement et quantitativement moins bien représentées dans les feuilles rouges que dans les baies mûres; elles sont absentes dans les feuilles vertes du Cabernet Sauvignon (DARNÉ 1986).

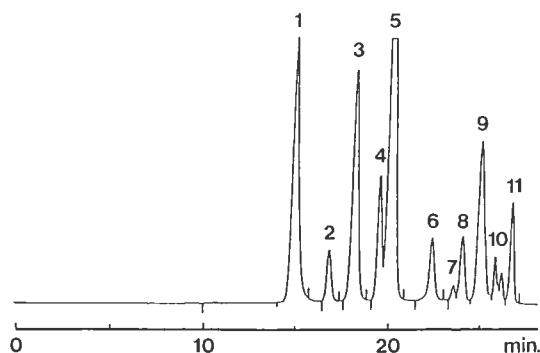


Fig. 2: Séparation chromatographique sur colonne courte des anthocyanes d'un extrait de baies rouges de Cabernet Sauvignon prélevées au stade de la maturité ($\lambda = 520$ nm).

Short-column chromatographic separation of anthocyanins in mature red berries of Cabernet Sauvignon ($\lambda = 520$ nm).

Conclusions

Les résultats obtenus mettent nettement en évidence trois faits:

1° — La composition anthocyanique des feuilles est différente de celle des baies. La comparaison du contenu en anthocyanes des feuilles rouges avec celui des baies vérées fait ressortir, pour les trois cépages étudiés, des différences qualitatives et quantitatives importantes. Ces résultats sont en accord avec ceux que viennent de publier WENZEL *et al.* (1987) pour d'autres variétés. Ils signifient sans doute qu'il existe un métabolisme des anthocyanes propre à chacun des organes, qui pourrait être déterminé par des différences dans la nature et l'origine de leurs précurseurs polyphénoliques ou des enzymes qui interviennent au cours de leur synthèse.

2° — La composition anthocyanique des feuilles de chacune des trois variétés est différente. Des variations sont nettes, mais relativement faibles entre les deux cépages non teinturiers; elles semblent plus importantes du point de vue quantitatif pour le cépage teinturier.

3° — La composition anthocyanique des feuilles des trois cépages étudiés varie en fonction du temps. Les modifications observées traduisent l'existence d'une accumulation de toutes les molécules d'anthocyanes entre la véraison et la maturité des raisins, suivie d'une diminution des teneurs accompagnée de la disparition de certaines molécules (anthocyanines acylées), au moment de la chute des feuilles.

Résumé

Les teneurs en anthocyanes des feuilles rouges de trois cépages de *Vitis vinifera* L. (Merlot noir, Cabernet Sauvignon et Gamay Fréaux) ont été déterminées par CLHP pour trois étapes du cycle végétatif (véraison et maturité des raisins, chute des feuilles). La composition anthocyanique des feuilles diffère nettement de celle des baies. Il apparaît des variations entre les trois cépages: les feuilles du cépage teinturier sont plus riches que celles des cépages non teinturiers. La teneur en anthocyanes des feuilles des trois cépages augmente pendant la période de maturation du raisin puis diminue jusqu'à la chute des feuilles.

Références bibliographiques

- DARNÉ, G.; 1986: Mise en évidence d'anthocyanes dans les feuilles vertes de Cabernet Sauvignon. *Connaiss. Vigne Vin* **20**, 189—193.
- — ; GLORIES, Y.; 1987: Considérations nouvelles sur la synthèse des anthocyanes des baies de raisin au cours de la véraison. *Physiologie de la Vigne*. 3^e Symp. Intern. sur la Physiologie de la Vigne, Bordeaux, 24—27 Juin 1986; 132—137. O.I.V., Paris.
- — ; MADERO TAMARGO, J.; 1979: Mise au point d'une méthode d'extraction des lipides solubles totaux, des glucides solubles totaux et des composés phénoliques solubles totaux des organes de la vigne. *Vitis* **18**, 221—228.
- DOURNEL, J. M.; 1985: Recherches sur les Combinaisons Anthocyanes-Flavanols. Influence de ces Réactions sur la Couleur du Vin Rouge. Thèse 3^e Cycle, Bordeaux II.
- WENZEL, K.; DITTRICH, H. H.; HEIMFAHRT, M.; 1987: Die Zusammensetzung der Anthocyane in den Beeren verschiedener Rebsorten. *Vitis* **26**, 65—78.
- WILLIAMS, M.; HRAZDINA, G.; WILKINSON, M. M.; SWEENEY, J. G.; IACOBUCCI, G. A.; 1978: High-pressure liquid chromatographic separation of 3-glucosides, 3,5-diglucosides, 3-(6-O-p-coumaryl) glucosides and 3-(5-O-p-coumaryl glucoside)-5-glucosides of anthocyanidins. *J. Chromatogr.* **155**, 389—398.
- WULF, L. W.; NAGEL, C. W.; 1978: High pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. *Amer. J. Enol. Viticult.* **29**, 42—49.

Eingegangen am 9. 11. 1987

G. DARNÉ
Laboratoire de Physiologie Végétale
et Ampélogie
Université de Bordeaux I
Avenue des Facultés
33405 Talence cedex
France

Y. GLORIES
Institut d'Œnologie
Université de Bordeaux II
351, Cours de la Libération
33405 Talence cedex
France