

LA COULEUR DES VINS ROUGES

Véronique Cheyrier

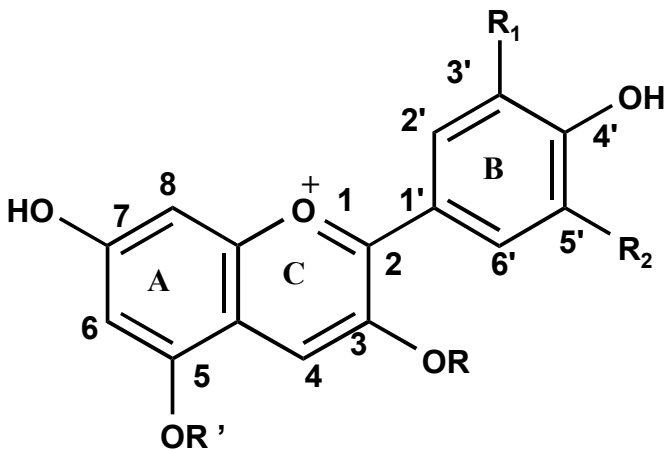
Unité Mixte de Recherche Sciences pour l’Oenologie, INRA, 2, place Viala, 34060 Montpellier cedex.

Déterminer les relations qui existent entre la composition phénolique, la qualité du vin et les pratiques œnologiques est un défi majeur pour la recherche en œnologie. Parmi les composés phénoliques, les anthocyanes, qui sont les pigments rouges contenus dans les baies, sont très importants pour la qualité du vin. Les anthocyanes (dont le nom provient des mots grecs anthos (fleur) et kyanos (bleu)) sont des pigments omniprésents dans les plantes et sont responsables d’une large palette de couleurs allant de l’orange au violet. En outre, ce sont des molécules assez instables pouvant servir de substrats à de nombreux enzymes et subir différents types de réactions chimiques au cours de la vinification. Après avoir présenté les structures des anthocyanes des baies et les mécanismes majeurs qui sont à l’origine des propriétés colorantes, cet article passera en revue les connaissances actuelles dont nous disposons sur les produits, les mécanismes de ces réactions et leurs conséquences sur la couleur du vin et la stabilité de la couleur.

Que sont les pigments anthocyaniques ?

Les anthocyanes appartiennent à la famille des flavanoïdes, qui s’appuie sur un squelette consistant en deux noyaux benzéniques (A et B) et d’un hétérocycle oxygéné (C). Ce sont des dérivés glycosylés de chromophores aglycones, nommés anthocyanidines. Ils sont habituellement décrits par leurs formes cationiques flavylium, qui sont les formes rouges rencontrées lors de l’identification des anthocyanes et leur analyse (Brouillard et Dangles, 1993).

Les anthocyanes des baies sont basées sur cinq anthocyanidines, qui diffèrent par leur nombre de groupes hydroxyles (OH) et méthoxyles (OCH₃) situés sur le noyau B, tel que montré dans la figure 1.



Anthocyanidines (R=R'=H)	R ₁	R ₂
cyanidine	OH	H
peonidine	OCH ₃	H
delphinidine	OH	OH
petunidine	OCH ₃	OH
malvidine	OCH ₃	OCH ₃

Figure 1 : Anthocyanidines des baies sous leur forme cation flavylium

Ces molécules diffèrent également par le nombre et la position des sucres liés à la molécule d’anthocyane ainsi que par la nature des substituants acylés des sucres (acides acétique, p-coumarique et caféique).

Les proportions et quantités de ces molécules dépendent fortement des espèces et des variétés (Roggero et al., 1988, Mazza et Miniati, 1993). Par exemple, l’espèce *vinifera* contient surtout des 3-glucosides (Figure 1, R = Glc, R'= H) et quelques traces de 3,5 diglucosides

(Figure 1, R= R' = Glc) qui sont considérés comme spécifiques aux espèces *non vinifera* (Ribéreau-Gayon, 1959). En outre, au sein des variétés *vinifera*, le Pinot noir est dépourvu d'anthocyanes acylés.

Avec l'augmentation de la substitution du noyau B, la couleur du cation flavylum se déplace vers des longueurs d'ondes plus importantes (d'orange à violet). La glycosylation a comme résultat un effet hypsochrome léger (de violet à rouge) mais augmente drastiquement la solubilité et la stabilité des pigments. L'acylation des sucres, en particulier avec les acides phénoliques, augmente également la couleur et sa stabilité, permettant ainsi à des mécanismes d'interaction intramoléculaire de se développer, tel que discuté par la suite. Cependant, ces changements ne sont pas suffisants pour expliquer la gamme importante des couleurs qui sont associées aux anthocyanes des plantes.

Pourquoi la couleur des anthocyanes est-elle si changeante ?

Dissous dans l'eau, les cations rouges flavylum d'anthocyanes (AH⁺) sont transformés en plusieurs autres formes, à travers un transfert des protons et les réactions d'hydratation (Brouillard et Delaporte, 1977, Cheminat et Brouillard, 1986). Les proportions de ces formes « secondaires » sont tout d'abord conditionnées par le pH, les ions flavylum étant prédominants uniquement dans des milieux très acides (pH<2). Lorsque le pH augmente, les cations flavylum sont soit déprotonés (Figure 2, chaîne de réactions 1) et prennent la forme de bases quinoniques bleues (A et A⁻), soit hydratés (Figure 2, chaîne de réactions 2) et deviennent alors des hémiacétals incolores (B). La forme hémiacétal résultant de l'addition d'eau est la forme majeure de la malvidine 3-glucoside aux valeurs de pH comprises entre 2 et 7 (Brouillard and Delaporte, 1977).

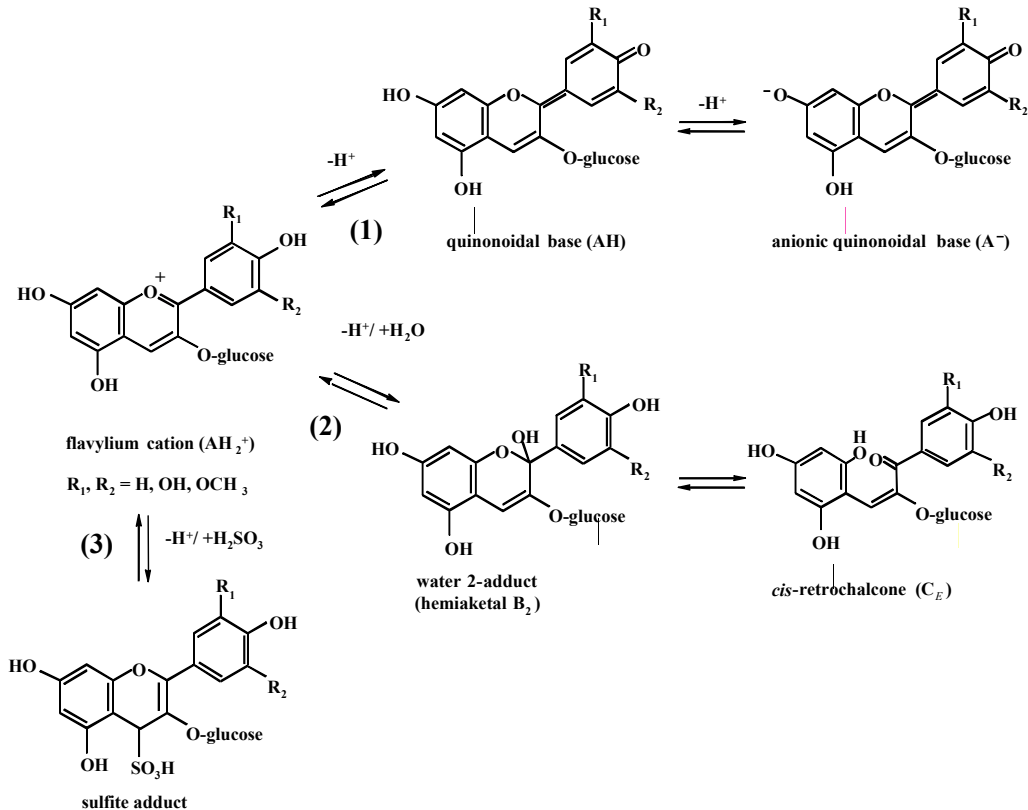


Figure 2 : Réactions principales des anthocyanes dans un milieu aqueux (une forme seulement est représentée pour chaque base quinonoïdale, parmi trois isomères possibles)

Enfin, il faut noter que les sulfites réagissent avec les cations flavylum de la même façon que l'eau pour former des adduits incolores (Figure 2, réaction 3), la structure de ces adduits ayant été récemment établie (Berke et al., 1998).

Comment la couleur anthocyanique est-elle stabilisée par la co-pigmentation ?

En l'absence de mécanisme de stabilisation, au pH du vin, environ 80% des anthocyanes du raisin se retrouvent sous leur forme hydratée incolore. Les mécanismes de stabilisation se produisent grâce à la réaction du chromophore anthocyanique avec d'autres espèces présentes dans la solution et qui peuvent être soit une molécule anthocyanique identique (auto-association), soit l'un de ses groupes acylés (co-pigmentation intramoléculaire), soit une autre molécule (co-pigmentation intermoléculaire).

Les mécanismes impliqués dans ces procédés ont été étudiés et d'excellentes publications les décrivent en détails (Goto et Kondo, 1991, Brouillard et Dangles, 1983). L'augmentation de l'intensité et de la stabilité de la couleur faisant suite à une réaction d'auto-association ou de co-pigmentation anthocyanique est due au déplacement de l'équilibre d'hydratation vers la forme flavylum après piégeage de ce dernier ou de la base quinonique dans des complexes de copigmentation, tel que schématisé dans la figure 3. Ce phénomène est particulièrement important dans la gamme des pH du vin, où les formes hydratées prédominent généralement.

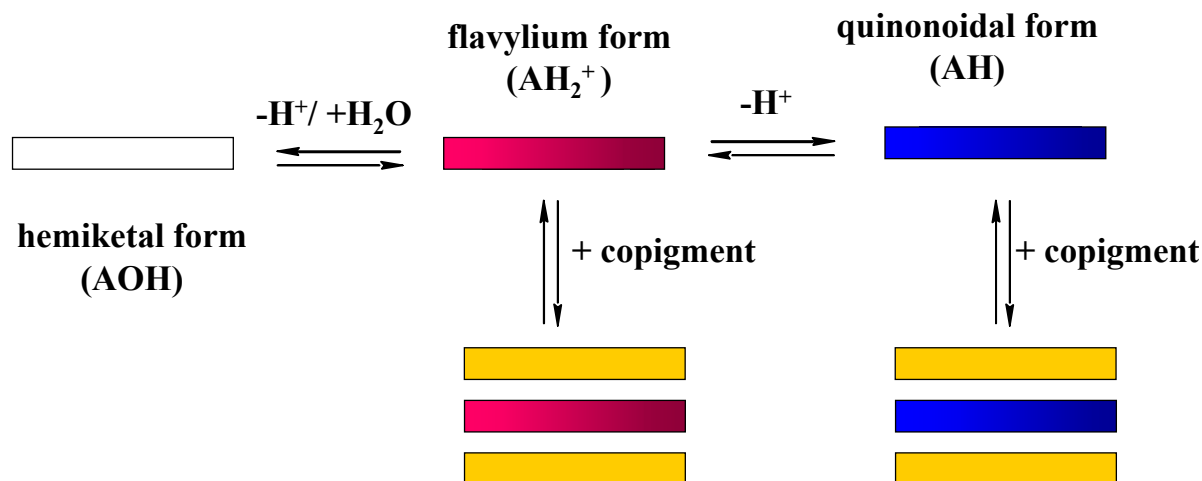


Figure 3 : Principe du procédé de co-pigmentation

Qu'arrive t'il aux anthocyanes des baies lors de la vinification ?

La diffusion des constituants phénoliques dans le moût en fermentation dépend de leur solubilité et de leur localisation dans la baie de raisin. Cette diffusion est également influencée par divers facteurs tels que la température, la teneur en éthanol et dioxyde de soufre, et la fréquence à laquelle le moût est homogénéisé. Les anthocyanes qui sont localisées dans les pellicules – et dans la pulpe pour les cépages teinturiers – sont extraites rapidement. Leur concentration atteint son maximum après quelques jours et diminue lentement pendant que l'extraction des tannins se poursuit.

La disparition des anthocyanes observée pendant la macération se poursuit lors du vieillissement. Cependant la décoloration est généralement moins importante, ce qui signifie que les anthocyanes, une fois extraites, se transforment en d'autres pigments (Somers, 1971). Ces pigments sont plus résistants à l'action décolorante du dioxyde de soufre et généralement décrits comme des pigments polymériques.

Deux groupes importants de réactions, à savoir les procédés enzymatiques et les réactions chimiques impliquant les anthocyanes et les flavanols, se produisent pendant la vinification. Bien que ces deux types de réactions apparaissent en même temps, la première prévaut dans les premières étapes de la vinification tandis que la seconde prédomine dans les dernières étapes, c'est-à-dire lorsque l'activité enzymatique décroît.

Les réactions enzymatiques, catalysées pour la plupart par des polyphénoloxidasés, peroxydases, glycosidases et estérases, démarrent quand la structure de la cellule est endommagée. Les anthocyanes sont de très mauvais substrats pour les polyphénoloxidasés, mais elles réagissent facilement avec les o-quinones générées par l'oxydation enzymatique d'autres phénols. La réaction globale résulte en une décoloration importante (Cheynier et al., 1995). Cependant, cette réaction est plutôt limitée dans le vin rouge, car les levures de fermentation entrent en concurrence avec les polyphénoloxidasés pour la consommation de l'oxygène disponible.

Les anthocyanes peuvent être également oxydés directement par les peroxydases et par la laccase, conduisant à une décoloration. La dégradation des anthocyanes par les glycosidases, contenues dans les préparations enzymatiques (de type pectinases ou β -glycosidases), entraîne la production d'aglycones instables et résulte ainsi en une perte de couleur. Ce phénomène peut être accru par la présence d'acyl-estérases.

Puis les réactions chimiques prédominent petit à petit, au fur et à mesure que l'activité enzymatique décroît. Ces réactions impliquent généralement les anthocyanes et les tannins, soit directement soit par l'intermédiaire d'acétaldéhyde. Elles sont basées sur des mécanismes d'addition nucléophile dans lesquels les anthocyanes et les tannins peuvent jouer le rôle d'électrophiles (c'est-à-dire de molécules montrant une déficience en électrons qui sont enclines à attirer les molécules présentant un excès d'électrons, appelées nucléophiles) ou de nucléophiles

(Figure 4).

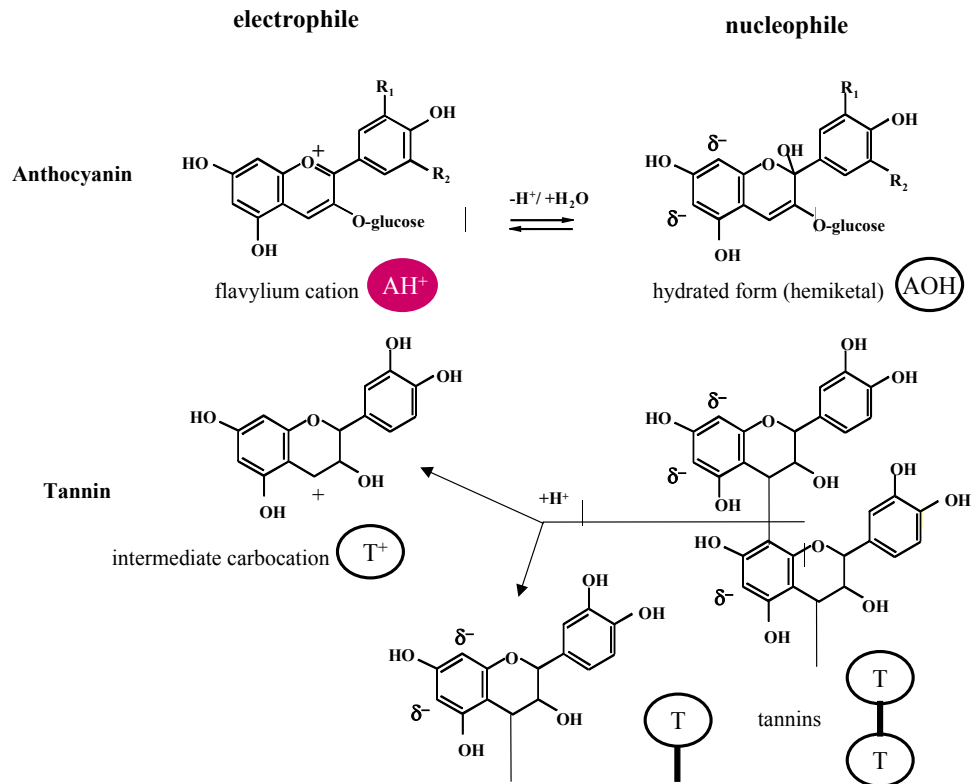


Figure 4 :
 Propriétés
 nucléophiles et
 électrophiles des
 anthocyanes et
 des tannins (δ
 indique l'excès
 d'électrons dans
 les sites
 nucléophiles)

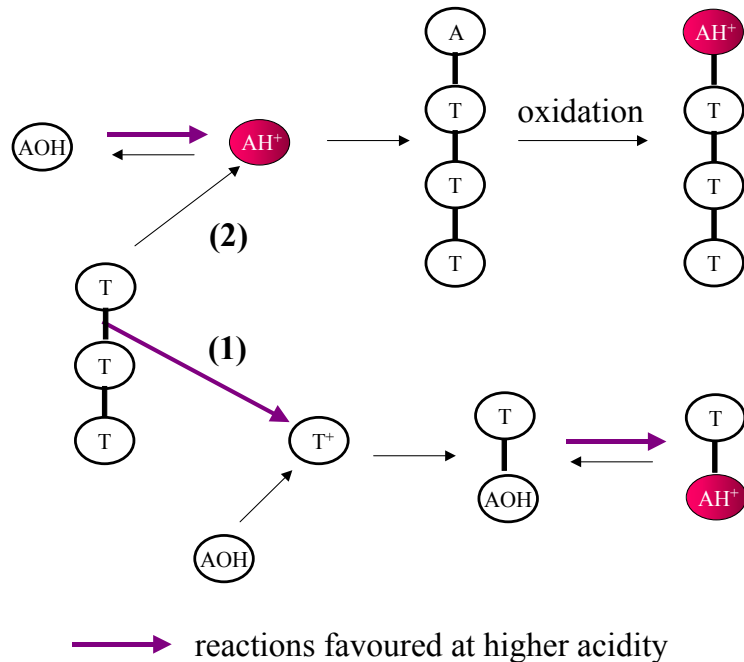
Les anthocyanes peuvent réagir comme des électrophiles grâce à la charge positive de la forme flavylum (AH^+). Les flavanoides neutres, tels que les tannins, présentent un excès d'électrons dans leurs positions C-8 et C-6 et se comportent ainsi comme des nucléophiles. Ce type de réaction s'applique également aux formes hydratées des anthocyanes. En outre, la rupture catalysée par les acides des liaisons C-C qui lient les unités constitutives des tannins se produit spontanément dans le vin et génère des carbocations intermédiaires (T^+) électrophiles. Il en résulte que les réactions directes entre les anthocyanes et les tannins se produisent à travers deux mécanismes distincts (Figure 5).

Le premier de ces mécanismes (Figure 5, 1) implique la rupture des tannins suivie par l'addition d'anthocyanes hydratées (AOH) sur le carbocation résultant T^+ . La forme incolore T-AOH ainsi générée s'hydrate ensuite, donnant la forme T-A $^+$ rouge.

Dans la seconde réaction (Figure 5, 2), le tannin s'additionne directement au cation anthocyanique afin de former un adduit A-T incolore intermédiaire, qui peut ensuite être oxydé en la forme rouge A $^+$ -T, ou converti en une autre espèce incolore (non montrée).

A $^+$ -T et T-A $^+$ sont toutes deux des structures plus complexes que les anthocyanes, mais ces dernières, qui résultent de la rupture des tannins, sont plutôt des oligomères que des polymères.

Figure 5. Mécanismes des réactions des tannins anthocyaniques



Les réactions impliquant l'acétaldéhyde conduisent à la formation de produits dont les unités sont reliées par des ponts éthyle (CH-CH₃), qui peuvent être des dérivés des tanins (T-ethyl-T), des adduits tanin-anthocyanine (A-ethyl-T) et des oligomères d'anthocyanes (A-ethyl-A). La formation de ces produits implique l'addition nucléophile d'anthocyanes hydratées ou d'unités de tannins sur le carbocation résultant de la protonation de l'acétaldéhyde. La taille moléculaire de ces produits varie beaucoup car elle dépend du nombre d'étapes successives dans la réaction induite par l'acétaldéhyde et de la taille des précurseurs polyphénoliques, qui varie également (de forme monomérique jusqu'à des chaînes de tannins comprenant plus de 25 unités.)

Enfin, un autre mécanisme de réaction qui conduit à de nouveaux pigments basés sur une structure pyranoanthocyanique (et parfois désignés par le terme de vitisines) a récemment été

démontré (Fulcrand et al., 1996, Cheynier et al., 1997, Fulcrand et al., 1998). Ces pigments incluent des composés de faible poids moléculaire, résultant de la réaction de métabolites de levure tels que l'acétaldéhyde, l'acide pyruvique ou le vinylphénol avec les anthocyanes des baies. Ils incluent également des espèces dont le poids moléculaire est plus élevé et dans lesquelles l'unité pyranoanthocyanique est liée à une molécule de tannin (Francia-Aricha et al., 1997). Des exemples de pigments résultant de réactions des anthocyanes avec l'acétaldéhyde sont montrés dans la figure 6.

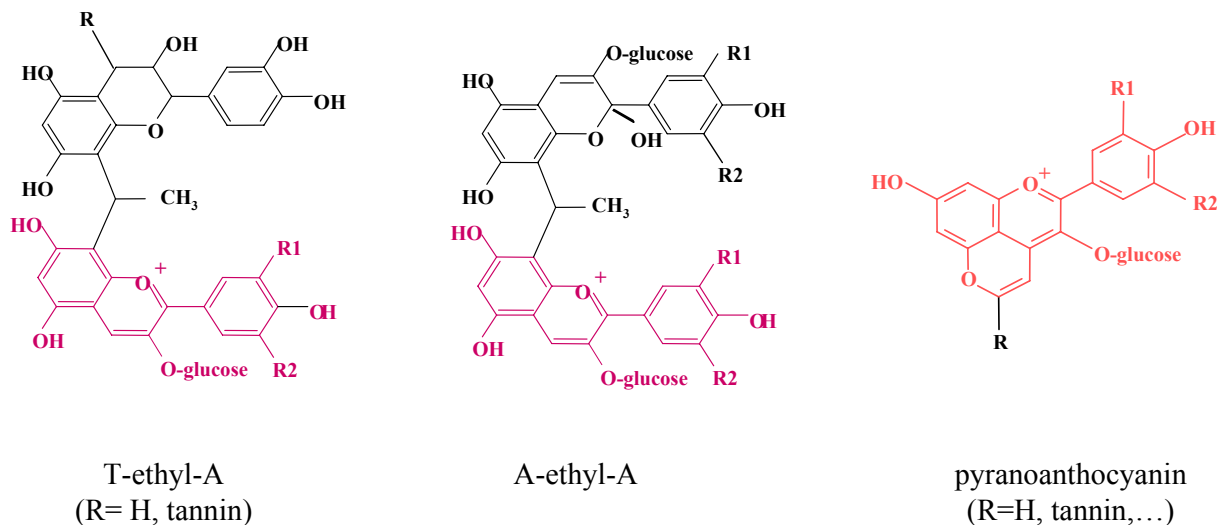


Figure 6 : Structures des pigments formés par la réaction de l'acétaldéhyde avec les anthocyanes.

Quelles sont les propriétés colorantes des divers types de dérivés anthocyaniques formés dans le vin ?

La transformation des anthocyanes en différents pigments mentionnés plus haut augmente considérablement la gamme des couleurs disponibles (d'orange à violet). En outre, la substitution du noyau C des anthocyanes empêche la décoloration par l'eau ou le SO₂.

Ainsi, les pyranoanthocyanes sont des pigments oranges particulièrement résistants à l'hydratation et à l'ajout de SO₂.

Les formes T-A⁺ et A⁺-T sont de la même couleur que les anthocyanes elles-mêmes mais la forme A⁺-T est résistante à l'action décolorante des sulfites en raison de la substitution du noyau C de l'anthocyanone tandis que la forme T-A⁺ devrait théoriquement être sensible au SO₂ et à l'hydratation. Il reste à déterminer si ces formes sont stabilisées par des mécanismes d'association tel que décrit pour les pigments comprenant des ponts éthyle dans leur structure.

Ces dérivés (c'est à dire T-ethyl-A et A-ethyl-A) sont des pigments violets et résistent beaucoup mieux à la décoloration par action d'eau ou du SO₂ que les anthocyanes des baies. Etant donné que le noyau C de ces dérivés n'est pas substitué, cette résistance est probablement due à leur implication dans des réactions d'association moléculaire. Ainsi, il a été récemment montré que la seule forme significative du dimère anthocyanone-éthyl-anthocyanone dans le vin est la forme A⁺-Et-AOH, dans laquelle une unité anthocyanique est incolore et l'autre est rouge (Atanosova et al., 2002). Cela signifie que la conversion des pigments du raisin (75-80% AOH, 20-25% AH⁺ dans la gamme de pH du vin) en dimère A-Et-A (50% AOH, 50% AH⁺) ne conduit pas seulement à un passage du rouge au violet mais augmente également beaucoup l'intensité colorante. Il est néanmoins important de souligner que les pigments résistants à l'action

décolorante des sulfites ne sont pas nécessairement polymériques et que certains pigments polymériques peuvent ne pas être résistants.

Qu'est qui détermine les proportions des divers types de nouveaux pigments ?

L'importance relative des adduits directs ou comportant des ponts éthyles dépend surtout de la présence d'acétaldéhyde dans le vin. L'acétaldéhyde est un produit du métabolisme de la levure et, en tant que tel, est toujours présent, en petite quantité. Il provient également de l'oxydation de l'éthanol, tant et si bien que son niveau augmente suite à une exposition du vin à l'air. La conversion des anthocyanes des baies en pigments violets A-Et-A et A-Et-T est ainsi augmentée lors de l'application de micro-oxygénation (Atanasova et al., 2002). Après de longues périodes de vieillissement, une conversion supplémentaire de ces pigments en pyranoanthocyanes conduit à des teintes plus jaunes. En outre, l'oxydation est nécessaire pour la conversion des espèces A-T incolores en pigments A⁺-T.

Étant donné que les anthocyanes et les tannins entrent en concurrence en tant que nucléophiles dans la plupart des réactions, les concentrations relatives des anthocyanes et des tannins déterminent celles des dérivés issus des tannins, des anthocyanes ou des deux. Cette proportion dépend de la variété de raisin et de la maturité mais elle peut être aussi profondément modifiée par les conditions de macération car les anthocyanes diffusent plus rapidement que les tannins. Il est nécessaire d'avoir une connaissance plus approfondie sur les vitesses des diverses réactions et sur les propriétés des nombreux produits formés avant d'être en mesure de déterminer un ratio optimal (tanin/anthocyane) pour produire un type de vin donné.

Le pH du vin est un autre paramètre important : la division catalysée par les acides est une étape clé dans la formation de T-A⁺ et des tannins- pyranoanthocyanes et elle évidemment favorisée par de faibles valeurs de pH. La protonation de l'acétaldéhyde, qui peut être augmentée par une acidité élevée, apparaît également comme un facteur limitant dans la formation des dérivés présentant des ponts éthyles. Enfin, étant donné que l'hydratation des anthocyanes dépend du pH, des pH plus élevés accroissent le pouvoir qu'ont les anthocyanes de concurrencer les tannins dans des réactions d'addition nucléophile. Cependant, dans la gamme des pH du vin, la formation de T-A⁺ et d'espèces T-ethyl-A⁺ n'est jamais limitée par la disponibilité de la forme hydratée.

Y a t'il des bons et des mauvais pigments et des bonnes ou mauvaises réactions ?

Les réactions des anthocyanes produisent à la fois des produits incolores et des pigments couvrant une large palette de couleurs. La plupart de ces pigments montrent, par rapport à leurs précurseurs anthocyaniques, une stabilité colorante accrue vis à vis de l'hydratation et de l'action blanchissante du SO₂. Cette propriété n'est pas liée au poids moléculaire et n'est en particulier pas limitée à des espèces dont le poids moléculaire est élevé.

La conversion des anthocyanes en adduits tannins-anthocyanes est également responsable de la diminution de l'astringence. Cela a été attribué classiquement à une augmentation du poids moléculaire du tannin car les tannins de poids moléculaire élevé étaient considérés comme insolubles et donc non-astringents. Cependant, des études récentes ont montré que la solubilité des tannins ne diminue pas quand leur poids moléculaire augmente et que l'astringence augmente en fait avec la longueur des chaînes de tanins. Il a été également démontré que les réactions dans le vin aboutissent à la formation d'espèces au poids moléculaire plus important (à travers les réactions induites par l'acétaldéhyde et par la formation de complexes A-T) mais aussi à des espèces de poids moléculaires inférieurs (à travers les ruptures de liaison catalysées par les acides) (Cf Figure 5). Ces derniers mécanismes sont favorisés par la présence de grandes quantités d'anthocyanes qui piègent les produits issus de la rupture des liaisons catalysée par les acides comme les formes T-A⁺ et les tannins-pyranoanthocyanes. En conséquence, la diminution de l'astringence observée pendant le vieillissement du vin implique

vraisemblablement de tels procédés plutôt que des réactions de polymérisation. Cependant, le goût des dérivés anthocyaniques et l'effet de l'incorporation d'unités anthocyaniques dans une structure de tannins sur l'astringence de ces structures reste à étudier.

Bibliographie

- Atanasova., H. Fulcrand. Cheynier, and M. Moutounet, 2002, Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine making: *Analytica Chimica Acta*. **458**: 15-27.
- Atanosova., H. Fulcrand, C. Le Guernevé, O. Dangles, and V. Cheynier, 2002, First evidence of acetaldehyde-induced anthocyanin polymerisation: *Polyphenol Communications 2002*: 417-418.
- Berke, B., C. Chèze, J. Vercauteren, and G. Deffieux, 1998, Bisulfite addition to anthocyanins : revisited structures of colourless adducts: *Tetrahedron Letters*. **39**: 5771-5774.
- Brouillard, R., and O. Dangles, 1993, Flavonoids and flower colour, in J. B. Harborne, ed., The flavonoids. Advances in research since 1986: London, Chapman and Hall: 565-588.
- Brouillard, R., and B. Delaporte, 1977, Chemistry of Anthocyanin Pigments. 2. Kinetic and Thermodynamic Study of Proton Transfer, Hydration, and Tautomeric Reactions of Malvidin 3-Glucoside. *J. Amer. Chem. Soc.* **99**: 8461-8468.
- Cheminat, A., and R. Brouillard, 1986, NMR investigation of 3-O(β -D-Glucosyl)malvidin structural transformations in aqueous solutions: *Tetrahedron letters*. **27**: 4457-4460.
- Cheyrier., H. Fulcrand, S. Guyot, J. Oszmianski, and M. Moutounet, 1995, Reactions of enzymically generated quinones in relation to browning in grape musts and wines, in C. Y. Lee, and J. R. Whitaker, eds., Enzymatic browning and its prevention in foods. A. C. S. Symp. Series. **600**: 130-143.
- Cheyrier., H. Fulcrand: Sarni, and M. Moutounet, 1997, Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de la vinification.: *Analisis*. **25**: M14-M21.
- Francia-Aricha, E. M., M. T. Guerra, J. C. Rivas-Gonzalo, and C. Santos-Buelga, 1997, New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 2262-2266.
- Fulcrand, H., C. Benabdeljalil, J. Rigaud. Cheynier, and M. Moutounet, 1998, A new class of wine pigments yielded by reactions between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*. **47**: 1401-1407.
- Fulcrand, H., P. J. Cameira dos Santos, P. Sarni-Manchado, V. Cheynier, and J. Favre- Bonvin, 1996, Structure of new anthocyanin-derived wine pigments.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*. **7**: 735-739.
- Goto, T., and T. Kondo, 1991, Structure and molecular stacking of anthocyanins. Flower color variation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**: 17-33.
- Mazza, G., and E. Miniati, 1993, grapes, in G. Mazza, and E. Miniati, eds., Anthocyanins in fruits, vegetables and grains: Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, CRC Press.
- Ribéreau-Gayon:, 1959, Recherches sur les anthocyanes des végétaux, Application au genre *Vitis*, Faculté des Sciences de Bordeaux, Bordeaux.
- Roggero, J. P., J. L. Larice, C. Rocheville Divorne: Archier, and S. Coen, 1988, Composition anthocyanique des cépages. I : Essai de classification par analyse en composantes principales et par analyse factorielle discriminante: *Revue Française d'Oenologie*. **112**: 41-48.
- Somers, T. C., 1971, The polymeric nature of wine pigments: *Phytochemistry*. **10**: 2175-2186.