

L'HPTLC au service de la connaissance de la vigne

Carole PINEDA
Sylvie DARNAULT
Nadia MOREAU
07 Juin 2007 - CCCM

LVMH RECHERCHE

PARFUMS & COSMETIQUES



Retour sur État des Lieux

- ❖ Rencontre entre Sylvie DARNAULT et Carole PINEDA lors d'une journée CCCM et à l'issue d'une présentation LVMH – 3 Juin 2004
 - Intérêt pour les travaux LVMH
 - Méthodologie 'screening phytochimique' par HPTLC
- ❖ Rencontre de Carole PINEDA avec Patrice ANDRE lors de la journée CCCM organisée par LVMH – 21 Octobre 2004
- ❖ Rencontre des 2 parties sur site BNIC – 30 Septembre 2005
 - Proposition de caractérisation d'extraits par HPTLC
- ❖ Soumission des résultats sur site LVMH – 11 Mai 2006
 - Perspectives à discuter

- ❖ Établir la cartographie moléculaire en vue de l'obtention de marqueurs spécifiques
 - Identification
 - Différenciation - maturité

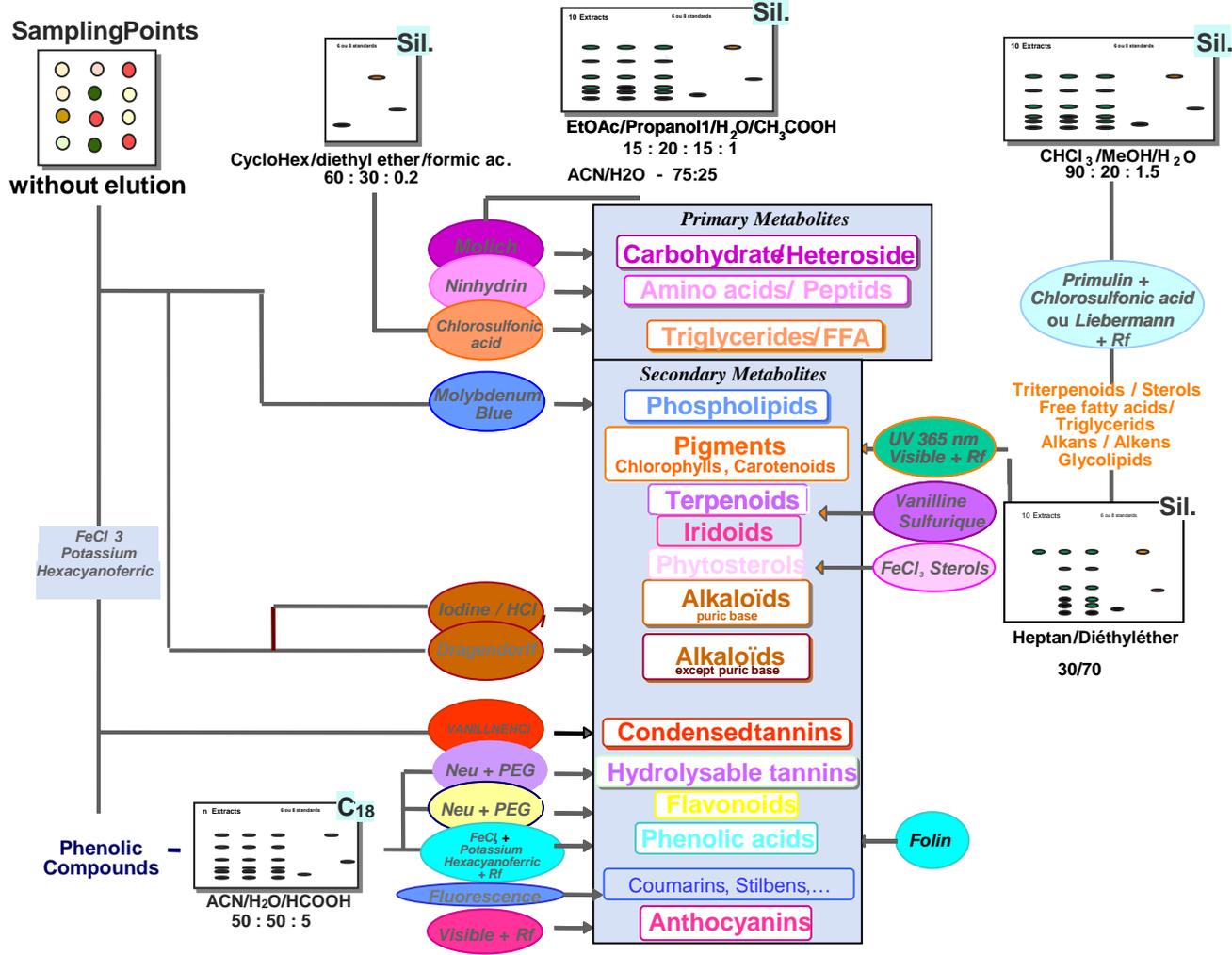
- ❖ Appliquer la méthodologie HPTLC à des extraits issus de la vigne (pellicule, pulpe, moûts)

- ❖ Déterminer l'intérêt et la pertinence de l'HPTLC



Bureau National Interprofessionnel du Cognac

Méthodologie Screening Phytochimique par HPTLC





Bureau National
Interprofessionnel
du Cognac

➔ Résultats Préliminaires Prometteurs



Nadia MOREAU

- ❖ Contribution à l'identification structurale des molécules d'intérêt ET à l'estimation quantitative
 - Conditions optimisées (AMD), Densitométrie (évaluation du profil spectral, teneur en composé,...)

L'HPTLC au service de la connaissance de la vigne

- ❖ Station Viticole de Cognac, BNIC : l'expertise de la vigne
- ❖ Laboratoire LVMH Recherche : l'expertise de l'HPTLC

OBJECTIFS

- ❖ Cartographie moléculaire globale du cépage sur des raisins d'Ugni Blanc (pellicule-pulpe-moûts)
- ❖ Approfondissement des résultats sur les précurseurs d'arômes (famille des Terpènes dont Caroténoïdes)

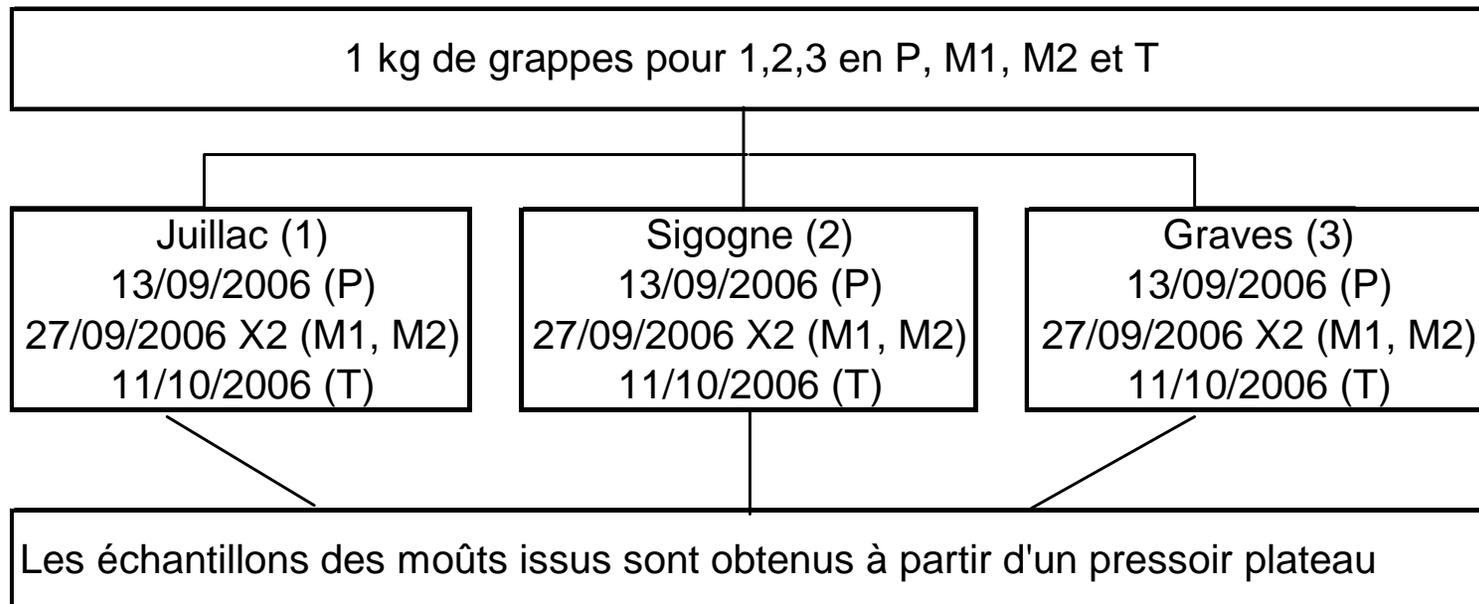
Plan d'action du Projet

- ❖ Mise au point sur Raisins blancs d'Afrique du Sud
 - ❖ Protocole HPTLC
 - ❖ Extractions : hydroalcoolique, spécifique, gamme de polarité
 - ❖ Ciblage des grandes familles présentes

- ❖ Transposition sur Raisins du Cépage Ugni Blanc

Échantillons d'Ugni Blanc

- ❖ Prélèvement des échantillons d'Ugni Blanc sur la campagne 2006
 - ❖ Grappes de raisins
 - ❖ Moûts correspondants



Préliminaires du Projet

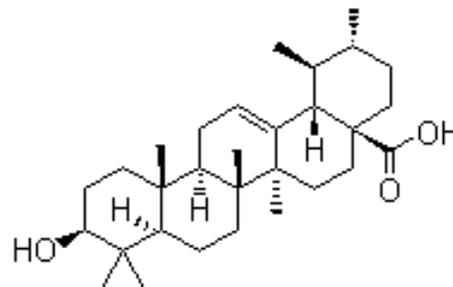
❖ Partie bibliographique

- ❖ Sur les molécules du raisin : ~110 molécules recensées
- ❖ Sur l'extraction : méthodes et solvants utilisés

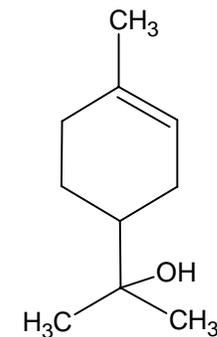
❖ Prise en main de l'HPTLC

- ❖ Conditions standard (screening phytochimique interne)
- ❖ Conditions spécifiques :

Élutions et révélateurs (pour Terpènes)

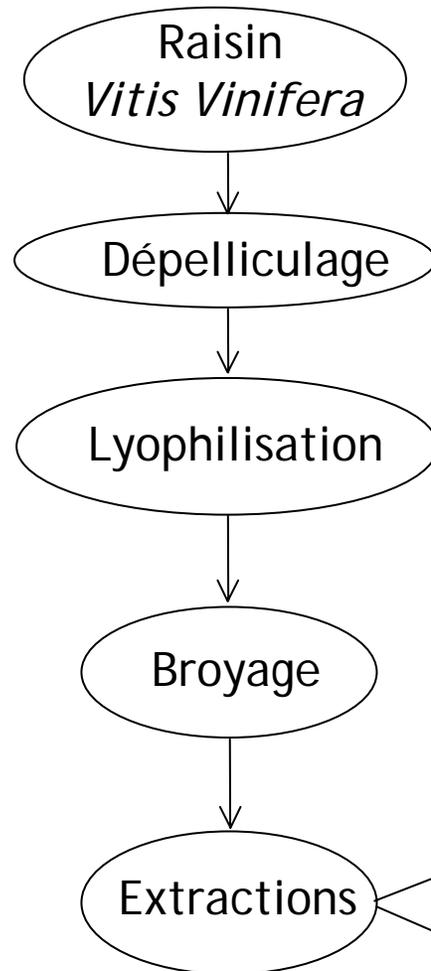


Acide ursolique - Triterpène



α -terpinéol - Monoterpène

Préparation des extraits



- Pour cartographie moléculaire globale
- Pour approfondissement sur les précurseurs d'arômes



Bureau National
Interprofessionnel
du Cognac

Préparation du raisin

« Dépelliculage » et lyophilisation

"Cépage"	Rdt massique total (%)	
	Pellicule	Pulpe
Afrique du Sud	2	10
Ugni Blanc (P)	3	8
Ugni Blanc (M)	3	8
Ugni Blanc (T)	4	9



Raisins récoltés sur le site de Juillac

Préparation des extraits -> Cartographie moléculaire globale

Extraction ASE (Accelerated Solvent Extraction)

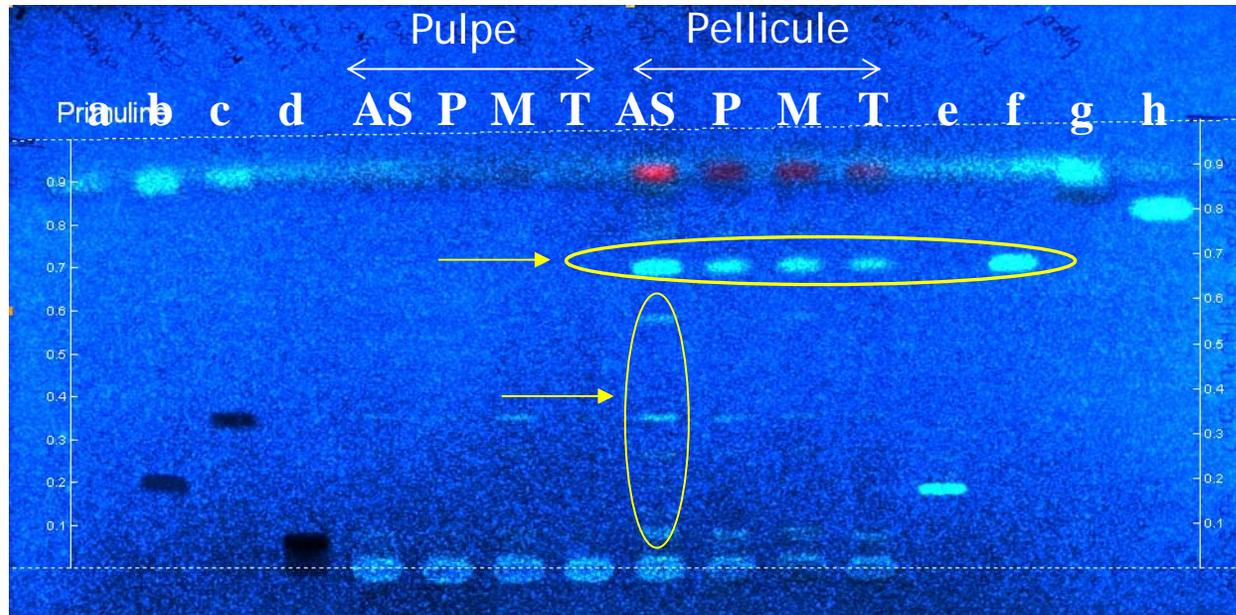
- ❖ *EtOH/H₂O - 90/10 v/v*
→ Condition standard du Labo LVMH
- ❖ Bon Rendement massique pour les pellicules : ~ 70%
- ❖ Rendement plus faible pour les pulpes : entre 20 et 45%

Méthode du Screening phytochimique -> Cartographie moléculaire globale

Domaine des terpènes

Phase Silice - Eluant : $CHCl_3/MeOH/H_2O$ 90/20/1.5 v/v/v

Révélation à Primuline - Lecture sous 366nm



AS = Afrique du Sud
P = Ugni Blanc (P)
M = Ugni Blanc (M)
T = Ugni Blanc (T)

- a. α -terpinéol
- b. ε -viniférine
- c. Resvératrol
- d. Lutéoline-7-O-glucoside
- e. α -héderine
- f. Ac. Ursolique
- g. β -ionone
- h. lupéol

Infos importantes pour AS – Pellicule :

- zone des triterpènes
- zone des saponines et des stilbènes

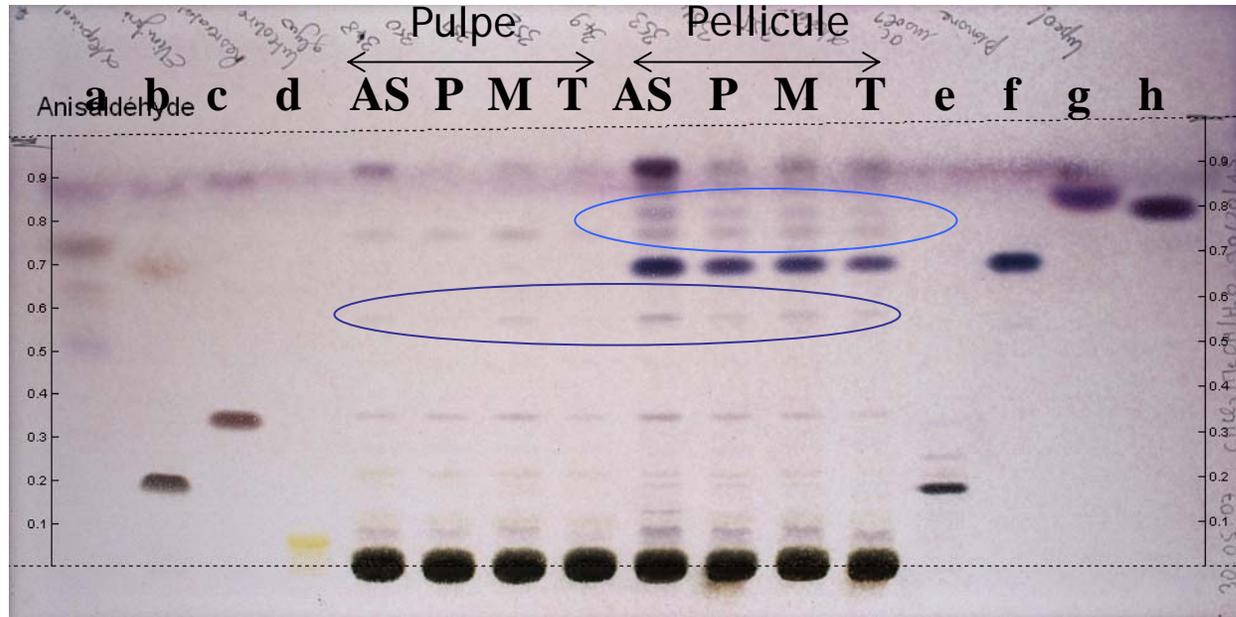
Marqueur commun (cépages) proche triterpène

-> Cartographie moléculaire globale

Domaine des terpènes

Phase Silice - Eluant : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 90/20/1.5 v/v/v

Révélation à l'anisaldéhyde - Lecture dans le visible



AS = Afrique du Sud
P = Ugni Blanc (P)
M = Ugni Blanc (M)
T = Ugni Blanc (T)

- a. α -terpinéol
- b. ε -viniférine
- c. Resvératrol
- d. Lutéoline-7-O-glucoside
- e. α -héderine
- f. Ac. Ursolique
- g. β -ionone
- h. lupéol

Intérêt de la révélation :

- zone des monoterpènes
- zone de marqueurs d'intérêt (quantitatif)

Pellicule + riche, quantitativement et qualitativement

-> Cartographie moléculaire globale

Domaine des Acides Aminés



*Phase Silice – Eluant : ACN/H₂O
75/25 v/v*

*Révélation à Ninhydrine – Lecture
dans le visible*

AS = Afrique du Sud

P = Ugni Blanc (P)

M = Ugni Blanc (M)

T = Ugni Blanc (T)

f. Proline

g. Arginine

Présence d'acides aminés

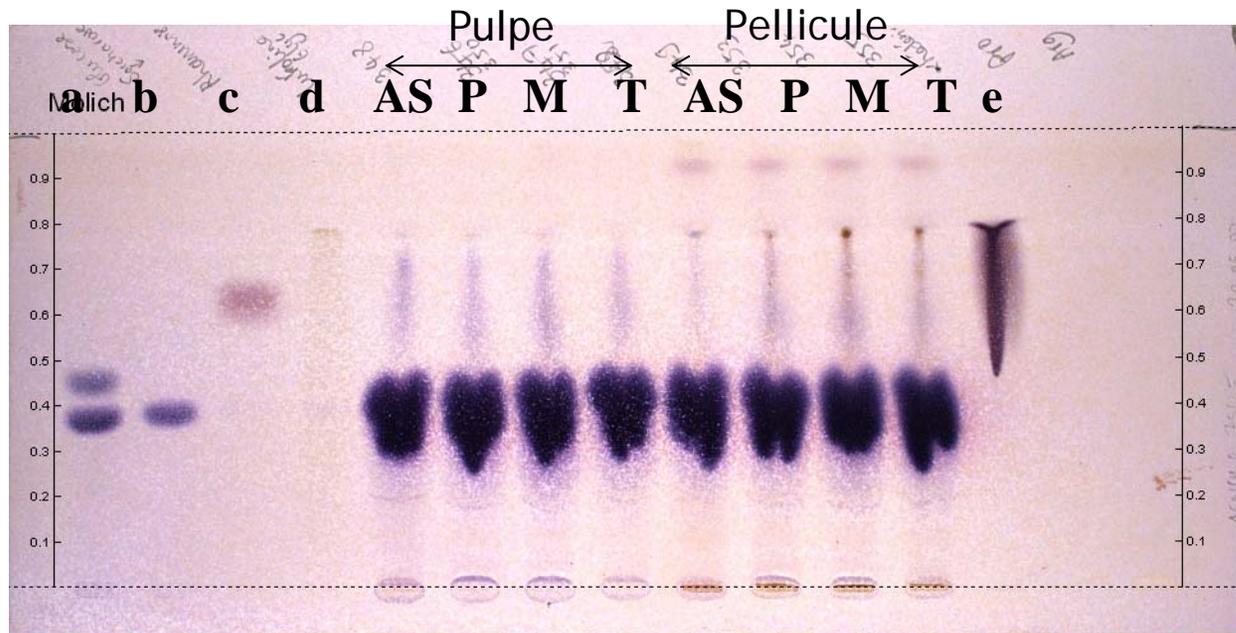
quelle que soit la provenance

quel que soit l'organe

-> Cartographie moléculaire globale

Domaine des sucres

*Phase Silice – Eluant : ACN/H₂O 75/25 v/v
Révélation à Molich – Lecture dans le visible*



AS = Afrique du Sud
P = Ugni Blanc (P)
M = Ugni Blanc (M)
T = Ugni Blanc (T)

a. Glucose
b. Saccharose
c. Rhamnose
d. Lutéoline-7-O-glycosilée
e. α -héderine

→ Présence de composés sucrés
quelle que soit la provenance
quel que soit l'organe

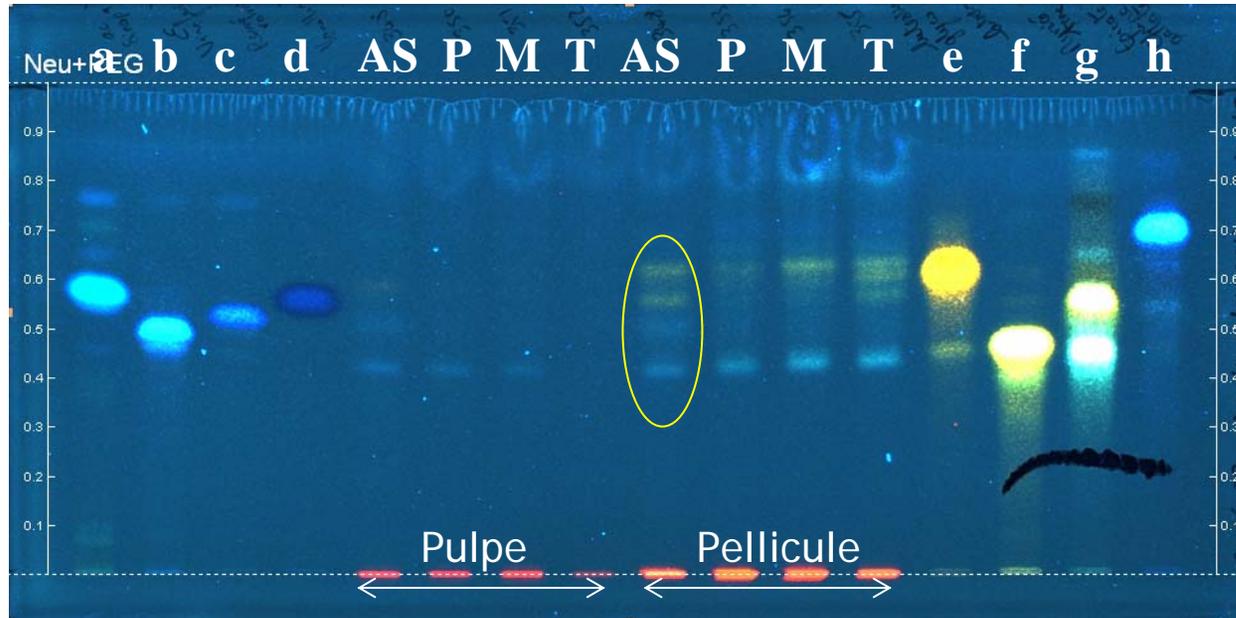
→ Présence d'hétéroside(s)
Majorité de monosaccharides
Présence de disaccharides

-> Cartographie moléculaire globale

Domaine des Phénols

Phase C18 - Eluant : ACN/H₂O/HCOOH 50/50/5 v/v/v

Révélation Neu + PEG – Lecture sous 366 nm



AS = Afrique du Sud

P = Ugni Blanc (P)

M = Ugni Blanc (M)

T = Ugni Blanc (T)

a. Ac. Sinapique

b. ε-viniférine

c. Resvératrol

d. Vanilline

e. Lutéoline-7-O-glycosilée

f. Lutéoline

g. Myricétine

h. Epicatechine gallate

Richesse des pellicules

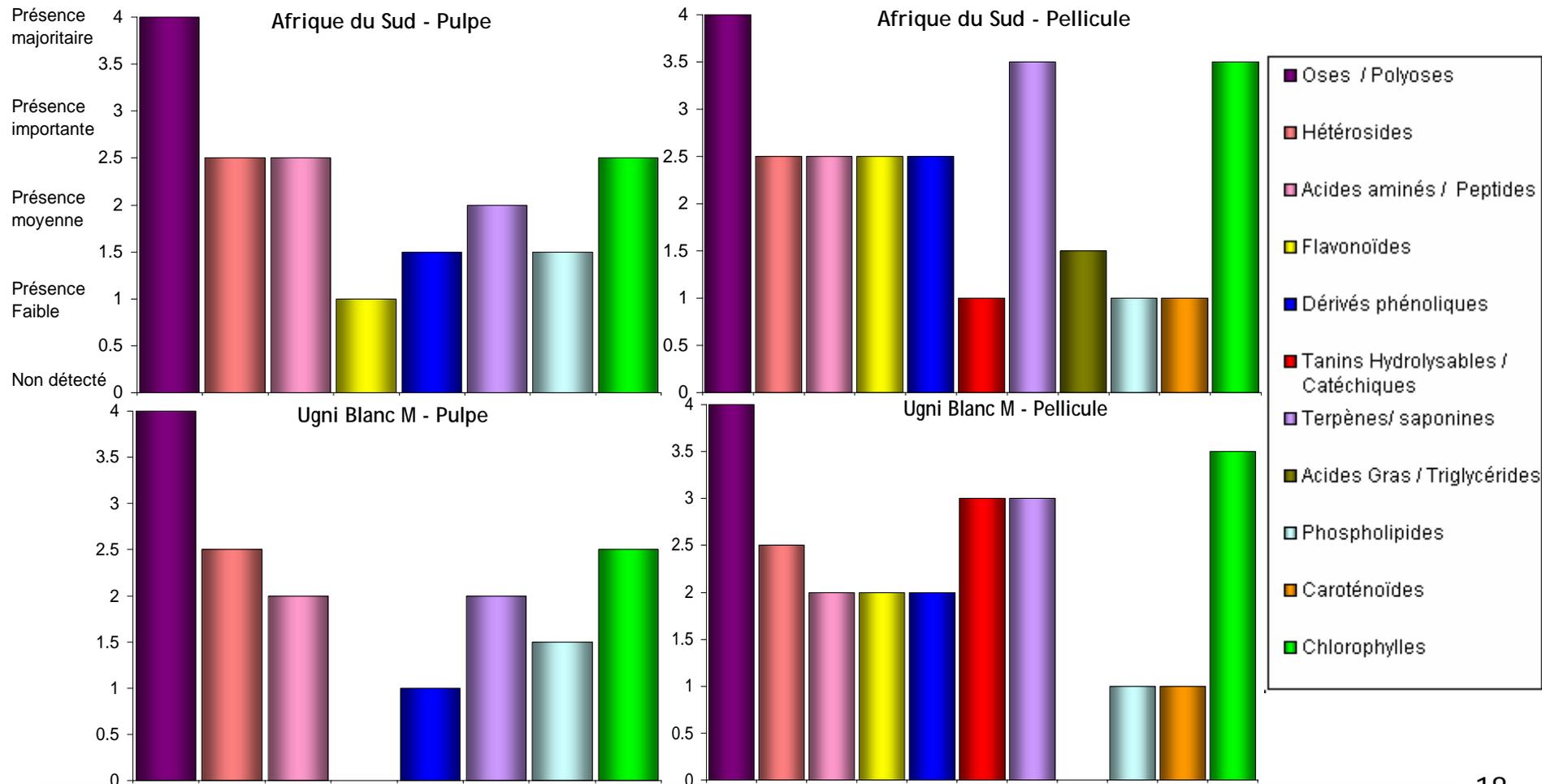
Diversité moléculaire plus importante pour Afrique du Sud

Différenciation quantitative pour l'Ugni Blanc

Profil Phytochimique

Cartographie moléculaire globale

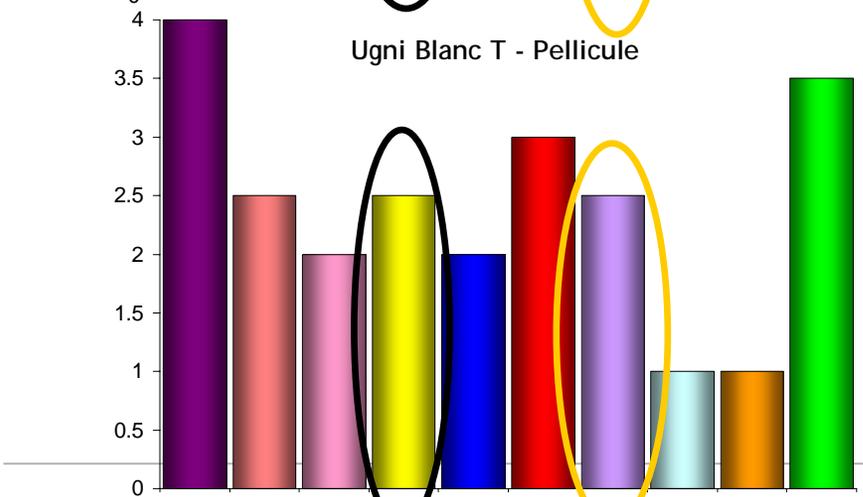
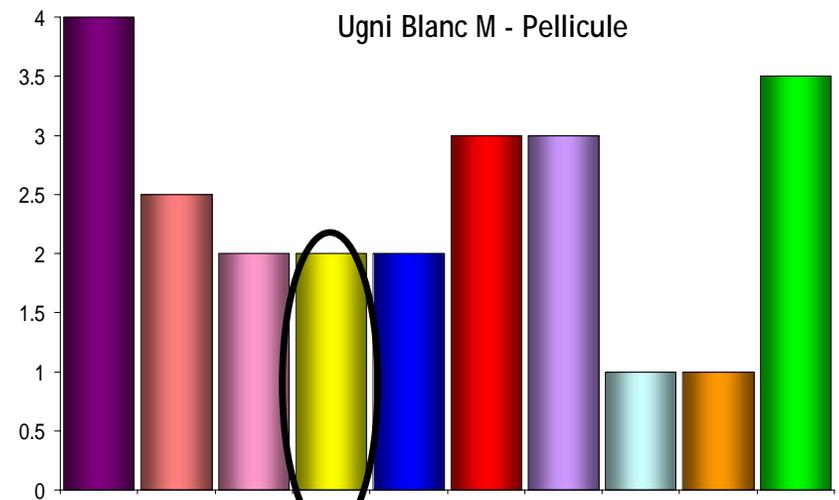
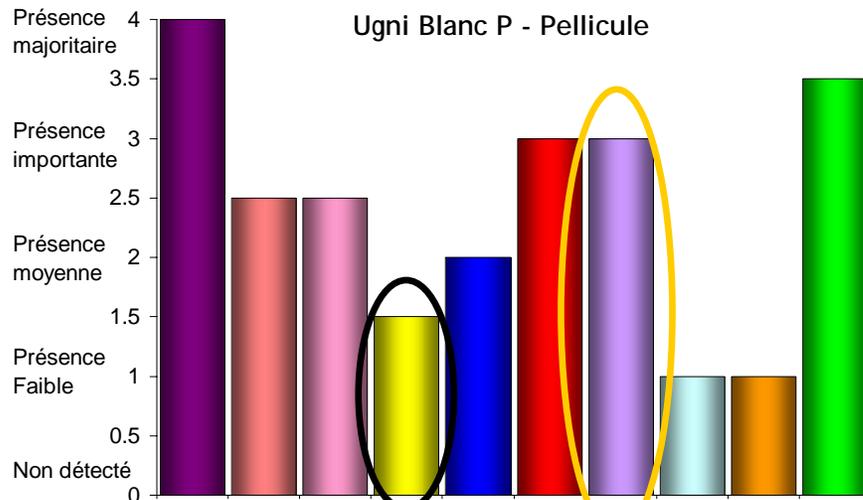
Différenciation des 2 'cépages'



Profil Phytochimique

Cartographie moléculaire globale

Différenciation en terme de maturité (date de récolte)



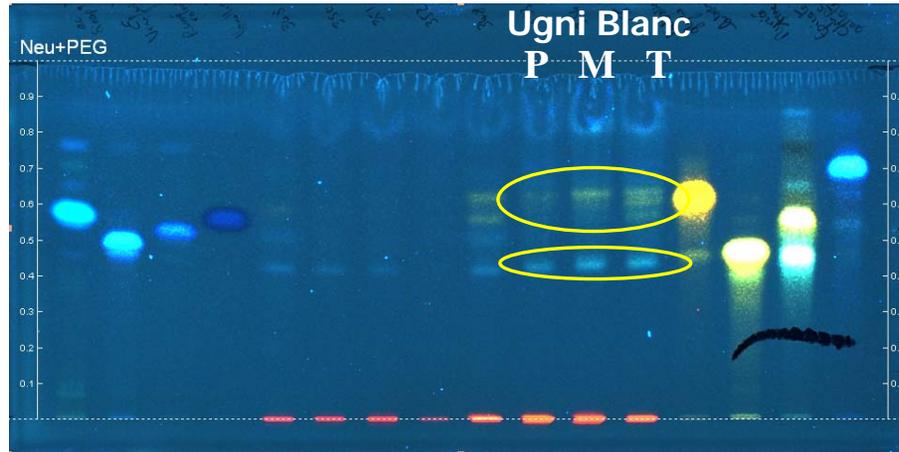
- Oses / Polyoses
- Hétérosides
- Acides aminés / Peptides
- Flavonoïdes
- Dérivés phénoliques
- Tanins Hydrolysables / Catéchiques
- Terpènes/saponines
- Acides Gras / Triglycérides
- Phospholipides
- Caroténoïdes
- Chlorophylles

Profil Phytochimique

Marqueurs de différenciation

Différenciation en terme de maturité

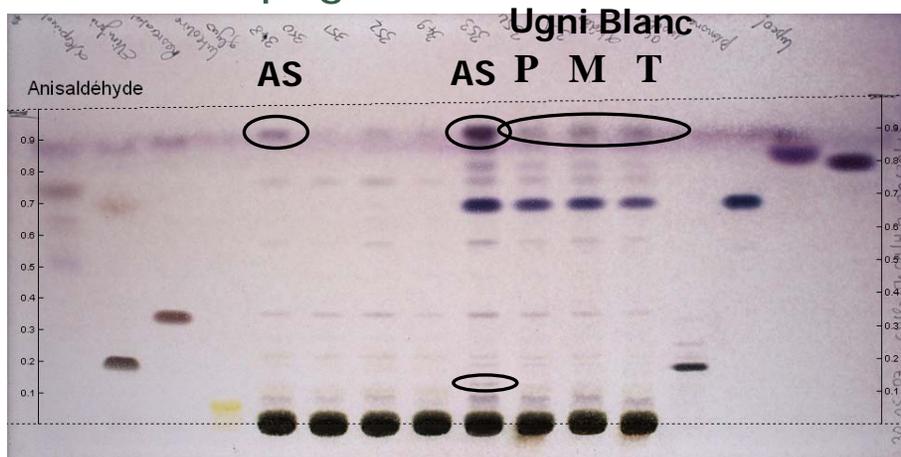
Phase C18 - Eluant :
ACN/H₂O/HCOOH
50/50/5 v/v/v
Révélation Neu +
PEG – Lecture sous
366 nm



Augmentation des
flavonoïdes avec la
maturité

Différenciation des 2 'cépages'

Phase Silice - Eluant :
CHCl₃/MeOH/H₂O
90/20/1.5 v/v/v
Révélation à
l'anisaldéhyde -
Lecture dans le visible



Différenciation qualitative
marqueur qualitatif pour
Afrique du Sud

Différenciation quantitative
marqueurs communs

Conclusion & Perspectives

- ❖ Pellicules plus riches que la pulpe
- ❖ HPTLC : outil pour la différenciation selon :
 - ☹ Le cépage
 - ☹ La date de récolte
- ❖ Différenciation du site de récolte
- ❖ Recherche de marqueurs spécifiques
 - ☹ Extraction Hexane – famille des TERPENES (précurseurs d'arôme)
- ❖ Optimisation d'identification
 - ☹ hydrolyse (recherche génine),...
 - ☹ HPTLC/AMD, densitométrie,...



Bureau National
Interprofessionnel
du Cognac

LVMH RECHERCHE
PARFUMS & COSMETIQUES

Merci pour votre attention

L'HPTLC au service de la connaissance de la vigne

Carole PINEDA
Sylvie DARNAULT
Nadia MOREAU
07 Juin 2007 - CCCM

LVMH RECHERCHE

PARFUMS & COSMETIQUES

