

50376
1982
133

N° d'ordre : 988

50376
1982
133

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR 3ème CYCLE

(Spectrochimie et Méthodes d'Analyse)

par

Ahmed STATGUA

**APPORT DE LA SPECTROMETRIE RAMAN
DE RESONANCE A L'ETUDE DES ANTHOCYANES**



Soutenu le 29 septembre 1982 devant la Commission d'Examen

Messieurs	M. BRIDOUX	Président
	J.C. MERLIN	Rapporteur
	R. BOURIQUET	Examineur
	R. BROUILLARD	Examineur

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER,
CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET,
GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE,
LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET,
MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN,
ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNOT Ernest	Biologie végétale

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FOURET René	Physique du solide
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie physique

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, électrotechnique, automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre

Mme MIMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LINTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences économiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAHIEU Jean Marie	Physique atomique et moléculaire.
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean Paul	Physiologie animale
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique

M. WATERLOT Michel
M. WERNER Georges
M. WOSNIAK Michel
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Géologie générale
Informatique fondamentale appliquée
Hydrométallurgie
Algèbre

A mes parents

A ma femme Nadia

A mes frères et soeurs

A Aziza Jasmine et Naoufel

Témoignage d'affection

Ce travail a été réalisé à l'U.E.R. de Chimie de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, dans le laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman du C.N.R.S. (L.P. 2641) que dirige Monsieur le Professeur Michel DELHAYE, Directeur d'Institut au C.N.R.S.

Je le prie de trouver ici le témoignage de ma profonde et sincère gratitude pour m'avoir accueilli dans son laboratoire.

Je suis très sensible à l'honneur qu'a bien voulu me faire Monsieur le Professeur Michel BRIDOUX, Directeur de l'I.U.T. de Béthune, d'accepter la présidence de ce jury, je le remercie vivement.

Que Monsieur Raymond BROUILLARD, Professeur à l'Institut de Chimie de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg et Monsieur le Professeur Robert BOURIQUET de l'Université de Lille I, trouvent ici mes vifs remerciements et ma reconnaissance pour avoir examiné ce travail.

Je prie Monsieur Jean Claude MERLIN, qui a guidé mes pas dans la recherche et a dirigé ce travail et auprès de qui j'ai trouvé tout l'aide et le soutien moral et matériel, de trouver ici l'expression de ma gratitude et sincères remerciements.

Enfin, je remercie tous les membres du laboratoire qui m'ont permis de mener à bien ce travail, en particulier Mademoiselle Nathalie SZYDLOWSKI pour son aide inoubliable, Madame Chantal DESCAMPS qui, avec soin et beaucoup de patience a effectué la dactylographie et la mise en page de ce mémoire, et Monsieur Jean Pierre LABAËYE pour la réalisation des figures. Qu'ils trouvent ici l'expression de mes amitiés les plus sincères.

SOMMAIRE

INTRODUCTION :	1
CHAPITRE I : GENERALITES	
1. Les pigments du règne végétal.....	4
2. Les anthocyanes.....	8
3. Intérêt de l'étude des anthocyanes.....	16
CHAPITRE II : METHODES EXPERIMENTALES	
PARTIE I : Préparation et purification des anthocyanes... 19	
1. Origine des produits.....	19
2. Extraction et purification.....	19
3. Séparation et identification des anthocyanes..	21
4. Caractérisation chimique des anthocyanes.....	28
PARTIE II : Méthodes spectroscopiques..... 29	
1. Spectroscopie d'absorption U.V.-visible.....	29
2. Spectrométrie Raman de résonance.....	29

CHAPITRE III : OBSERVATIONS <i>IN SITU</i> ET <i>IN VIVO</i> DES SPECTRES RAMAN DE RESONANCE DES PIGMENTS ANTHOCYANIQUES.....	41
1. Etude des pigments du raisin.....	42
2. Pigmentation de " <i>Malva sylvestris</i> ".....	49
3. Etudes anthocyanes du chou-rouge " <i>Brassica oleracea</i> ".....	50
4. Pigmentation de " <i>Tulipa cultivar</i> ".....	57
5. Conclusion.....	61
 CHAPITRE IV : INTERPRETATION ET CHANGEMENT STRUCTURAL	
1. Attribution des spectres Raman de résonance des anthocyanes sous forme cation flavylum.....	62
2. Transformations structurales des antho- cyanes.....	67
3. Mécanisme de transformation structurale...	71
4. Complexation des anthocyanes.....	73
5. Conclusion.....	75
 CONCLUSION.....	77
 ANNEXE : EFFET RAMAN DE RESONANCE.....	80
 BIBLIOGRAPHIE.....	92

INTRODUCTION

Les anthocyanes sont les pigments hydrosolubles les plus répandus dans le règne végétal, elles sont responsables des colorations vives rencontrées chez de nombreux végétaux. Ces pigments peuvent être répartis dans tous les organes des plantes mais se rencontrent plus particulièrement dans les fruits et les fleurs.

Tous les pigments anthocyaniques possèdent une même structure de base - le phényl-2 benzopyrylium - et ne se différencient que par l'état de substitution des cycles, ce qui conduit à de profondes modifications de leur spectre d'absorption visible. Ces modifications ne sont pas très bien comprises, c'est pour cela que nous nous sommes intéressés à l'étude de ces molécules, pour essayer de comprendre les variations de teintes en fonction de la structure de ces composés.

Comme ces molécules possèdent une bande d'absorption située dans le visible, la spectrométrie Raman de résonance s'avère être un outil de choix pour l'étude de ces pigments d'autant plus qu'elle permet l'obtention de spectres de vibration de chromophores sans être gêné par un environnement complexe non absorbant.

Depuis l'avènement des sources lasers et le perfectionnement des techniques spectroscopiques, la spectrométrie Raman de résonance n'a cessé de voir son rôle s'étendre pour les études analytiques et structurales dans tous les domaines, en particulier, la biologie et la biochimie. La connaissance des modes normaux de vibrations de ces pigments peut apporter des renseignements analytiques et structuraux très intéressants.

Les pigments anthocyaniques n'ont jamais été étudiés par spectrométrie Raman de résonance. Aussi il nous a semblé intéressant de voir l'apport de la spectrométrie Raman de résonance à la connaissance des structures de ces pigments, de déterminer les méthodes de séparation et de purification les plus adaptées à cette technique spectroscopique et d'analyser les informations que les spectres Raman peuvent nous fournir.

Dans ce mémoire, nous consacrons le premier chapitre à des généralités sur les pigments et en particulier, les anthocyanes. Nous présentons l'intérêt de la spectrométrie de résonance à ce genre d'étude.

Dans le deuxième chapitre, nous présentons les méthodes d'extraction et de purification des anthocyanes, les techniques chromatographiques de séparation et d'identification sont discutées. Nous incluons également dans ce chapitre la description de l'appareillage spectroscopique utilisé au cours de cette étude.

Les pigments anthocyaniques ne sont pas disponibles dans le commerce, aussi, nous avons effectué nos travaux sur des composés directement extraits des végétaux. Par excitation *in situ* d'une seule cellule végétale à l'aide de la Microsonde M.O.L.E., il est possible d'obtenir le spectre de vibration du pigment inclus dans son milieu naturel.

La comparaison des spectres obtenus *in situ* et *in vitro* font l'objet du troisième chapitre. L'identification des anthocyanes extraites et séparées par chromatographie est faite par comparaison des Rf et des longueurs d'onde des maximums d'absorption avec des données bibliographiques. Nous étudions plus particulièrement la pigmentation du raisin, de la mauve des champs "*Malva sylvestris*" et du chou rouge "*Brassica oleracea*". Des exemples de fleurs (tulipe, iris, delphinium, oeillet) sont présentés.

Dans le quatrième chapitre, nous proposons une attribution de certains domaines des spectres Raman de résonance obtenus à différentes conditions acido-basiques. La complexation des anthocyanes par des sels métalliques est présentée.

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS

1. LES PIGMENTS DU REGNE VEGETAL

De nombreuses substances chimiques sont responsables de la coloration du monde végétal. Elles existent aussi bien chez les organismes les plus simples que chez les individus les plus évolués. Les substances colorantes sont généralement incluses dans les cellules végétales, elles sont soit solubilisées dans le cytoplasme, soit contenues dans des vacuoles, soit fixées à d'autres constituants cellulaires.

D'après leur site de localisation dans la cellule, les pigments végétaux sont séparés en deux groupes : les composés liposolubles comme les caroténoïdes présents dans les tissus membranaires et les composés hydrosolubles dissous dans le suc cellulaire et qui comprend entre autre les flavonoïdes. Les pigments des végétaux peuvent être groupés en différentes classes.

1.1 - Les pigments chlorophylliens :

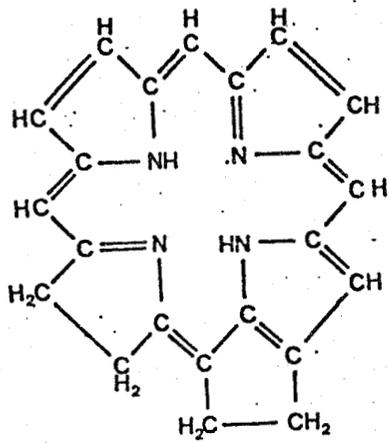
Les pigments chlorophylliens sont les pigments verts les plus répandus dans la nature et sont les colorants essentiels de la matière vivante : feuilles des plantes supérieures ainsi que des bactéries, algues, lichens, cryptogames vasculaires ... Ils sont inclus dans les chloroplastes. Leur rôle prédominant est d'absorber l'énergie de la lumière solaire et de la transformer en énergie chimique, lors de la photosynthèse.

La structure de base des pigments chlorophylliens est la porphine, un cycle tétrapyrolique (Fig. 1.a). Les dérivés substitués sont généralement trouvés sous forme de complexes avec le magnésium comme c'est le cas des chlorophylles a et b (Fig. 1.b).

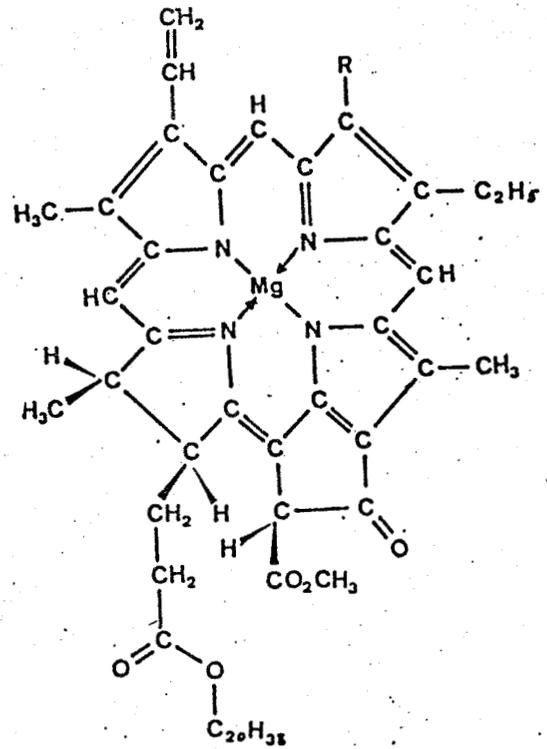
1.2 - Les caroténoïdes :

Les caroténoïdes sont les pigments liposolubles les plus répandus dans le monde végétal. Ils sont responsables de la majorité des colorations rouge et jaune. Cependant tous les tissus verts des plantes renferment des caroténoïdes qui sont localisés avec la chlorophylle dans les chloroplastes. Ils jouent dans ce cas le rôle de récepteur secondaire de la lumière.

Les caroténoïdes les plus courants chez les plantes sont le β -carotène (Fig. 1.c), la lutéine, la violaxanthine (Fig. 1.d) et la néoxanthine (1). On peut cependant trouver d'autres types de caroténoïdes mais en plus faible quantité. Les caroténoïdes sont des longues molécules polyisopréniques possédant des doubles liaisons conjuguées ; chaque extrémité de la molécule est formée généralement d'un noyau cyclohexénique non saturé et substitué. Les deux principales classes de caroténoïdes sont les carotènes dont le cycle cyclohexénique est non saturé et les xanthophylles qui sont caractérisés par des fonctions oxygénées (OH ; C=O) sur les noyaux terminaux.



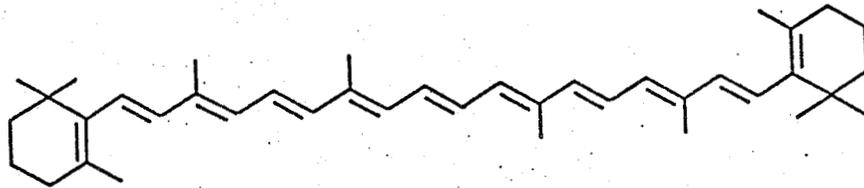
a) Porphine



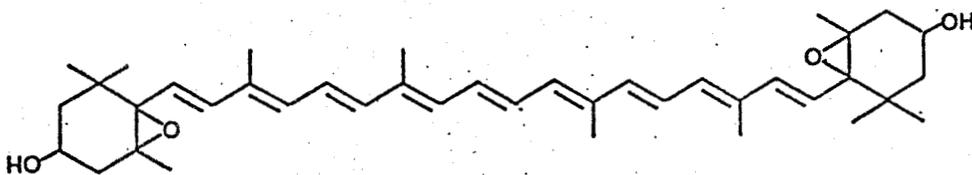
b) Chlorophylle a et b

a R = CH₃

b R = OCH



c) β Carotène



d) Violoxanthine

FIG. 1 : STRUCTURE DE LA CHLOROPHYLLE ET DES CAROTENOÏDES



Il existe actuellement plus de 300 caroténoïdes connus, se caractérisant par la nature du groupement terminal (fonctions acides, cycles benzéniques, chaînes polyéniques, etc...) et par la modification du motif isoprénique de la chaîne (fonctions acétyléniques, alléniques, epoxy, etc...).

1.3 - Les flavonoïdes :

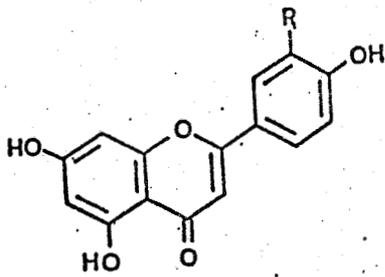
Le terme flavonoïdes s'applique à l'ensemble des composés possédant une structure dérivée du phényl-2 chromone (ou flavone) (Fig. 2.a) qui se caractérise par deux cycles benzéniques reliés entre eux par l'intermédiaire d'un hétérocycle oxygéné. Les différents flavonoïdes se différencient par l'état d'oxydation des atomes de l'hétérocycle benzénique.

Dans la nature les substances flavoniques sont sous forme d'hétérosides.

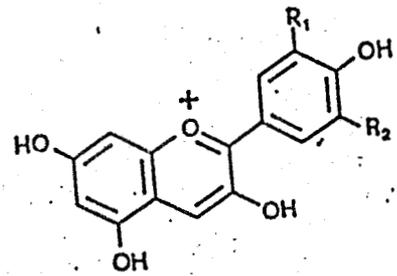
Certains flavonoïdes ne possèdent pas la structure de base de la flavone mais en dérivent, c'est le cas des chalcones et des auronnes (Fig. 2.i et j).

Sur la figure 2 nous reportons les structures de certains types de flavonoïdes les plus connues.

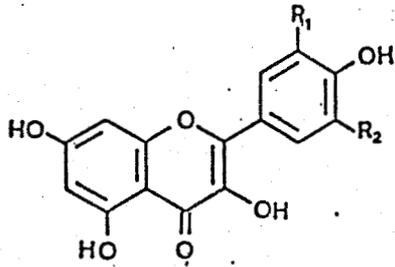
Ces pigments sont généralement contenus dans les vacuoles cellulaires des plantes supérieures et sont responsables de la pigmen-



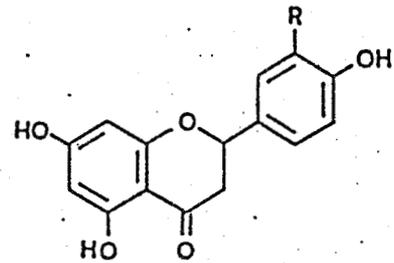
a) Flavone



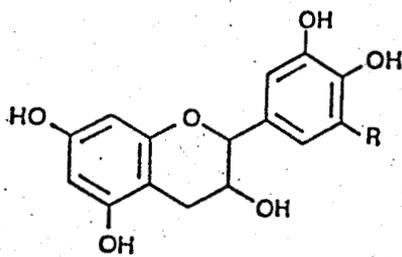
b) Anthocyanidine



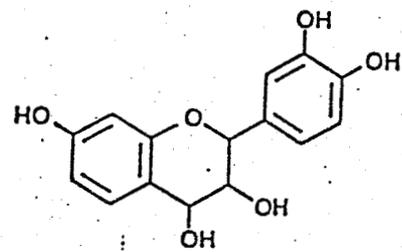
c) Flavonol



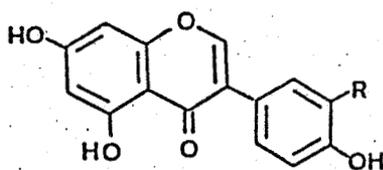
d) Flavonone



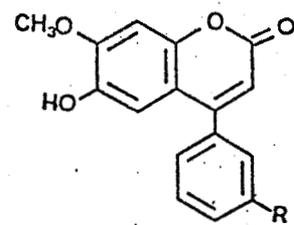
e) Catechines



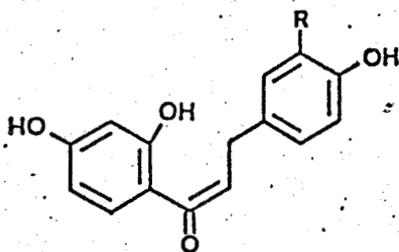
f) Proanthocyanidine



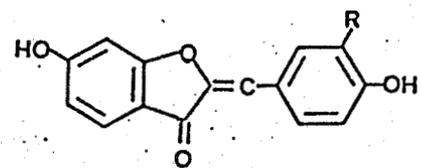
g) Isoflavone



h) Neoflavone



i) Chalcone



j) Aurone



FIG. 2 : STRUCTURE DES PRINCIPAUX FLAVONOÏDES

tation des fleurs, des fruits et de certaines feuilles.

Les colorations les plus vives, observées dans la nature, sont provoquées par la présence d'un ou plusieurs dérivés des flavonoïdes appelés anthocyanes (Fig. 2.b). C'est cette classe de dérivés des flavonoïdes qui a fait l'objet de ce travail.

1.4 - Les autres pigments :

Dans le règne végétal, on rencontre d'autres pigments tels que les dérivés quinoniques (benzoquinones, naphthoquinones, anthraquinones, quinones polycycliques et quinones N-hétérocycliques. Leur contribution à la coloration des plantes est relativement faible, elles donnent des teintes allant du jaune pâle jusqu'au noir.

Les phytochromes sont des pigments photochromiques bleu-vert. Ce sont des protéines possédant un chromophore tétrapyrrolique linéaire qui existent sous deux formes (Fig. 3) :

- "Pr" qui est la forme inactive, possède son maximum d'absorption dans le rouge (660 nm)

- "Pfr" qui est la forme active, absorbe dans le rouge lointain (730 nm).

Leur rôle essentiel est le contrôle du développement et du métabolisme des plantes vertes.

On peut encore citer les pigments suivants : bêtacyanines, bêtaxanthines, les O-Acylphénols, les pyrones et des pigments azotés

(phénazines, phénoxazines et mélanines) qui sont peu répandus et dont le rôle est peu connu.

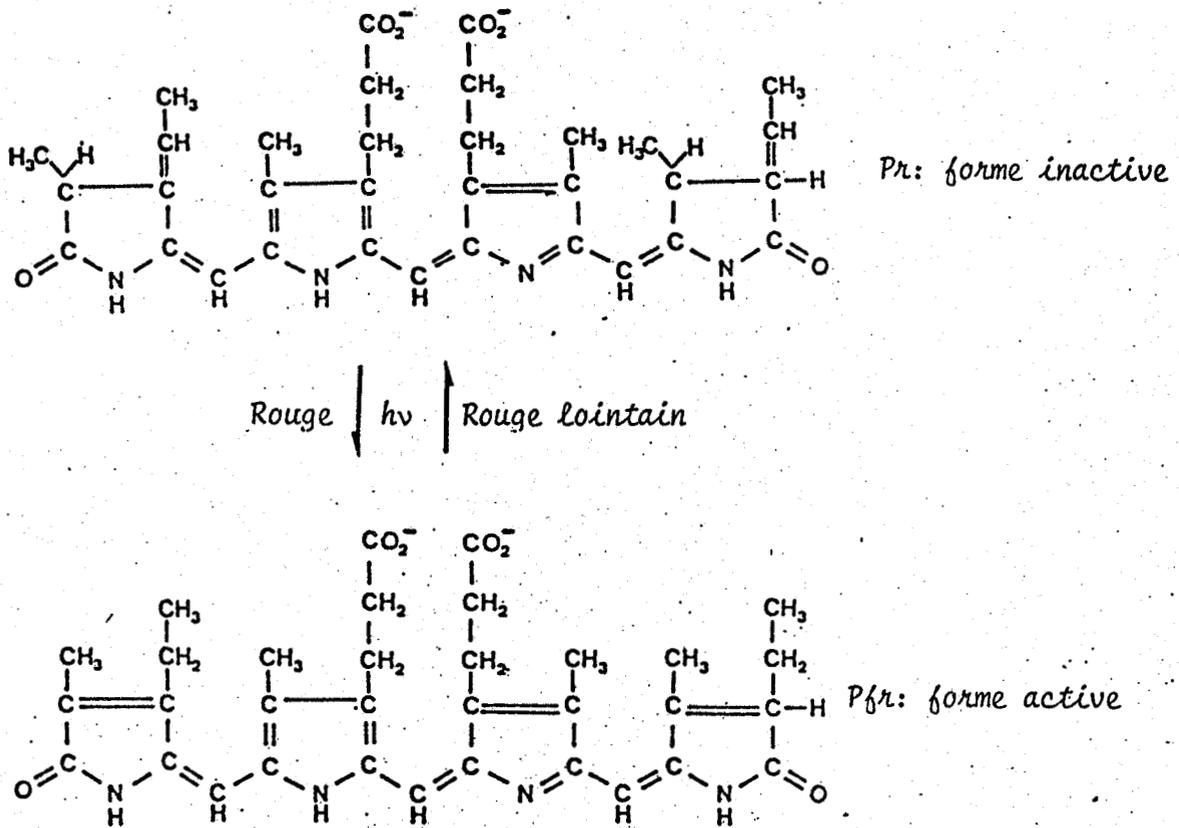


FIG. 3 : STRUCTURE DU PHYTOCHROME

2. LES ANTHOCYANES

Les anthocyanes sont les pigments hydrosolubles les plus répandus dans le règne végétal, elles se localisent dans les fleurs, les fruits, les feuilles de certaines espèces et sont à l'origine d'une très grande variété de couleurs allant du rouge au bleu.

Ces composés sont généralement trouvés dans la nature sous forme d'hétérosides ; il faut donc faire la distinction entre la molécule glucidée appelée anthocyanane et la molécule débarrassée de ses

sucres, qui constitue l'aglycone et qui est appelée anthocyanidine (Fig. 2.b).

Deux nomenclatures peuvent être utilisées pour désigner ces substances. La première conforme à la nomenclature de Genève et qui est adoptée en France, utilise les terminaisons "oside" pour les hétérosides et "idol" pour les aglycones. Un autre système adopté pratiquement dans tous les pays et qui tend à supplanter le premier, utilise les terminaisons "ine" pour les hétérosides et "idine" pour les aglycones. C'est ce dernier système que nous utiliserons dans la suite de ce mémoire.

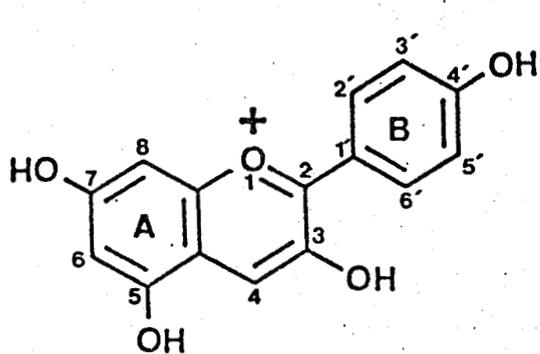
Du point de vue chimique, les anthocyanes sont des dérivés hydroxylés et méthoxylés du phényl-2 benzopyrène. Elles se différencient des autres flavonoïdes par l'absence de groupement carbonyle dans l'hétérocycle oxygéné. Le cycle benzénique adjacent à l'hétérocycle est appelé cycle A, le cycle benzénique latéral est appelé cycle B.

Le cation flavylum dans lequel l'atome d'oxygène trivalent est chargé positivement est la forme la plus stable de cette molécule.

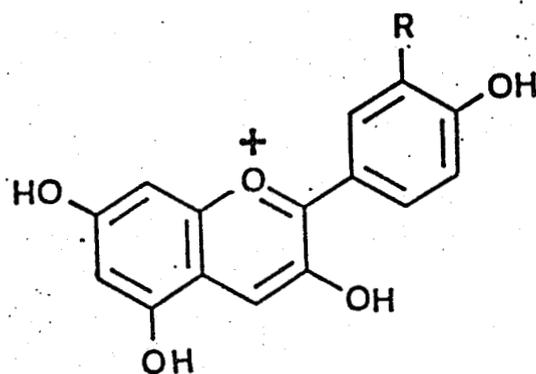
2.1 - Les aglycones :

Dans la nature six anthocyanidines sont répandues : pélargonidine, cyanidine, péonidine, delphinidine, petunidine et malvidine (Fig. 4). Ces substances ont la même structure de base que celle

du flavylum (phényl-2 benzopyrylium) et ne varie que par l'hydroxydation ou la méthyoxydation des cycles benzéniques.

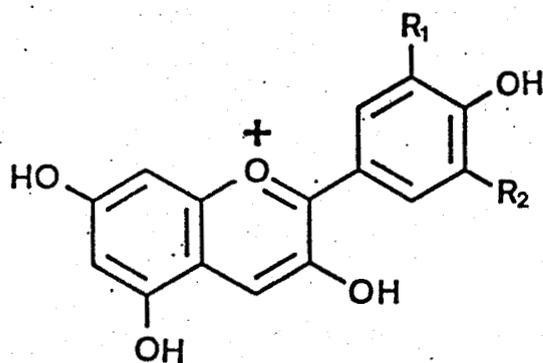


Pelargonidine



R= OH *Cyanidine*

R= OCH₃ *Péonidine*



R₁ = R₂ = OH *Delphinidine*

R₁ = OH, R₂ = OCH₃ *Petunidine*

R₁ = R₂ = OCH₃ *Malvidine*

Fig. 4 : Structure des aglycones

A côté de ces principales structures, on connaît des anthocyanidines peu répandues pour lesquelles les groupements hydroxyles du groupement benzopyrylium peuvent être méthylés, ce sont l'hirsutidine (méthyl-7 malvidine), la rosidine (méthyl-7 péonidine) : la capensinidine (méthyl-8 malvidine) et la méthyl-5 delphinidine.

On connaît d'autres pigments dont le groupement hydroxyle en position 3 est substitué par un H, ce sont la tricétinidine (pentahydroxy_5,7,3',4',7' flavylum), la capérine (diméthoxy-6,4' dihydroxy-5,7 flavylum) et surtout l'apigénidine et la lutéolidine (Fig. 5).

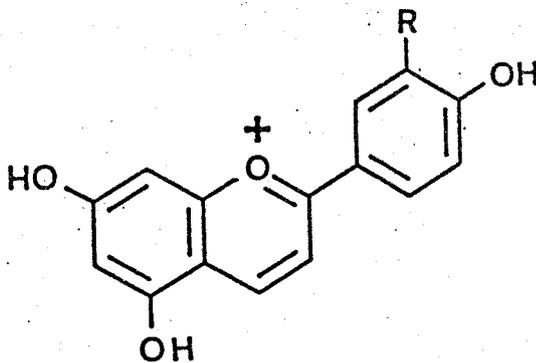


Fig. 5 : Structure de l'apigénidine (R=H) et la lutéolidine (R=OH)

2.2 - Les liaisons hétérosidiques :

Les anthocyanes existent dans la nature sous forme d'hétérosides dont l'hydrolyse acide libère une ou plusieurs molécules de sucre. La glucosidification des groupements OH se fait généralement en positions 3 et 5 sur l'aglycone. Toutes les anthocyanes connues possèdent une molécule de sucre en position 3.

La glucosidification de cet OH est indispensable à la stabilité de la molécule (2), ceci a été montré par la régénération de la forme rouge par acidification de la forme incolore, alors que

la forme rouge n'est plus régénérée par acidification dans le cas des anthocyanidines hydroxylées en position 3. La molécule de glucose est probablement fixée avant le dernier stade de la synthèse de l'anthocyane. Dans le cas des hétéropolysides, les molécules glucidiques se fixent en position 3 ou 3 et 5, donc si une seconde molécule de sucre substitue un hydrogène d'un groupement hydroxyle, c'est toujours en position 5. Les 3, 5 dimonosides sont très répandus, une seule exception est la sophoroside-3, glucoside - 7 pélargonidine.

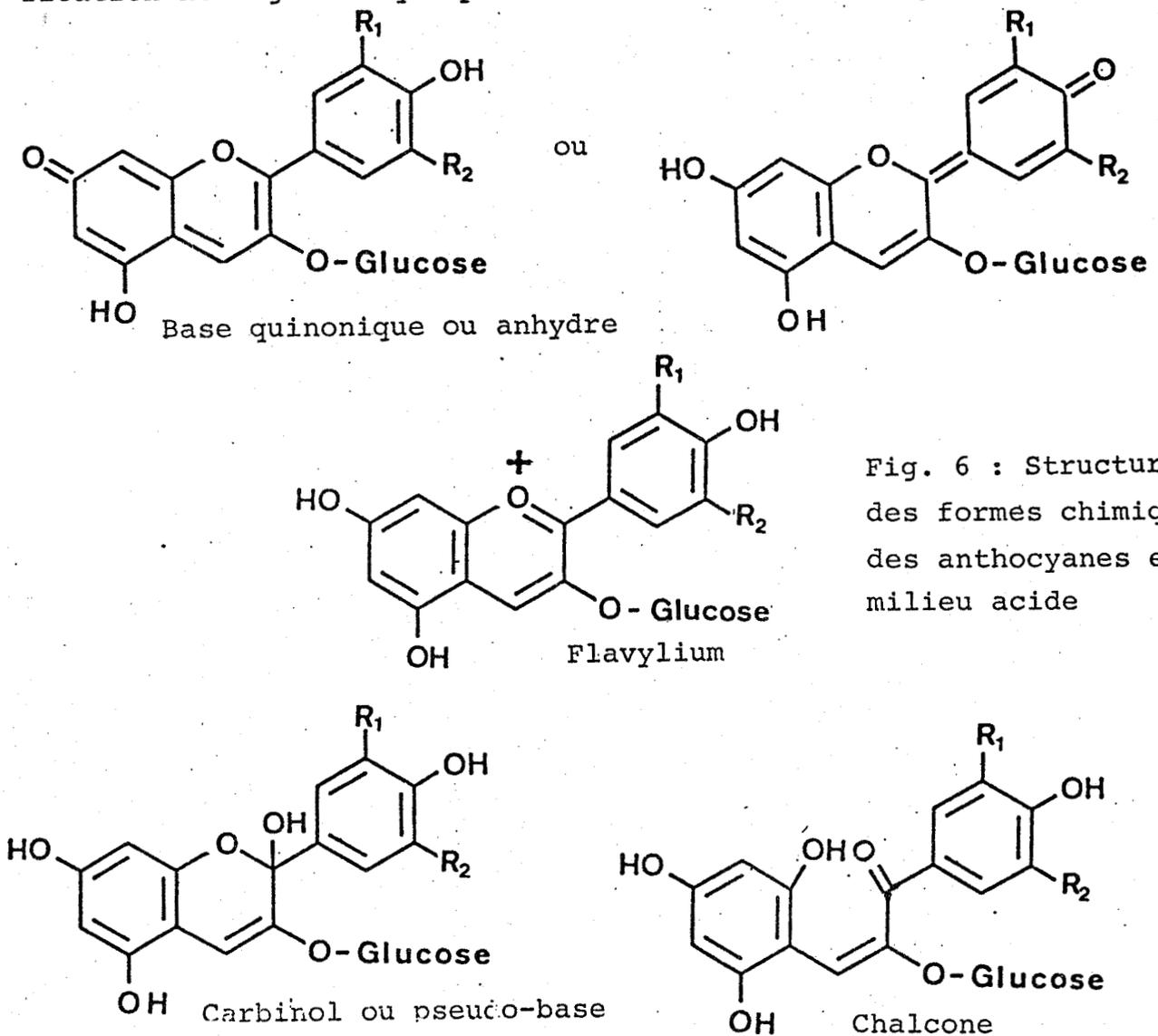
Le glucose est la molécule glucidique qui intervient le plus fréquemment, on rencontre cependant d'autres molécules glucidiques telles que la rutinoside, le galactose, ... Certains glucides peuvent être acylés et possèdent un acide organique estérifié.

2.3 - Les différentes formes chimiques des anthocyanes :

Les changements de couleurs observés dans les solutions anthocyaniques en fonction du pH sont engendrés par des transformations structurales. Ainsi le cation flavylum qui est l'espèce la plus stable, donne une couleur rouge aux solutions acides, alors que les deux formes tautomères de la base quinonique donnent à la solution neutre (pH 6) une coloration violette qui disparaît progressivement pour donner une solution incolore contenant la forme carbinol ou pseudo-base (Fig. 6).

En milieu alcalin, à partir de pH 8, les anthocyanes sont

décomposé par ouverture du cycle et par oxydation ; la réacidification ne régénère que partiellement la forme rouge.



2.4 - Rôle des anthocyanes :

Le rôle prédominant des anthocyanes est la coloration des pétales de fleurs, de fruits et même de certaines feuilles. La coloration des fleurs leur confère tout autant que la forme, le parfum et le nectar, un caractère propre qui attire les insectes, papillons, et abeilles assurant ainsi leur fertilisation.

Différents auteurs se sont intéressés au rôle physiologique des anthocyanes dans les plantes (3), mais celui-ci n'est pas très bien compris jusqu'à présent. Certaines hypothèses leur confèrent un rôle de réserve de sucre, aucun rôle photorécepteur n'a pu être démontré.

L'hydroxylation du noyau latéral est le facteur prépondérant sur la coloration des fleurs, ainsi les trois pigments de base pèlargonidine, cyanidine et delphinidine ne diffèrent que par le nombre de groupements OH sur le cycle latéral. La méthylation de ces groupements hydroxyles n'entraîne qu'une très faible modification de la coloration.

Dans les fleurs bleues, les anthocyanes sont complexées par des sels métalliques (Aluminium, fer, magnésium, etc...), ou par des composés organiques appelés Co-pigments. Ces Co-pigments peuvent être des hétérosides flavoniques ou des tanins hydrolysables.

Le tableau suivant donne la participation de certains pigments dans la couleur de certaines fleurs (3).

COULEUR	PIGMENTS	EXEMPLES DE FLEURS
Ivoire et crème	flavone et/ou flavonol (apigénine et/ou Quercitrine	<i>Antirrhinum majus</i> Ivoire ou <i>Dalhia variebilis</i>
Jaune	caroténoïde seul flavonol seul aurone seul caroténoïdes et fla- vonol ou chalcone	Rose "jaune" et tulipe "jaune" <i>Primulus vulgaris</i> <i>Antirrhinum majus</i> jaune <i>Lotus corniculatas, ulex</i> européens
Orange	caroténoïde seul Pelargonidine et aurone	<i>Litium regale</i> <i>Antirrhinum majus</i>
Rouge	Pelargonidine pure Cyanidine et caroté- noïde Cyanidine et flavo- noïdes	<i>Pelargonium, slavia splendens</i> <i>Tulipe cultivar</i> <i>Chasmenthe et lapegrousa</i>
Magenta ou légèrement pourpre	Cyanidine pure	<i>Camellia hortense</i> rouge <i>Bégonia cultivar</i> rouge
Rose	péonidine pure	<i>Péonia, Rosa régosa</i>
Mauve ou violette	delphinidine pure malvidine pure	<i>Verbena, Brunfelsia, calycine</i> <i>Malva sylvestris</i>
Bleue	cyanidine et co-pigment cyanidine "complexe avec les métaux" delphinidine et co-pigment	<i>Meconopsis betonieifolia</i> <i>Centauréa cyanus</i> <i>Plumbiégocapensis</i>
Pourpre	delphinidine très concentrée	<i>Tulipe "noire"</i> (Queen of the night) <i>Viola withochina</i>

Tableau I : Contribution des pigments aux couleurs de
certaines fleurs

3. INTERET DE L'ETUDE DES ANTHOCYANES

Les anthocyanes sont des pigments qui ont été très étudiés par le passé. Leur intérêt en oenologie semble très évident et il est important de connaître leurs propriétés chimiques, leur stabilité en fonction du milieu dans lequel elles se trouvent et du temps.

Un nouveau centre d'intérêt, beaucoup plus récent concerne l'industrie alimentaire en général. Comme les hommes et les animaux ont consommé ces pigments sans effet nuisible depuis le début des âges, leur emploi comme colorant synthétique des aliments serait très apprécié. Si leur utilisation ne s'est pas généralisée, c'est à cause de l'instabilité de ces molécules, on a vu dans le paragraphe précédent que seul le cation flavylum, obtenu en milieu acide, est stable. Toutes les études précédentes ont été réalisées par spectrométrie d'absorption U.V.-visible. Si cette technique présente de gros avantages sur le plan analytique et de la simplicité d'emploi, elle est par contre assez pauvre pour l'étude structurale de ces composés.

La spectrométrie de vibration qui apporte des renseignements sur la nature des liaisons chimiques, sur la symétrie et la configuration des molécules a été très peu utilisée. On ne note qu'une seule étude par spectrométrie d'absorption infrarouge, réalisée par M.L. JOSIEN et P. RIBEREAU-GAYON (4). Les flavonoïdes ont par contre été beaucoup plus étudiés par spectrométrie de vibration

mais les auteurs se sont beaucoup plus intéressés aux caractéristiques de l'élongation C=O vers 1600 cm^{-1} qu'à la totalité des spectres.

Il semble donc intéressant d'effectuer une étude des anthocyanes par spectrométrie de vibration en utilisant une technique assez récente : la spectrométrie Raman de résonance.

Sans entrer dans le détail du principe de la spectrométrie Raman (voir annexe), il est bon de rappeler que le spectre Raman est observé par l'analyse de la lumière diffusée par un échantillon quand ce dernier est irradié par une radiation monochromatique.

L'utilisation des sources lumière laser pouvant être focalisées sur une très petite surface confère une très grande simplicité à la technique. Les échantillons peuvent être liquide, solide ou gazeux, analysés à l'air libre ou sous atmosphère contrôlée. De plus l'eau possède un spectre de diffusion très faible ce qui permet l'étude de solutions aqueuses.

L'application de la spectrométrie Raman à l'étude des molécules d'intérêt biologique est relativement récente car l'expérimentateur était confronté à deux obstacles majeurs :

- La faible sélectivité de l'effet Raman qui ne permet l'obtention de spectres que pour des solutions suffisamment concentrées (concentration supérieure à 10^{-2} M)
- La grande complexité des spectres obtenus.

L'utilisation des sources laser avec leur gamme étendue de radiations excitatrices disponibles permet de contourner ces obstacles.

La spectrométrie Raman ordinaire est obtenue lorsque l'échantillon est excité dans une de ses fenêtres de transmission. Si on irradie la molécule avec une radiation monochromatique de longueur d'onde voisine d'une de ses bandes d'absorption électronique, un couplage entre niveaux électroniques et niveaux vibrationnels, se traduit par une forte intensification de certaines raies du spectre. Cette exaltation qui peut atteindre 10^6 , permet l'analyse de composés à des concentrations compatibles avec les milieux biologiques jusque 10^{-8} M dans le meilleur des cas. Ces bandes observées correspondent à l'édifice polyatomique responsable de la bande d'absorption d'où une grande simplification du spectre. Il est ainsi possible d'étudier des molécules à très faible concentration incluses dans un milieu complexe non absorbant à la longueur d'onde utilisée. La spectrométrie Raman est donc une méthode bien adaptée à l'étude des pigments naturels.

Le faisceau laser pouvant être focalisé sur une très petite surface, il est possible d'interroger de très faibles quantités de matière et de réaliser des études *in situ*.

CHAPITRE II

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

PARTIE I

PRÉPARATION ET PURIFICATION DES ANTHOCYANES

1. ORIGINE DES PRODUITS

Très peu de composés anthocyaniques sont disponibles dans le commerce, aussi nous avons entrepris nos études sur des composés extraits directement à partir de produits naturels. Des développements récents dans la chimie et la biochimie des anthocyanes ayant été réalisés (5-7), il est possible de connaître les sources des différents pigments anthocyaniques.

Au cours de notre étude nous avons utilisé les pétales de diverses variétés de fleurs, la peau de raisin "Muscat" et des cultures de cellules d'un type de chou rouge "*Brassica-Oleracéa*" variété "tête de nègre". Cette culture a été réalisée au laboratoire de physiologie végétale II par Monsieur P. MORINVILLE.

2. EXTRACTION ET PURIFICATION

En général l'extraction de tous les composés phénoliques et en particulier des anthocyanes est réalisée après broyage du matériel végétal frais ou sec. Cette extraction ne présente pas de difficultés majeures, bien qu'il soit parfois nécessaire d'effectuer

une purification de l'extrait initial. L'extrait brut de plante est préparé en faisant agir un solvant approprié sur le broyat. Les solvants utilisés au cours de cette opération sont surtout des solvants polaires à base d'eau, de méthanol, d'éthanol ou d'acétone.

L'eau apparaît comme un solvant médiocre pour l'extraction des anthocyanes (8), alors que le méthanol et l'éthanol apparaissent plus efficaces. L'acétone a un rendement d'extraction assez bon, mais on constate une rapide dégradation des anthocyanes au cours du temps.

Au cours de l'extraction, deux paramètres apparaissent comme très importants : ce sont la température et le pH. En prenant certaines précautions, l'extraction peut être effectuée à température élevée, pour augmenter la vitesse d'extraction. L'extraction est plus efficace quand on opère en milieu acide et les composés extraits sont ainsi stabilisés sous la forme d'un cation flavylum. Cependant il est recommandé d'utiliser les acides minéraux avec beaucoup de prudence car ils peuvent entraîner une dégradation des pigments au cours d'opérations de concentration des extraits.

Pour purifier l'extrait global et éliminer les composés gênants (graisses, chlorophylles), on peut reprendre l'extrait avec un autre solvant comme l'hexane, l'acétate d'éthyle ou le chloroforme.

Nos extractions ont surtout été effectuées par des solutions aqueuses et méthanoliques acidifiées à 1 % d'acide chlorhydrique.

Comme l'eau possède un spectre Raman de faible intensité, nous avons pu étudier l'extrait brut sans être gêné par le solvant.

3. SEPARATION ET IDENTIFICATION DES ANTHOCYANES

Les extraits bruts contiennent généralement plusieurs types d'anthocyanes ; il est donc nécessaire de pouvoir les séparer et les identifier.

3.1 - Chromatographie sur papier :

La séparation des anthocyanes par chromatographie sur papier est effectuée le plus souvent sur papier Watman 3 MM ou Watman n°1. Ces papiers donnent d'excellents résultats.

Le papier Watman 3 MM permet de séparer les anthocyanes d'un extrait plus ou moins complexe à cause de son épaisseur et sa capacité d'absorption. Le papier Watman n° 1 donne aussi une excellente séparation des anthocyanes mais il a une faible capacité d'absorption à cause de sa faible épaisseur, nous l'avons utilisé pour déterminer les Rf des anthocyanes du chou-rouge pour les comparer avec ceux obtenus par HARBORNE (9, 10).

Les solvants d'élution utilisés sont nombreux (11), les mélanges les plus utilisés sont :

- Méthanol - acide chlorhydrique à 1 %
- Butanol - acide formique - eau
- Butanol - acide acétique - eau (BAW)

nous avons choisi ce dernier mélange qui nous a donné de bons résultats. Les proportions étant 12 : 3 : 5. Les différentes taches peuvent être découpées et les constituants redissous dans des solvants appropriés comme l'eau ou le méthanol pour les études par spectrométrie Raman.

3.2 - Chromatographie sur couche mince :

La chromatographie sur couche mince permet une excellente résolution, une sensibilité plus poussée et une grande rapidité d'exécution, ce qui permet le travail en série (12). Cette technique chromatographique est très répandue et couramment appliquée (13, 14).

Les chromatogrammes sur couche mince de cellulose et gel de silice donnaient en général des taches au contour plus net que les chromatogrammes sur papier réalisés dans les mêmes conditions.

Plusieurs systèmes de solvants sont utilisés pour l'élution des anthocyanes sur couche mince (11), mais le mélange butanol-acide acétique-eau reste l'éluant le mieux adapté.

Nous représentons sur le tableau II les Rf des trois principales taches obtenues par chromatographie de l'extrait brut d'une variété de raisin d'Afrique du Sud, en utilisant différents mélanges de solvants.

SOLVANT	SOLVANT I	SOLVANT II	SOLVANT III	SOLVANT IV
1ère tache (mauve)	0,46	0,42	0,43	0,38
2ème tache (rouge)	0,45	0,39	0,41	0,35
3ème tache (bleue)	0,40	0,32	0,27	0,33

Tableau II : Rf des anthocyanes d'une variété de raisin d'Afrique du Sud dans différents mélanges de solvants.

Dans le tableau III, nous donnons la composition des différents solvants avec les proportions et la durée d'élution pour chaque mélange.

Solvant	Composition	Proportions (ml)	Durée d'élution (h)
SOLVANT I	éthyl-acétate, acide formique, eau	14 : 3 : 3	3
SOLVANT II	n-butanol, acide acétique, eau (BAW)	12 : 3 : 5	7
SOLVANT III	acétone, éthyl-acétate, acide formique, eau	10:11:4:2	2,5
SOLVANT IV	n-butanol, éthyl-acétate, acide formique, eau	10:11:3:2	5

Tableau III : Composition et proportions des solvants dans l'éluant et la durée d'élution.

Ces différents systèmes d'élution donnent des taches bien concentrées aux contours bien nets, mais nous avons obtenu une meilleure séparation avec le mélange n-butanol, acide-acétique, eau.

3.3. - Méthode d'identification :

La facilité de détection des anthocyanes sur papier et couche mince est certainement une des raisons qui explique le succès de l'utilisation de la chromatographie pour la séparation et l'identification de ces composés. Les anthocyanes apparaissent en spots rouges sur les chromatogrammes donc leur révélation ne pose pas de grandes difficultés. Les taches peuvent ensuite être récupérées et remises en solution pour d'autres analyses.

L'identification des anthocyanes par chromatographie suppose l'utilisation de produits de référence, mais seul un nombre limité est disponible commercialement (diglucoside 3-5 malvidine chez ROTH et le chlorure de pèlargonidine chez FLUKA). L'identification des anthocyanes par comparaison des Rf obtenus par l'expérimentateur avec ceux donnés dans la littérature, n'est pas une méthode rigoureuse, car ces valeurs ne sont pas toujours reproductibles. Elles sont influencées par de nombreux facteurs tels que la température, le degré d'humidité, la qualité du papier ou du dépôt. L'égalité des Rf n'est pas une preuve d'identification, il faut que cette égalité se retrouve dans plusieurs solvants et que d'autres méthodes physiques ou chimiques confirment le résultat.

L'étude chromatographique des anthocyanes, en fonction de leur structure dans un solvant alcoolique (Butanol) ou aqueux (9, 15) a permis de dégager certaines conclusions qui apportent des éléments permettant leur identification.

- 1°) Une augmentation du nombre de groupes hydroxyles diminue le Rf aussi bien dans le solvant alcoolique (butanol acétique) que dans un solvant aqueux.
- 2°) La méthylation des hydroxyles augmente le Rf.
- 3°) La glucosidification diminue le Rf dans le solvant alcoolique et l'augmente dans les solvants aqueux.
- 4°) L'acylation des groupes glucidiques augmente le Rf dans les deux solvants.

Une identification par comparaison des Rf, nécessite donc l'isolement du produit pur, l'identification de l'aglycone et la caractérisation de l'hétéroside par des tests appropriés comme une hydrolyse alcaline pour savoir si l'hétéroside est acylé.

Dans le tableau IV, nous présentons les Rf des principales anthocyanes relevés dans la littérature (9, 11).

ANTHOCYANES	Rf		COULEUR
	Papier Watman n° 1	Plaque de gel de silice	
<i>Pêlargonidine</i>			
Monoglucoside-3	0,44	0,44	rouge-orangé
Diglucoside-3,5	0,31	0,31	
<i>Cyanidine</i>			
Monoglucoside-3	0,38	0,38	rouge
Diglucoside-3,5	0,28	0,28	
<i>Péonidine</i>			
Monoglucoside-3	0,41	0,41	rose
Diglucoside-3,5	0,30	0,31	
<i>Delphinidine</i>			
Monoglucoside-3	0,26	0,26	pourpre
Diglucoside-3,5	0,15	0,15	
<i>Pétunidine</i>			
Monoglucoside-3	0,35	0,35	pourpre
Diglucoside-3,5	0,24	0,24	
<i>Malvidine</i>			
Monoglucoside-3	0,38	0,38	mauve
Diglucoside-3,5	0,31	0,31	

Tableau IV : Rf des anthocyanes dans BAW sur papier (9) et sur plaque de silice (11)

3.4 - Chromatographie sur colonne :

La chromatographie sur colonne est également une technique très utilisée pour la séparation des anthocyanes. Cette méthode permet l'isolement des pigments à partir d'une faible quantité de substance végétale et donne un bon fractionnement. Chaque composé est obtenu avec une concentration supérieure à celle obtenue par chromatographie sur plaque ou sur papier.



Différents types de colonnes peuvent être employés pour séparer les anthocyanes :

- La poudre polyclar A.T avec un éluant à base d'eau-éthanol et HCl (14).
- Les gels de polyamide qui sont sous forme de perles dont le gonflement détermine la zone d'utilisation.
- Les gels de silice et d'acide silicique comme les polyvinylpyrrolidiques PVP, sont des adsorbants très énergiques des anthocyanes.
- Les résines échangeuses d'ions servent surtout pour la purification des extraits végétaux.
- Le talc fixe les matières colorantes anthocyaniques et permet une élution très facile.
- Les sephadex sont des gels de dextrane, ils permettent une très bonne séparation des anthocyanes (16, 17) ; c'est le type de colonne que nous avons utilisé (Sephadex L.H.20) avec comme éluant une solution à 60 pour cent de méthanol-eau acidifiée à 1 % par HCl.

3.5 - Autres techniques chromatographiques :

La chromatographie en phase liquide à haute performance peut être appliquée à la séparation des anthocyanes (18-20). Cette technique permet une sélectivité, une résolution, une rapidité et une sensibilité (quantité minimale détectable de l'ordre de 50 mg) supérieures aux techniques chromatographiques classiques.

Les différentes colonnes utilisées sont : μ Bondapack C₁₈/10 μ m, Nucléosil C₁₈/10 μ m, Pertisil PXS ODS/10 μ m, Li chrosorb RP-8/5 μ m. Les éluants sont à base d'acide acétique, d'eau, de méthanol ou de butanol (21-22). Bien que les temps de rétention ne soient pas reproductibles, ils sont ordonnés.

La chromatographie en phase gaz ne donne pas de bons résultats (23-24).

4. CARACTERISATION CHIMIQUE DES ANTHOCYANES

Certaines réactions de dégradation ont permis d'établir la structure des anthocyanes (25) et peuvent être utilisées soit pour leur identification, soit pour leur dosage, nous citerons :

- L'action du bisulfite qui permet le dosage de SO₂ dans le vin rouge (26).
- L'oxydation par l'eau oxygénée qui permet d'identifier les glucides en position 3 (27-28).
- La copigmentation avec les métaux (Al³⁺, Fe³⁺) qui permet par l'apparition d'un complexe bleu en milieu peu acide de déterminer les anthocyanes ayant deux groupements OH libres en ortho sur leur noyau latéral.

Cette réaction permet de différencier la cyanidine et la péonidine d'une part, la delphinidine et la pétunidine de la malvidine d'autre part.

Le magnésium, le potassium, le cuivre, l'étain et l'uranium sont également susceptibles de former des complexes avec les anthocyanes.

PARTIE II

MÉTHODES SPECTROSCOPIQUES

1. SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION U.V. ET VISIBLE

La spectroscopie d'absorption visible et ultraviolette est une méthode très employée pour l'identification des anthocyanes. La réalisation de spectres d'absorption électronique des substances chromatographiées directement sur papier a été envisagée, mais à cause des impuretés que peut entraîner l'éluant (29), l'enregistrement des spectres de solutions reste la méthode la plus utilisée. La coloration des anthocyanes en solution acide varie en fonction du nombre et de la position des substituants en l'occurrence, des groupements hydroxyles et méthoxy.

Les spectres d'absorption des anthocyanes présentent deux bandes d'absorption intenses, l'une dans le visible et l'autre dans l'ultra-violet vers 270-280 nm. La bande visible se déplace vers les grandes longueurs d'onde quand on passe de la pélargonidine (1 OH) à la cyanidine (2 OH) et à la déphinidine (3 OH) : le coefficient d'extinction molaire augmente dans le même sens. Cette bande est attribuable aux transitions électroniques mettant en jeu les électrons π de l'hétérocycle central conjugué aux deux cycles

benzéniques, elle varie avec le pH et subit un glissement en fonction du solvant utilisé (Tableau V) et (Fig. 7).

<i>Solvant</i>	$\lambda_1 \text{ max}$ nm	$\lambda_2 \text{ max}$ nm
eau	276	518
méthanol	278	534
éthanol	278	544
butanol	276	550

Tableau V : Longueur d'onde des maximums d'absorption de la diglucoside-3,5 malvidine en fonction du solvant

La méthylation des hydroxyles du noyau latéral modifie peu le spectre d'absorption. Par contre la méthylation des groupements OH en position 7, comme c'est le cas pour la rosinidine et l'irsutidine, perturbe fortement le spectre d'absorption (2).

La bande d'absorption dans l'ultra-violet correspond aux groupements phénoliques et n'est pas affectée par la variation du pH (dans la mesure où les fonctions phénols ne sont ionisées) cette bande correspond à la bande II des flavones (2).

La glucosidification entraîne un effet bathochromique du maximum d'absorption dans le visible de 10 nm, alors que la position

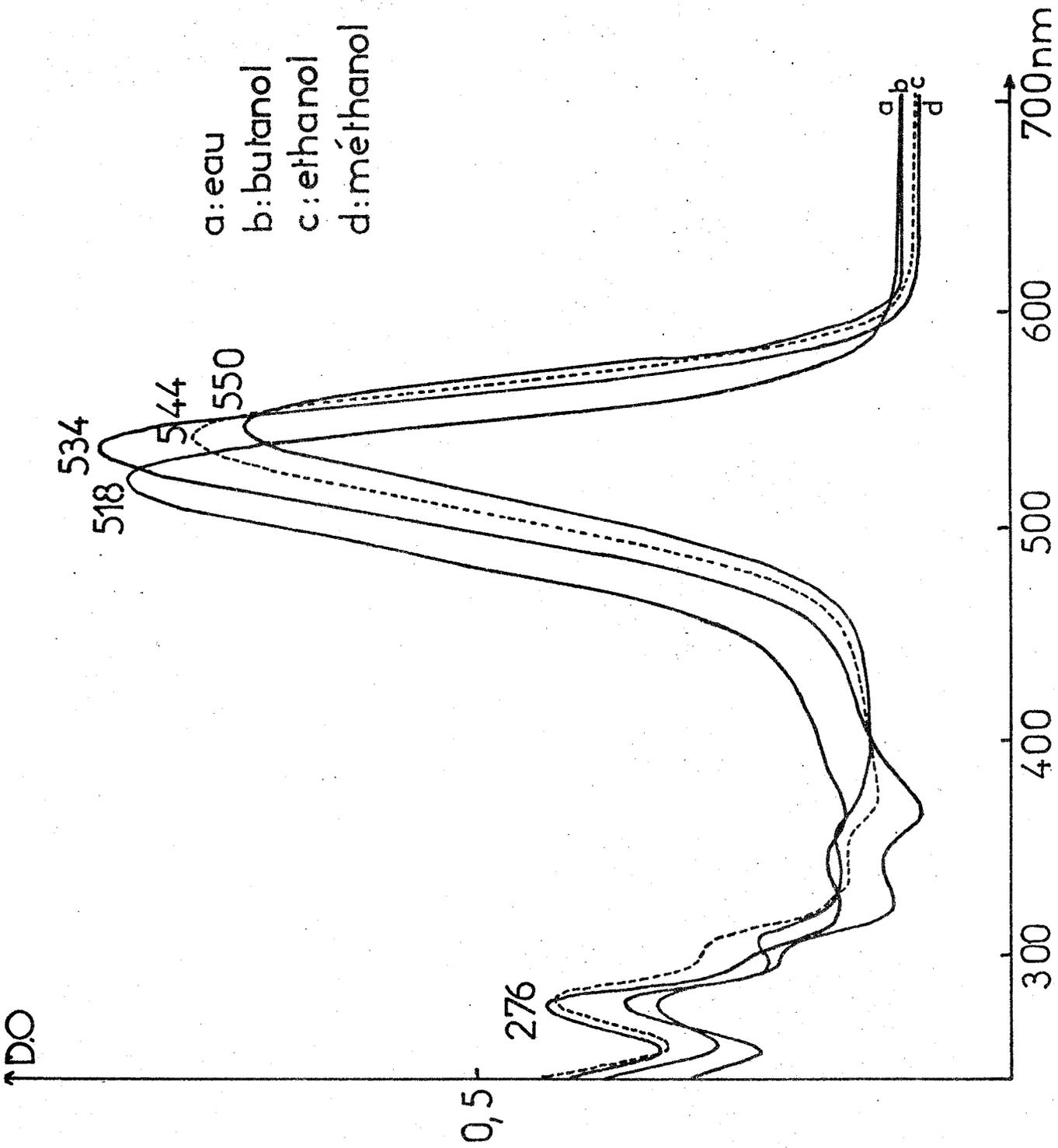


Fig: 7 Spectres d'absorption de la diglucoside-3,5 malvidine dans différents solvants.

de la bande d'absorption dans l'ultra-violet ne subit aucune modification. Les coefficients d'extinction subissent un fort abaissement (Tableau VI)

	$\lambda_1 \text{ max}$	ϵ_1	$\lambda_2 \text{ max}$	ϵ_2
Cyanidine	278	14600	547	34700
Diglucoside-3,5 cyanidine	279	5000	535	12500
Malvidine	277	13300	557	36200
Monoglucoside-3 malvidine	278	5400	545	10300

Tableau VI : Maximum d'absorption d'anthocyanidine et de leur glucoside dans l'éthanol HCl 0,1 % (2)

Pour les anthocyanes acylées, le spectre des résidus acylés intervenant dans la structure se superpose au spectre d'absorption de l'aglycone (30), ainsi pour l'acide p.coumarique on observe une bande d'absorption à 308-313 nm et entre 326 et 329 nm s'il existe un acide caféique ou férulique.

D'après HARBORNE (30), pour des produits parfaitement purs, le rapport des densités optiques au maximum d'absorption de l'acide et au maximum d'absorption du pigment dans le visible est proportionnel au nombre de molécules d'acide pour une molécule d'anthocyanidine. Ce rapport est de 50 à 60 pour cent pour une molécule et environ 90 pour cent pour deux molécules.

De même, si la position 5 d'une anthocyane est libre (glucide en 3), le spectre de ce pigment présente un épaulement caractéristique à 440 nm. Le rapport des densités optiques à 440 nm et au maximum d'absorption dans le visible, varie du simple au double selon que le groupement OH en position 5 est libre ou non.

Nous donnons dans le tableau VII, les maximums d'absorption des principales anthocyanes d'après la littérature (31).

2. SPECTROMETRIE RAMAN DE RESONANCE

2.1 - Choix des longueurs d'onde excitatrices

L'une des principales difficultés rencontrées au cours de cette étude est le problème de la fluorescence qui apparaît comme un signal très intense rendant difficile l'observation des spectres Raman. Ce phénomène peut être provoqué par les composés eux-mêmes (fluorescence intrinsèque) ou par certains composés organiques dans les solvants (fluorescence extrinsèque) ; dans ce cas, un traitement de purification du solvant s'impose pour éliminer les produits gênants (filtration sur charbon actif, distillation). Dans le cas des anthocyanes une forte fluorescence apparaît quand la radiation excitatrice possède une longueur d'onde voisine du maximum d'absorption dans le visible. Le maximum de fluorescence est insensible à la longueur d'onde d'excitation.

Composés	λ max dans H ₂ O - pH 0,5		λ max dans méthanol HCl 1%	
	λ I nm	λ II nm	λ I nm	λ II nm
Chlorure de pélargonidine		505		522
Glucoside-3 pélargonidine	266,5	494	267	508
Sophoroside-3 pélargonidine	275	500	269	509
Diglucoside-3,5 pélargonidine		494		504
Chlorure de cyanidine	274	516	275	537
Glucoside-3 cyanidine	278	510	282	528
Glucoside-5 cyanidine	271	514	273	532
Diglucoside-3,5 cyanidine	275	508	278	524
Chlorure de delphinidine	272	522	274	547
Glucoside-3 delphinidine	274	516	277	539
Rutinoside-3 delphinidine	277,5	518	278,5	540
Rutinoside-3,glucoside-5 Dp	274	519		538
Chlorure de péonidine	272	515	273	535
Glucoside-3 péonidine	278	510	280	524
Chlorure de malvidine		525	276	545
Glucoside-3 malvidine	277	514	277	536
Diglucoside-3,5 malvidine	272	518	274	534
Glucoside-5 malvidine		522		543
Chlorure de pétunidine		524	273	544
Glucoside-3 pétunidine	269	518	270	536
Diglucoside-3,5 pétunidine	270	516	272	534

Tableau VII : Maximum d'absorption dans un tampon citrate à pH 0,5, dans le méthanol acide à 1 % (31) des principales anthocyanes.



Sur la figure 8, nous avons superposé les spectres d'absorption et de fluorescence de la diglucoside-3,5 malvidine. Nous voyons que pour respecter les conditions de la résonance une excitation vers 518 nm s'avère nécessaire, cependant le signal Raman diffusé se superpose à un signal de fluorescence très intense. Pour diminuer l'influence de ce signal parasite, il faut utiliser des longueurs d'onde d'excitation plus courtes et diminuer d'autant la résonance. Les radiations 488 nm et 457,9 nm d'un laser à Argon ionisé (Spectra Physics 164 C) conviennent à ce genre d'étude.

2.2. - Spectromètres utilisés :

Au cours de cette étude que nous avons réalisée, nous avons utilisé différents spectromètres adaptés aux problèmes que nous avons à résoudre. Ainsi, pour l'étude de solutions stables, nous avons utilisé un spectromètre conventionnel, un spectromètre équipé d'un système de balayage rapide a été employé pour l'étude des solutions évoluant dans le temps. Les études *in situ* sur des vacuoles cellulaires ont été réalisées à l'aide d'un microspectromètre à effet Raman.

2.3. - Spectromètre conventionnel :

Le spectromètre que nous avons utilisé pour l'étude des solutions stables est un spectromètre à balayage lent, comportant un triple monochromateur. Le prototype a été réalisé au laboratoire

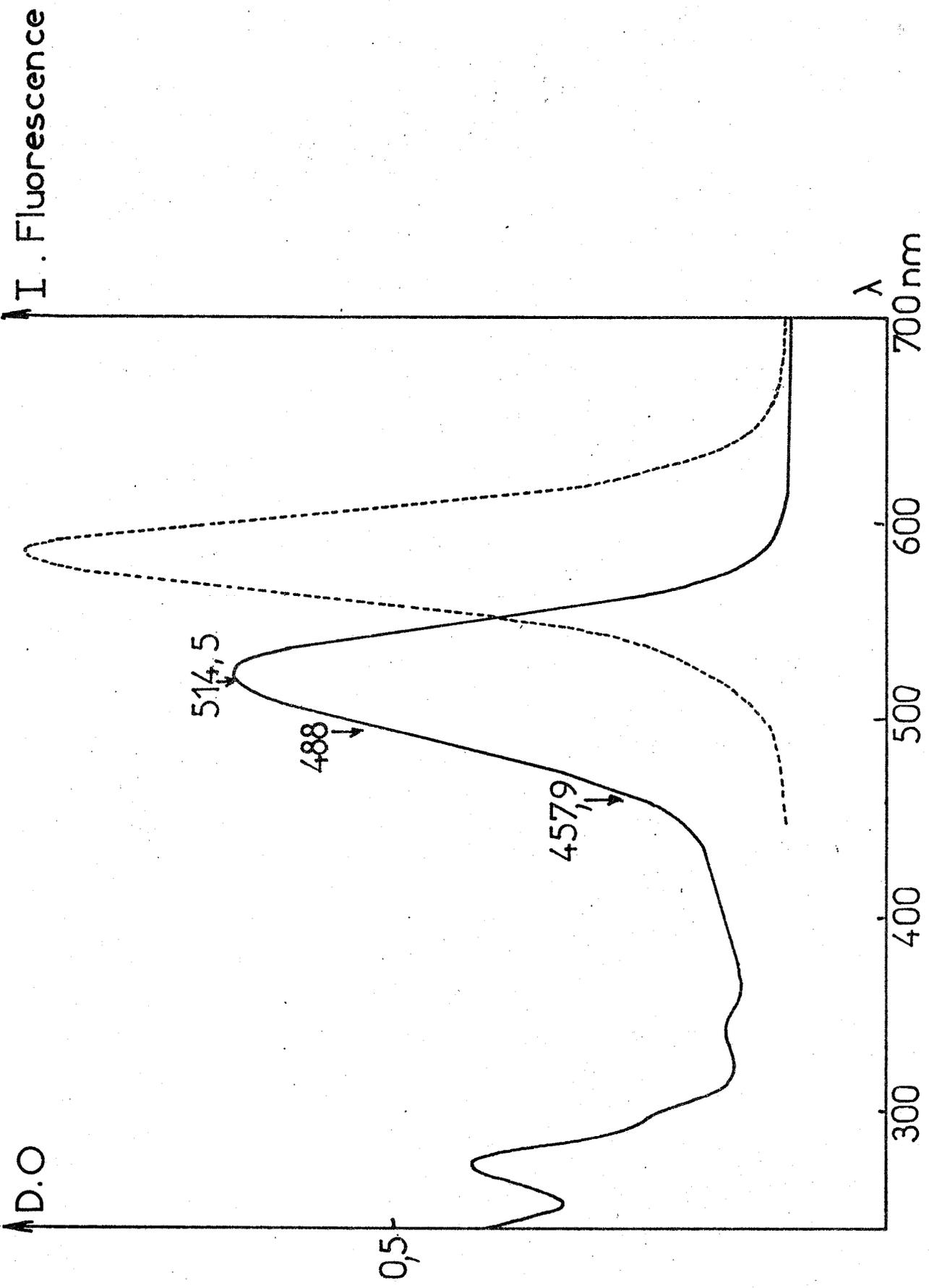


Fig: 8 Spectres d'absorption électronique et de fluorescence de la diglucoside-3,5 malvidine.

(32) et a donné naissance à la série des spectromètres T.800 Coderg, ensuite la série R.T DILOR.

C'est un montage additif constitué de trois monochromateurs de 800 mm de focale possédant chacun un réseau plan de 1800 traits/mm. Les quatre fentes s'ouvrent de façon continue.

Ce spectromètre possède un taux de lumière parasite très faible, ce qui rend la rejection de la radiation excitatrice excellente.

La détection est assurée par un photomultiplicateur refroidi par effet Peltier afin de diminuer fortement le bruit thermique. La tension engendrée aux bornes du circuit RC est amplifiée puis enregistrée sur papier au moyen d'un enregistreur potentiométrique. Le dispositif de balayage mécanique assurant la rotation des réseaux est synchronisé avec le défilement de l'enregistreur.

2.4. - Spectromètre à balayage rapide :

Pour l'étude des systèmes chimiques en évolution rapide, il a été développé, au laboratoire, des spectromètres à balayage rapide, ce fut en 1960 par M. DELHAYE (33), ensuite par F. WALLART en 1970, qui a mis au point un système de balayage spectral rapide (34) équipant un spectromètre double monochromateur à réseaux plans gravés, puis par J.M. BENY (35) qui a équipé un spectromètre double monochromateur à réseaux holographiques concaves d'un dispositif de balayage rapide (Ramanor H.G.2), c'est cet appareil que nous avons utilisé pour l'étude des solutions évoluant en fonction du temps.

Le spectromètre utilisé est le prototype réalisé par Lirinord, de la série des Ramanor H.G.2 (I.S.A-Jobin Yvon). Les réseaux holographiques qui l'équipent ont une focale d'environ 1 m et un rayon de courbure de 920,5 cm et possèdent 2000 traits/mm. De par leur fabrication, ils ont un taux de "ghosts" nul, ce qui confère au spectromètre un taux de lumière parasite extrêmement faible. L'ouverture des fentes s'effectue de manière continue.

Le mécanisme de balayage rapide adapté sur cet appareil permet d'explorer un intervalle spectral réglable entre 0 et 1500 cm^{-1} en un temps pouvant atteindre un minimum d'une seconde. Le dispositif transmet à la barre cosécante et donc au porte-réseaux un mouvement de rotation linéaire alternatif rapide. Un capteur linéaire permet de connaître à tout moment la valeur du nombre d'onde.

La détection est assurée par un photomultiplicateur Hamamatsu R 943. Celui-ci est suivi d'un amplificateur à courant continu possédant des constantes de temps RC adaptées à ce type de balayage. Le signal sortant de l'amplificateur est ensuite filtré afin d'éliminer les hautes fréquences inutiles. Ce filtre passe-bas possède différentes fréquences de coupure comprises entre 10 et 1650 Hz.

Le mécanisme de balayage rapide fournit un signal en dent de scie qui assure le balayage horizontal d'un oscilloscope à mémoire. Le signal issu du filtre passe-bas est envoyé sur l'amplificateur vertical du même oscilloscope, ce qui permet ainsi la visualisation constante du spectre Raman.

Les spectres peuvent également être tracés au moyen d'un enregistreur rapide.

Il est possible de transférer les spectres Raman dans un système d'acquisition et de traitements de données, en vue de les accumuler ou de leur faire subir diverses opérations (soustraction du spectre du solvant, lissage, etc...). Nous avons à notre disposition l'interzoom S.E.I.N. pour faire ces opérations. Il est synchronisé sur le signal à analyser grâce à des impulsions issues du mécanisme de balayage. Les spectres sont ensuite retranscrits au moyen d'une table traçante X-Y.

2.5 - Microspectromètre à Effet Raman :

L'analyse ponctuelle par effet Raman est une technique analytique récente mise au point au laboratoire (M. DELHAYE et P. DHAMELINCOURT) (36). La radiation monochromatique émise par un laser peut être focalisée sur une très petite surface de l'échantillon, l'analyse de la lumière diffusée par le volume irradié, permet l'identification et la localisation des différents édifices polyatomiques présents dans ce volume.

Basée sur ces travaux, la Microsonde M.O.L.E. à effet Raman (37), a été réalisée, et a été commercialisée par la Société I.S.A. Jobin-Yvon. Elle permet d'effectuer une microanalyse des composants d'un mélange hétérogène, à l'air libre ou sous atmosphère contrôlée, on peut ainsi obtenir le spectre Raman d'un

échantillon microscopique de quelques μm^3 de volume. La microsonde moléculaire laser associe dans un même appareil : un microscope optique classique, un filtre optique à réseaux holographiques concaves possédant un très faible taux de lumière parasite, un système de détection monocanale et multicanale.

Cette association permet différents types de fonctionnement : deux de ces modes sont particulièrement utilisés :

a) *Microspectromètre Raman* (Fig. 9.a)

En utilisant le dispositif d'éclairement en fond clair, l'objectif du microscope focalise le faisceau laser sur l'échantillon et recueille la lumière diffusée qui est analysée par le filtre optique. Le détecteur est un photomultiplicateur (microspectromètre) ou un tube intensificateur d'images suivi d'une caméra de télévision (microspectrographe). Le spectre Raman obtenu permet l'identification des espèces polyatomiques contenues dans le volume irradié. C'est ce mode d'éclairement que nous avons utilisé au cours de nos manipulations, en prenant toutefois certaines précautions. En effet, l'irradiation d'une cellule vivante à une longueur d'onde coïncidant avec l'une des bandes d'absorption peut entraîner des dommages très importants. Il a été nécessaire dans tous les cas de minimiser au maximum la puissance du faisceau laser incident, voire même de défocaliser le faisceau laser pour éviter toute perturbation due à un échauffement local de l'échantillon.

b) *Microscope Raman* (Fig. 9.b)

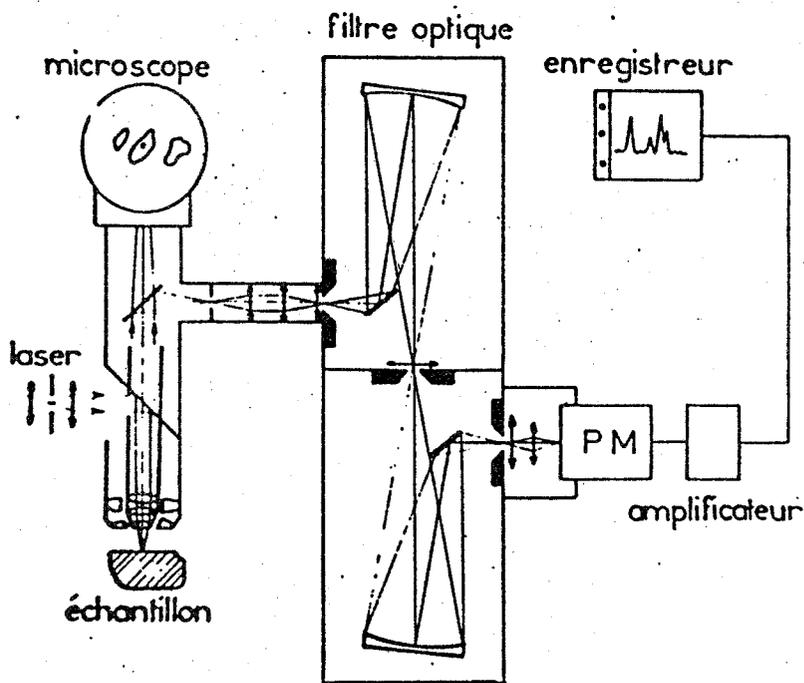
L'échantillon hétérogène est éclairé globalement grâce à une optique annulaire associée au dispositif d'éclairage fond noir. En isolant, grâce au filtre optique, une raie Raman caractéristique d'un des constituants de l'échantillon, on obtient à l'aide de la détection multicanale une image micrographique donnant la répartition de ce constituant à la surface de l'échantillon avec une résolution spatiale de l'ordre du μm .

Cette technique permettant l'obtention des spectres de diffusion (vibration, fluorescence) et des images d'un objet à une longueur d'onde donnée, est parfaitement adaptée à l'étude de la localisation des espèces chimiques à l'intérieur d'une cellule, et a déjà trouvé de nombreuses applications dans le domaine de la microanalyse (37). La localisation des espèces peut être réalisée *in situ* et *in vivo*.

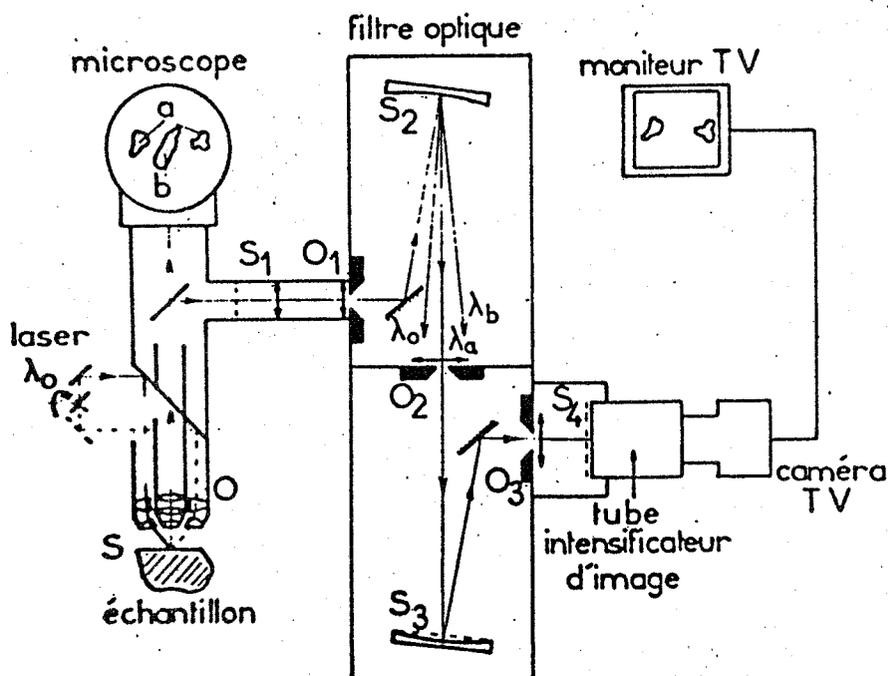
La microsonde moléculaire MOLE est équipée d'un système d'acquisition et de traitement de données. Il comprend :

- Un coffret microordinateur MOSTEK à base d'un microprocesseur Z.80.
- Une console de visualisation alphanumérique avec clavier.
- Un boîtier de liaison pour la communication éventuelle avec un microordinateur.

Ce système permet entre autre d'effectuer des accumulations de spectres en liaison avec le microordinateur (38).



a) mode microspectromètre Raman



b) mode microscope Raman

FIG.9 : SCHEMAS SIMPLIFIES DES PRINCIPAUX MODES DE FONCTIONNEMENT DE LA MICROSONDE MOLE



3. SPECTROMÈTRE D'ABSORPTION

Au cours de nos études des anthocyanes, nous avons utilisé un spectromètre d'absorption électronique conventionnel type DUOSPAC 203 (I.S.A. Jobin-Yvon) pour la réalisation des spectres d'absorption des extraits anthocyaniques à partir de produits naturels et pour d'autres études.

CHAPITRE I

CHAPITRE II

CHAPITRE III

OBSERVATIONS *IN SITU* ET *IN VIVO* DES SPECTRES RAMAN
DE RÉSONANCE DE PIGMENTS ANTHOCYANIQUES

Les systèmes pigmentaires des végétaux supérieurs sont souvent complexes. Les vacuoles contiennent toujours plusieurs types d'anthocyanes d'où la grande variété de nuances dans les teintes des fleurs ou des fruits. Comme aucune étude des anthocyanes par spectrométrie Raman de résonance n'a été réalisée jusqu'à ce jour, il nous était donc impossible d'utiliser des travaux antérieurs comme référence pour attribuer nos spectres. Il a donc été nécessaire dans un premier stade de notre travail de :

- Choisir différentes espèces végétales connues pour contenir tel ou tel type d'anthocyane.
- Observer *in situ* au moyen de la microsonde moléculaire MOLE le spectre Raman de résonance des pigments contenus dans le liquide vacuolaire.
- Extraire et de séparer les différents constituants pigmentaires, de les identifier et d'obtenir leur spectre Raman de résonance afin de pouvoir établir la contribution de chacun d'eux au spectre du mélange vacuolaire.

C'est l'ensemble de ces opérations d'aspect analytique que nous présentons dans ce chapitre.

1. ETUDE DES PIGMENTS DU RAISIN

Les anthocyanes contenues dans les différentes variétés de raisin ont été étudiées depuis fort longtemps car leur rôle en oenologie est évident. De leur conservation et de leur transformation dépend la "robe" des vins si appréciée des connaisseurs. Le pigment majeur des raisins est la glucoside-3 malvidine, dérivé méthylé de la delphinidine. Il est souvent mélangé à un certain nombre d'autres pigments anthocyaniques, dont la nature et la qualité peuvent varier avec le type de cépage et les conditions climatiques.

1.1. Etude in situ :

La peau de raisin de type "Muscat de Provence" observé au microscope présente de nombreuses cellules pigmentaires (Fig. 10.a), c'est sur ces dernières que nous avons focalisé la radiation excitatrice 488 nm.

Les spectres Raman de résonance obtenus sont caractéristiques des pigments contenus dans la vacuole ; ils sont reproductibles d'une vacuole à l'autre (Fig. 10.b).

Nous avons également enregistré sur cette préparation le spectre d'absorption du pigment présent dans la peau de raisin à l'aide de la microsonde MOLE. L'utilisation d'un système d'acquisition et de traitement de données (TRACOR NORTHERN TN 1710) permet d'enregistrer

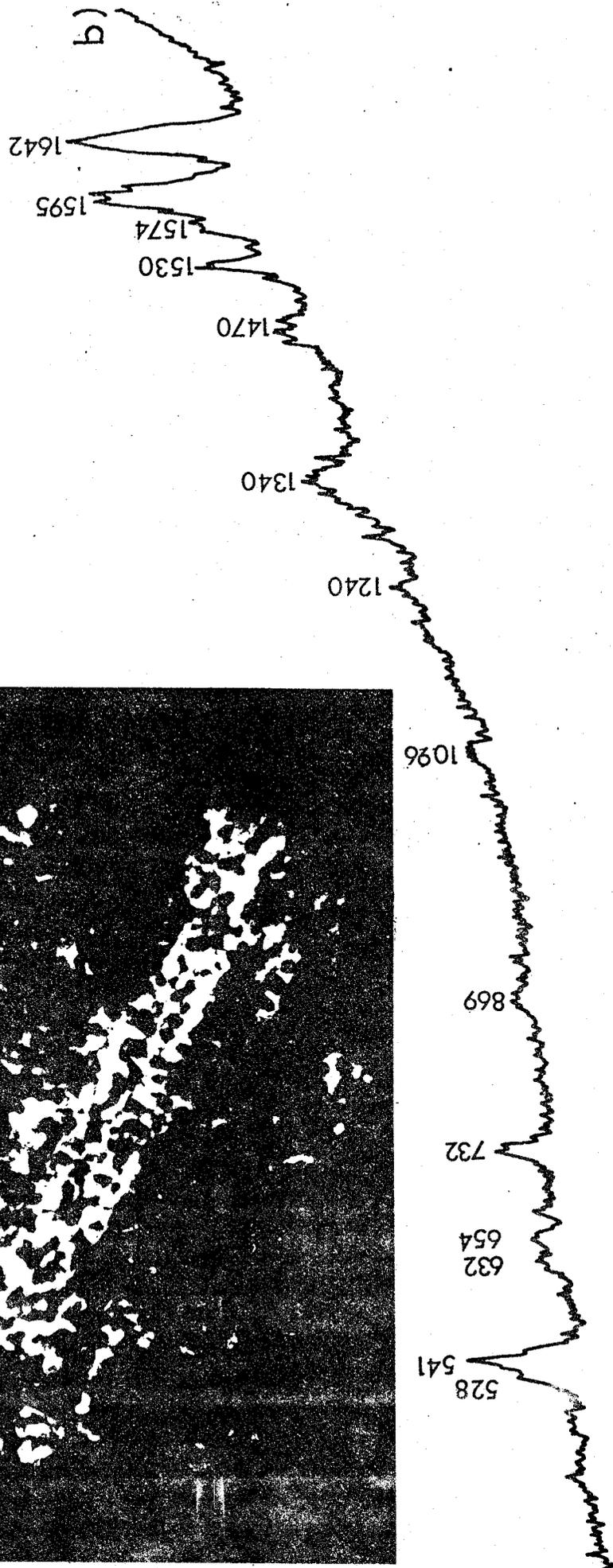
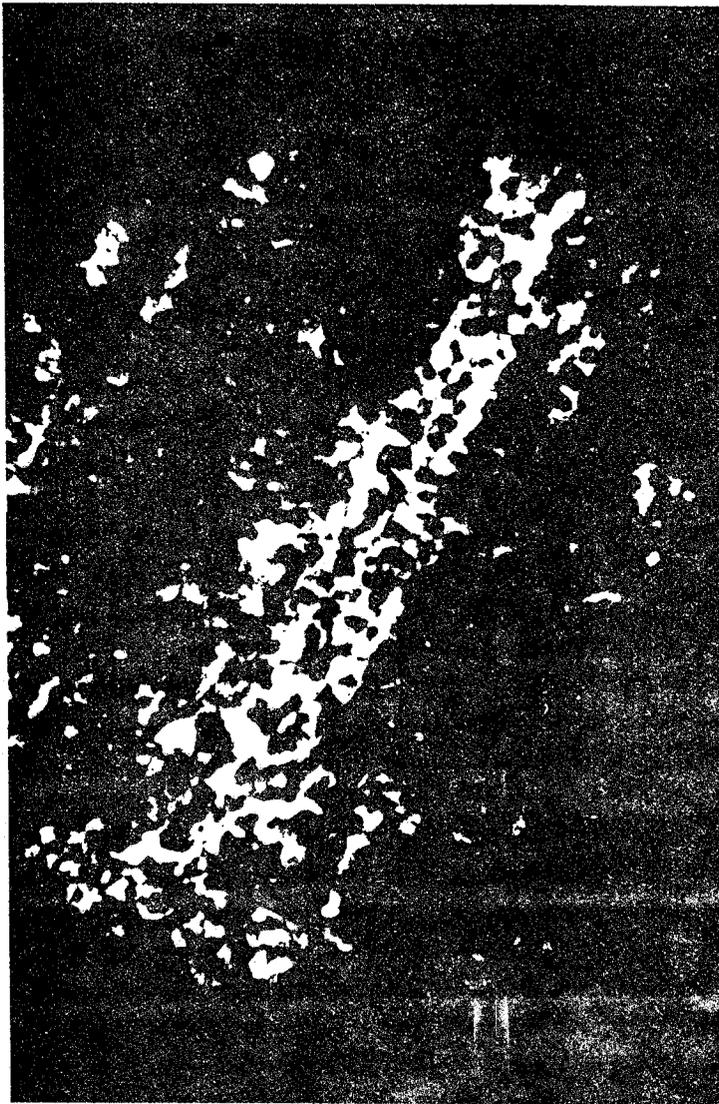


Fig: 10 a) Photo des cellules de la peau de raisin excitées
b) Spectre Raman de résonance in situ des pigments présents dans la peau de raisin "muscat".

le spectre d'émission de la lampe blanche, le spectre de cette lampe transmis par la préparation et d'effectuer le rapport de ces deux signaux. Il est ainsi possible d'obtenir le spectre d'absorption *in situ* d'une substance contenue dans une préparation microscopique de quelques centaines de microns carrés de surface (Fig. 11). La surface analysée est d'environ $0,018 \text{ mm}^2$, elle peut être réduite par l'interposition de diaphragmes limitant le champ.

La longueur d'onde du maximum d'absorption de la peau de raisin est situé à 529 nm.

1.2. Spectres Raman de résonance et d'absorption des extraits bruts :

L'extraction des anthocyanes à partir du raisin "Muscat" a été réalisée par macération des peaux dans le méthanol acidifié à 1 % par HCl ou dans une solution aqueuse acide à pH 1. Les anthocyanes libérées se trouvent alors en solution sous la forme stable de chlorure de flavylum.

Le spectre d'absorption de la solution est présenté sur la figure 12. Les longueurs d'onde des maximums d'absorption sont comparables à celles obtenues pour l'ensemble des pigments anthocyaniques (31).

Les spectres Raman de résonance des solutions méthanoliques et aqueuses ont été réalisés à l'aide des radiations 488 nm et 457,9 nm (Fig. 13 et 14).

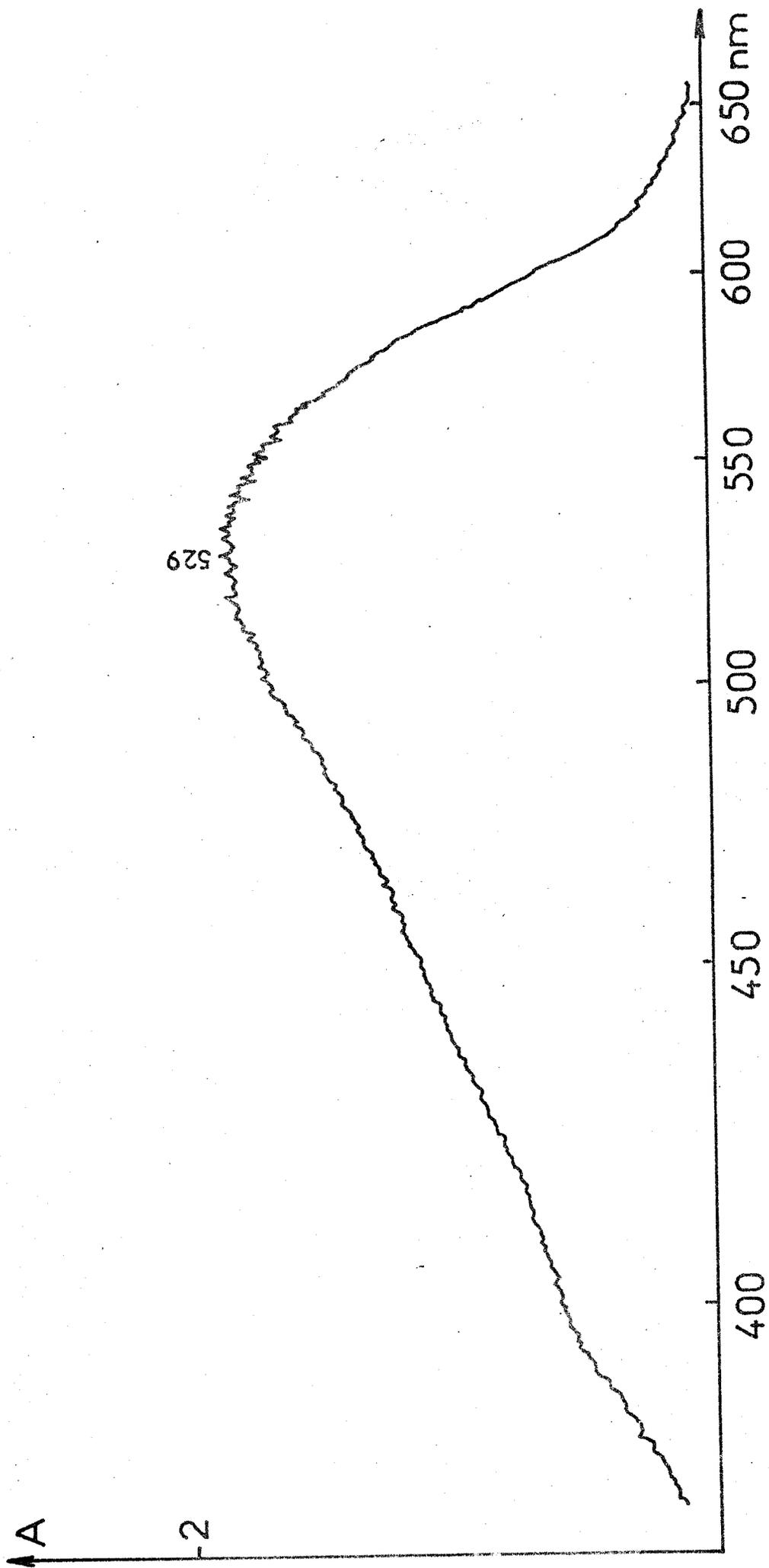


Fig: 11 Spectre d'absorption électronique obtenu in situ dans la peau de raisin.

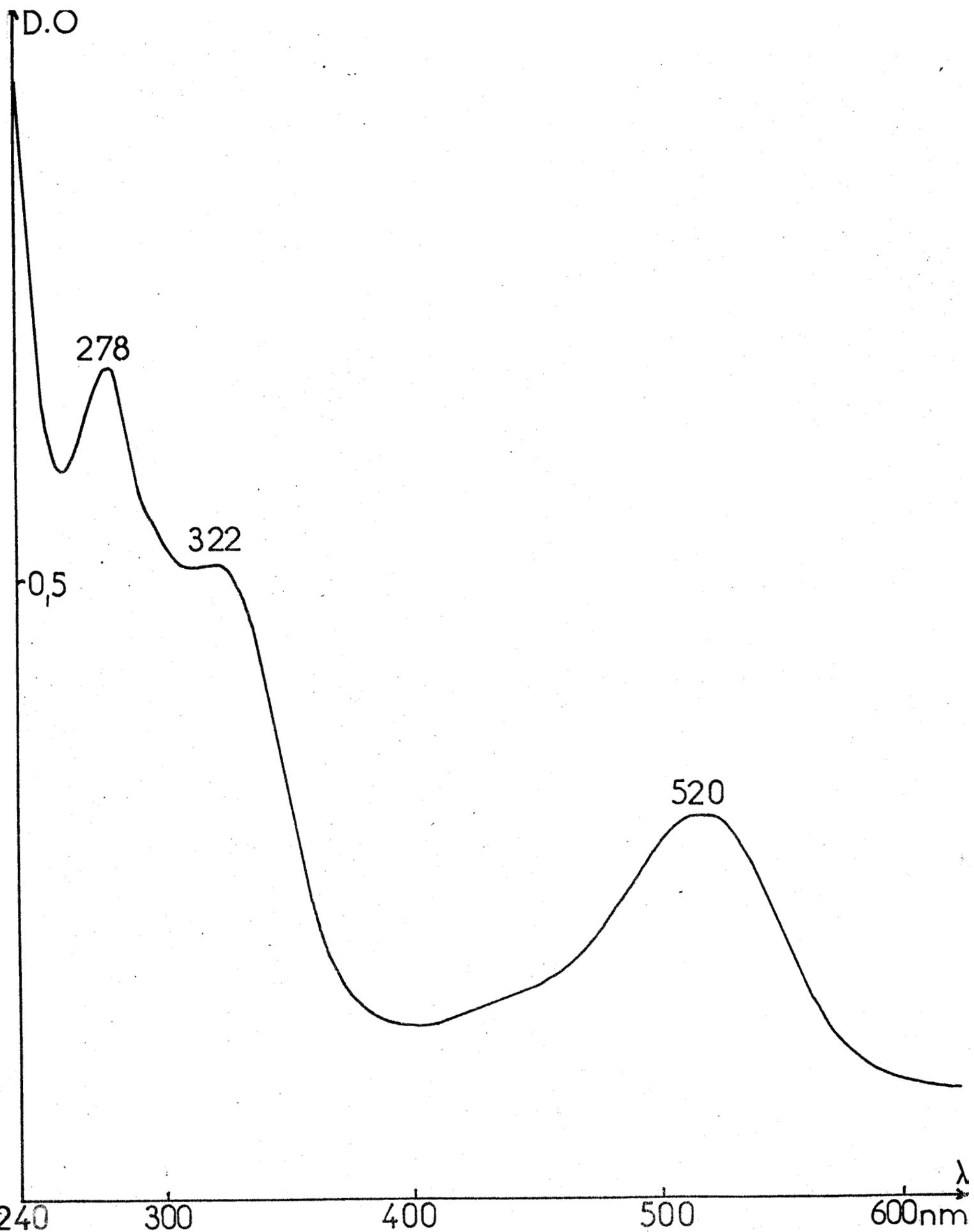
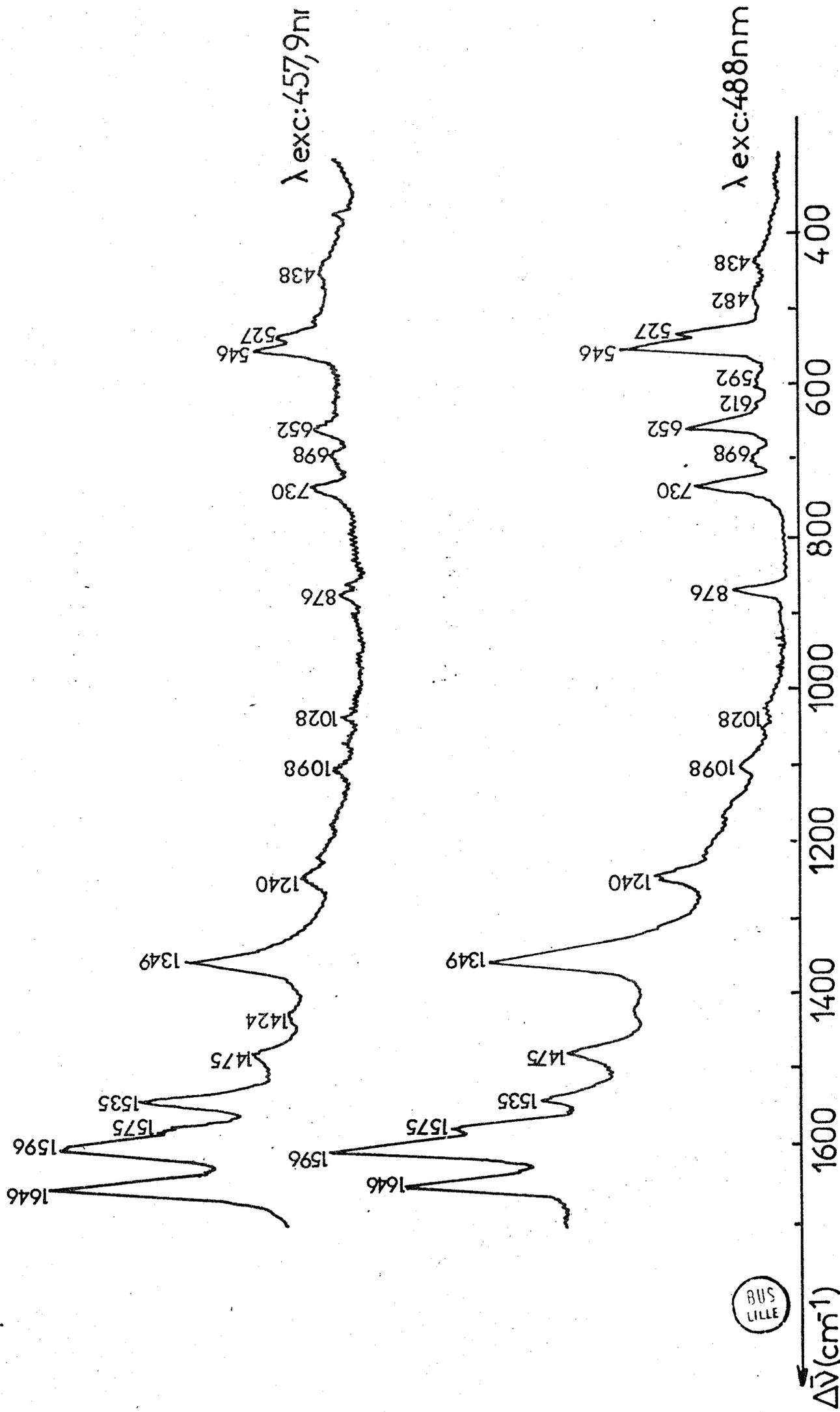


Fig: 12 Spectre d'absorption des anthocyanes du raisin "muscat" en solution aqueuse pH1



BUS LILLE

Fig 13 Spectres Raman de résonance de l'extrait aqueux des anthocyanes du raisin muscat de Provence.

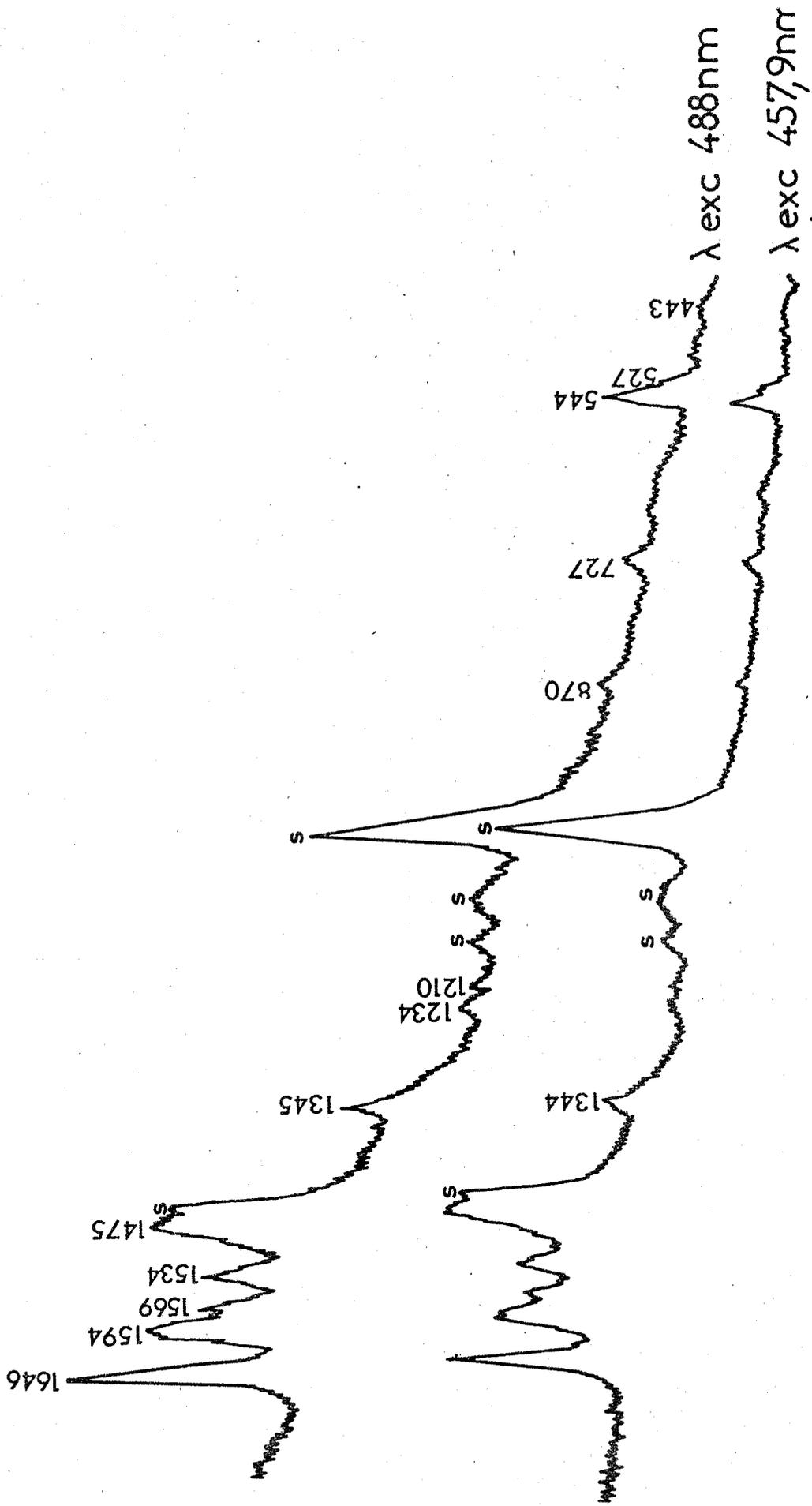


Fig:14 Spectres Raman de résonance de la solution méthanolique des pigments anthocyaniques extraits à partir du raisin "muscat"

Les spectres Raman obtenus *in situ* et en solution sont similaires, nous pouvons conclure que les anthocyanes existent dans la vacuole des cellules sous forme de cation flavylum.

Ces spectres illustrent parfaitement la qualité du solvant H₂O pour ce genre d'étude, en effet, les solutions méthanoliques présentent des raies intenses pouvant perturber les intensités de certaines raies.

De fortes variations en intensité relative peuvent être observées dans la région 1500-1650 cm⁻¹ quand on compare les spectres obtenus avec les radiations 488 nm et 457,9 nm.

1.3. Séparation et identification des différents constituants de l'extrait de peau de raisin "Muscat de Provence" :

Pour séparer et caractériser les différents constituants pigmentaires du raisin, nous avons principalement utilisé la chromatographie sur couche mince, méthode très bien décrite dans la littérature et qui peut nous fournir de nombreuses valeurs de références.

La séparation par chromatographie ascendante sur plaque de gel de silice (60 HP-TLC) dépourvue de support fluorescent avec comme éluant le mélange n-butanol-acide acétique-eau (BAW) dans les proportions (12-3-5), donne six taches bien nettes dont les R_f sont reproduits dans le tableau VIII.

Pour caractériser, par spectroscopie d'absorption U.V.-visible,

les principales taches (Rf = 0,15 ; 0,22 ; 0,34 ; 0,38), les fractions correspondantes ont été grattées et reprises par une solution aqueuse à pH 1 ; les spectres sont reproduits sur la figure 15. Il est possible de remarquer que les bandes visibles des fractions 3 et 4 possèdent un épaulement vers 440 nm, ce qui permet de les caractériser comme des monoglucosides (10).

Nous avons ainsi caractérisé les différentes fractions par l'action du chlorure d'aluminium en solution tamponnée à pH 3. Les résultats sont regroupés dans le tableau VIII. L'action de $AlCl_3$ se manifeste par une coloration bleue si deux hydroxyles adjacents sont présents sur le cycle phénolique.

Tache n°	Rf obtenu	λ max visible	Action de $AlCl_3$	Identification proposée	Rf litté- rature	λ max visible littéra.
1	0,15	513	oui	Diglucoside-3,5 delphinidine	0,15	516
2	0,22	515	oui	Diglucoside-3,5 petunidine ou monoglucoside-3 delphinidine	0,24 0,26	516 518
3	0,34	516	oui	Monoglucoside-3 petunidine	0,35	515
4	0,38	520	non	Monoglucoside-3 malvidine	0,38	520
5	0,44					
6	0,46					

Tableau VIII : Identification des anthocyanes extraites de la peau de raisin "Muscat de Provence".

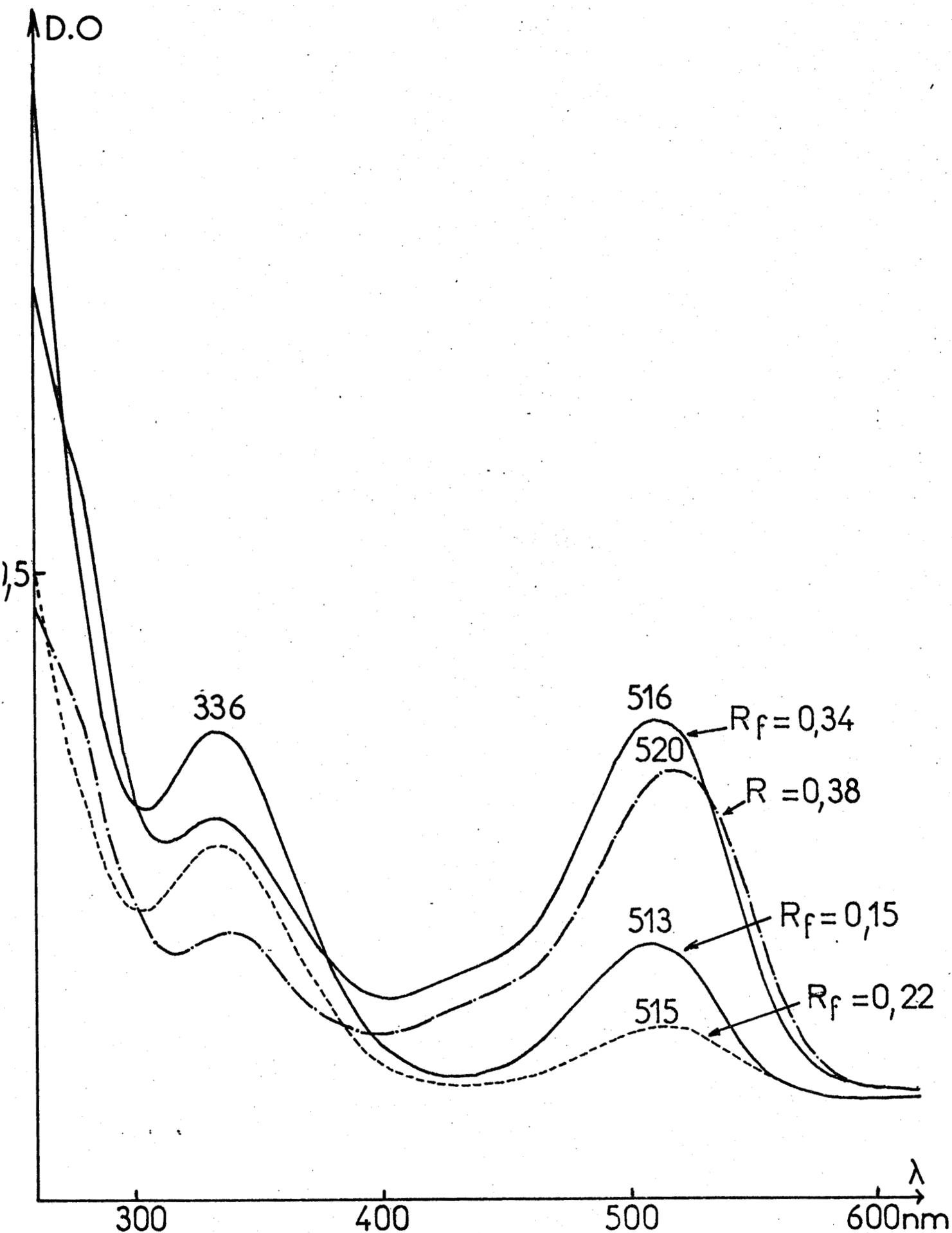


Fig 15 Spectres d'absorption des principales anthocyanes du raisin "muscat de provence"

La présence de pigments diglucosés indique bien que le raisin "Muscat de Provence" n'est pas à classer dans le groupe des *vitis vinifera* qui sont les espèces utilisées pour la vinification.

1.4. Spectres Raman de résonance des constituants de l'extrait brut du raisin "Muscat" :

Les spectres Raman de résonance des principales fractions chromatographiées ont été réalisés à partir de solutions aqueuses à pH 1.

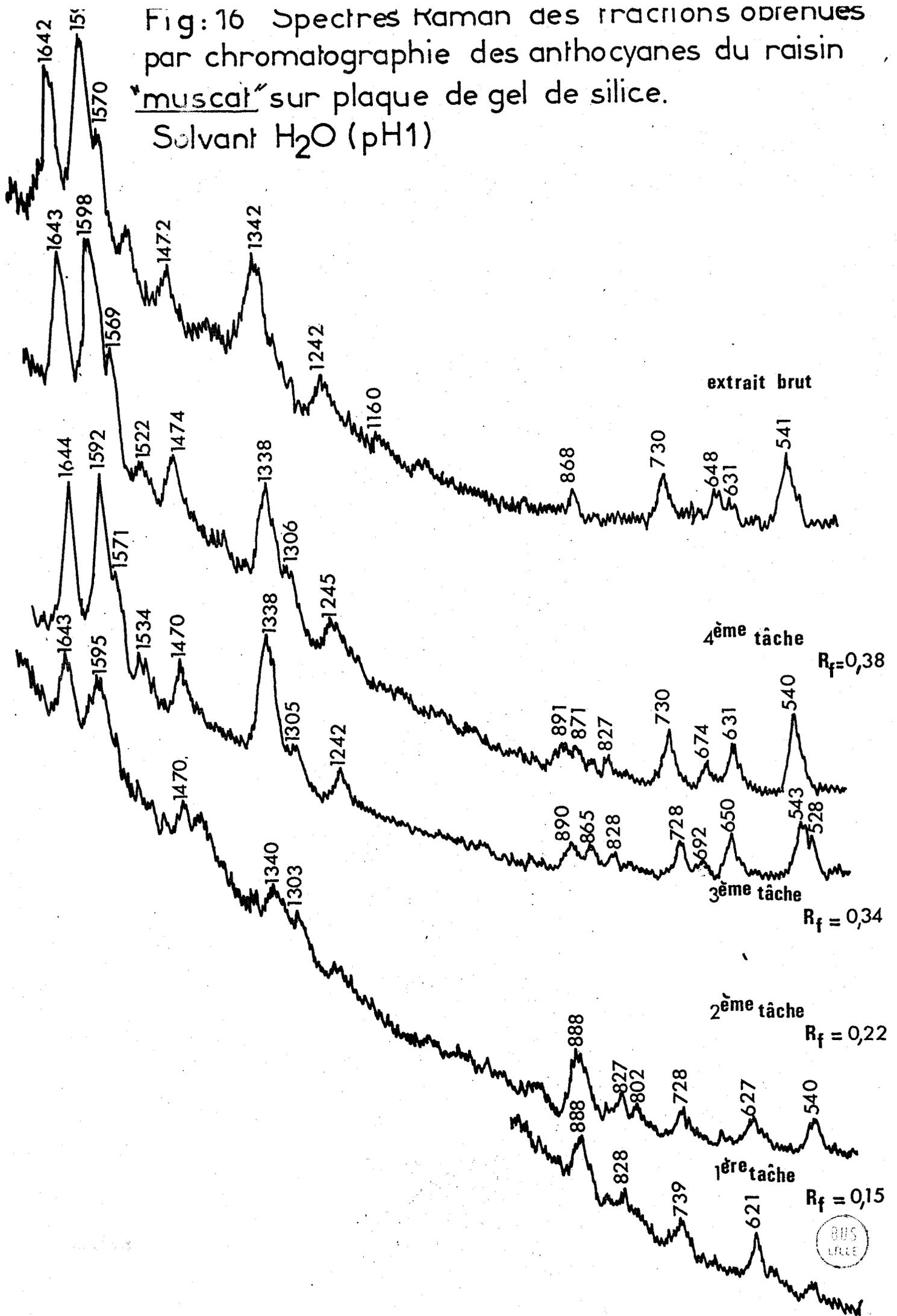
Nous comparons sur la figure 16, les spectres Raman de résonance des quatre principales taches au spectre obtenu pour l'extrait brut. Une très forte fluorescence de la fraction 1 empêche l'observation des bandes de haute fréquence.

Nous pouvons distinguer deux zones bien définies :

- La zone $1100-1650 \text{ cm}^{-1}$ est comparable pour la totalité des spectres présentés. Ce domaine spectral ne semble pas caractéristique du type d'anthocyane considéré.
- La région $500-900 \text{ cm}^{-1}$ est très différente d'une anthocyane à l'autre ; il semble qu'elle pourrait apporter des renseignements quant à la nature du pigment anthocyanique.

L'utilisation d'une chromatographie sur colonne pourrait apporter de nombreux avantages par rapport à la chromatographie sur couche mince surtout pour l'étude Raman des solutions.

Fig: 16 Spectres Raman des fractions obtenues par chromatographie des anthocyanes du raisin "muscat" sur plaque de gel de silice.
Solvant H₂O (pH1)



- Possibilité d'obtenir des solutions plus concentrées.
- Le pigment obtenu directement en solution prêt à être analysé par spectrométrie Raman. En effet, l'opération qui consiste à récupérer la tache, de la solubiliser et de filtrer la solution peut introduire certaines impuretés fluorescentes. Elle est ici supprimée.

Cette technique a été testée sur une variété de raisin en provenance d'Afrique du Sud, en utilisant une colonne séphadex L.H.20 de longueur 1 m, de section intérieure 10 mm et un solvant d'élution constitué d'un mélange à 60 % de méthanol dans l'eau acidifiée par HCl à 1 %.

Nous avons obtenu une séparation bien nette de trois composés de couleurs rouges. La séparation sur couche mince de gel de silice a donné également trois taches dont deux bien nettes.

Les différentes fractions, recueillies ont directement été utilisées pour enregistrer les spectres d'absorption et les spectres Raman de résonance (Fig. 17 et 18).

Nous n'avons pas cherché, dans ce cas à caractériser les différentes fractions, mais nous pouvons cependant observer que le spectre de la première fraction est analogue au spectre de la tache n° 2 obtenu par chromatographie sur couche mince du raisin "Muscat". Nous pouvons donc l'attribuer à la malvidine monoglucosée.

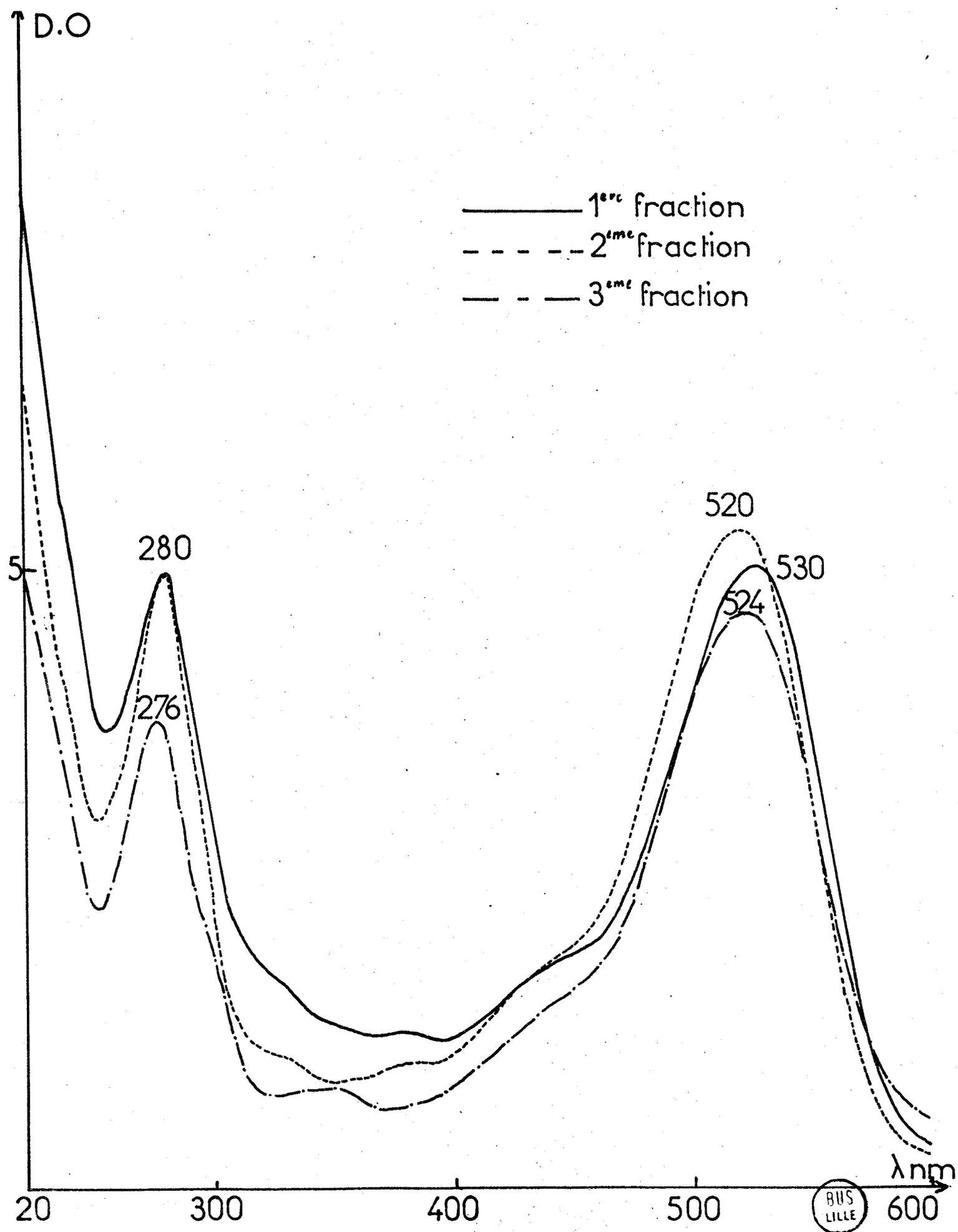


Fig:17 Spectres d'absorption des anthocyanes du raisin d'afrique du sud obtenues par chromatographie sur colonne

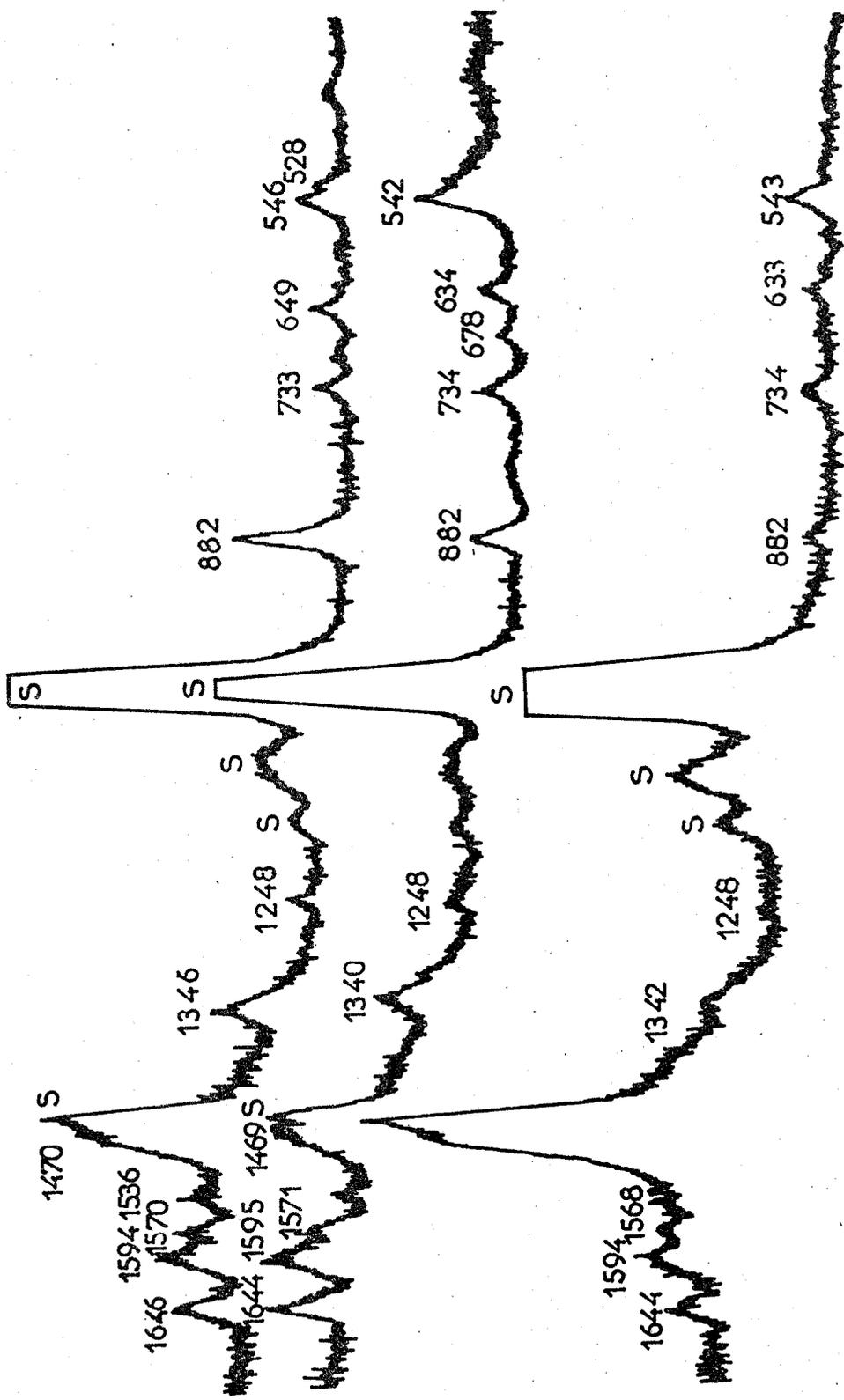


Fig:18 Spectres Raman des fractions du raisin d'afrique du sud obtenues par chromatographie sur colonne .

Bien que présentant certains avantages, cette technique n'a pas été employée plus amplement. En effet, les raies caractéristiques du solvant peuvent gêner l'observation de certaines bandes du pigment. Une évaporation suivie d'une redissolution, s'avère nécessaire si l'on désire utiliser l'eau comme solvant.

2. PIGMENTATION DE MALVA SYLVESTRIS

Le pigment majeur de la mauve des champs *Malva sylvestris* est la diglucoside-3,5 malvidine ; c'est dans cette fleur qu'elle fut mise en évidence et caractérisée la première fois d'où son nom de malvine.

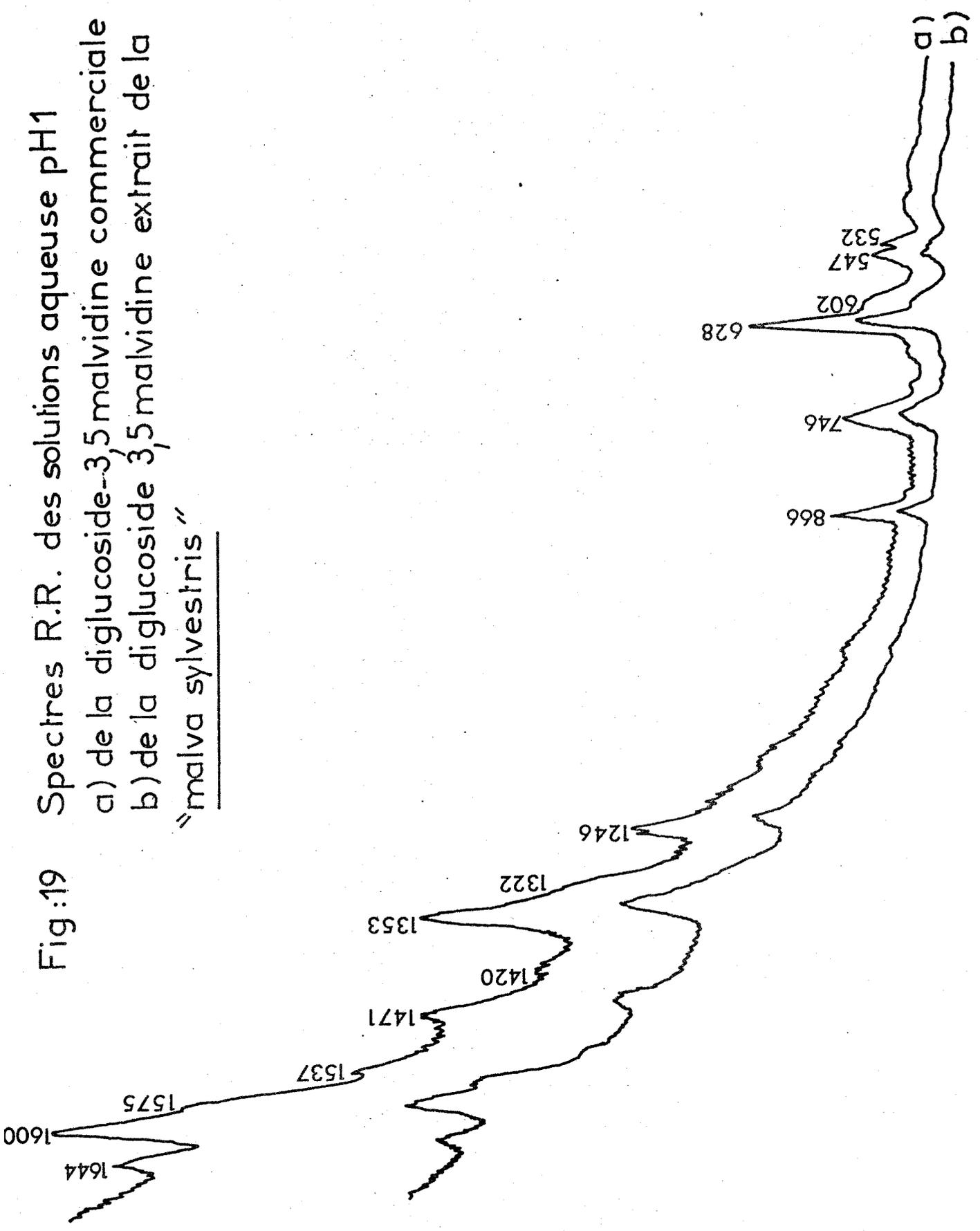
L'extraction de ce pigment dans l'eau à pH 1 donne une solution rouge possédant un maximum d'absorption à 518 nm. La chromatographie de cette solution sur plaque de gel de silice avec le solvant BAW donne une tache unique possédant un Rf de 0,30 ce qui montre que la malvine est pratiquement le seul pigment présent dans la mauve.

Sur la figure 19, nous présentons les spectres Raman de résonance des solutions aqueuses de l'extrait brut et de la diglucoside-3,5 malvidine commerciale (ROTH-8346). Nous pouvons constater la parfaite similitude des spectres.

Ce pigment présente l'intérêt de posséder la même aglycone que le pigment majeur du raisin la glucoside-3 malvidine. La comparaison de ces deux spectres (Fig. 20) nous fournit un premier élément quant à la compréhension des bandes de diffusion Raman. Si les domaines spectraux $700-1650 \text{ cm}^{-1}$ sont comparables en fréquences et en intensités relatives, les raies observées dans la région $500-650 \text{ cm}^{-1}$ sont différentes. Le pigment diglucosé sur le groupement benzopyrylium possède une raie d'intensité moyenne vers 625 cm^{-1} qui n'apparaît pas dans le spectre Raman du pigment monoglucosé. Les autres caractéristiques spectrales de cette région sont également différentes d'un pigment à l'autre ce qui nous permet d'attribuer ce domaine spectral à des vibrations propres au groupement benzopyrylium.

Fig:19 Spectres R.R. des solutions aqueuse pH1

- a) de la diglucoside-3,5 malvidine commerciale
- b) de la diglucoside 3,5 malvidine extrait de la "malva sylvestris"



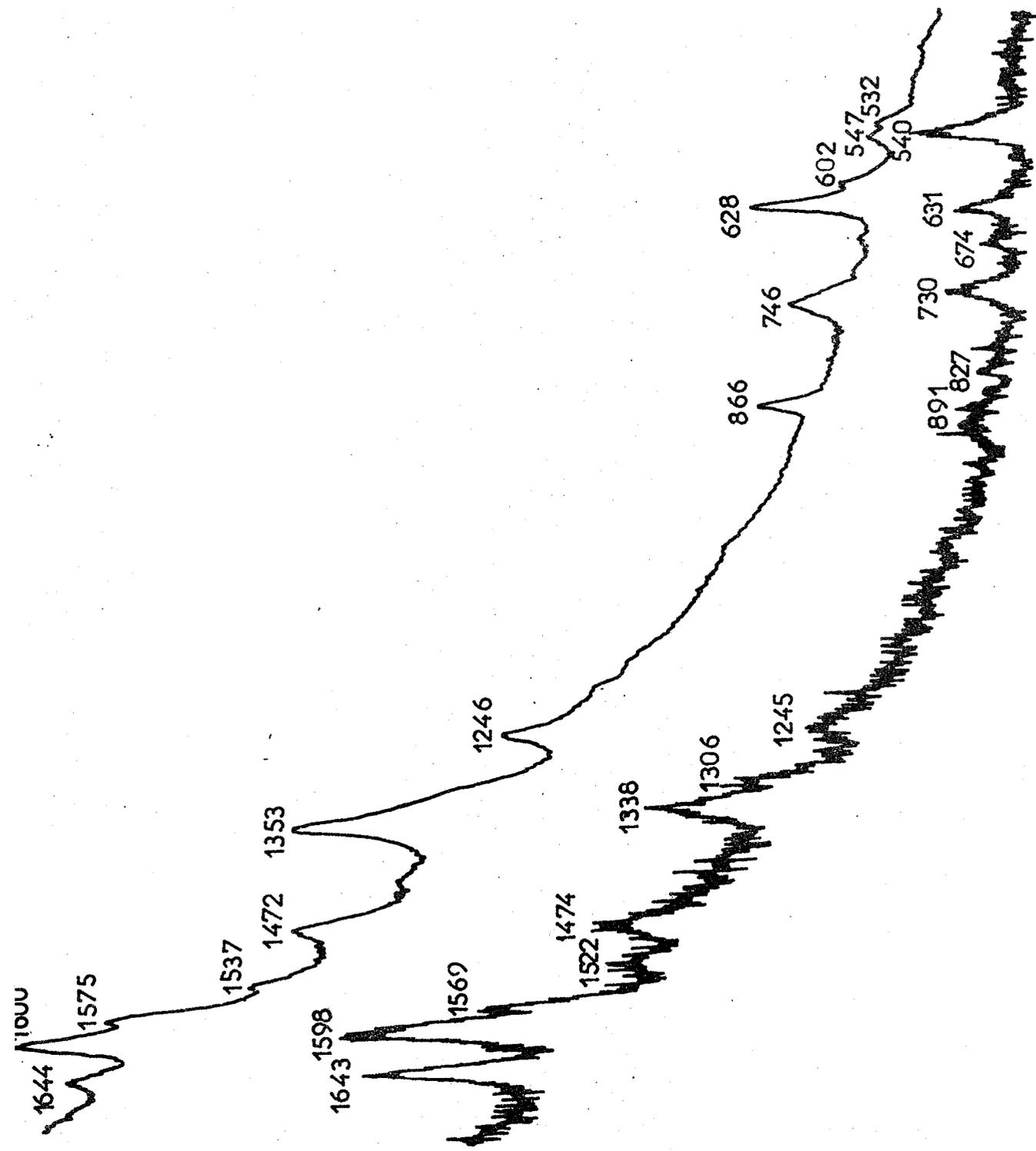


Fig: 20 Spectres R.R. de la malvine mono et diglucoside



3. ETUDE DES ANTHOCYANES DU CHOU-ROUGE "BRASSICA OLERACEA"

3.1. Milieu de culture :

L'étude des anthocyanes du chou-rouge "*Brassica-Oléracéa*" (variété "tête de nègre") a été réalisée sur des cellules issues d'une colonie tissulaire (appelée souche) provenant de la culture *in vitro* de fragments de feuilles de chou-rouge.

Les colonies tissulaires ont proliféré sur un milieu nutritif synthétique composé de macroéléments (phosphates, nitrates, sulfates), de microéléments (cuivre, fer, molybdène), de vitamines, de substances de croissance (acide α -naphtylacélique, 6-benzyl-aminopurine) et de saccharose (30 g/l). Le milieu nutritif est solidifié par l'agar-agar (gelose), après être stérilisé par autoclavage à 110°C pendant 30 minutes et placé en boîte de pétri. Les prélèvements de cellules ont été effectués après 7 et 14 jours de culture, c'est à dire quand les colonies tissulaires sont respectivement en cours et en fin de phase de croissance (39).

3.2. Etude des anthocyanes du chou-rouge par spectroscopie Raman de résonance :

Les cellules pigmentaires du chou-rouge, observées sous le microscope, sont représentées sur la figure 21. La vacuole contenant le mélange anthocyanique occupe la presque totalité de la cellule. Il nous a été impossible dans ce cas de focaliser le faisceau laser à l'intérieur de la vacuole, l'absorption de la radiation excitatrice par le liquide vacuolaire provoque un échauffement de la vacuole. Les meilleurs résultats ont été obtenus en minimisant au maximum la puissance du faisceau

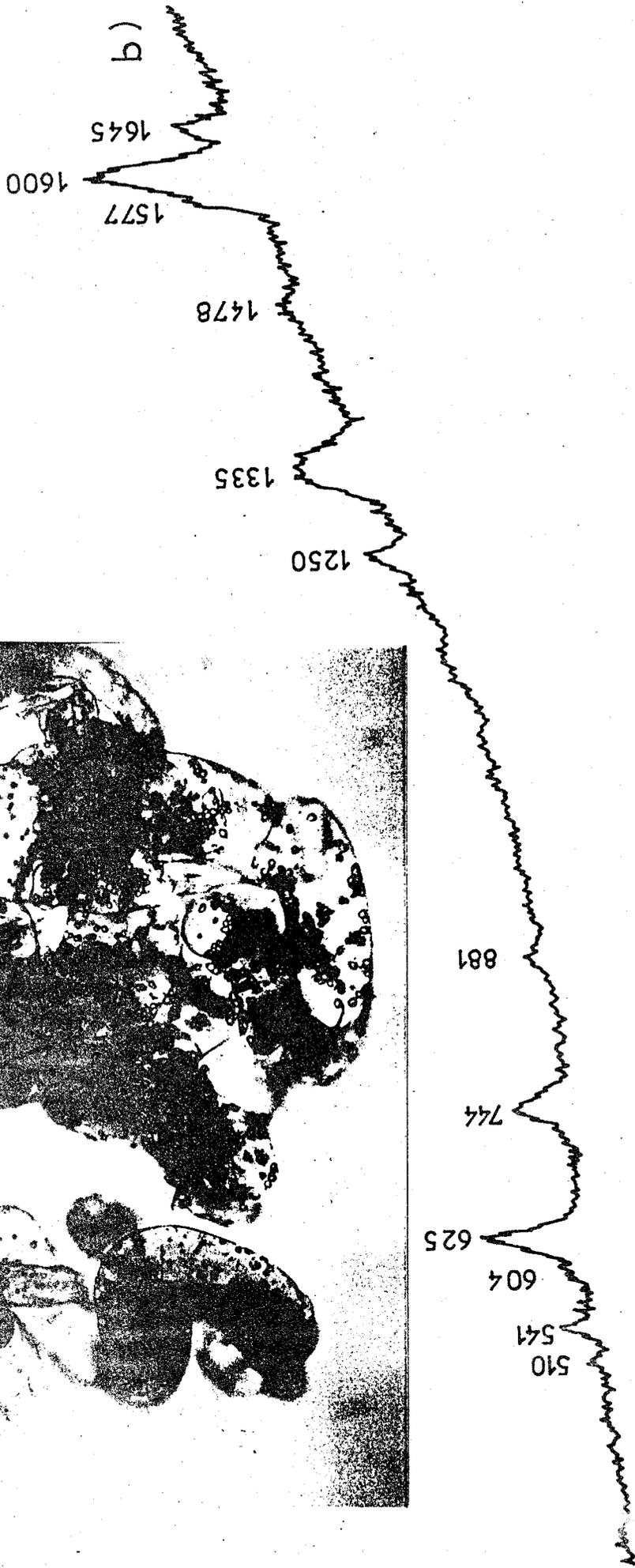


Fig: 21 a) Photo des cellules pigmentaires du chou-rouge
 b) Spectre R.R des anthocyanes du chou rouge in-situ

laser et en défocalisant le point d'impact, de manière à irradier l'ensemble de la vacuole. A plusieurs reprises, nous avons constaté une très forte fluorescence quand les cellules se dégradent sous l'impact du faisceau laser.

De très nombreuses cellules ont été sondées ; les spectres les plus caractéristiques ont été reproduits dans la figure 22.

Les spectres 1, 2 et 3 ont surtout été observés à partir des préparations étudiées après 7 jours de culture, donc en phase de croissance. Ces spectres se caractérisent par des raies attribuables à des caroténoïdes (1525, 1154, et 1003 cm^{-1}) superposées au spectre des anthocyanes (1644, 1600, 620 cm^{-1}).

Ces caroténoïdes semblent se dégrader facilement sous le faisceau laser, si le temps d'irradiation se prolonge ou si la puissance de la radiation excitatrice est trop élevée. Par contre le spectre des anthocyanes ne semble pas perturbé.

Les spectres 4 et 5 ont été obtenus pour la totalité des cellules en fin de croissance ; les raies des caroténoïdes ne sont plus observées et le spectre des anthocyanes présente des différences notables avec celui observé pour les cellules plus jeunes ; principalement dans les rapports d'intensité des raies $1600-1640 \text{ cm}^{-1}$.

Il semblerait donc que :

- Des caroténoïdes sont synthétisés par la cellule au cours de sa phase de croissance, puis disparaissent quand les cellules ont

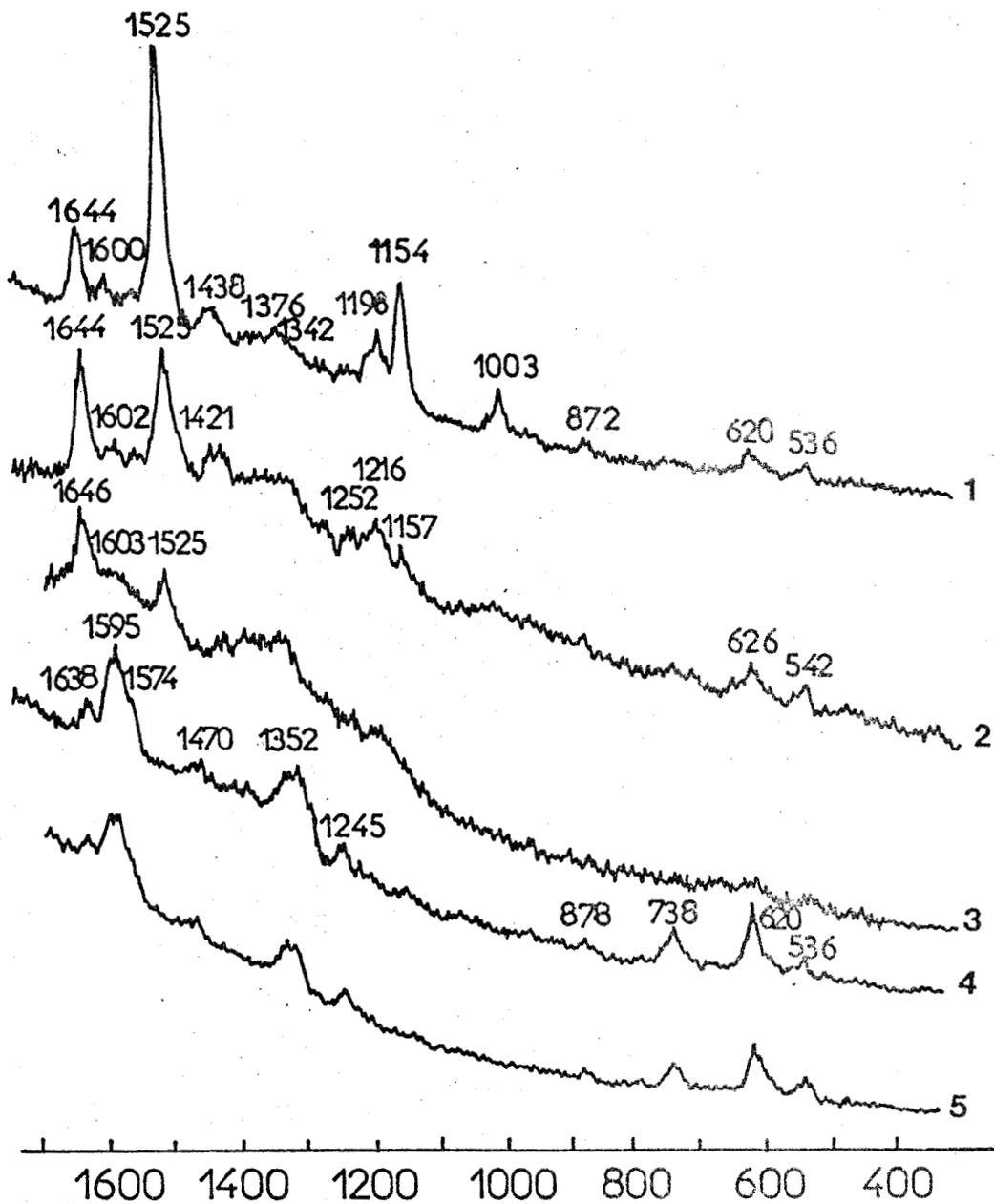


Fig:22 Spectres Raman de résonance *in situ* obtenus par irradiation de différentes cultures de cellules de chou rouge. Excitatrice: 488nm (50mW).

terminé leur développement. La localisation de ces caroténoïdes n'a pas pu être réalisée de manière précise ; il semblerait qu'elles soient présentes dans tout le cytoplasme et en quantité plus importante au voisinage de la vacuole.

- Les anthocyanes ne semblent pas avoir la même structure pendant la phase de croissance et à la fin de leur développement. La modification des intensités relatives dans $1600-1650 \text{ cm}^{-1}$ peut être le reflet d'une complexation de l'anthocyane ou de la présence de la molécule sous la forme base quinonique.

Nous pensons que la seconde hypothèse est la plus probable car si l'on modifie légèrement le pH vacuolaire en plaçant les cellules dans une solution d'HCl (0,005 M), nous obtenons *in situ* un spectre Raman de résonance identique à celui observé pour une solution aqueuse de pigment à pH 1 et aux spectres obtenus à partir des cellules âgées de 14 jours. Une modification du pH vacuolaire entre la phase de croissance et la maturité des cellules pourrait expliquer ce phénomène.

Il est à noter que l'examen de cellules dépigmentées, c'est à dire dont la croissance s'est effectuée à l'abri de la lumière, ne met en évidence aucun caroténoïde.

Ces observations pourraient apporter une réponse à certaines des hypothèses avancées par les physiologistes sur la biosynthèse des anthocyanes (40).

Pour le chou-rouge, il a été constaté que la lumière rouge (660 nm) et la lumière rouge lointain (730 nm) contrôlent la biosynthèse des anthocyanes par l'intermédiaire d'un phytochrome, situé dans la membrane des cellules (41). Ce phytochrome agit dans le tissu cultivé *in vitro* par transformation de la forme active (P_{fr}) en forme inactive (P_r) à l'obscurité (42-43) ou par irradiation en lumière rouge lointain (44-45).

Chez certaines espèces (par exemple *Brassica papa*), la synthèse des anthocyanes est induite par exposition à la lumière rouge uniquement si celle-ci est précédée par une longue durée d'irradiation à la lumière bleue.

A partir de ces éléments, certains auteurs ont suggéré que la lumière bleue est active par l'intermédiaire d'un pigment autre que le phytochrome. Les caroténoïdes et les flavines sont des composés susceptibles d'intervenir dans ce type de photoréaction.

Ainsi la mise en évidence de caroténoïdes dans les cellules de chou-rouge en phase de croissance par spectrométrie Raman de résonance peut apporter une réponse à l'hypothèse de la présence d'un second photorécepteur autre que le phytochrome.

3.3. Séparation et identification des anthocyanes de "Brassica-oléracéa"

Nous avons effectué une séparation par chromatographie sur papier Watman n° 1 des anthocyanes du chou-rouge extraites par macération des

cellules dans du méthanol acidifié (HCl 1 %) ou dans une solution aqueuse à pH 1, nous observons trois taches dont les Rf sont donnés dans le tableau IX et comparés avec les valeurs de Harborne (10). L'éluant utilisé est le mélange BAW dans les proportions 5-1-4.

Taches	Rf	Rf d'après Harborne (10)
Première	0,36	0,34
Deuxième	0,33	0,33
Troisième	0,23	0,23

Tableau IX : Rf des anthocyanes du chou rouge

Les différentes taches ont été ensuite découpées et remises en solution aqueuse à pH 1. Les spectres d'absorption électronique de ces trois solutions ainsi que l'extrait brut sont reproduits dans la figure 22.

Nos résultats sont en parfait accord avec ceux précédemment obtenus par Harborne (10). La similitude des spectres montre qu'il s'agit bien de la même aglycone avec des hétérosides différents. Les trois principaux anthocyanes responsables de la coloration du chou rouge sont des hétérosides de la cyanidine appelés Rubrobrassicine A, B et C et dont la structure est la suivante :

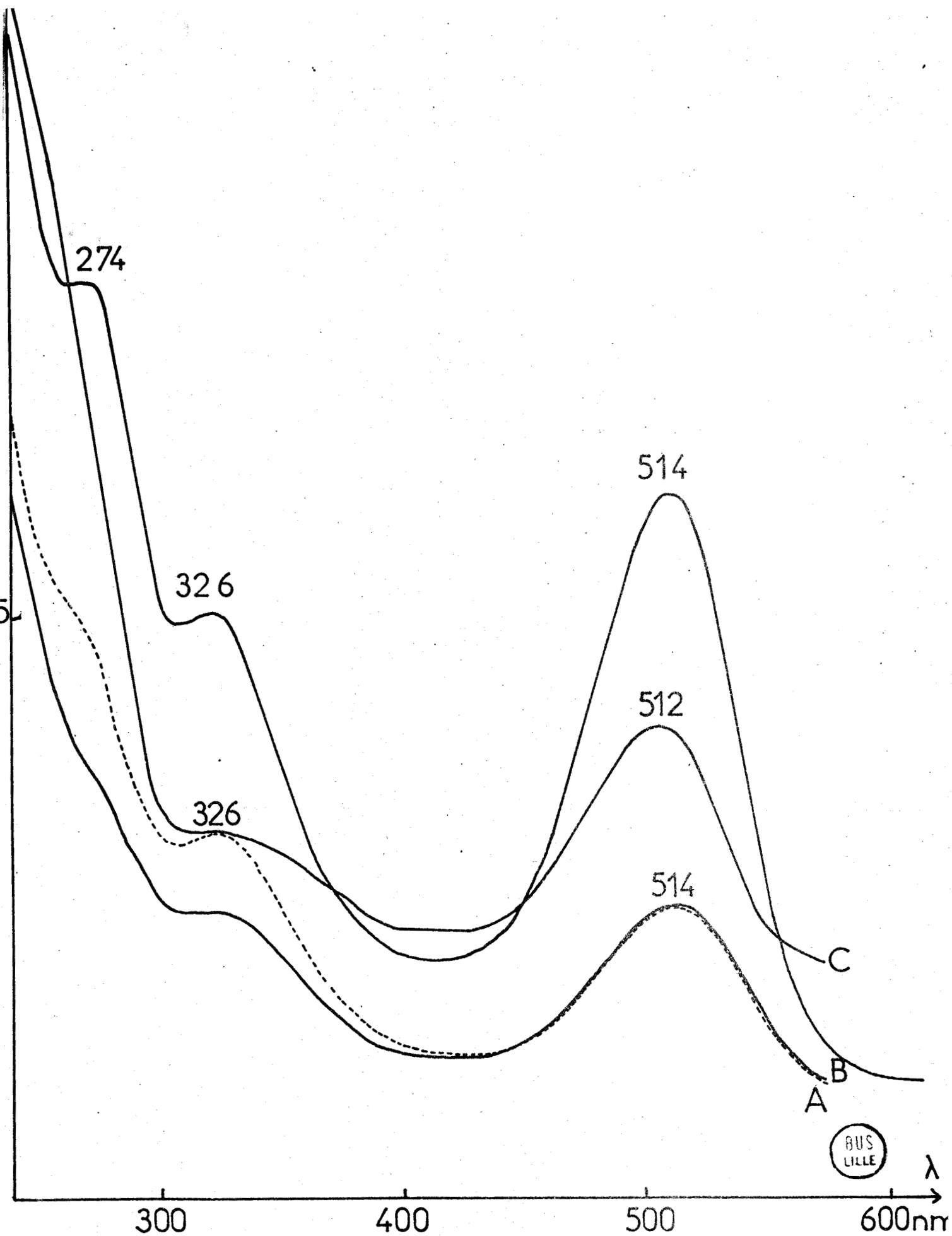
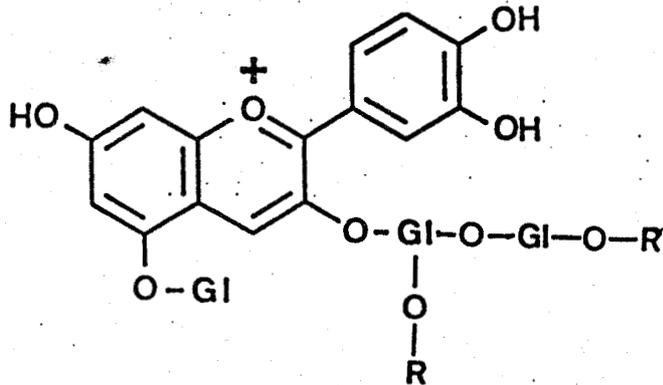


Fig: 23 Spectres d'absorption des anthocyanes du chou rouge (rubrobrassicine A, B et C et l'extrait brut)



Rubrobrassicine

Gl est un glucide

Avec R un groupement acylé ou un hydrogène

- Rubrobrassicine A : glucoside-5, p-coumaroylsophorose-3 cyanidine
- Rubrobrassicine B : glucoside-5, feruloysophorose-3 cyanidine
- Rubrobrassicine C : glucoside-5, diferuloysophorose-3 cyanidine

Les groupements acylés sont greffés sur un oxygène d'un groupement OH de la sophoroside-3, formulé par R dans la structure de la rubrobrassicine. D'autres pigments dérivés de la cyanidine sont également présents dans le chou rouge mais en plus faible quantité (46).

- Glucoside-5, di-p-coumaroylsophoroside-3 cyanidine
- Glucoside-5, sinapoylsophoroside-3 cyanidine
- Glucoside-5, disinapoylsophoroside-3 cyanidine
- Glucoside-5, malouylsophoroside-3 cyanidine

3.4. Spectre Raman de résonance des solutions :

L'étude des spectres Raman de résonance des extraits totaux des anthocyanes en milieu aqueux à pH 1, a été effectuée sur des solutions obtenues par macération des cellules. Nous les comparons à ceux obtenus à partir des pigments chromatographiés (Fig. 24.a-b).

Les spectres sont identiques en intensités et en fréquences, ce qui est conforme avec l'une des propriétés de la spectrométrie Raman de résonance (voir annexe). Seules les bandes attribuables aux vibrations du chromophore, ici, l'aglycone de la cyanidine sont exaltées par résonance. Les spectres présentent tous une raie à 624 cm^{-1} caractéristique de la diglucosidation du groupement benzopyrylium ce qui confirme l'hypothèse précédemment avancée à propos de la malvidine.

Fig: 24a Spectres Raman de résonance des pigments de chou rouge "brassica oleracea" extraits par une solution aqueuse pH1

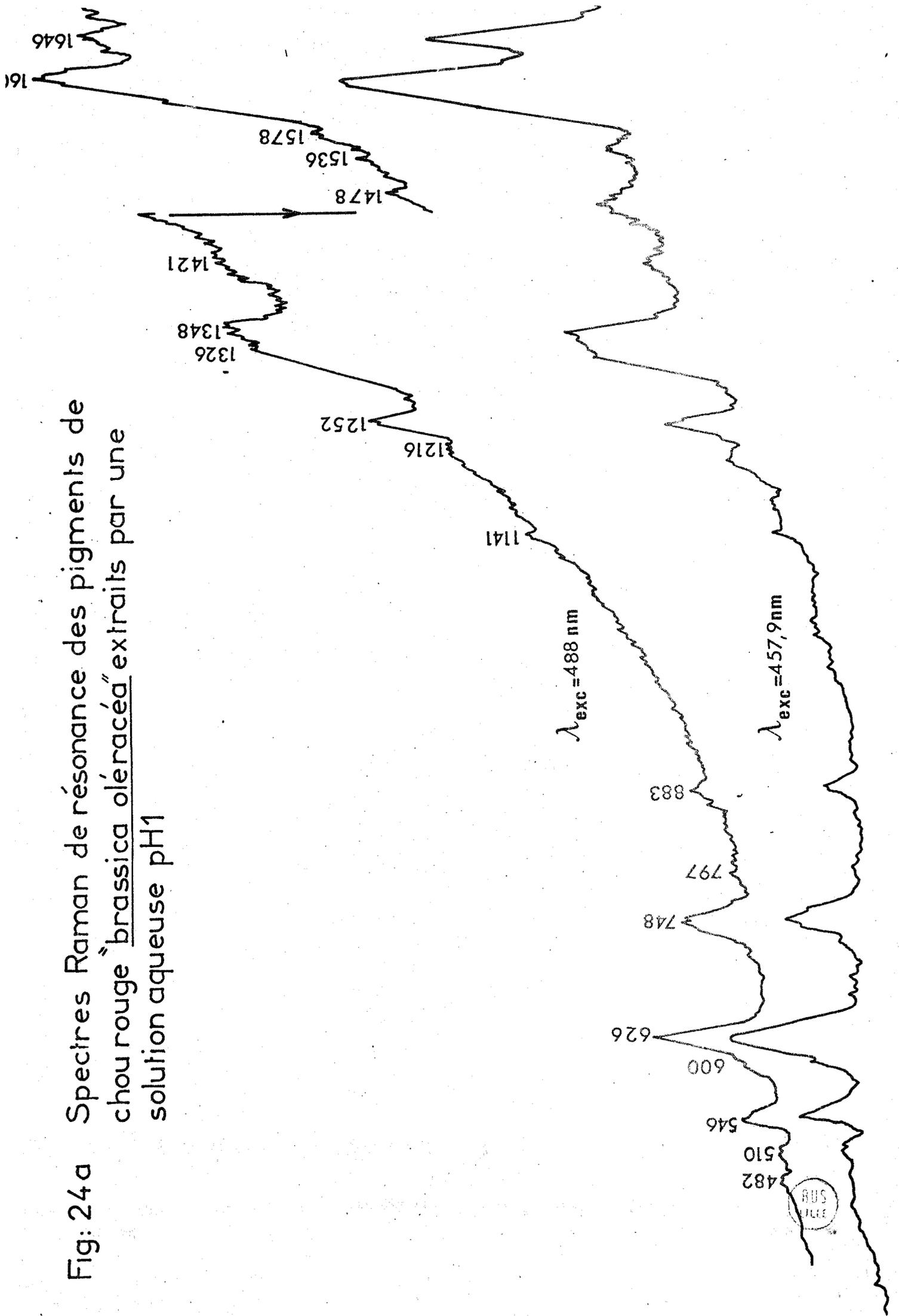
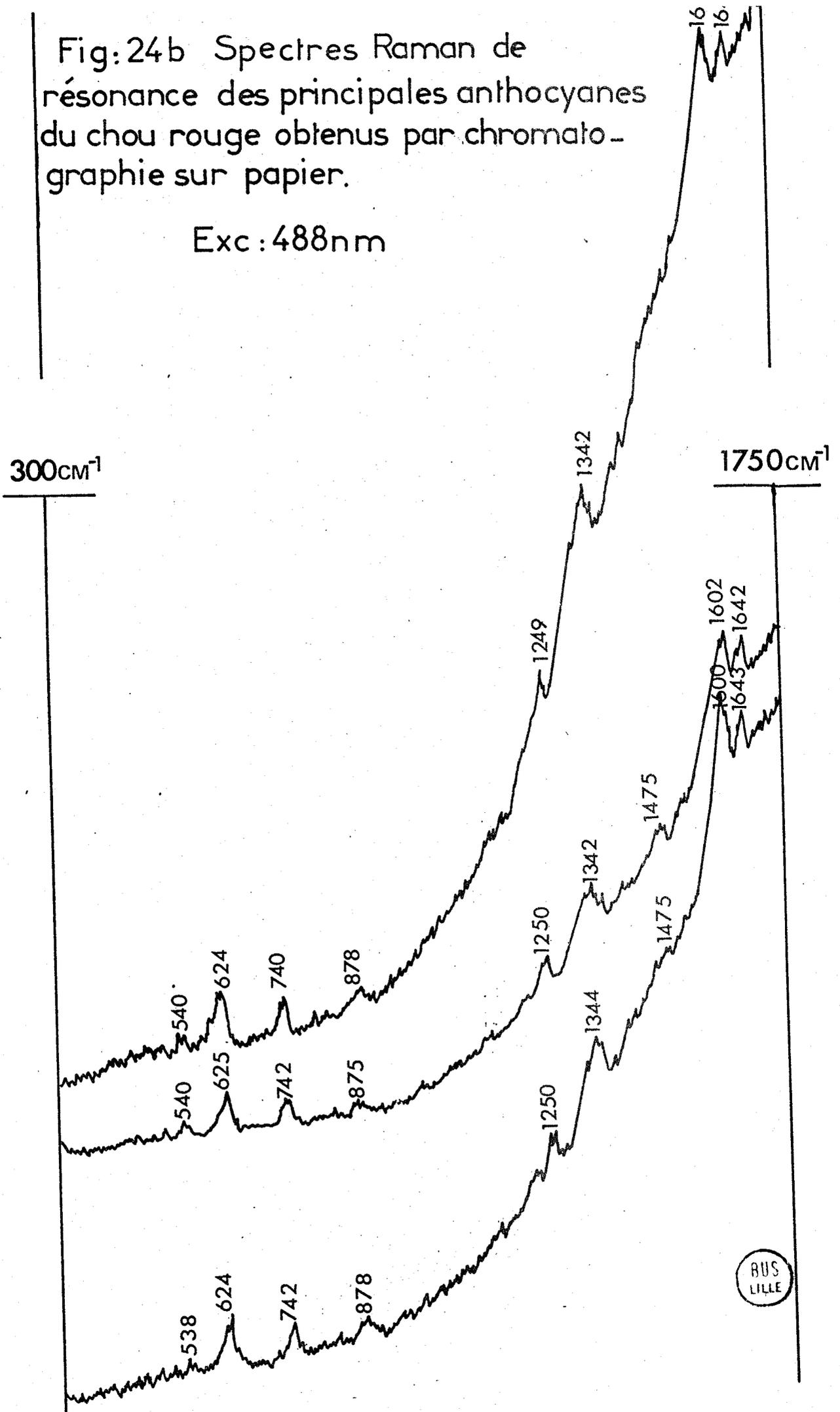


Fig:24b Spectres Raman de résonance des principales anthocyanes du chou rouge obtenus par chromatographie sur papier.

Exc : 488nm



4. PIGMENTATION DE TULIPA CULTIVAR

La tulipe est une fleur très appréciée pour sa grande variété de couleurs qui peuvent varier par toutes les gammes de l'orangé au rouge, du jaune au noir. La pigmentation de différentes espèces a été étudiée et certaines données de la littérature sont disponibles pour que nous puissions obtenir une relation entre la couleur et le pigment majeur dans les pétales (Tableau X). Dans chacun des cas nous avons :

- Enregistré les spectres Raman de résonance *in situ* des pigments présents dans les vacuoles des cellules de pétales.
- Extrait les pigments dans des solutions aqueuses à pH acide (pH 1).
- Enregistré les spectres d'absorption de l'extrait brut.
- Effectué une chromatographie sur plaque de gel de silice de l'extrait brut en éluant avec le solvant précédemment utilisé (BAW).

Les spectres d'absorption et Raman de résonance des échantillons étudiés (pétales et solutions) sont reproduits sur les figures suivantes (25, 26, 27, 28 et 29). Il est possible de remarquer que certains spectres d'absorption des pigments extraits, en particulier pour les tulipes rouges et noires, ont un épaulement vers 440 nm, caractéristique de la non-glucosidification de la position 5 (10).

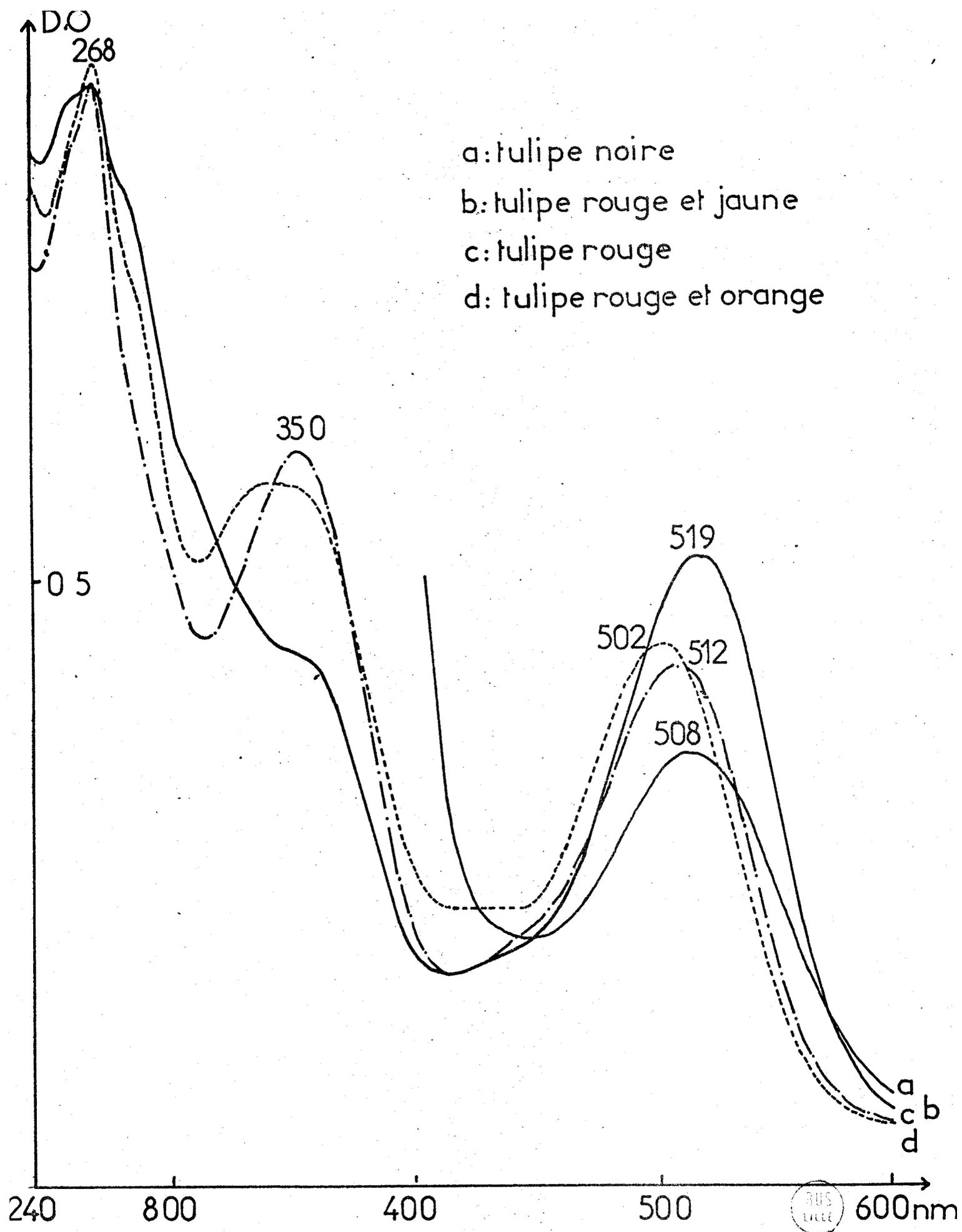


Fig: 25 Spectres d'absorption des pigments extraits de "tulipa cultivar"

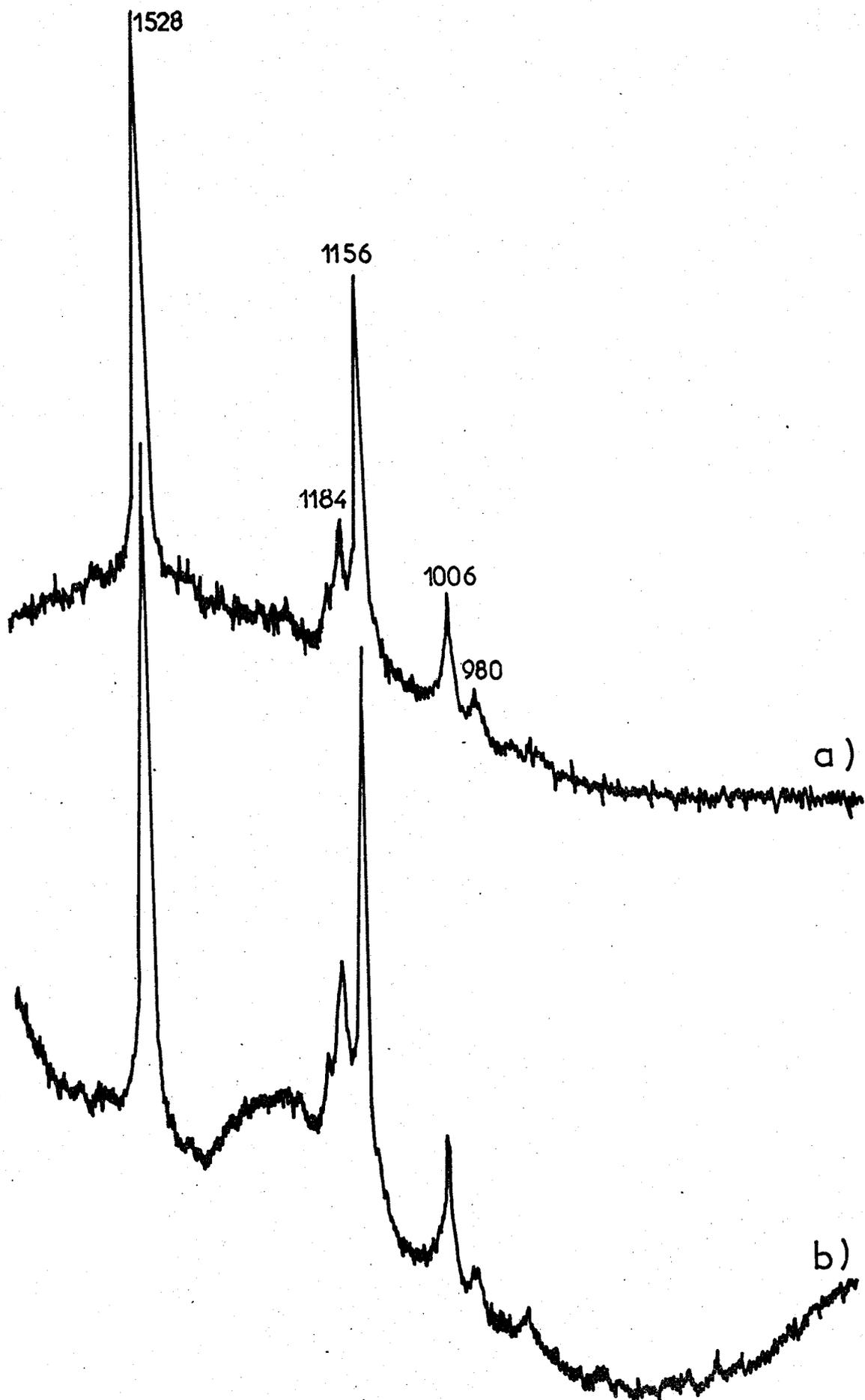


Fig: 26 Spectres Raman de résonance des pigments in situ :
a) de la tulipe jaune
b) de la tulipe orange.

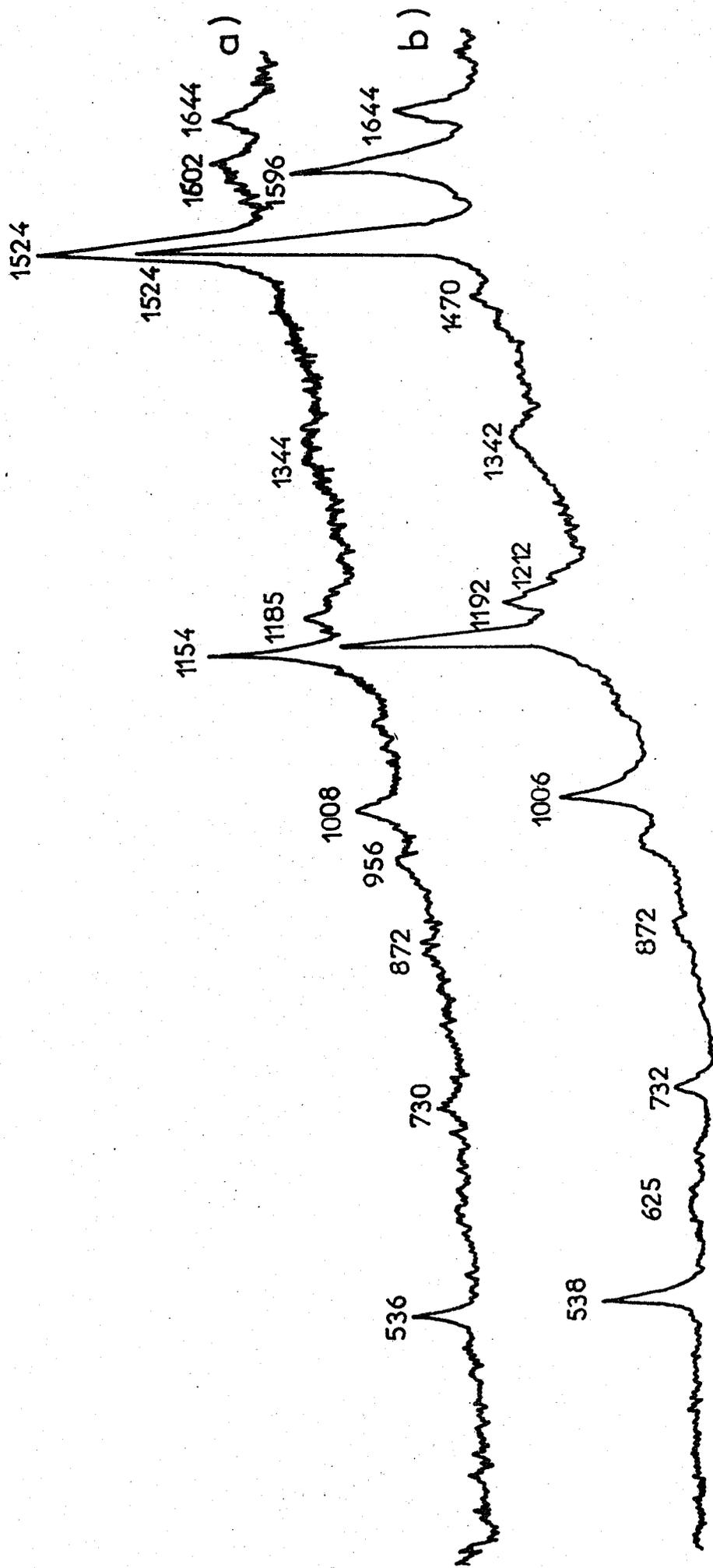
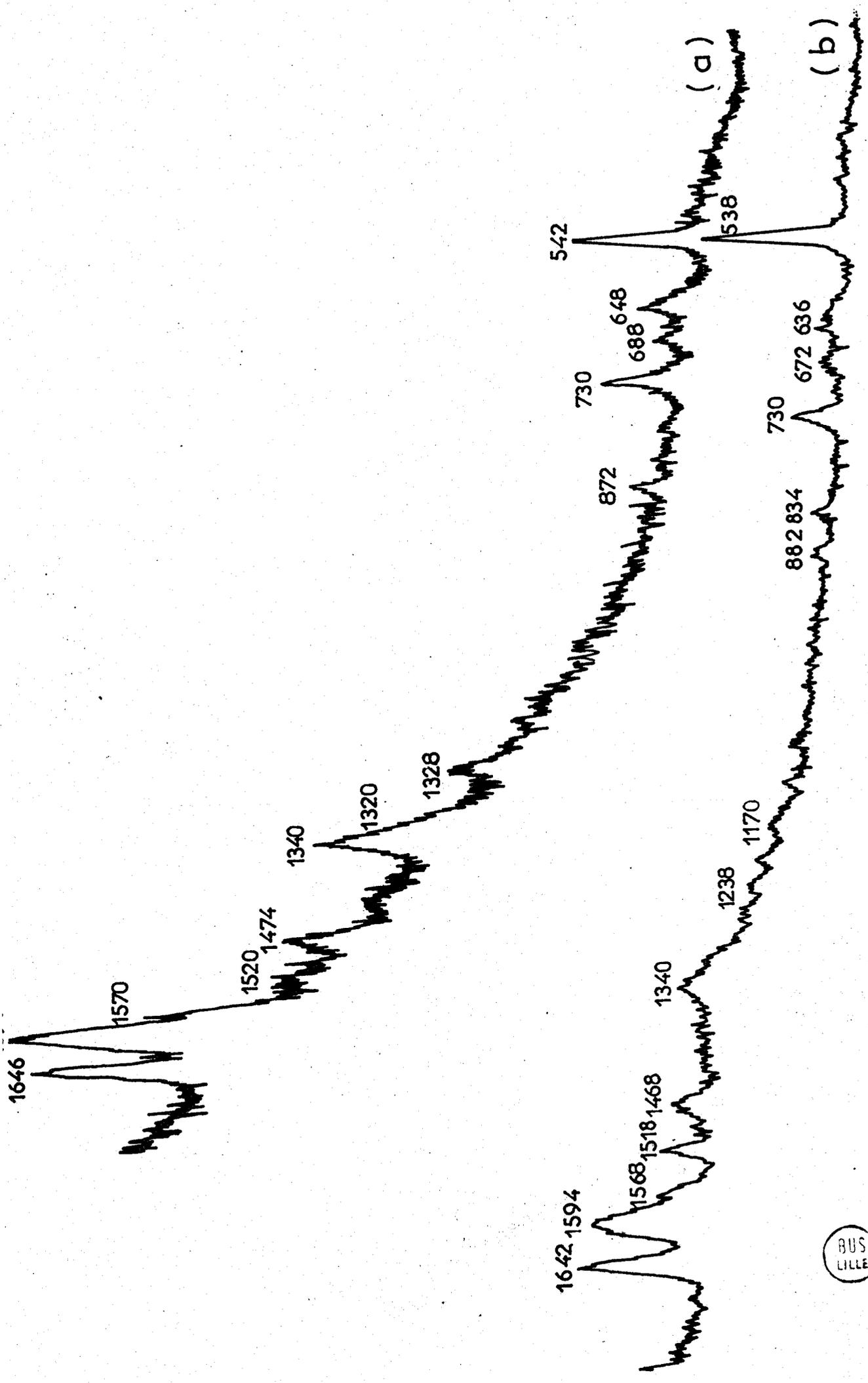


Fig: 27 Spectres Raman de résonance des pigments de:
 a) la tulipe rouge et jaune
 b) la tulipe rouge et orange



BUS
LILLE

Fig:28 Spectres Raman de résonance des pigments de la tulipe rouge
 a) en solution aqueuse à pH1 b) in situ dans un pétale

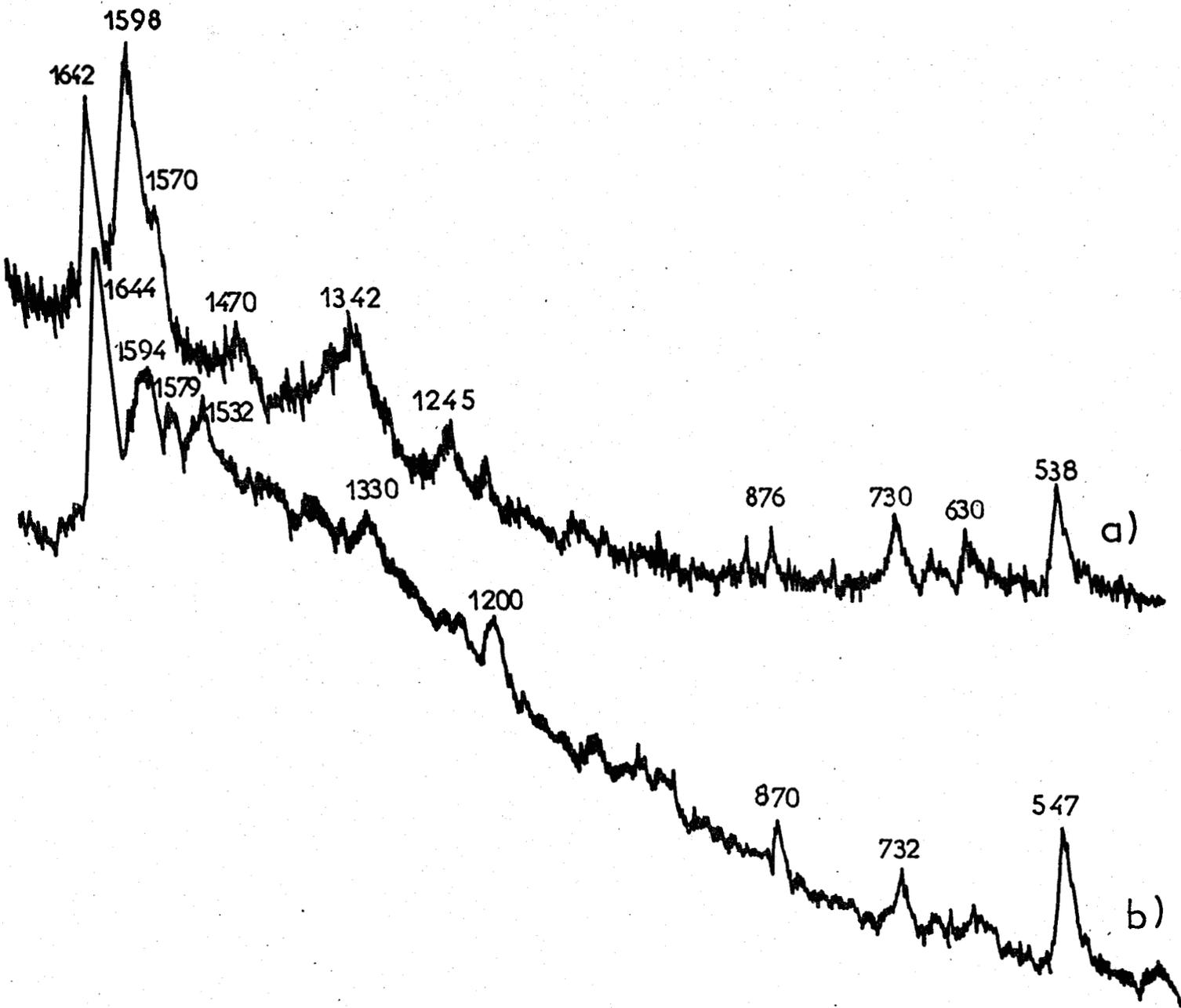


Fig: 29 Spectres Raman de résonance des pigments de la tulipe noire
 a) en solution aqueuse pH1
 b) in situ dans un pétale

. Les pigments majeurs des tulipes jaunes et orangées sont les caroténoïdes. Ces molécules se caractérisent par deux raies très intenses à 1528 cm^{-1} et 1156 cm^{-1} respectivement attribuables aux élongations des doubles et simples liaisons conjuguées de la chaîne polyénique. Aucune raie attribuable aux anthocyanes n'est observée dans la région 1600 cm^{-1} .

. Pour les tulipes bicolores (rouge et orange puis jaune et rouge) l'observation du spectre Raman de résonance obtenu par excitation d'une zone rouge met en évidence à la fois des caroténoïdes (1524 et 1157 cm^{-1}) et des anthocyanes ($1640-1600\text{ cm}^{-1}$) ce qui semble indiquer la présence de caroténoïdes sur la totalité du pétale.

. La tulipe rouge ne contient que des anthocyanes ; la raie de faible intensité observée à 1518 cm^{-1} ne peut être attribuée à un caroténoïde car elle est observée dans le spectre du pigment en solution aqueuse.

La similitude des spectres *in situ* et en solution indique que l'anthocyane se trouve sous la forme du cation flavylum dans le liquide vacuolaire.

. Les anthocyanes responsables de la forte pigmentation de la tulipe noire ne conservent pas leur structure quand elles sont mises en solution aqueuse. Ceci peut être démontré par les fortes variations observées entre le spectre obtenu *in situ* et le spectre de la solution principalement dans la région 1600 cm^{-1} .

Si le cation flavylium est la forme présumée de la solution à pH 1, une structure de type quinonique peut être responsable des modifications spectrales (intensification de la raie 1644 cm^{-1} et de la teinte bleutée de la fleur). La forte concentration du pigment accentuant cette nuance jusqu'au noir.

Pour la totalité des spectres obtenus à partir de *Tulipa cultivar* nous voyons apparaître une raie vers 540 cm^{-1} indiquant d'après les résultats précédemment présentés, le caractère monoglucoside des anthocyanes.

Tulipe	Pigment majeur	λ_{max} (H ₂ O)		λ_{max} littérature (H ₂ O)		Rf obtenu	Rf littérature	Anthocyane majeur proposée
		$\lambda_{\text{I max}}$	$\lambda_{\text{II max}}$	$\lambda_{\text{I max}}$	$\lambda_{\text{II max}}$			
		U.V	visible	U.V	visible			
Rouge	Delphinidine et cyanidine	267	512	278	510	0,33	0,38	Monoglucoside-3 cyanidine
Noire	Delphinidine	267	519	274	516	0,23	0,26	Monoglucoside-3 delphinidine
Rouge et orange	Cyanidine et caroténoïde	267	502	278	510	0,36	0,38	Monoglucoside-3 cyanidine
Rouge et jaune	Cyanidine et caroténoïde	267	508	278	510	0,41 et 0,34	0,41 et 0,38	Monoglucoside-3 péonidine & monoglucoside-3 cyanidine
Orange	Caroténoïdes							
Jaune	Caroténoïdes							

Tableau X : Longueurs d'onde des maximums d'absorption. Rf et identification des anthocyanes de certaines variétés de tulipes.



5. CONCLUSION

A partir des exemples étudiés dans ce chapitre, il apparaît que l'étude des anthocyanes et leur caractérisation par spectrométrie Raman de résonance peuvent être réalisées *in situ*, sans être gêné par l'environnement biologique complexe ; sur les figures suivantes (30, 31, 32), nous présentons des spectres Raman de résonance obtenus par excitation *in situ* des pétales de fleurs.

Nous remarquons comme précédemment que la glucosidification de l'aglycone peut se différencier par la présence d'une raie moyennement intense à 624 cm^{-1} pour les diglucosides, alors que les monoglucosides voient l'intensité de la raie à 540 cm^{-1} s'exalter.

L'acylation des groupements glucosidiques n'a apparemment aucun effet sur le spectre Raman de résonance.

La comparaison des spectres des pigments *in situ* et extraits par une solution aqueuse acide (Fig. 30, 31, 32) peut apporter des renseignements intéressants quant à la structure des pigments présents dans le liquide vacuolaire. Il est intéressant de noter que la majorité des spectres Raman de résonance obtenus *in situ* sur des fleurs de teinte bleue se caractérise par une forte intensité de la raie vers 1640 cm^{-1} ; intensité que l'on ne retrouve pas dans les spectres des solutions acidifiées où prédomine le cation flavylum. La contribution de la forme quinonique peut expliquer, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, la variation d'intensité et la couleur bleue observée.

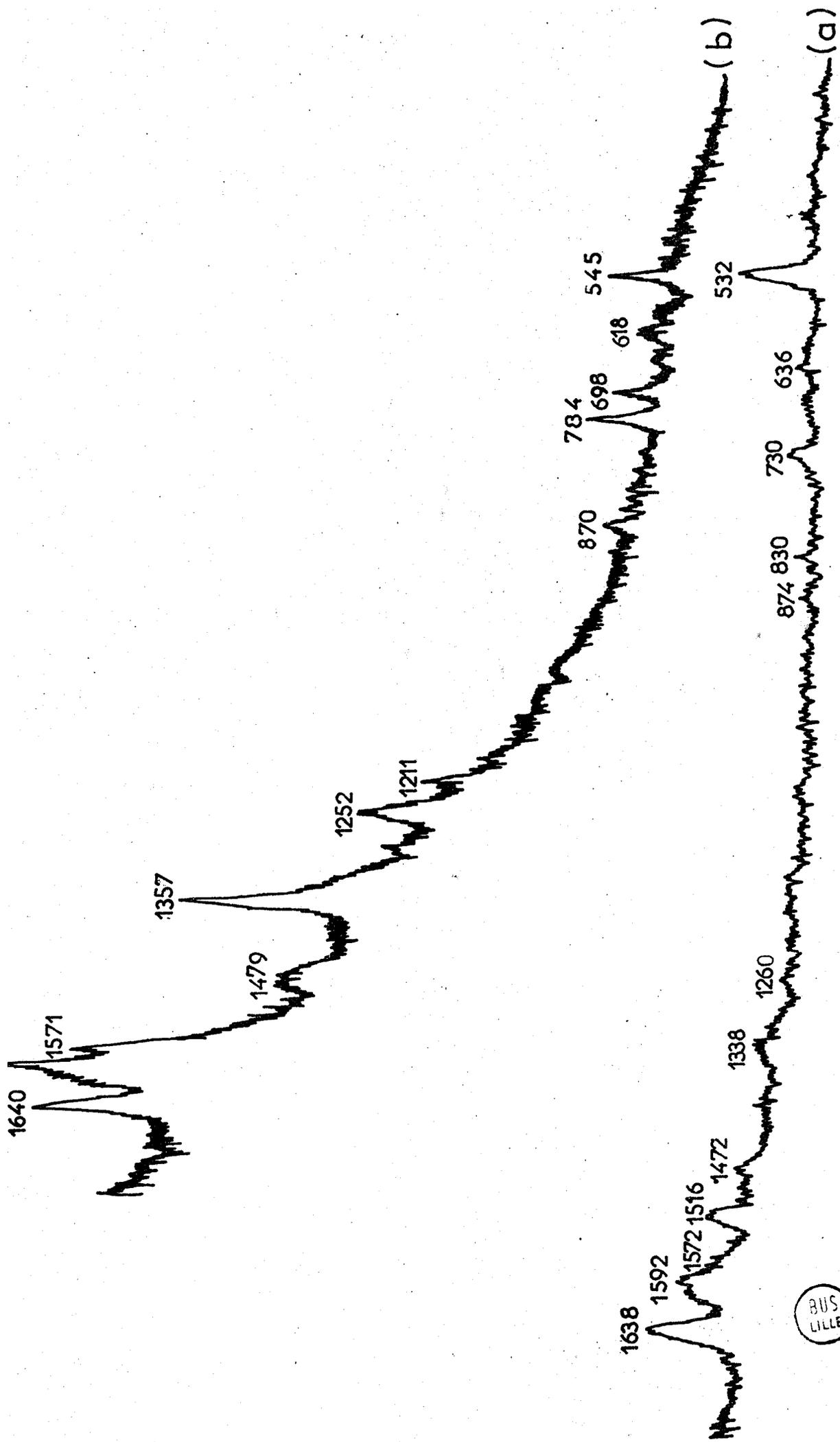


Fig: 30 Spectres R.R. des pigments anthraniques du "delphinium" (bleu)
 a) in situ
 b) en solution aqueuse à pH1

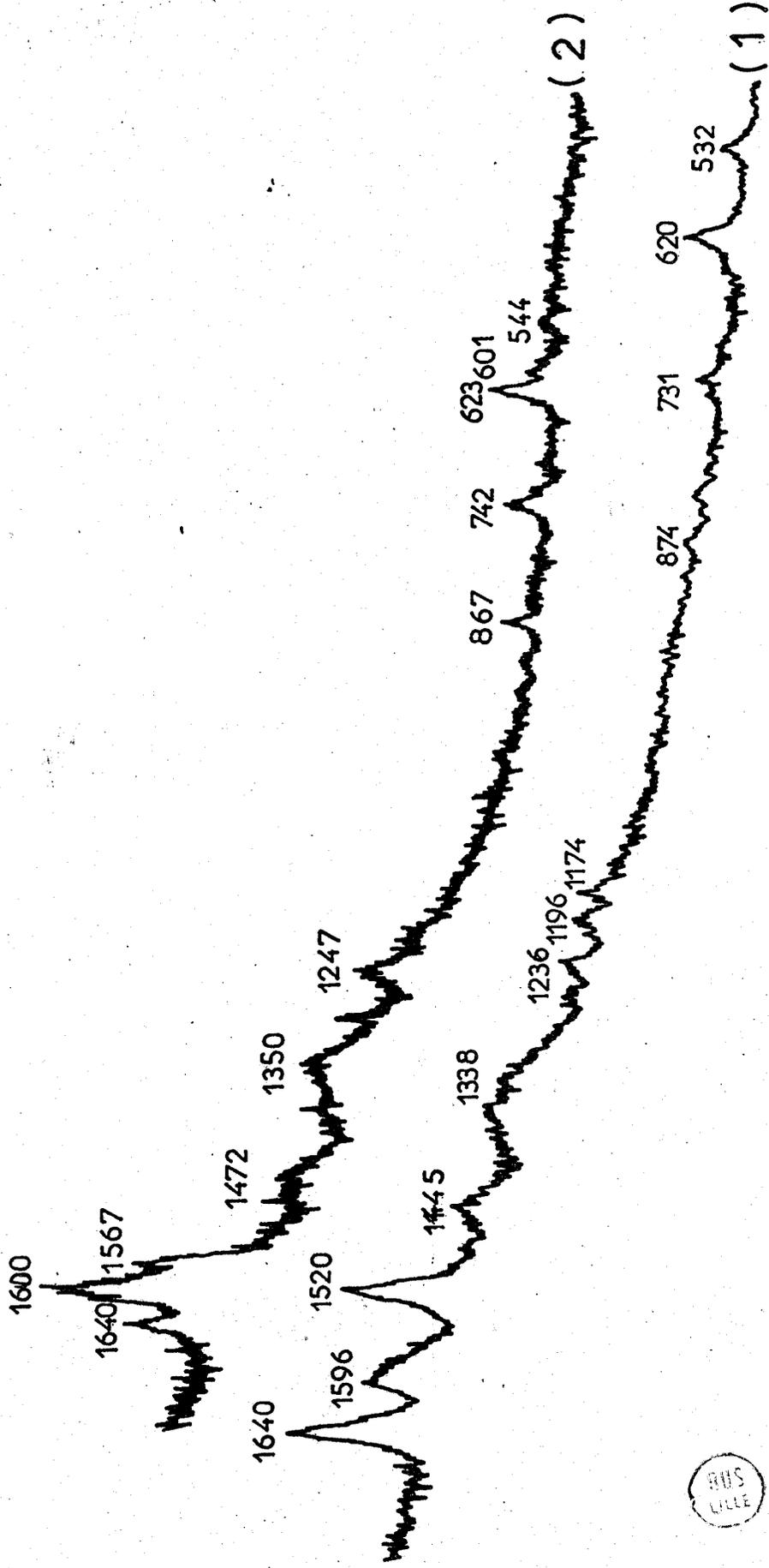


Fig 31 Spectres des pigments anthocyaniques de "Iris Germanica" bleu
 1) in situ
 2) en solution aqueuse à pH1

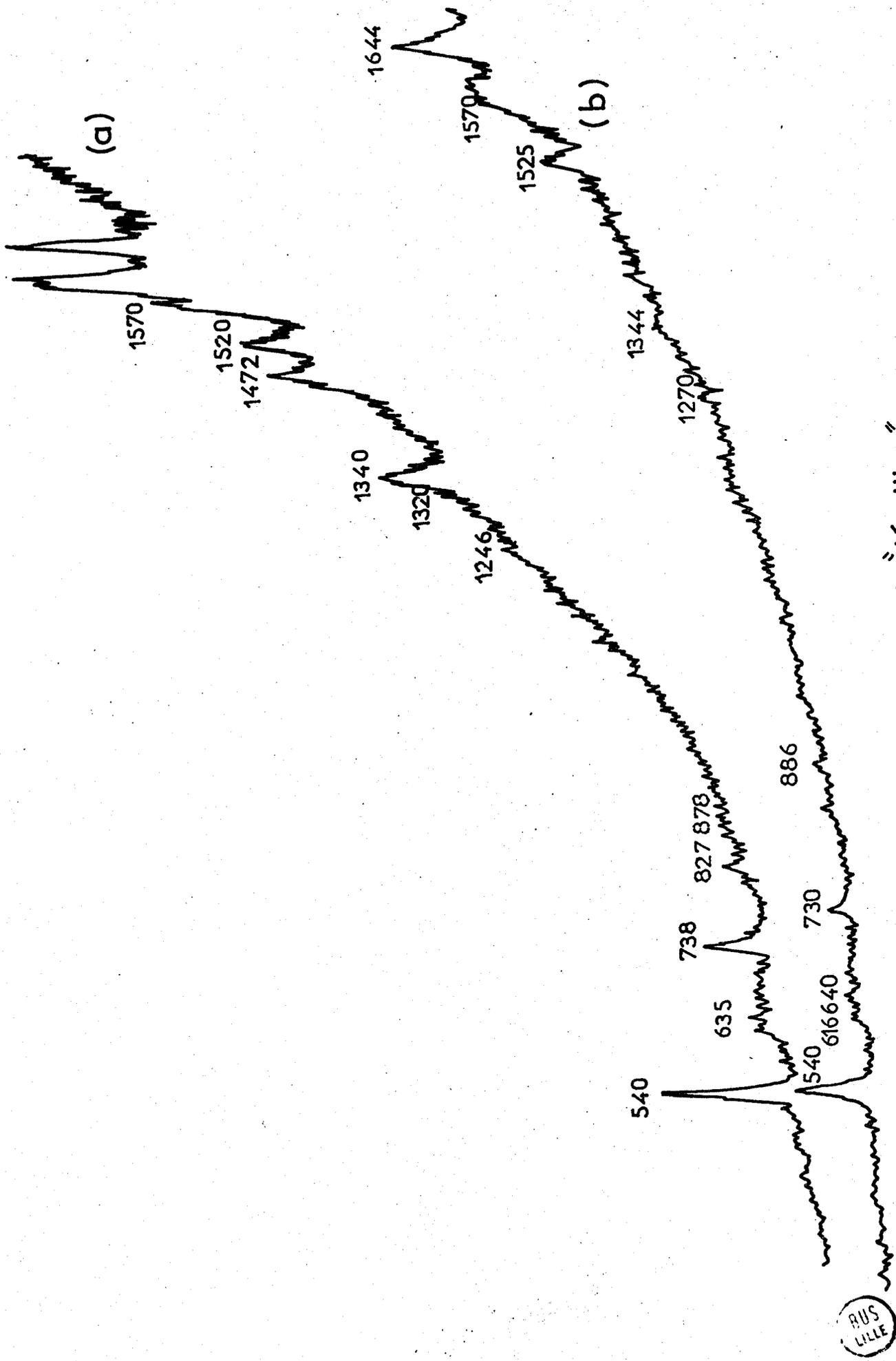


Fig: 32 Spectres Raman des pigments de "l'oeillet"

a) en solution aqueuse pH1

b) in situ sur pétale

RUS LILLE

CHAPITRE IV

INTERPRÉTATION ET CHANGEMENT STRUCTURAL

Ayant à notre disposition les spectres Raman de résonance de différents types d'anthocyanes commerciaux ou extraits de certaines plantes, nous sommes en mesure maintenant de faire une comparaison et une étude plus approfondie des modes de vibration des anthocyanes sous la forme de cation flavylum.

Dans le tableau XI, nous avons regroupé les fréquences caractéristiques de différentes anthocyanes mono et diglucosées, ces valeurs seront par la suite comparées aux fréquences obtenues pour des molécules analogues comme la flavone (Fig. 33), la quercétine (Fig. 34), le précocène (Fig. 35), et le chlorure de méthoxy-4', méthyl-4, hydroxy-7 flavylum (Fig. 36) qui est une anthocyane non naturelle synthétisée par la Société Coca Cola et la quinaldine qui possède un hétéroatome azoté (Fig. 37).

1. ATTRIBUTION DES SPECTRES RAMAN DE RESONANCE DES ANTHOCYANES
SOUS FORME CATION FLAVYLIUM

Les spectres Raman de résonance des anthocyanes présentent de nombreuses analogies, nous pouvons discerner plusieurs domaines bien caractéristiques.

Région 1450-1660 cm^{-1} :

On trouve généralement cinq raies dont les intensités sont conservées d'une anthocyane à l'autre ; les fréquences de ces raies correspondent bien aux valeurs des spectres infrarouges relevées

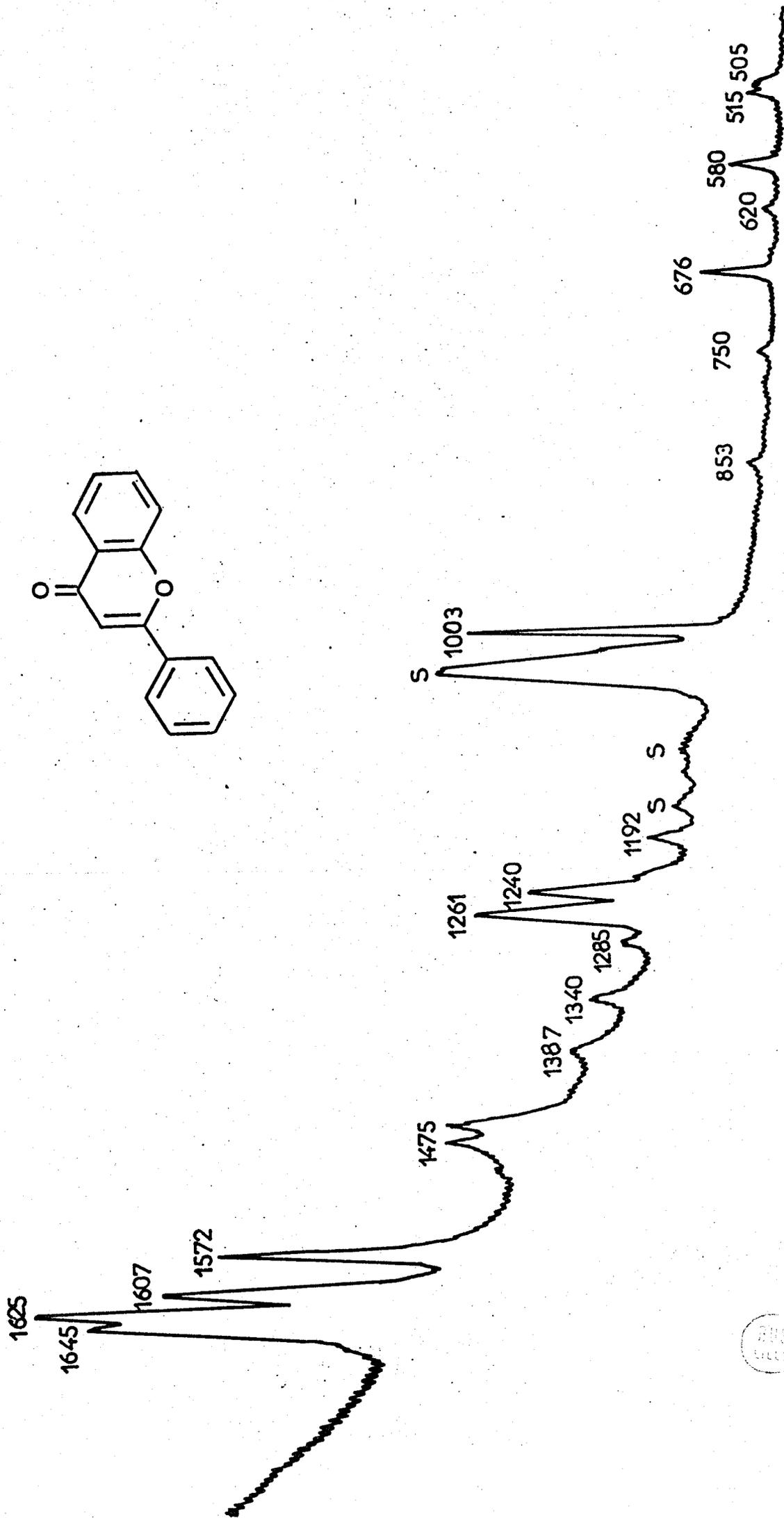


Fig:33 Spectre Raman de la flavone



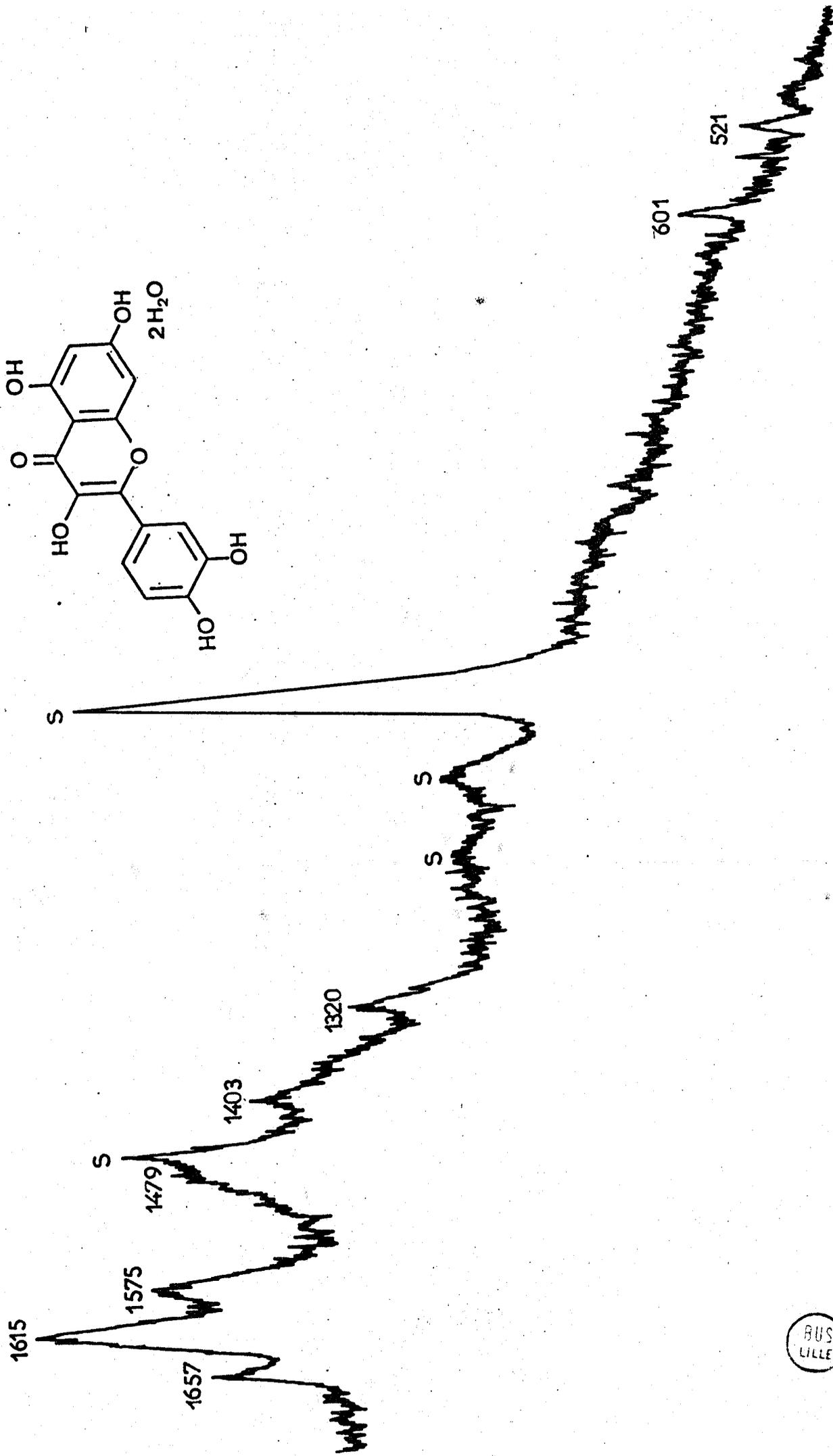
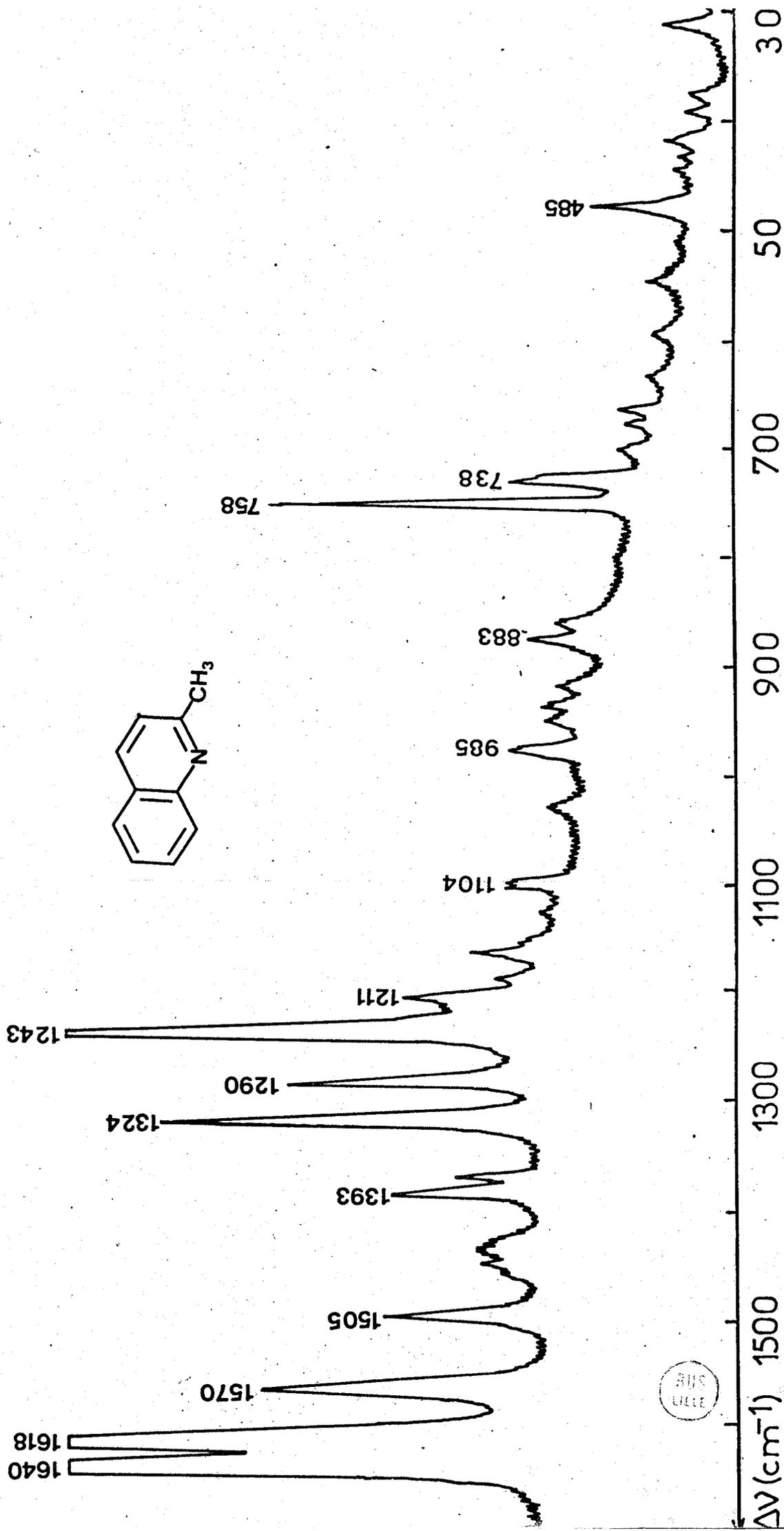


Fig:34 Spectre Raman de la quercétine dihydrate



Fig:35 Spectre Raman de la précocène



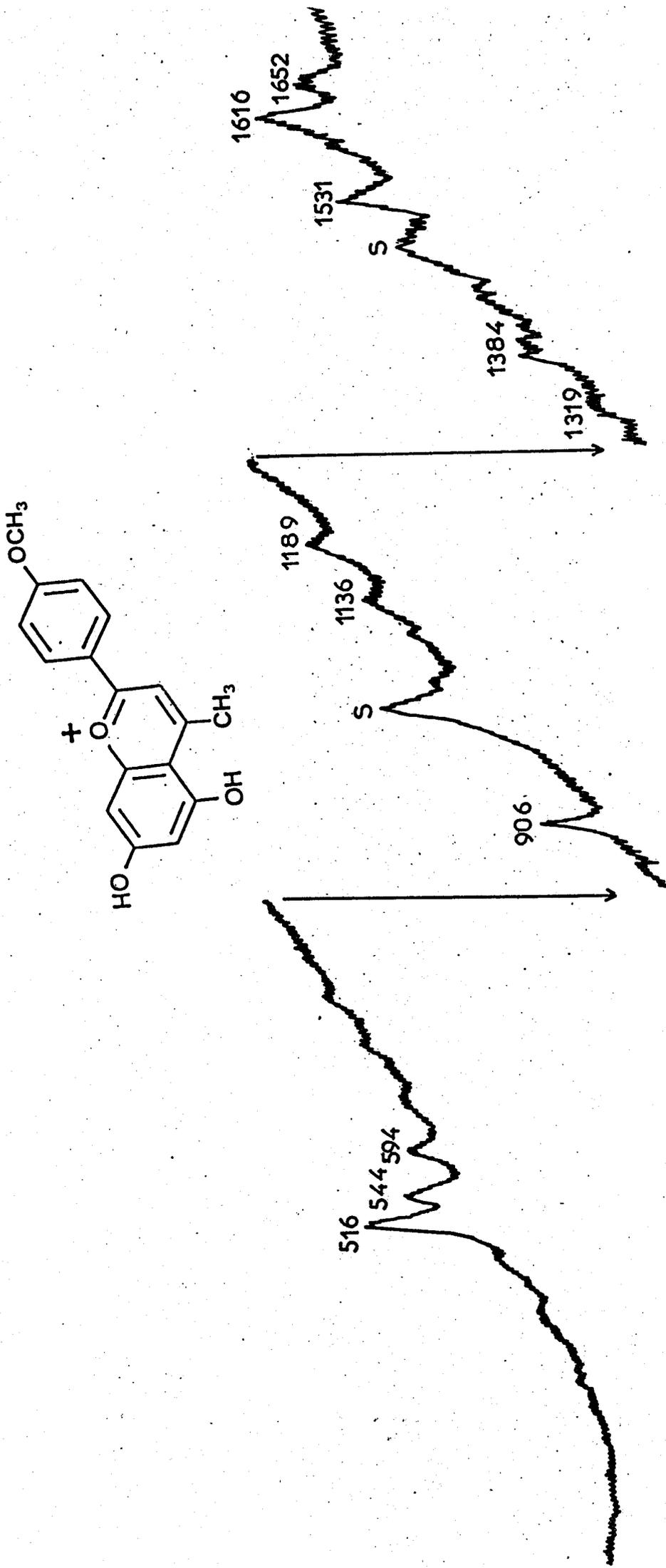


Fig: 36 Spectres Raman du chlorure de methoxy-4', methyl-4, hydroxy-7flavylum .

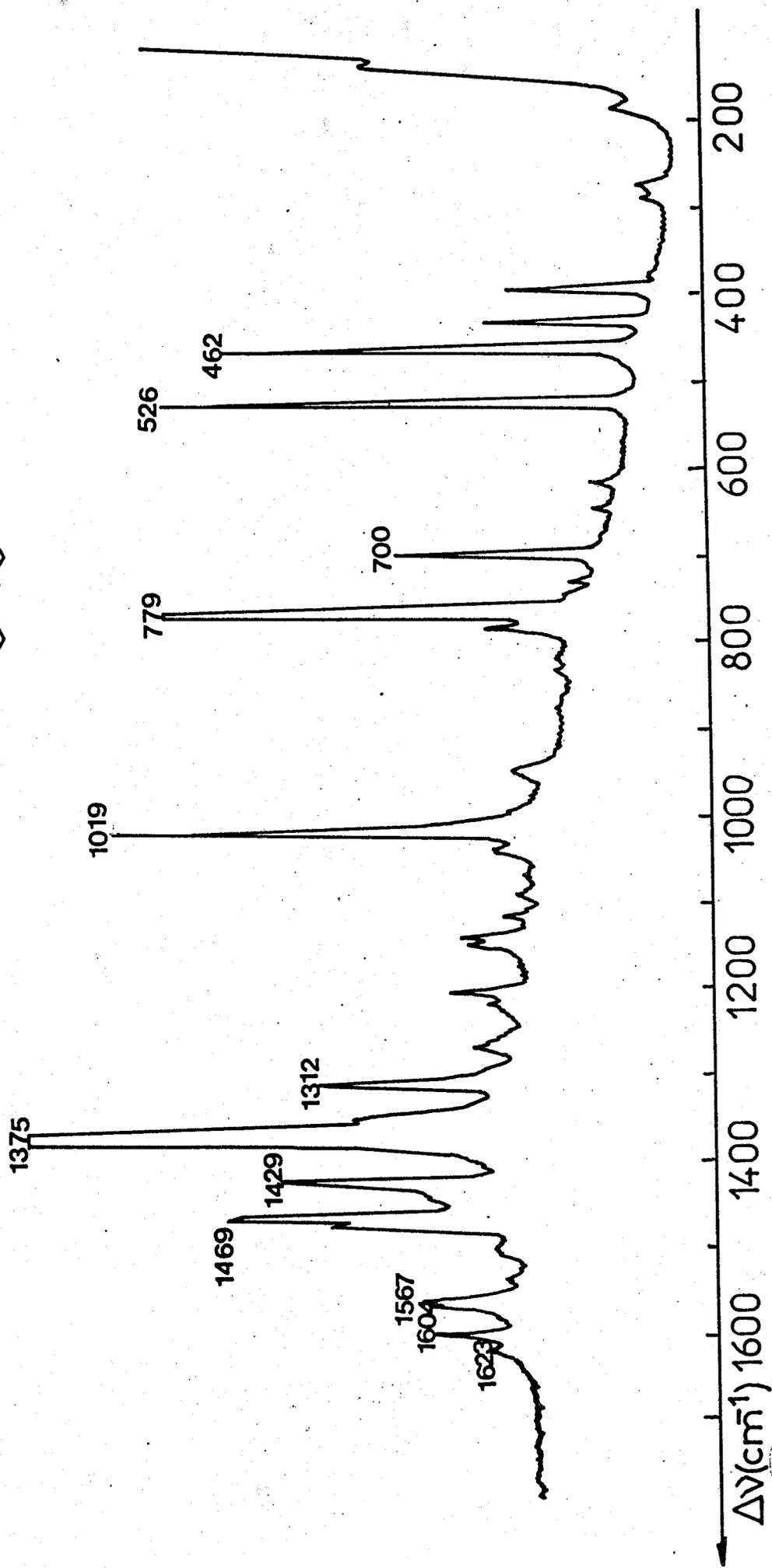
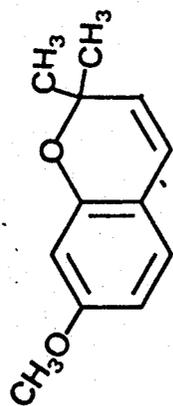


Fig:37 Spectre Raman de la quinaldine

par P. RIBEREAU-GAYON et M.L. JOSIEN pour les six anthocyanidines (4). Un profil identique peut être remarqué pour l'ensemble des molécules de référence utilisé à l'exception de la flavone où apparaît une raie vers 1625 cm^{-1} , sans doute attribuable à l'élongation de la double liaison C=O greffé en C 4 sur le cycle pyrylium.

On attend dans cette région les modes de vibration propres aux cycles benzéniques. Nous ne pouvons pas distinguer la participation du cycle A de celui du cycle B, cependant comme les spectres du précocène et de ses dérivés substitués (47), dépourvus de cycle B possèdent cet ensemble de raies et que l'état de substitution de ce cycle B ne modifie en rien les caractéristiques spectrales de cette région (par exemple : le passage de la pélargonidine à la cyanidine et à la delphinidine), nous pensons que le cycle A contribue en majorité aux caractéristiques spectrales observées. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la glucosidification perturbe très peu cette région en fréquence et en intensité.

La contribution des modes de déformation CH_3 peut être considéré entre 1440 et 1470 cm^{-1} ; elle est observée en infrarouge vers 1460 cm^{-1} sur les spectres des anthocyanidines méthylées. Dans les spectres Raman de résonance, la raie vers 1470 cm^{-1} est présente même pour les dérivés ne comportant pas de substituant OCH_3 . Cette contribution peut donc être écartée.

Région 1100-1400 cm^{-1} :

Cette zone dominée par deux massifs importants, l'un centré vers 1340 cm^{-1} , qui apparait double dans certains spectres, l'autre situé vers 1240 cm^{-1} .

Dans cette région, il est possible de prévoir des modes de déformation β OH vers $1150-1250 \text{ cm}^{-1}$, des modes caractéristiques des groupements Ph-OCH_3 vers $1160-1210 \text{ cm}^{-1}$, des déformations symétriques de groupements méthylés vers $1285-1370 \text{ cm}^{-1}$ et un mode d'élongation de liaison C-O possédant un caractère aromatique vers 1250 cm^{-1} .

Tous les spectres des anthocyanes étudiées sont identiques dans cette région. Pour la même raison que celle précédemment invoquée, les modes où interviennent les groupements méthyls peuvent être écartés. Nous pouvons proposer l'attribution suivante :

- 1240 cm^{-1} groupements phénoliques
- 1340 cm^{-1} élongation du groupement C-O à caractère aromatique, ce mode est observé à des valeurs voisines dans les spectres obtenus à partir du précocène et des dérivés flavoniques. Le caractère aromatique du cycle oxonium est provoqué par la présence des doubles liaisons conjuguées, elle est responsable de la stabilité de l'édifice.

Dans un système conjugué tel que l'ion flavylum, la charge positive n'est pas localisée sur un atome bien défini, mais est

répartie sur différents atomes de la molécule. Ainsi pour le cation flavylum, on peut envisager des formes limites à structure oxonium, à structure carbonium et dans le cas des anthocyanidines une autre possibilité peut être envisagée. En effet par leurs substituants, la charge positive peut être représentée sur l'un des substituants hydroxyles. Finalement la vraie structure correspond à un "hybride de résonance" entre différentes formes mésomères limites (Fig. 38) (2).

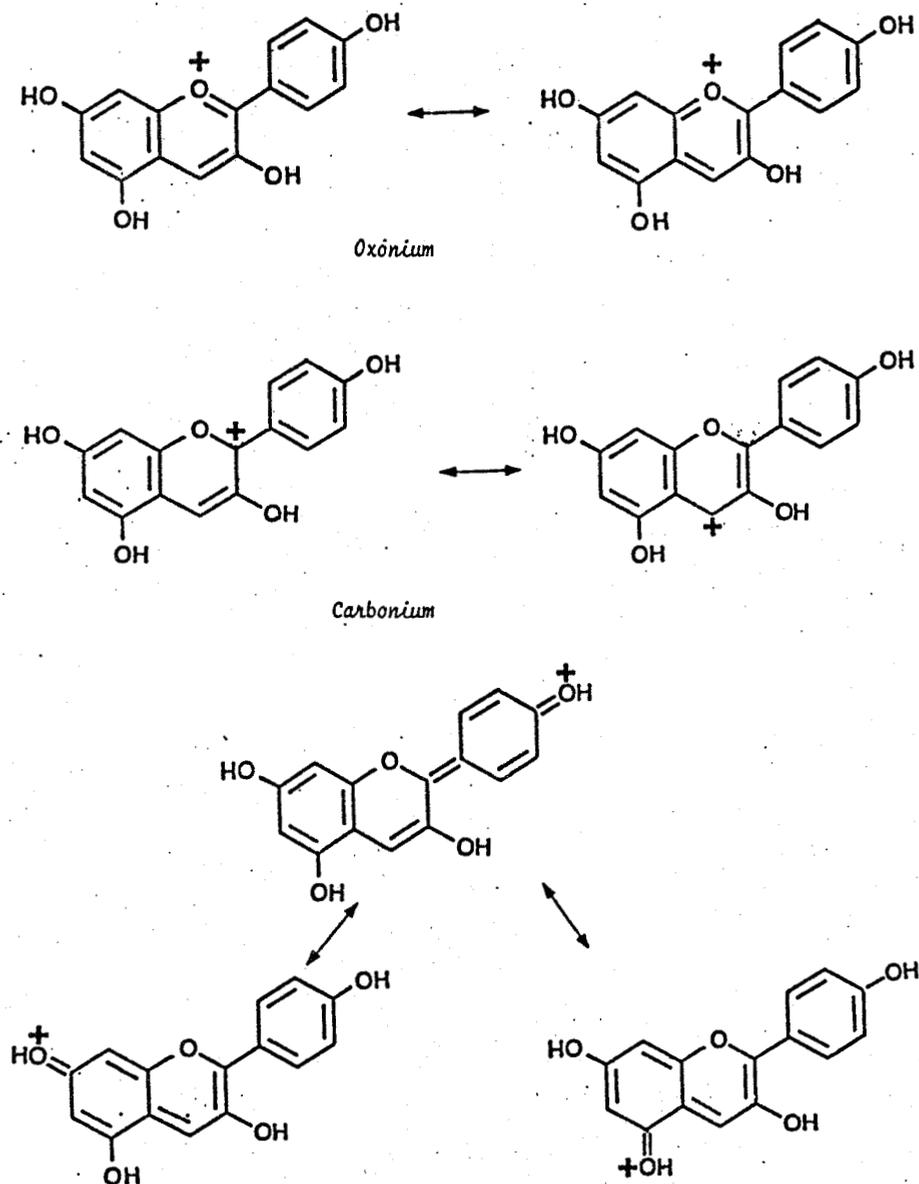


Fig. 38 : Structure des formes limites de la pèlargonidine

Dans la pratique, les représentations oxonium et carbonium sont les plus utilisés ; certaines propriétés chimiques indiquent une faible densité électronique sur le carbone 2 (2).

Région 1000-1100 cm^{-1} :

Cette région dans laquelle on peut attendre des modes dûs au groupement $\text{O}-\text{CH}_3$ est relativement peu intense dans les spectres Raman de résonance bien qu'en spectrométrie infrarouge c'est le domaine spectral qui se prête le mieux à la différenciation et l'identification des anthocyanes.

Région 500-900 cm^{-1} :

Dans ce domaine spectral nous attendons principalement des modes de vibration de squelette et des modes de déformation CH hors du plan. Le détail de ces spectres est représenté sur la figure 39 pour six anthocyanes mono et diglucosés. Nous voyons parfaitement l'analogie existant entre les monoglucosés d'une part, et les diglucosés d'autre part.

Les dérivés substitués en 3 sont dominés par une raie à 540 cm^{-1} , la diglucosidification en 3 et 5 diminue fortement l'intensité de cette raie et exalte l'intensité des bandes situées dans le domaine spectral $620-625 \text{ cm}^{-1}$.

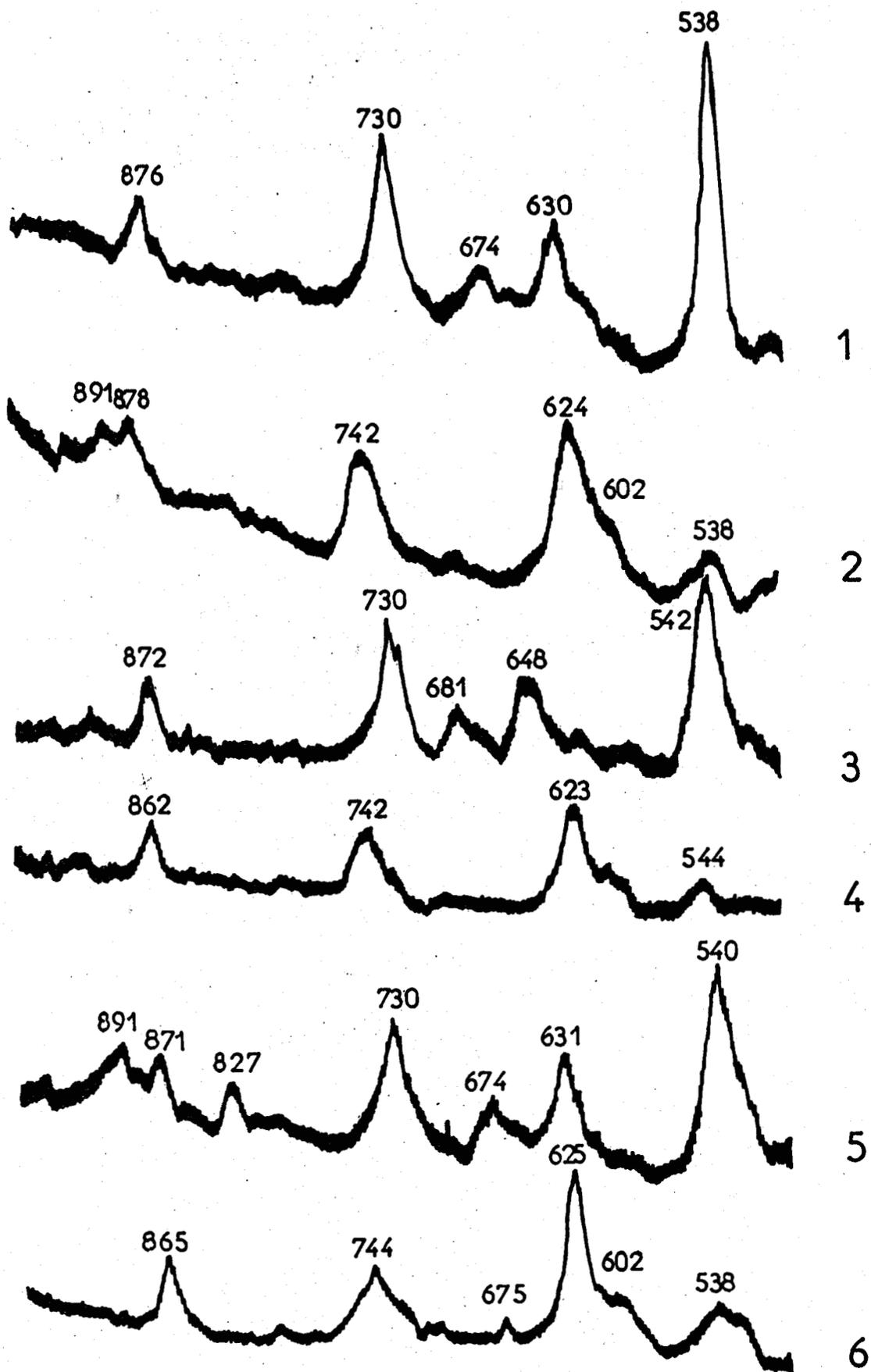


Fig:39 Spectres Raman de résonance des anthocyanes respectivement mono et diglucosés



1 et 2 : de cyanidine

3 et 4 : de delphinidine

5 et 6 : de malvidine

Malvidine		Delphinidine		Cyanidine		Pélargonidine		Péonidine		Pétunidine		Attribut proposée
Monoglucoside	Diglucoside											
1643	1645	1646	1640	1642	1645	1644	1643	1644	1643	1644	1644	Vibrations
1598	1602	1594	1600	1598	1602	1598	1595	1598	1595	1592	1592	de squelette
1569	1571	1570	1567	1570	1573	1570	1570	1570	1570	1571	1571	du groupe
1522		1520		1525		1520	1534	1520	1534			benzopyryllium
1474	1471	1474	1472	1470	1472	1472	1470	1472	1470	1470	1470	
1338	1352	1340	1350	1342	1346	1340	1340	1340	1340	1338	1338	β OH
1306		1315		1323		1320		1320	1303	1305	1305	
1245	1250	1240	1247	1245	1252	1246	1242	1246	1242	1242	1242	C-O aromatique
891		898					888		888	890	890	
871	874	872	867	876	880	878		878		865	865	
827							827		827	828	828	groupement
730	744	730	742	730	745	738	728	738	728	726	726	
674		681		674						692	692	benzopyryllium
631	626	648	623	630	624	635	627	635	627	650	650	
540	604		601		603					543	543	
	542	542	544	538	543	540	540	540	540	528	528	
	527	518		510	511							

Tableau XI: Fréquences et attributions des raies observées sur les spectres Raman de résonance de différents anthocyanes



Les différences de substitution sur le cycle benzénique B ne semblent avoir aucune influence marquante dans ce domaine que nous pouvons donc attribuer au groupement benzopyrylium ; le cycle benzénique B n'ayant aucune contribution directement observable. Ceci expliquerait la grande analogie de tous les spectres que nous avons pu observer au cours de cette étude.

La spectrométrie Raman de résonance n'exaltant que les modes vibrationnels des groupements participant à la délocalisation électronique, on pourrait être amené à la conclusion que seul le groupement benzopyrylium participe à cette délocalisation, ce qui explique mal l'influence de la substitution du cycle B sur le spectre d'absorption et par voie de conséquence sur la couleur de l'anthocyane.

Nous ne pouvons pas, au stade actuel de notre étude, apporter une réponse satisfaisante à ce phénomène. Une connaissance approfondie du spectre de diffusion Raman est nécessaire par l'étude du profil d'excitation des différentes raies (variation des intensités avec la fréquence de la radiation excitatrice) et par une attribution plus précise des modes de vibrations en utilisant des substitutions isotopiques.

2. TRANSFORMATIONS STRUCTURALES DES ANTHOCYANES

Le comportement des anthocyanes et des anthocyanidines en fonction du pH est variable selon leur structure et dépend plus particulièrement de l'état de substitution des cycles (voir chapitre I).

Les études de changements conformationnels ont été réalisées à partir de la malvine commerciale (diglucoside-3,5 malvidine). Les spectres d'absorption U.V.-visible et Raman de résonance ont été réalisés à partir d'échantillon cristallisé dissous dans les solutions tampons correspondantes.

- Spectres U.V. :

Les spectres obtenus à différents pH sont présentés sur la figure 40.

A pH acide, le spectre est dominé par une bande centrée à 520 nm attribuable au cation flavylium (AH^+). Une autre bande dans l'ultra-violet qui n'est pas affectée par le pH est probablement due au groupement phénolique non ionisé (2).

Si le pH augmente, nous observons une décroissance très forte de la bande visible au profit des bandes situées dans l'ultra-violet à cause de la formation de la pseudobase (B). Ce n'est qu'à pH 6 qu'apparaît une nouvelle bande visible vers 540 nm attribuable à la base quinonique. Cette forme est très instable et nous pouvons observer une rapide décroissance de l'absorption de l'échantillon en fonction du temps (Fig. 41).

Pour un pH supérieur, la formation de l'anion (A^-) se traduit par un glissement de la bande d'absorption vers les grandes longueurs d'onde, à pH très basique il y a formation d'une chalcone ionisée qui absorbe vers 400 nm.

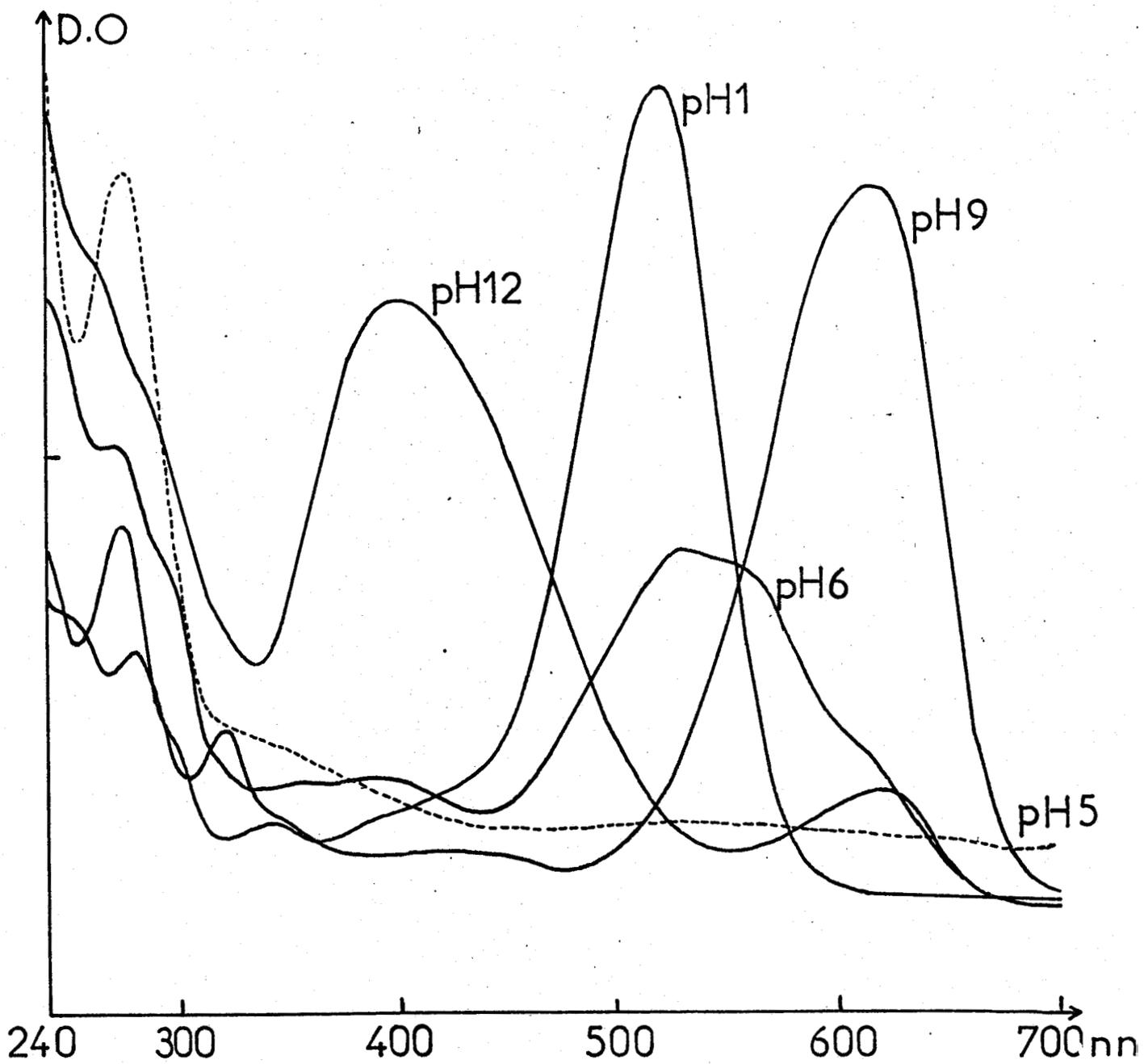


Fig:40 Spectres d'absorption de la diglucoside-3,5 malvidine à différents pH.

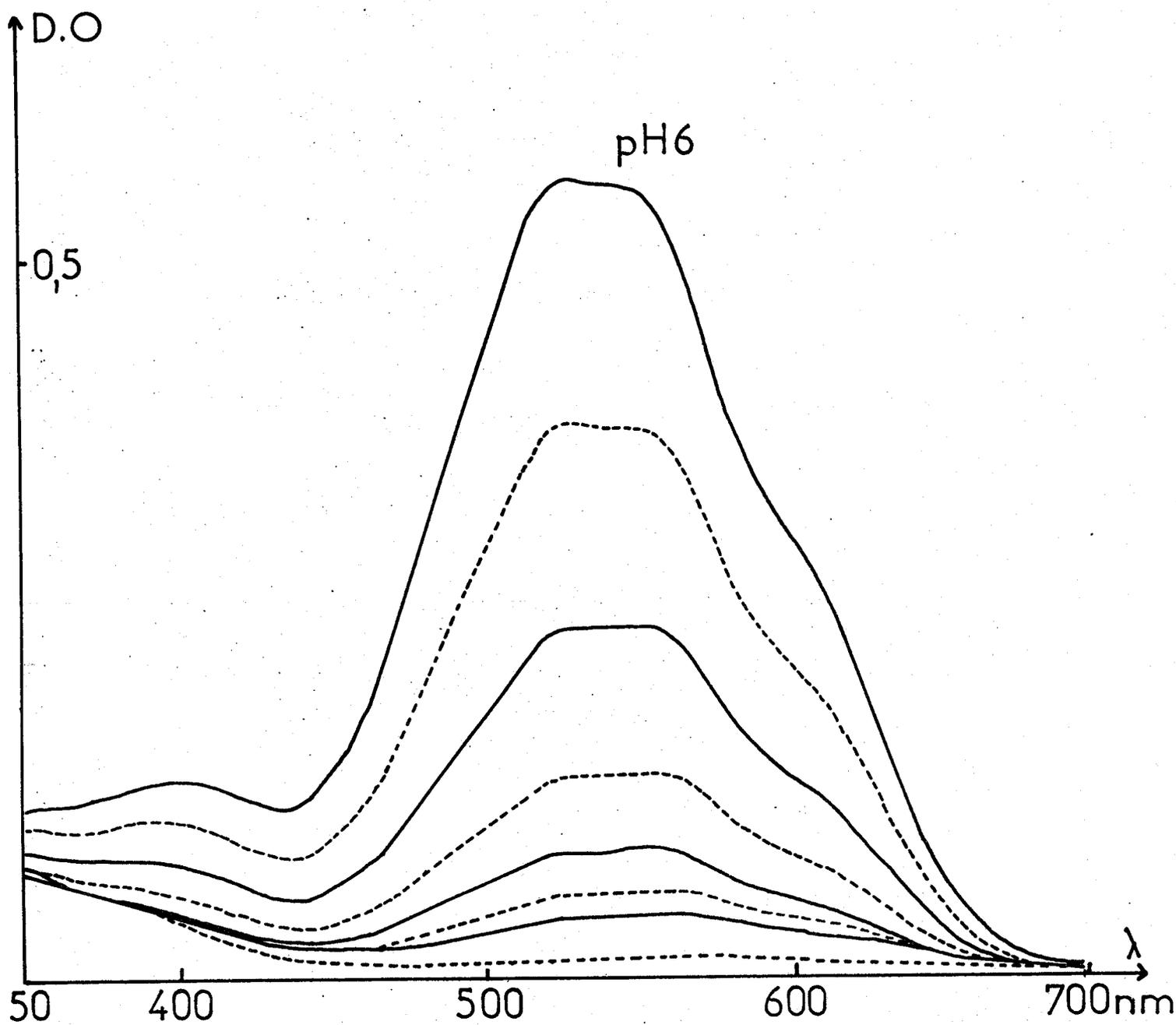


Fig:41 Spectres d'absorption de la diglucoside-3,5 malvidine à pH6 en fonction du temps.
 Temps d'enregistrement d'un spectre: 3mn
 Temps d'enregistrement total: 95 mn



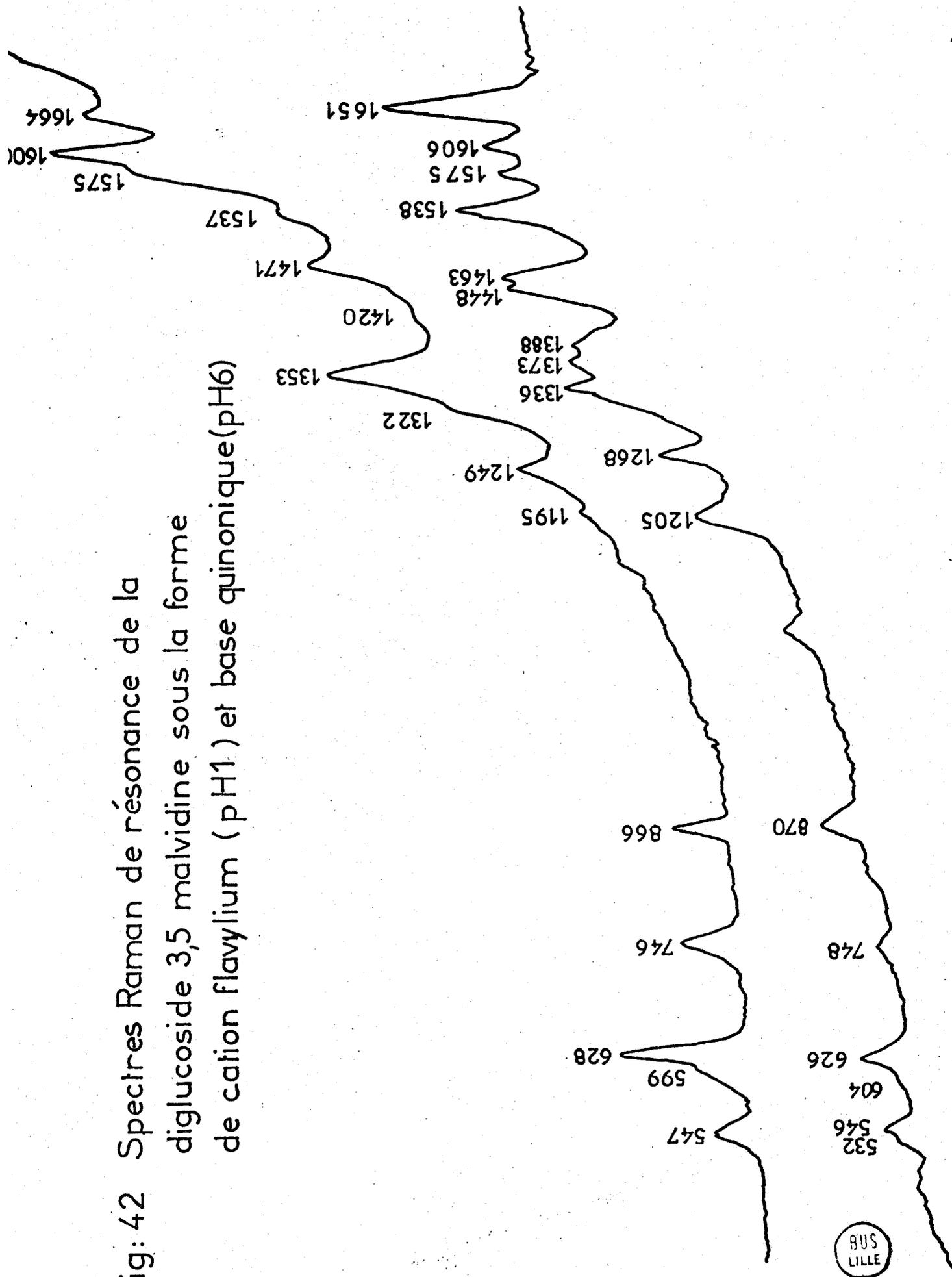
- Spectres Raman de résonance :

Comme pour l'absorption U.V.-visible, les spectres ont été enregistrés immédiatement après dissolution de la malvine en poudre dans une solution du pH désiré. L'utilisation du dispositif de balayage rapide équipant le spectromètre Ramanor HG.2 permet l'enregistrement du spectre dans les quelques secondes qui suivent la mise en solution.

Le spectre Raman de résonance du cation flavylum se conserve jusqu'à environ pH.4 avec cependant une diminution notable de l'intensité des raies, due à l'augmentation de la concentration des formes chalcones et carbinol. Ces espèces n'absorbent pas dans le visible, elles ne contribuent pas au spectre de diffusion observé.

Au dessus du pH.4, on observe une modification du spectre Raman. Cette modification se poursuit jusqu'à pH.6 ; pH pour lequel la base quinonique prédomine pour donner la couleur bleue. Le spectre Raman de résonance obtenu à partir de la solution neutre est très différent de celui du cation flavylum (Fig. 42), principalement dans le domaine spectral 1200-1700 cm^{-1} . Par analogie aux spectres des composés paraquinoniques (48) nous pouvons attribuer les raies 1651 cm^{-1} et 1606 cm^{-1} respectivement aux élongations des doubles et des simples liaisons présentes dans la structure quinonique. L'élongation C=O doit vraisemblablement être comprise dans le mode de vibration apparaissant à 1651 cm^{-1} car la délocalisation induite par cette structure doit diminuer considérablement la fréquence d'élongation C=O.

Fig: 42 Spectres Raman de résonance de la diglucoside 3,5 malvidine sous la forme de cation flavylum (pH1) et base quinonique(pH6)

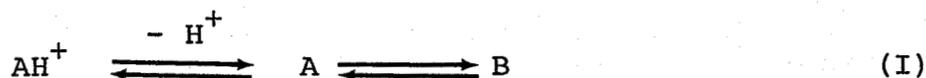


Les raies situées dans le domaine 1150-1550 cm^{-1} peuvent toujours par analogie aux composés de structure quinonique, être attribuées aux modes C-C et β CH du cycle quinonique. Une contribution des modes de vibrations des cycles à caractère aromatique peut être attendue dans ce domaine.

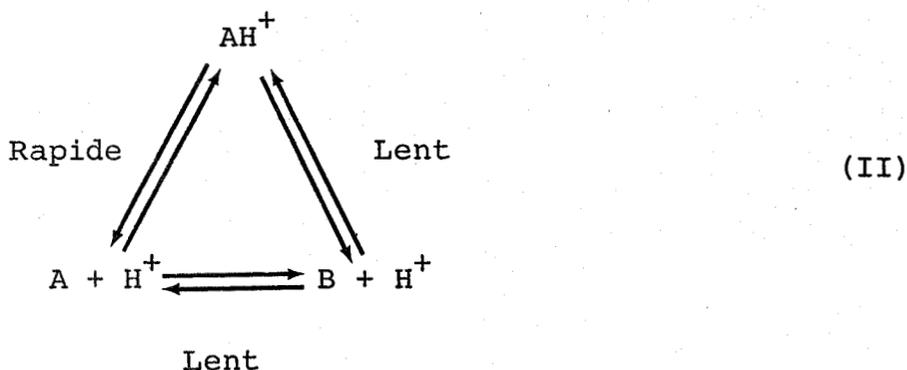
Il est intéressant de noter que pour des pH plus basiques, il semblerait qu'une forme quinonique se conserve, car nous observons des caractéristiques spectrales très proches de celles observées à pH.6. Seuls des glissements en fréquence dans les régions 1500-1660 cm^{-1} et 500-900 cm^{-1} traduisent la déprotonation du groupement hydroxyl sur le cycle benzopyrylium.

3. MECANISME DE TRANSFORMATION STRUCTURALE

Le mécanisme qui a été longtemps admis (équation I)

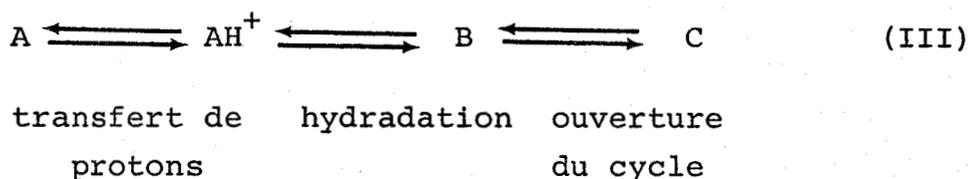


n'explique pas l'effet de la diminution du pH sur la vitesse de transfert du proton qui devient très rapide comparé à la réaction d'hydratation. Aussi, BROUILLARD et DELAPORTE ont établi un nouveau mécanisme de transformations structurales des anthocyanes en milieu acide plus complet (49) (équation II).



C'est un mécanisme triangulaire qui montre que l'équilibre entre le cation flavylum et le carbinol peut passer par deux chemins, l'un direct et l'autre par l'intermédiaire de la base anhydre A.

En considérant la réaction d'ouverture de chaîne à partir du carbinol B, les anthocyanes en milieu acide (pH 0-6) peuvent avoir quatre structures chimiques en équilibre selon l'équation III (Fig. 43).



Les proportions de ces formes à l'équilibre sont déterminées par le milieu (pH, température, etc...). Cinétiquement, les équilibres de transfert de proton et d'hydratation sont très rapides, l'équilibre de tautomérie entre les formes chalcone et carbinol est très lent (50).

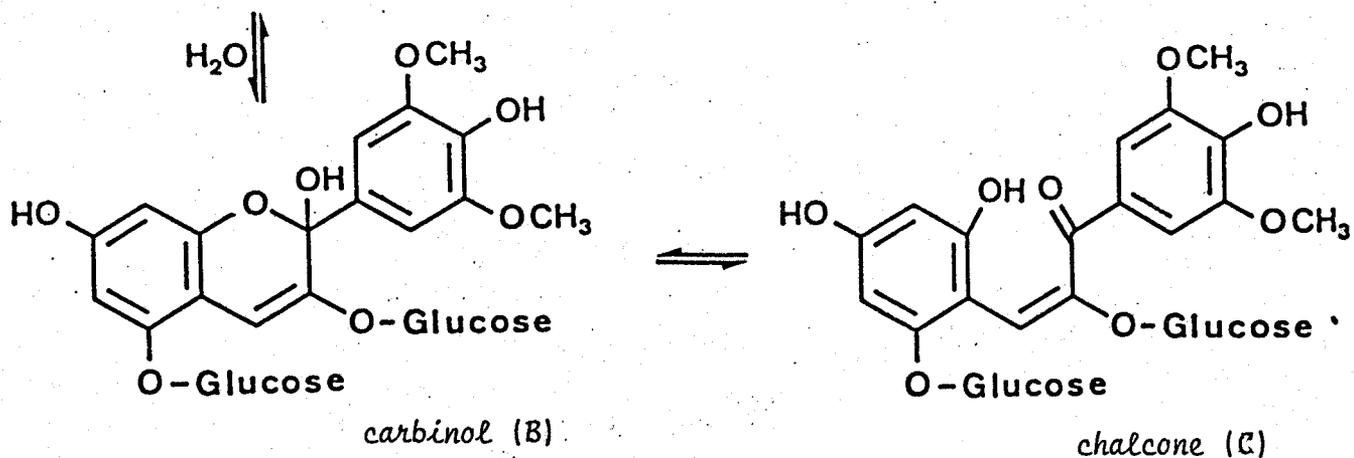
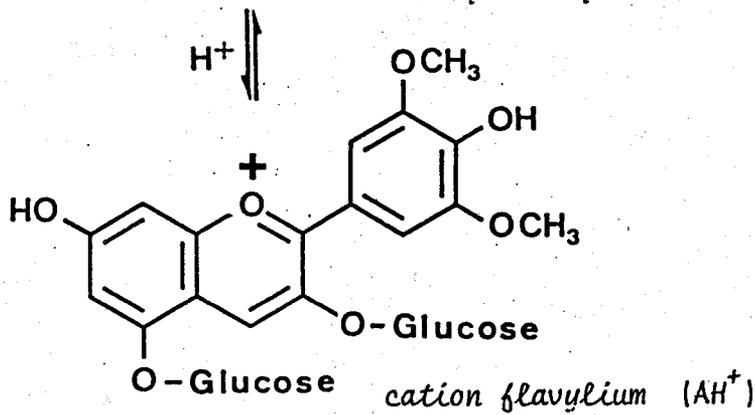
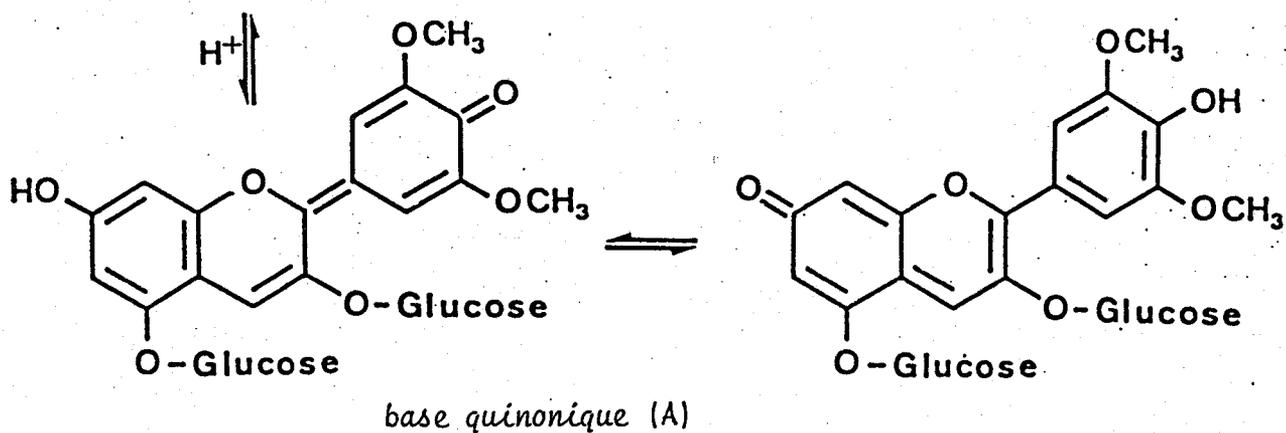
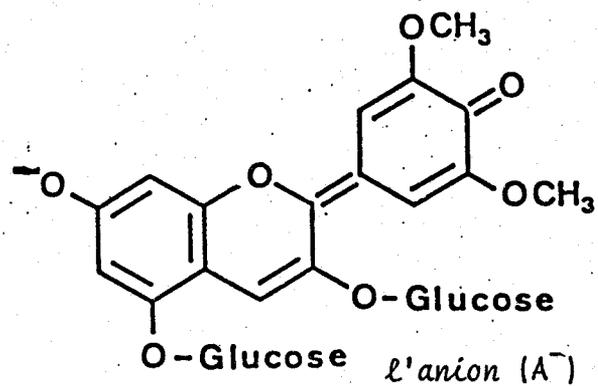


FIG.43 : TRANSFORMATION STRUCTURALE DE LA DIGLYCOSIDE -3,5 MALVIDINE EN FONCTION DU pH

4. COMPLEXATION DES ANTHOCYANES

Le spectre d'absorption visible, donc la couleur des anthocyanes dépend de plusieurs facteurs tels que la structure du pigment, le solvant, le pH et la présence d'autres substances qui peuvent former des complexes avec les anthocyanes.

L'acide ascorbique et le sulfite de sodium décolorent les solutions anthocyaniques ; ainsi par attaque nucléophile du cation flavylum, l'anion de l'acide sulfureux forme probablement un acide sulfonique-4 chromène (51), par contre des pigments flavoniques telles que la rutine et la quecétrine peuvent accentuer la coloration, à la fois par effet hyperchrome et bathochrome (52).

Les ions métalliques tels que Al^{3+} et Fe^{3+} peuvent former des complexes avec les anthocyanes possédant deux groupements hydroxyles sur le phényl latéral, la solution prend alors une couleur bleue. La nécessité d'avoir deux groupements OH, voisins pour que le complexe se développe, a suggéré la structure suivante (53)

Par addition de chlorure d'aluminium à une solution de cyanidine extraite de "*Brassica oleracea*" en milieu tamponné à pH.3 par le phtalate de potassium, nous avons obtenu une solution bleue dont le spectre Raman de résonance est présenté sur la figure 45.

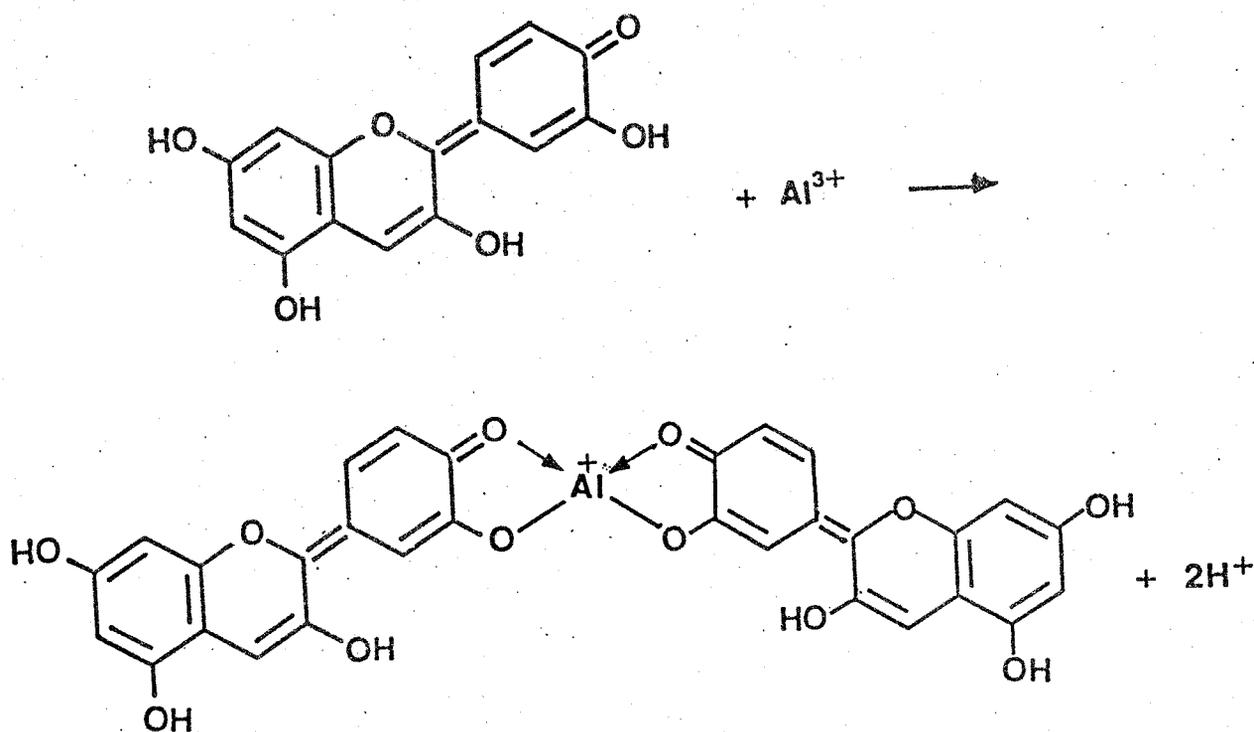
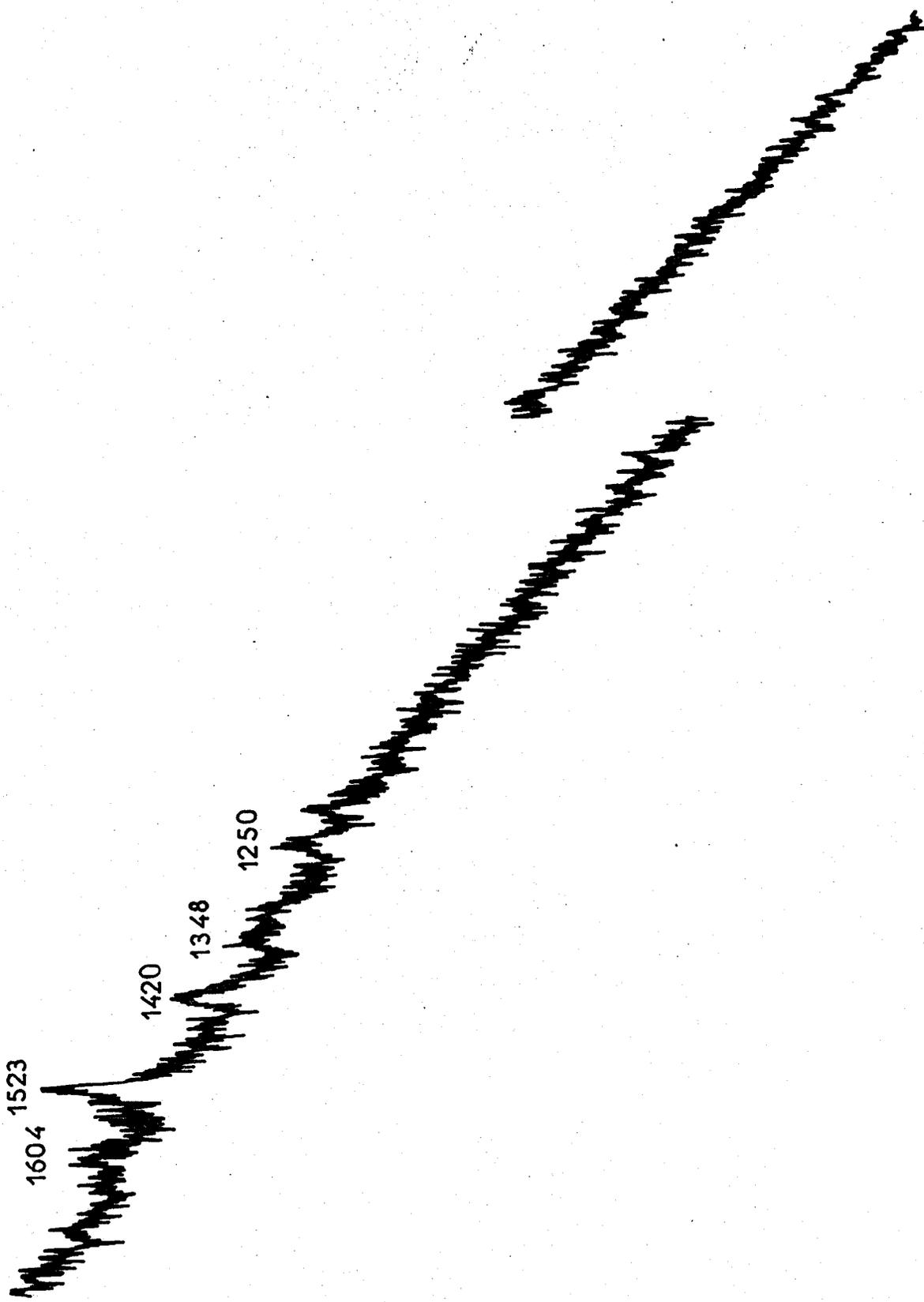


Fig. 44 : Structure du complexe de la cyanidine avec l'ion aluminium.

Bien que le spectre soit de qualité médiocre à cause de la forte fluorescence de la solution, il est possible de remarquer des différences notables avec celui de la base quinonique. La structure quinonique présente dans le complexe et donc sensiblement différente de celle observée pour la malvine à pH neutre. En effet la raie de forte intensité située vers 1650 cm^{-1} dans le spectre de la base quinonique n'est plus observée ; elle est remplacée par une raie intense vers 1510 cm^{-1} . Dans le cas du complexe, la liaison dative O-Al doit perturber considérablement la distribution électronique le long de la liaison C=O.



BUS
LILLE

Fig:45 Spectre Raman du complexe de la cyanidine du chou rouge avec le chlorure d'aluminium

Par comparaison du spectre du complexe en solution avec les spectres Raman de résonance obtenus à partir de fleurs de couleur bleue (*Delphinium* et *Iris germanica*) il est possible de dire que la couleur n'est pas provoquée par complexation des anthocyanes avec des ions métalliques, mais vraisemblablement par le pH de la solution vacuolaire qui doit être relativement proche de la neutralité. En effet, de récentes études sur des pétales de fleurs, ont montré que le pH des solutions vacuolaires peut varier entre 2,5 et 7,5 (54).

5. CONCLUSION

Cette première approche dans l'attribution des spectres Raman de résonance des anthocyanes est sans doute incomplète par manque de données de base. Une analyse plus détaillée par l'étude du comportement de chacune des bandes avec la longueur d'onde de la radiation excitatrice, avec des substitutions isotopiques sur les cycles et les groupements hydroxyles, devrait permettre de compléter cette attribution.

Nous pouvons cependant dégager certains résultats spectroscopiques intéressants :

- Le spectre Raman de résonance des anthocyanes, sous forme cation flavylum, est caractéristique du seul groupement benzopyrylium de la molécule.

- Le spectre Raman de la solution à pH neutre confirme la présence d'une structure quinonique dans laquelle le cycle A conserve son caractère aromatique.
- La complexation par les métaux perturbe fortement la structure de l'anthocyane ; si cette dernière est engagée dans le complexe sous une forme quinonique comme il est généralement admis, la double liaison C=O perd beaucoup de son caractère double.

CONCLUSION

Cette étude que nous avons réalisée permet de mieux définir les possibilités et les limites de la spectrométrie Raman de résonance appliquée à l'étude des pigments anthocyaniques. Ce genre d'étude n'ayant jamais été réalisé auparavant, il était difficile de connaître l'apport de cette technique à la connaissance de la structure de ces pigments.

L'utilisation de la spectrométrie Raman de résonance permet d'observer le spectre de vibration du pigment seul sans être gêné par les bandes attribuables aux autres composés présents dans le milieu analysé.

Les possibilités analytiques de la méthode sont évidentes ; il est possible d'obtenir des informations *in situ* sur la structure et l'état de substitution des anthocyanes présentes dans un liquide vacuolaire. Si certaines précautions sont prises pour ne pas dénaturer la cellule sondée, il est même possible de considérer que ces analyses sont réalisées *in vivo*. Ces études ont été rendues possibles grâce au développement des techniques réalisées au laboratoire dans le domaine de la résolution spatiale (microspectromètre Raman) et de la résolution temporelle (système de balayage rapide).

La comparaison des spectres obtenus *in situ* et *in vitro* permet de déterminer la structure des anthocyanes dans le végétal. C'est ainsi que nous pouvons dire que dans le raisin le cation flavylum prédomine comme dans le cas des fleurs de nuance rouge. La coloration bleue ne semble pas, dans les exemples que nous avons étudiés, être

provoquée par une complexation avec des ions métalliques, mais par un effet de pH. La stabilisation de la forme quinonique dans des milieux proches de la neutralité à l'intérieur de la vacuole est un problème auquel nous ne pouvons répondre à ce stade du travail.

Les spectres Raman de résonance des différents types d'anthocyanes étudiés au cours de ce travail sont très similaires, ce qui nous permet de penser que la contribution du groupement benzopyrylium est prépondérante dans le phénomène de diffusion. Ceci est une limite certaine à l'étude analytique de ces pigments. En effet comme les différentes variétés d'anthocyanes se distinguent les unes des autres par l'état de substitution du cycle phénolique, il semble très difficile de déterminer la nature exacte de l'anthocyane étudiée.

Par contre les différences de substitution du groupement benzopyrylium sont très visibles dans le domaine des basses fréquences des spectres Raman de résonance ; il est possible ainsi de distinguer une anthocyane monoglucosée d'une diglucosée.

La grande similitude des spectres ne nous a pas permis de proposer une attribution complète des modes de vibration des formes flavylium et quinoniques des anthocyanes. Un affinement des résultats pourrait être obtenu par des études plus approfondies, par exemple en utilisant la substitution isotopique (deutération des cycles et des groupements OH) et en réalisant l'étude des profils d'excitation, dans le domaine où la fluorescence permet d'obtenir un rapport signal sur bruit correct.

En conclusion la spectrométrie Raman de résonance semble être une méthode bien adaptée à l'étude des anthocyanes, et la poursuite de ce travail devrait permettre de reculer les limites que nous avons énoncées plus haut.

Ce travail doit être poursuivi, par l'emploi d'excitatrice dans l'ultra-violet. De même que, les possibilités d'obtention de solutions anthocyaniques pures offertes par la H.P.L.C. doivent être exploitées. Le couplage spectrométrie Raman chromatographie par excitation *in situ* des anthocyanes séparées sur plaque de chromatographie, doit être poursuivi.

ANNEXE

EFFET RAMAN DE RÉSONANCE

1. SPECTROSCOPIE DE DIFFUSION RAMAN

L'analyse spectrale de la lumière diffusée par un échantillon illuminé par une radiation monochromatique ν_0 montre que le système diffuse non seulement un rayonnement de fréquence ν_0 (diffusion Rayleigh) mais aussi un rayonnement de fréquence $\nu_0 - \nu_i$ (diffusion Raman Stokes) et un rayonnement de fréquence $\nu_0 + \nu_i$ (diffusion Raman anti-Stokes).

Les valeurs sont égales aux fréquences des modes normaux de vibrations de la molécule irradiée. Pour une molécule comportant N atomes, le nombre de modes normaux de vibrations est $3N - 6$ ($3N - 5$ pour une molécule linéaire).

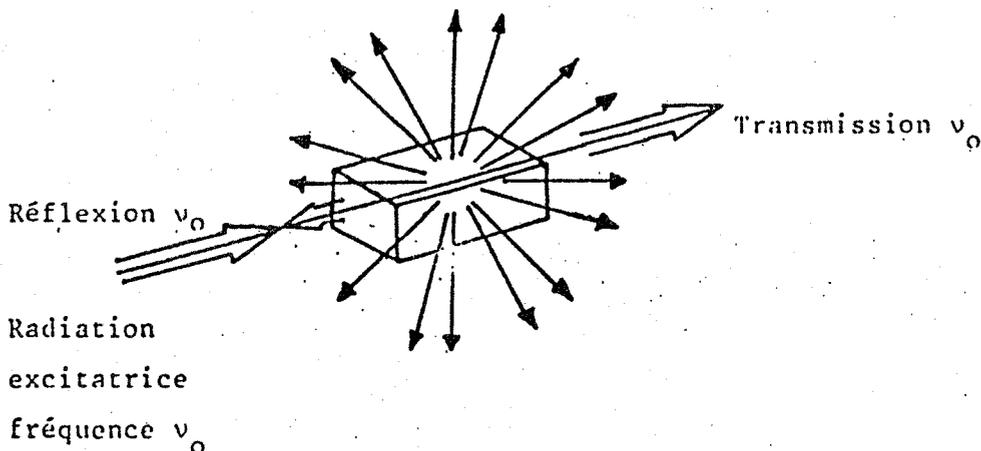


Fig. 46 : Transmission, réflexion et diffusion de la lumière par un milieu.

Les raies Raman Stokes et anti-Stokes sont symétriques par rapport à la raie Rayleigh de fréquence ν_0 .

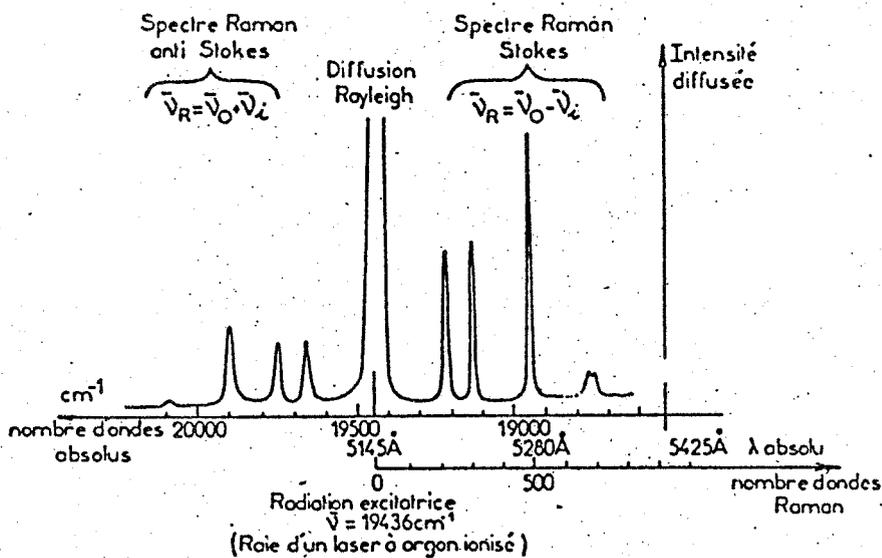


Fig. 47 : Présentation d'un spectre Raman.

2. RAMAN DE RESONANCE

L'effet Raman ordinaire est obtenu lorsque l'échantillon est illuminé dans une fenêtre de transmission. L'effet Raman de résonance est obtenu lorsque la longueur d'onde excitatrice coïncide avec une bande d'absorption du produit (Fig. 48). Ce phénomène se manifeste par une exaltation de l'intensité des raies correspondant à certaines

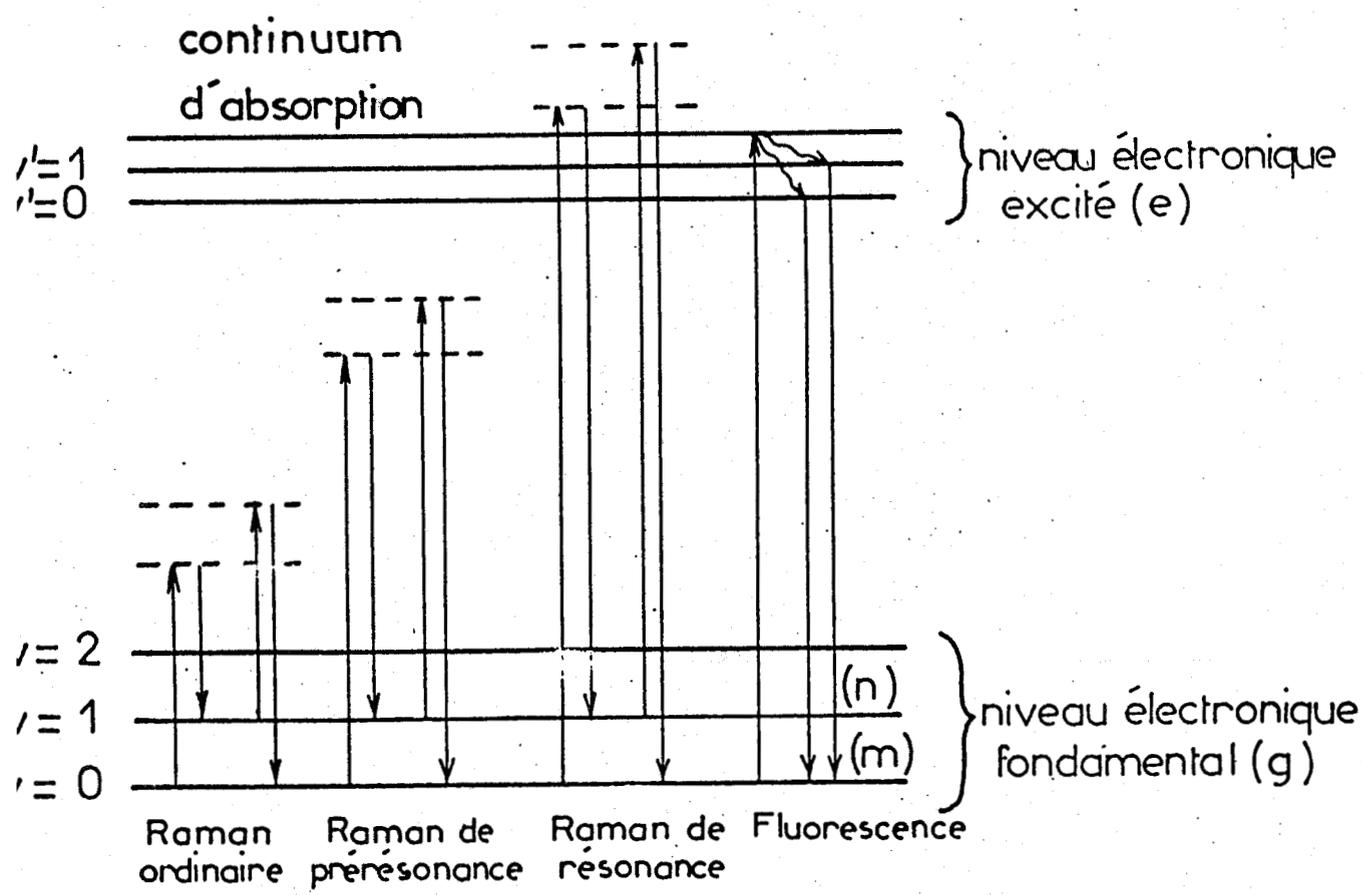


Fig: 48 Niveaux énergétiques et transitions spectrales

vibrations de la molécule. Cet effet résulte du couplage entre les transitions électroniques et vibrationnelles. Les raies exaltées sont propres à des groupes d'atomes (chromophore) dont les transitions électroniques sont responsables de la bande d'absorption mise en jeu dans cet effet.

Dans un édifice moléculaire complexe, par un choix judicieux de la longueur d'onde excitatrice, la spectroscopie Raman de résonance permet de mettre en évidence les fréquences des vibrations du chromophore indépendamment de son environnement (non absorbant à cette longueur d'onde) (55).

L'avènement de sources lasers nous offre un large domaine pour le choix de la longueur d'onde excitatrice et permet l'étude par spectrométrie Raman de résonance de molécules qui absorbent à des longueurs d'onde données, à des faibles concentrations jusqu'à 10^{-6} - 10^{-8} M (56). On peut également suivre l'apparition ou la disparition d'un intermédiaire coloré (57).

L'intensité d'une raie Raman, correspondant à une transition entre un état initial m et un état final n , suivant un angle solide 4π est donnée par la relation :

$$I_{mn} = \frac{2^7 \pi^5}{3^2 C^4} I_0 (\nu_0 - \nu_{mn})^4 \sum_{ij} |(\alpha_{ij})_{mn}|^2 \quad (I)$$

Dans laquelle I_0 est l'intensité de la radiation incidente de fréquence ν_0 , ν_{mn} est la fréquence d'une raie Raman de la molécule diffusante, α_{ij} est le $ij^{\text{ème}}$ élément du tenseur de diffusion $(\alpha_{ij})_{mn}$ qui relie le champ électrique à l'élément de matrice du moment de transition induit P_{mn} .

$$P_{mn} = \int \psi_n^* P \psi_m d\tau \quad (II)$$

ψ_m et ψ_n sont des fonctions d'onde dépendantes du temps et des états m et n .

L'intensité Raman diffusée dépend des propriétés du tenseur de polarisabilité. A partir de l'équation de KRAMERS-HEISENBERG DIRAC, PLACZEK (58) a établi l'expression du tenseur de polarisabilité

$$(\alpha_{ij}) = \frac{1}{h} \sum_e \frac{(M_j)_me (M_i)_en}{\nu_e - \nu_0 - \nu_m + i\delta_e} + \frac{(M_i)_me (M_j)_en}{\nu_e - \nu_n + \nu_0 + i\delta_e} \quad (III)$$

Les quantités $(M_j)_me$ et $(M_i)_en$ sont les moments de transition de l'opérateur moment électrique dipolaire suivant les directions j et i de l'état m vers l'état e et de l'état e vers l'état n . ν_0 est la fréquence de la radiation incidente.

ν_m et ν_n sont les fréquences propres des états initial m et final n . δ_e est la fréquence de l'état électronique excité. δ_e est une constante d'amortissement qui tient compte de la durée de vie finie et de la largeur spectrale de l'état intermédiaire qui est dû soit aux transitions radiatives spontanées d'un état vers d'autres états, soit aux radiations non radiatives.

$$\delta_e = \frac{1}{4\pi\tau_e}$$

τ_e est la durée de vie de la molécule dans l'état intermédiaire.

Si la fréquence de la radiation excitatrice ν_0 se rapproche de l'une des fréquences propres $\nu_e - \nu_m$, le premier terme de α_{ij} et par

conséquent Imn peut augmenter fortement sans toutefois tendre vers l'infini à cause du terme d'amortissement δ_e . Ceci constitue le phénomène de résonance qui exalte sélectivement certains modes normaux de vibrations.

Le calcul des éléments $(\alpha_{ij})_{mn}$ à partir de la théorie de la polarisabilité proposée par Placzek (58) n'est valable que loin de la résonance et ne permet pas de connaître le type de vibrations intervenant dans le mécanisme de la résonance et les variations de l'intensité avec la fréquence de la radiation incidence.

3. EXPRESSION DU TENSEUR DE POLARISABILITE

3.1 - Pré-résonance :

Plusieurs théories ont été développées pour le calcul du tenseur de polarisabilité dans le cas de la pré-résonance et de la résonance. De toutes ces théories, la plus utilisée est celle d'Albrecht (59) basée sur l'approximation adiabatique de Born-Oppenheimer. Cette approximation est basée sur la séparation des fonctions d'onde vibrationnelles et électroniques. La fonction d'onde électronique est développée en série de Taylor suivant les déplacements des noyaux en utilisant le formalisme de Herzberg-Teller. Petitcolas (60) a abouti à des expressions semblables à celles d'Albrecht, en appliquant une théorie basée sur une perturbation du 3ème ordre dépendante du temps. On obtient alors l'expression de α_{ij} simplifiée (61) :

$$\alpha_{ij} = \frac{1}{h} \sum_{e,h} \frac{(M_j)_{ge} h_{ef}^{\Delta v} (M_i)_{fg}}{(v_e - v_o) (v_f - v_d)} + \frac{(M_i)_{ge} h_{ef}^{\Delta v} (M_j)_{fg}}{(v_e + v_d) (v_f + v_o)} \quad (IV)$$

dans laquelle le facteur d'amortissement a été supprimé, la sommation a été faite sur tous les états excités e et f pris deux à deux. Cependant on ne tient compte en général que des deux premiers états excités, leur contribution étant considérée de loin comme la plus importante dans le tenseur de diffusion.

$(M_j)_{ge}$ et $(M_i)_{fg}$ sont les moments de transition de l'opérateur moment dipolaire électronique (62) suivant les directions j et i, de g à e et de f à g respectivement, avec g l'état électronique fondamental, v_e et v_f les fréquences de transition électronique de e à f ; $h_{ef}^{\Delta v}$ est l'élément de matrice du couplage vibronique liant les états e et f par l'intermédiaire de la vibration de fréquence $\Delta v = v_o - v_d$. (avec v_o et v_d , les fréquences des photons incidents et diffusés).

Dans cette équation, quelques termes, dont la contribution est moins importante, ont été omis de l'équation complète (60), ce qui limite sa validité à l'effet Raman de pré-résonance.

Deux modes de diffusion Raman de résonance sont importants et correspondent dans l'équation (III) aux conditions définies par Albrecht et Hutley (63) ; e = f terme A ; e ≠ f terme B.

3.1.1. Résonance de type A :

Lorsque les deux états e et f sont confondus, α_{ij} devient égal au terme A qui fait intervenir l'interaction vibrationnelle avec un seul état électronique excité, par l'intermédiaire des intégrales

de recouvrement de Frank-Condon. Ces intégrales sont nulles à la fois pour les états initial et final de la molécule uniquement lorsque les vibrations qui conduisent à une plus grande déformation de l'état électronique excité.

Dans ce cas les modes normaux qui permettent à la molécule les déformations nécessaires pour la faire passer de sa géométrie de l'état électronique fondamental à celle de l'état électronique excité seront fortement exaltés.

Pour une résonance de type A, l'intensité diffusée sera proportionnelle à F_A^2 .

$$I = F_A^2 = (v_o - v_{mn})^2 \frac{v_e^2 + v_o^2}{(v_e^2 - v_o^2)^2} \quad (V)$$

Shorygin (64) dans la théorie semi-classique arrive à une expression du même type, pour les modes de vibrations totalement symétriques, dans le cas de la pré-résonance.

3.1.2. Résonance de type B :

Ce phénomène d'exaltation correspond à la condition $e \neq f$, le tenseur (α_{ij}) est égal au terme B, il met en jeu le couplage vibronique entre les deux états électroniques excités e et f de la molécule.

Les vibrations exaltées dans ce phénomène peuvent être totalement symétriques ou non à condition que leurs symétries soient contenues dans le produit direct des représentations des deux transitions électroniques couplées.

L'exaltation dépendra à la fois de la valeur de l'élément de matrice de couplage vibronique $h_{ef}^{\Delta v}$ et des moments liés à la transition électronique.

Dans ce processus, l'intensité sera proportionnelle au terme F_B^2 .

$$I \sim F_B^2 = (v_o - v_{mn})^2 \frac{v_e v_f + v_o^2}{(v_e^2 - v_o^2)(v_f^2 - v_o^2)} \quad (\text{VI})$$

En général l'exaltation liée à un processus de type B est plus faible que celle de type A.

La prépondérance des termes A ou B dans un mécanisme d'exaltation pourra être mis en évidence par l'étude des profils d'excitation.

Dans le cas où on considère non seulement les états électroniques excités mais également la perturbation de l'état électronique fondamental, il apparait d'autres termes dans le mécanisme de résonance. L'expression du tenseur de diffusion prend la forme :

$$(\alpha_{ij}) = A + B + C + D$$

A \sim terme de totale symétrie

B \sim terme de couplage vibronique

C \sim terme anti-résonant

D le terme de radiation adiabatique

En général les termes C et D sont négligeables devant A et B.

3.2. Résonance rigoureuse :

Dans le cas de la résonance rigoureuse, c'est à dire quand ν_0 est très proche de ν_e , les équations deviennent plus complexes et les simplifications précédentes ne sont plus valables.

Cependant pour une vibration totalement symétrique dans le cas d'une résonance de type A en négligeant le second terme dans l'équation, l'intensité diffusée devient proportionnelle à (65) :

$$\frac{1}{(\nu_e - \nu_0)^2 + \delta^2}$$

Cette expression très simplifiée correspond à une bande d'absorption très fine de fréquence ν_e . Des théories plus complètes ont été développées (66, 67, 68).

4. FACTEUR DE DEPOLARISATION

Dans un premier temps, une raie Raman correspondant à un mode normal de vibration est définie par sa fréquence ν_{mn} et son intensité I_{mn} . De plus, en effet Raman ordinaire, la valeur de son facteur de dépolarisation (ρ) dépend de la symétrie du mode normal de vibration. Dans l'effet Raman de résonance, la connaissance de ρ_{RR} peut apporter plus d'informations à cause de sa dépendance vis à vis de la fréquence de la radiation excitatrice.

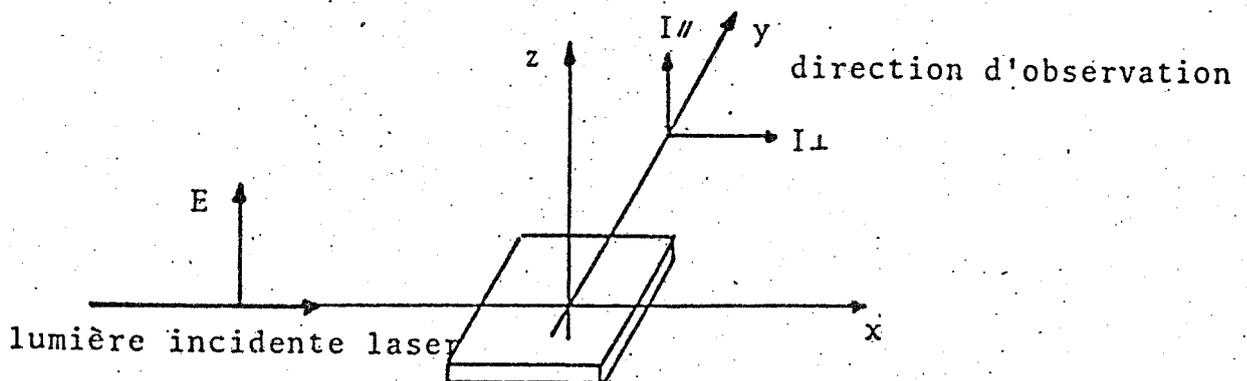
Le tenseur de polarisabilité est donné par :

$$\alpha_{ij} = \begin{pmatrix} \alpha_{xx} & \alpha_{xy} & \alpha_{xz} \\ \alpha_{yx} & \alpha_{yy} & \alpha_{yz} \\ \alpha_{zx} & \alpha_{xy} & \alpha_{zz} \end{pmatrix}$$

En diffusion Raman de résonance le facteur de dépolarisation ρ_{RR} s'exprime dans le cas d'une excitation polarisée linéairement (laser) par :

$$\rho_{RR} = \frac{I_{\perp}}{I_{\parallel}} = \frac{3\gamma_s^2 + 5\gamma_a^2}{5\bar{\alpha}^2 + 4\gamma_s^2}$$

avec I_{\parallel} et I_{\perp} définies sur le schéma suivant :



$\bar{\alpha}$, γ_s , γ_a invariants du tenseur de diffusion sont définis par :

$$\bar{\alpha} = \frac{1}{3} (\alpha_{xx} + \alpha_{yy} + \alpha_{zz}) \text{ partie isotrope}$$

$$\bar{\gamma}_s^2 = \frac{1}{2} (\alpha_{xx} - \alpha_{yy})^2 + (\alpha_{yy} - \alpha_{zz})^2 + (\alpha_{zz} - \alpha_{xx})^2 \\ + \frac{3}{4} (\alpha_{xy} + \alpha_{yx})^2 + (\alpha_{yz} + \alpha_{zy})^2 + (\alpha_{zx} + \alpha_{xz})^2$$

partie anisotrope

$$\gamma_a^2 = \frac{3}{4} (\alpha_{xy} - \alpha_{yx})^2 + (\alpha_{yz} - \alpha_{zy})^2 + (\alpha_{zx} - \alpha_{xz})^2$$

partie dipole magnétique

Lorsque le tenseur de diffusion est symétrique $\alpha_{yx} = \alpha_{xy}$
 $\alpha_{zx} = \alpha_{xz}$
 $\alpha_{yz} = \alpha_{zy}$

le terme γ_a est égal à zéro ; on retrouve alors la relation bien connue de ρ dans le cas de l'effet Raman ordinaire

$$\rho = \frac{3 \gamma_s^2}{45 \bar{\alpha}^2 + 4 \gamma_s^2}$$

avec

$$\bar{\gamma}_s^2 = \frac{1}{2} (\alpha_{xx} - \alpha_{yy})^2 + (\alpha_{yy} - \alpha_{zz})^2 + (\alpha_{zz} - \alpha_{xx})^2 \\ + 3 (\alpha_{xy}^2 + \alpha_{yz}^2 + \alpha_{zx}^2)$$

ρ pouvant prendre les valeurs $0 < \rho < 3/4$ pour un mode totalement symétrique et seulement la valeur $\frac{3}{4}$ ($\bar{\alpha} = 0$) pour un mode non totalement symétrique.

En Raman de résonance ρ_{RR} peut prendre d'autres valeurs :

- Pour des modes non totalement symétriques $\bar{\alpha} = 0$

$$\rho_{RR} = \frac{3}{4} + \frac{5}{4} \frac{\gamma_a^2}{\gamma_s^2}$$

Si $\gamma_a^2 = 0$ on obtient la polarisation "normale" avec $\rho_{RR} = \frac{3}{4}$

Si $\gamma_a^2 \neq 0$ on obtient la polarisation "anormale" avec $\rho_{RR} > \frac{3}{4}$

et la polarisation inverse avec $\rho_{RR} = \infty$ si $\gamma_s^2 = 0$ (tenseur anti-symétrique $\alpha_{ij} = -\alpha_{ji}$).

- Pour des modes totalement symétriques $\bar{\alpha} \neq 0$ et si $\gamma_a^2 = 0$

$$\rho_{RR} = \frac{3}{\frac{45 \bar{\alpha}^2}{\gamma_s^2} + 4}$$

avec $0 < \rho_{RR} < \frac{3}{4}$ lorsque $\infty > \frac{\bar{\alpha}^2}{\gamma_s^2} > 0$

En général, la théorie des groupes permettra de déterminer quels sont les invariants non nuls pour un mode normal particulier dans une molécule de symétrie donnée, donc de calculer théoriquement la valeur de ρ pour ce mode normal de vibration.

BIBLIOGRAPHIE

1. - T.W. GOODWEEN
Chemistry and biochemistry of plant pigments
2ème Edition vol.1, 225-257, 1976, ed. T.W. Goodwen
Academic Press.

2. - P. RIBEREAU GAYON
Les composés phénoliques des végétaux, 1968 Dunod

3. - J.B. HARBORNE
Chemistry and biochemistry of plant pigments
2ème Edition, vol.1, 736-774, 1974, ed. T.W. Goodwen
Academic Press.

4. - P. RIBEREAU-GAYON, et M.L. JOSIEN
Bull. Soc. Chim. France, 934, 1960.

5. - H. GRISEBACH
Biochemistry of plant phenolic 1979
Ed. T. Swain, J.B. Harborne et C.F. Van Sumere, Plenum N.Y.

6. - L. JURD
Adv. Food. Res., suppl. 3, 123, 1972.

7. - J.B. HARBORNE
Biochemistry of plant phenolic 1979

8. - M. BOURZEIX, DUPERNET, N. HEREDIA
I.A.A. n° 9-10, 1057-1064, 1975

9. - J.B. HARBORNE /
.Chromatographic Reviews, vol.1, 1959,
Ed. Lederer Elsevier, Amsterdam
. J. of chromato., 2, 581, 1959.

10. - J.B. HARBORNE
Phytochemistry, 2, 85, 1963.

11. - A. VACCARI et G. PIFFERI
Chromatographia, vol. 11, n° 4, 193-196, 1978.

12. - H. SAQUET
Doc. prep. Journ. etude prog. recents. Méthodes anal. qual.
quant. struct. polyphenols. Assemblée générale groupe.
Groupe polyphénols, 1-9 pp, 1976.

13. - MOROT-GAUDRY, NICOL, JOLIVET
J. of Chromato. 100, 206-210, 1976.

14. - G. HRAZDINA, et A.G. FRANZESE
Phytochemistry V 13, 225-229, 1974

15. - E.A.H. ROBERTS, R.A. CARTWRIGHT et D.J. WOOD
J. Sci. Foodagri., 7, 637, 1956.

16. - JARMAN et GROWDEN
Phytochemistry V.12, 171-173, 1973

17. - T.C. SOMERS

Nature 209, 368, 1966.

18. - M. WILKINSON, J.G. SWEENEY et G.A. IACOBUCCI

J. of Chromatog. 132, 349-351, 1977.

19. - J. ADAMOVIĆ et F.R. STIRMETZ

J. of Chromatog., 129, 464-465, 1976.

20. - L.W. WULF et C.W. NAGEL

. J. of Chromatog. 116, 271-279, 1976

. Am. J. Enol. Vitic., vol.29, n° 1, 42-49, 1978.

21. - N.W. PRESTON et C.F. BRIDLE

J. of Chromatog. 214, 222-228, 1981

22. - N. AKAVIA et D. STRACK

Z. Naturforsch 35 C, 16-19, 1980

23. - E.S. KEITH and J. POWERS

J. Food. Sci., 31, 71, 1966

24. - S.H. AL SHAKIR

Diss Abstr., B, 28, 2892, 1968.

25. - P. KARRER

Bull. Soc. Chim. 43, 1041, 1928

26. - L.F. BURROUGHS
Am. J. Enol. Vitic. Vol. 26, n° 1, 1975
27. - G. HRAZDINA et A. FRANZESE
Phytochemistry, vol. 13, 231-234, 1974
28. - L. JURD
Tetrahedron, 24, 4449-4457, 1968
29. - A.E. BRADFIELD et A.E. FLOOD
J. Chem. Soc. 4740, 1952
30. - J.B. HARBORNE
Phytochemistry 5, 1263, 1964
31. - S. TANCHEV
Compte-rendus de l'Académie Bulgare des Sciences
24, (10), 1337-1340, 1971.
32. - R. DEMOL
D.E.S., Lille 1974
33. - M. DELHAYE
Thèse Doct. ès Sciences, Lille 1960
34. - F. WALLART
Thèse Doct. ès Sciences, Lille 1970
35. - J.M. BENY
Thèse 3ème Cycle, Lille 1978.

36. - M. DELHAYE et P. DHAMELINCOURT
J. of Raman Spectrosc., 3, 33-34, 1975.
37. - P. DHAMELINCOURT
Thèse Doct. ès Sciences, Lille 1979.
38. - P. MORINVILLE
D.E.A. Physiologie végétale, Lille, Décembre 1979
39. - A. MITERMITE
D.E.A. Spectrochimie, Lille, Juillet 1982
40. - ROLIN
Phytochrome, photomorphogénèse et photopéridisme
Monographie et physiologie végétale, Masson et Cie, 1970
41. - PECKETT et HATHOUT BASSIM
Phytochemistry, 13, 815-821, 1974
42. - H. MOHR
Photomorphogénèses in physiology of plant growth and
development, Ed. M.B. Willins, Mc Grax-Hill, Londres 1969
43. - HUAULT
Thèse de 3ème Cycle, Rouen 1969
44. - PRATT
Photochem. Photobiol., 27, 81-105, 1978.

45. - PILL-SOON SONG et QUAE CHAE
Photochem. Photobiol., 30, 117-123, 1979
46. - G. HRAZDINA, H. MIREDALE et L.R. MATTICK
Phytochem., 16, 297, 1977
47. - E. DAVIN-PRETELLI, M. GUILIANO et col.
Helv. Chim. Acta, vol. 60, Fas.1, n° 25, 215-230, 1970
48. - J.C. MERLIN, J.L. LORRIAUX, A. DUPAIX, et E.W. THOMAS
J. of Raman Spectrosc., vol.11, n° 2, 131, 1981
49. - R. BROUILLARD et B. DELAPORTE
J. Am. Chem. Soc., 99, 8461, 1977
50. - R. BROUILLARD, B. DELAPORTE, J.M. EP HAGE CHAHINE et J.E. DUBOIS
J. Chim. Phys., 76, 273, 1979
51. - L. JURD
J. Food Sci., 29, 16, 1964
52. - S. ASEN, R.N. STEWART et K.H. NORRIS
Phytochem., 11, 1139, 1974
53. - E. BAYER, K. NETHER et H. EGETER
Chem. Ber. 93, 2871, 1960

54. - S. ASEN, R.N. STEWART et K.H. NORRIS
Phytochem., 14, 937, 1975
55. - J.C. MERLIN
Thèse Doct. ès Sciences, Lille 1979
56. - M. DELHAYE et J.C. MERLIN
Biochem., 57, 401, 1975
57. - C. BENY-BASSEZ
Thèse Docteur-Ingénieur, Lille 1978
58. - G. PLACZECH
Handbuch der Radiologie, Ed. E. Marx, 2, 209, 1934
59. - A.C. ALBRECHT
J. Chem. Phys., 34, 1476, 1961
60. - Q.W.L. PETICOLAS, L. NAFIE, P. STEIN, et J. FANCONI
J. Chem. Phys., 52, 1576, 1970
61. - D.W. COLLINS, D.B. FITCHEN et A. LEWIS
J. Chem. Phys., 59, 5714, 1973
62. - J. BEHRINGER
Raman Spectroscopy, vol.1, 169-223
H.A. Szymanski, Plenum Press, N.Y., 1967

63. - A.C. ALBRECHT et M.C. HUTELY
J. Chem. Phys., 55, 4438, 1971
64. - P.P. SHORYGIN
Russ. J. Phys. Chem., 40, 367, 1971
65. - R.S.L. CHAO et E.L. LIPPINCOTT
Applied Spectroscopy, 30, 270, 1976
66. - M. MINGARDI et W. SIEBRAND
J. Chem. Phys., 62, 1074, 1975
67. - VAN LABEKE
Thèse Doct. ès Sciences, Reims 1975
68. - B.B. JOHNSON et W.L. PETICOLAS
Ann. Rev. Phys. Chem., 27, 645, 1976

