

## Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre forestier

<sup>1</sup> *Nathalie Boizot, Jean-Paul Charpentier*

**Résumé :** *Parmi les méthodes de quantification des composés phénoliques, nous utilisons dans notre laboratoire préférentiellement un protocole utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu. Il s'agit d'une méthode analytique biochimique nécessitant la prise d'échantillons, l'extraction des composés phénoliques à partir de ces échantillons puis d'une mesure spectrophotométrique des extraits. Nous l'avons adaptée pour traiter beaucoup d'échantillons et avec peu de matière végétale à extraire. Tous les organes de l'arbre peuvent être étudiés de la feuille jusqu'aux racines en passant par le bois.*

**Mots clés :** extraction, polyphénols, réactif de Folin-Ciocalteu, spectrophotométrie

### Introduction

Les composés phénoliques ou polyphénols sont des métabolites secondaires caractérisés par la présence d'un cycle aromatique portant des groupements hydroxyles libres ou engagés avec un glucide. Ils sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs (racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines et bois) et sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques comme la croissance cellulaire, la rhizogenèse, la germination des graines ou la maturation des fruits. Les plus représentés sont les anthocyanes, les flavonoïdes et les tannins.

Le dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu a été décrit dès 1965 (Singleton et Rossi). Depuis, son utilisation s'est largement répandue pour caractériser les extraits végétaux d'origines les plus diverses. Dans notre laboratoire, nous utilisons ce dosage en routine après l'avoir adapté, afin qu'il réponde à deux objectifs : traiter un nombre important d'échantillons et ce à partir de très peu de matière végétale, être transposable à tout type de tissu de l'arbre (bois, feuilles, racines...).

### 1. Dosage des polyphénols totaux par le réactif de Folin-Ciocalteu

**1.1 Matériel végétal :** Les tissus végétaux sont congelés dans l'azote liquide au moment du prélèvement puis lyophilisés. Ils sont ensuite réduits en fine poudre grâce à un broyeur à billes de type Danguomeau (taille des particules environ 40µm), la finesse de la poudre conditionnant la qualité de l'extraction ultérieure.

**1.2 Extraction des composés phénoliques :** Les polyphénols sont extraits par macération de 50 mg de poudre dans 2 mL de solvant organique (acétone 80%), sous ultrasons pendant 45 min et à 4°C pour empêcher l'action de polyphénoloxydases qui dégraderaient les composés phénoliques. Après centrifugation, le surnageant contenant les polyphénols est récupéré. On procède à une deuxième extraction identique sur le culot pour extraire 30% de polyphénols supplémentaires et donc d'obtenir un dosage plus exhaustif. Les surnageants sont réunis avant d'être concentrés à sec sous vide.

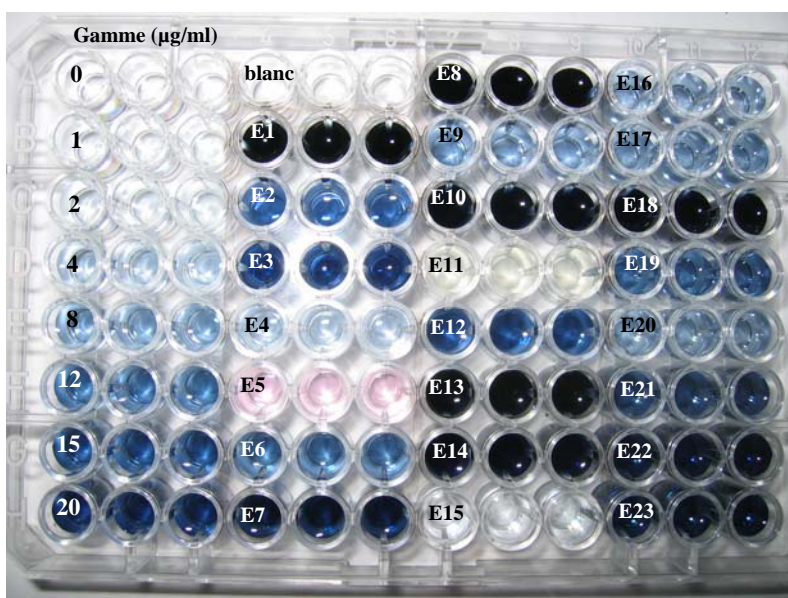
---

<sup>1</sup> INRA - Amélioration, Génétique et Physiologie Forestières, Laboratoire d'Analyses Biochimiques, BP 20619 Ardon - 45166 Olivet Cedex ☎ 02 38 41 78 64 [noel@orleans.inra.fr](mailto:noel@orleans.inra.fr) ; [charpentier@orleans.inra.fr](mailto:charpentier@orleans.inra.fr)

### 1.3 Dosage des polyphénols utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu

**1.3.1 Principe :** Le réactif est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et d'acide phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ). Il est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration produite, dont l'absorption maximum est comprise entre 725 et 750 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux.

**1.3.2 Mise en œuvre du dosage :** L'extrait sec est dilué dans de l'eau pour obtenir une absorbance finale comprise entre 0,5 et 1. On réalise une gamme étalon en milieu aqueux (8 points de concentrations de 0 à  $20\mu g.mL^{-1}$ ) avec un polyphénol témoin, en général de l'acide gallique. Pour réaliser le dosage,  $500\mu L$  de réactif de Folin-Ciocalteu (Sigma, dilué 10 fois dans de l'eau ultra pure) sont ajoutés à  $100\mu L$  d'extrait dilué ou de point de gamme. On ajoute ensuite  $400\mu L$  de  $Na_2CO_3$  ( $75g.L^{-1}$ ). Le blanc de la réaction ne contenant pas de polyphénol est réalisé comme le point  $0\mu g.mL^{-1}$  de la gamme. Les mélanges réactionnels, correspondant à chaque point de gamme et échantillon, sont agités et incubés 5 min à  $40^\circ C$ .  $250\mu l$ , sont distribués en triplicata sur une microplaque 96 puits (**photo 1**). La lecture de l'absorbance à 735 nm se fait grâce à un spectrophotomètre à microplaque *Multiskan Spectrum* (ThermoLifeSciences) dont le logiciel, par le biais de la gamme étalon, calcule la concentration moyenne des polyphénols présents dans les extraits végétaux en  $\mu g$  équivalent acide gallique. $mL^{-1}$  par exemple si l'on choisit l'acide gallique comme témoin. Nous exportons ces résultats sous Excel pour les convertir en quantité (mg) d'équivalent acide gallique par g de matière sèche (MS) extraite. L'utilisation des microplaques nous permet de quantifier en quelques minutes les polyphénols de 23 échantillons. On peut également utiliser des microplaques à barrettes modulaires de 8 puits (*Nunc*), ce qui permet d'utiliser une seule gamme pour lire successivement plusieurs microplaques.



**Photo 1 :** Exemple de microplaque comportant une gamme d'acide gallique ( $\mu g.mL^{-1}$ ) et 23 extraits de bois provenant de diverses essences

**1.3.3 Critique de la méthode :** Si l'extrait sec est faiblement soluble dans l'eau, on peut le diluer dans du méthanol. Il y a alors formation d'un précipité blanc au cours de la réaction qui doit être éliminé par centrifugation avant de remplir les microplaques. Cela n'affecte en rien les résultats obtenus ni leur reproductibilité (Scalbert *et al.* 1989).

Si le dosage de Folin-Ciocalteu est simple à mettre en œuvre et très sensible, il n'est cependant pas spécifique des polyphénols ; il réagit avec les acides aminés tyrosine et tryptophane des protéines, les sucres réducteurs comme le glucose et le fructose, l'acide ascorbique, l'acide tartrique et les sulfites. Nous utilisons un solvant acétonique plutôt que le

méthanol ou l'éthanol pour extraire les polyphénols, car il a l'avantage de précipiter les protéines et d'extraire faiblement les sucres. Néanmoins, il convient d'évaluer au préalable pour chaque type de tissu la quantité de composés non phénoliques pouvant interférer avec le réactif de Folin. Pour cela, on réalise un dosage différentiel avant et après passage de l'extrait sur une cartouche contenant 250 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP), sur lequel vont s'adsorber spécifiquement les polyphénols. Nous nous affranchissons d'un tel dosage si la teneur en composés non phénoliques des extraits est inférieure à 1%.

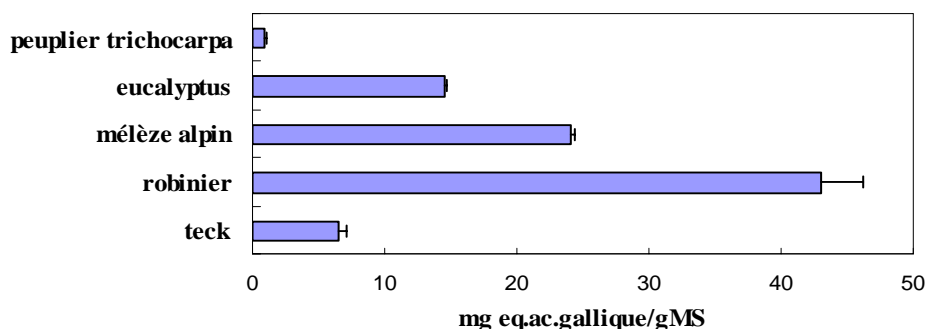
Dans des publications, les dosages indiqués sont réalisés avec une gamme d'acide gallique qui est un composé de coût peu élevé et qui se solubilise facilement dans l'eau. De plus, la gamme une fois préparée se conserve environ 1 mois à 4°C. Il est préférable de choisir le polyphénol témoin en fonction de la composition de l'extrait à analyser (acide gallique pour le bois de chêne riche en tannins hydrolysables, taxifoline pour le bois et les aiguilles de mélèze dont elle est le flavonoïde majoritaire...), car l'intensité de la réaction varie en fonction du nombre de groupements hydroxyles (-OH) portés par les noyaux benzéniques des molécules.

**1.3.4 Hygiène et sécurité :** Nous avons évalué le risque chimique lié à la mise en œuvre de notre protocole de dosage par le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode OHB. La fiche toxicologique fournie par Sigma (version 1.4 du 8 Février 2006 selon 91/155/CEE) indique que le réactif est un mélange de 5 composants entre autres de l'acide phosphorique dont l'indice OHB de 4 est le plus élevé. Le risque chimique devient acceptable à condition de réaliser toutes les manipulations sous sorbonne à parois latérales et fermeture frontale.

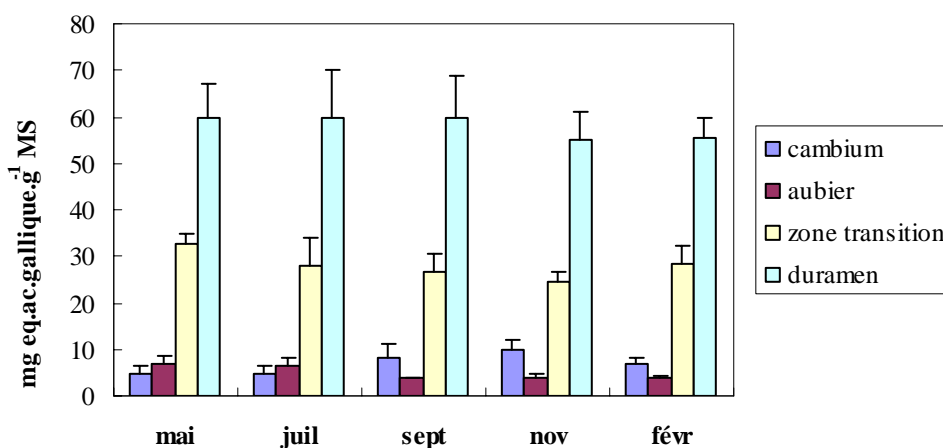
## 2. Résultats et exemples d'application

Dans le bois et plus particulièrement dans le duramen, l'accumulation de polyphénols solubles joue un rôle essentiel pour sa qualité, couleur et durabilité naturelle (résistance aux attaques de champignons et insectes pathogènes). Nous évaluons quantitativement les contenus en extractibles phénoliques dans le bois avec notre méthode et nous pouvons comparer différentes espèces entre elles (**figure 1**) ou différentes zones de bois d'une même espèce à différentes périodes (**figure 2**).

Ici, le choix du polyphénol témoin choisi pour la calibration a son importance. L'acide gallique, possédant un nombre moyen (3) de fonctions phénols est un bon compromis mais certains contenus sont forcément sous évalués par rapport à d'autres, comme chez le Teck.



**Figure 1 :** Teneur en composés phénoliques dans le duramen de différentes essences ligneuses



**Figure 2 :** Evolution de la teneur en polyphénols totaux dans différentes zones du bois de noyer noir en fonction de la période de végétation.

## Conclusion et perspectives

L'évaluation du contenu en composés phénoliques dans divers organes et tissus d'un arbre peut-être un indicateur très pertinent de changements d'états dus aux différentes conditions environnementales ou une réponse à des conditions de traitement particulier. Le contenu en composés phénoliques est aussi sous très forte influence génétique.

La méthode d'évaluation du contenu en composés phénoliques utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu est utilisée dans les laboratoires et donne des résultats fiables et reproductibles. Elle reste néanmoins une méthode analytique destructive (prise d'échantillon, réalisation d'un extrait) qui bien qu'optimisée demande la mise en œuvre de nombreuses manipulations. Nous étudions actuellement la mise en corrélation des mesures effectuées à l'aide de cette méthode utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu et les Spectres Proche Infrarouge pris sur le bois massif de différentes espèces afin d'aboutir à une méthode rapide et non destructive d'évaluation quantitative du contenu en composés phénoliques dans le bois.

## Bibliographie

- Ribéreau-Gayon P (1968) Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254 pp
- Scalbert A, Monties B, Janin G (1989) Tannins in wood: comparison of different estimation methods. *J Agric Food Chem* 37: 1324-1329
- Singleton VL, Rossi JA (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 16:144-158
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 299:152-178